



Université de Montréal

**Isolation, culture et caractérisation phénotypique  
de cellules musculaires lisses endobronchiques équines**

par  
Peltier Aude

Département des sciences cliniques  
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de maître ès science (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires option sciences cliniques

Novembre 2013

© Peltier Aude, 2013

## Résumé

Le muscle lisse endobronchique est l'un des acteurs principaux de l'asthme. La description de ces caractéristiques phénotypiques reste cependant très elliptique, notamment à cause de la difficulté inhérente à l'échantillonnage. Le cheval offre un large champ d'investigation en raison de sa taille et un modèle d'asthme pertinent en regard de la similitude entre asthme et souffle. La technique de culture et de caractérisation du muscle lisse a été mise au point à partir de muscle lisse trachéal. Ce modèle a ensuite été transposé et réalisé à partir de biopsies endobronchiques chez le cheval. Les cellules du muscle lisse ont été isolées, mises en culture puis caractérisées par immunofluorescence, cytométrie de flux et immunobuvardage. Le maintien du phénotype contractile en culture restant un défi dans l'établissement d'un modèle d'asthme réaliste.

Suite à l'isolement des cellules musculaires lisses à partir de muscle lisse trachéal équin et leur mise en culture en présence de 10% de FBS pendant 7 passages, 96.4% des cellules expriment l' $\alpha$ -smooth muscle-actine ( $\alpha$ -sm-actine), tandis que 83.8% et 77% expriment la desmine et la myosine respectivement. Les cellules musculaires lisses issues de biopsies endobronchiques expriment après 7 passages à 84% l' $\alpha$ -sm-actine, à 57% la desmine et 69% la myosine. Ces résultats ont été obtenus par immunofluorescence et immunobuvardage. Le pourcentage de cellules exprimant les protéines d'intérêt, tout comme l'intensité moyenne de fluorescence ne présentent pas de variation significative ni entre le 4<sup>ième</sup> et le 7<sup>ième</sup> passage, ni avec la caractérisation initiale, lors du premier passage.

Cette étude suggère qu'il est possible de maintenir le phénotype contractile en culture sur plastique en présence de 10% de FBS, et que les biopsies endobronchiques sont un support d'étude valable pour de futures investigations concernant le rôle du muscle lisse et ses caractéristiques.

**Mots-clés** : muscle lisse, endobronchique, biopsie, phénotype contractile, caractérisation, chevaux.

## Abstract

Endobronchial smooth muscle is one of the main stakeholder in asthma by alteration of his volume and phenotype. Sampling airway smooth muscle using endobronchial biopsies is performed in order to study pathways associated with remodeling, but currently, little is known regarding the stability of the ASM phenotypes during in vitro culture. Specifically, whether the contractile phenotype is maintained in culture and his evolution across passages is not established. Two problems could explain this lack of information: first the sampling, secondly the maintenance of contractile phenotype in culture.

We developed culture condition based on tracheal smooth muscle in the aim to ensure the upkeep of contractile phenotype. Then we developed a sampling protocol to harvest and maintain in culture ASM cells from endobronchial biopsies on a live animals. The stability of the ASM contractile phenotype was evaluated at each passage using immunofluorescence, FACS and western blot for  $\alpha$ -sm-actin, desmin and myosin contents over a 2-month period. No significant differences were observed between the first and the fourth last passage (4<sup>th</sup> to 7<sup>th</sup>). 96.4% of the tracheal smooth muscle cell expressed  $\alpha$ -sm-actin, 83.3 and 77% of cells expressed desmin and myosin respectively, at the 7<sup>th</sup> passage. Endobronchial smooth muscle expressed 84% of  $\alpha$ -sm-actin, 57% of desmin and 69% of myosin, respectively.

Contractile phenotype was maintained and we determined evolution of contractile phenotype in standardize conditions that will provide a characterized support for coming research.

**Keywords** : Airway smooth muscle, biopsy, contractile phenotype, characterization, horses

## Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Remerciements.....	ix
Introduction.....	1
Recension des écrits.....	2
1 Anatomie des voies respiratoires.....	2
2 Muscle lisse.....	2
2.1 Histologie.....	2
2.2 Physiologie.....	5
3 Modifications observées chez les patients asthmatique.....	7
3.1 Au sein du muscle lisse.....	7
3.2 Modifications des tissus avoisinants.....	9
4 Phénotypes des cellules du muscle lisse.....	11
4.1 Phénotypes et expression protéiques.....	11
4.2 Protéines impliquées dans le phénotype contractile.....	13
4.3 Influence de l'environnement sur le phénotype.....	15
5 Culture cellulaire.....	17
5.1 Principes généraux.....	17
5.2 Propriétés des cellules musculaires lisses en culture.....	18
5.3 Différences exprimées <i>in vitro</i> par les cellules musculaires lisses d'individus asthmatiques.....	20
Objectifs et hypothèses.....	22
Matériel et Méthodes.....	24
1 Introduction.....	24
2 Plan expérimental et animaux.....	24
3 Isolement du muscle lisse.....	25

3.1 Obtention des muscles lisses issus de trachée.....	25
3.2 Obtention de muscles lisses issus de bronches .....	27
3.3 Obtention de muscles lisses issus de biopsies endobronchiques .....	28
3.4 Digestion enzymatique.....	30
4 Ensemencement .....	31
5 Conditions de culture .....	32
6 Fibroblastes .....	33
7 Caractérisation du phénotype.....	33
7.1 Immunofluorescence.....	33
7.2 Cytométrie de flux .....	35
7.3 Immunobuvardage .....	35
8 Statistiques .....	36
Résultats .....	37
1 Suivi des cultures .....	37
2 Trachée.....	41
2.1 Histologie.....	41
2.2 Immunofluorescence.....	41
2.3 Cytométrie de flux .....	47
3 Bronches .....	53
3.1 Histologie.....	53
3.2 Immunofluorescence.....	53
4 Biopsies endobronchiques .....	55
4.1 Histologie.....	55
4.2 Immunofluorescence.....	56
4.3 Cytométrie de flux .....	57
4.4 Immunobuvardage .....	63
5 Fibroblastes .....	64
5.1 Immunofluorescence.....	64
5.2 Cytométrie de Flux .....	64
Discussion générale .....	65
Maintien du phénotype contractile.....	65

Représentativité de P0.....	67
Pureté de la population cellulaire obtenue : réflexions.....	68
Test de déprivation avec ajout d'insuline et test de confluence.....	69
Ouvertures et possibilités futures.....	70
Conclusion .....	71
Bibliographie.....	72
Annexe I : Produits et matériels.....	x

## Liste des tableaux

<b>Tableau I : Propriétés des phénotypes contractile et synthétique</b> .....	12
<b>Tableau II : Caractéristiques des cellules obtenues</b> .....	43

## Liste des figures

<b>Figure 1 : Organisation des cellules musculaires lisses .....</b>	<b>3</b>
<b>Figure 2 : Microscopie électronique d'une coupe transverse de trachée.....</b>	<b>4</b>
<b>Figure 3: Phosphorylation de la myosine.....</b>	<b>6</b>
<b>Figure 4 : Constitution de la myosine .....</b>	<b>13</b>
<b>Figure 5 : Localisation du muscle lisse trachéal prélevé .....</b>	<b>26</b>
<b>Figure 6 : Dissection du muscle lisse trachéal .....</b>	<b>27</b>
<b>Figure 7 : Bronche et dissection du muscle lisse bronchique.....</b>	<b>27</b>
<b>Figure 8 : Obtention du muscle lisse endobronchique .....</b>	<b>28</b>
<b>Figure 9 : Prélèvement de biopsies par endoscopie .....</b>	<b>29</b>
<b>Figure 10 : Schéma et illustration de biopsies .....</b>	<b>30</b>
<b>Figure 11 : Les différents types de cellules issus de biopsies endobronchiques en culture .....</b>	<b>37</b>
<b>Figure 12 : Illustrations de pseudopodes .....</b>	<b>38</b>
<b>Figure 13 : Culture présentant une répartition homogène des cellules musculaires lisses .....</b>	<b>39</b>
<b>Figure 14 : Histologie de la dissection effectuée sur du muscle lisse trachéal comprenant une majorité de muscle lisse (rose) ainsi que du tissu conjonctif (orangé). .....</b>	<b>41</b>
<b>Figure 15 : Pourcentage d'expression de trois protéines d'intérêts dans le muscle trachéal par immunofluorescence. ....</b>	<b>42</b>
<b>Figure 16 : Viabilité et nombre de cellules obtenues en fonction de la durée de la digestion .</b>	<b>44</b>
<b>Figure 17 : Effet de la durée de la digestion sur l'expression des protéines d'intérêts .....</b>	<b>45</b>
<b>Figure 18 : Vitesse de croissance des cellules musculaires lisses en fonction de la durée de la digestion .....</b>	<b>46</b>
<b>Figure 19 : Pourcentage de cellule exprimant les protéines contractiles d'intérêts par cytométrie de flux.....</b>	<b>48</b>
<b>Figure 20 : Fluorescence moyenne exprimée par la population cellulaire de muscle lisse trachéal pour les protéines d'intérêts.....</b>	<b>49</b>
<b>Figure 21 : Photo de culture cellulaire dans différents milieux .....</b>	<b>50</b>
<b>Figure 22 : Influence du milieu de culture sur la forme cellulaire .....</b>	<b>51</b>

<b>Figure 23 : Effet de la confluence et du milieu commercial sur l'expression protéique (FACS, trachée).....</b>	<b>52</b>
<b>Figure 24 : Histologie d'une coupe transverse de bronche avant dissection .....</b>	<b>53</b>
<b>Figure 25 : Pourcentage d'expression des protéines d'intérêts dans les cellules issues de muscle bronchique par immunofluorescence.....</b>	<b>54</b>
<b>Figure 26 : Histologie d'une coupe longitudinale de biopsie après dissection.....</b>	<b>55</b>
<b>Figure 27 : Images d'immunofluorescence réalisée sur des cellules musculaires lisses issues de biopsies endobronchiques.....</b>	<b>56</b>
<b>Figure 28 : Pourcentage d'expression des protéines d'intérêts obtenu par immunofluorescence .....</b>	<b>57</b>
<b>Figure 29 : Cytométrie de flux : fibroblastes et muscle lisse.....</b>	<b>58</b>
<b>Figure 30 : Pourcentage de cellules exprimant les protéines d'intérêts par cytométrie de flux à partir de biopsies endobronchiques .....</b>	<b>59</b>
<b>Figure 31 : Intensité moyenne de fluorescence exprimée par la population cellulaire issue de biopsies endobronchiques.....</b>	<b>60</b>
<b>Figure 32 : Comparaison de l'évolution de la desmine et de la myosine au cours du temps..</b>	<b>61</b>
<b>Figure 33 : Effet de la confluence sur le taux d'expression protéique à P4.....</b>	<b>62</b>
<b>Figure 34 : Mise en évidence et quantification des protéines d'intérêts par immunobuvardage .....</b>	<b>63</b>
<b>Figure 35 : Image d'immunofluorescence de fibroblastes .....</b>	<b>64</b>

## Remerciements

Je remercie toute l'équipe du laboratoire, tous ceux qui m'ont soutenue tout au long de cette maîtrise et plus particulièrement Dr Lavoie pour sa patience, la justesse de son jugement et l'enseignement prodigué.

## Introduction

L'asthme est une pathologie relativement fréquente (2 à 20%) dont la prévalence augmente et pouvant mener au décès (Subbarao, Mandhane et al. 2009). C'est également la maladie infantile chronique la plus répandue selon l'OMS. En raison de ses nombreuses répercussions, tant sur la qualité de vie que son coût à la société, l'asthme est un important sujet de recherche. Cette condition a son analogue dans le domaine équin sous le nom de "souffle", et "la pousse", ou en anglais, "Heaves", ou "Recurrent Airway Obstruction".

Chez l'humain comme chez l'animal, on observe comme signes cliniques caractéristiques une intolérance à l'effort, une diminution de la fonction respiratoire, et, lorsque sévère, des crises de détresse respiratoire déclenchées par une exposition des stimuli variés. Le traitement repose sur une combinaison de bronchodilatateurs (béta-2-agonistes ou anticholinergiques) et de glucocorticoïdes.

Chez l'humain, les facteurs déclenchant une exacerbation de la condition peuvent être, entre autres, le froid, l'exercice, un allergène extrinsèque tel l'ozone, du pollen, ou un rhinovirus (OMS). Dans le souffle équin, la cause majeure est l'exposition à des antigènes contenus dans le foin. Les chevaux représentent donc un modèle naturel d'asthme pour l'étude de certains aspects de cette pathologie humaine. Notamment, la longévité des chevaux s'apparente davantage à celle des humains qu'à celle des modèles murins. Leur taille leur confère de nombreux avantages en tant que sujet d'étude. Ils permettent également l'évaluation prospective de la maladie à divers stades du processus pathologique. Le muscle lisse en tant qu'acteur majeur de la bronchoconstriction retiendra notre attention dans ce mémoire.

# **Recension des écrits**

## **1 Anatomie des voies respiratoires**

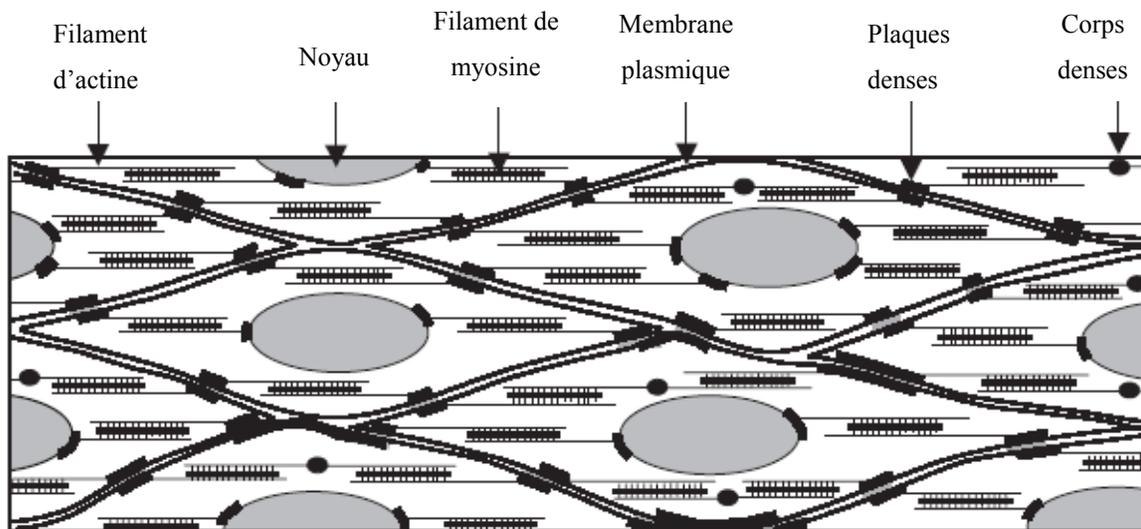
La trachée et les bronches ont un rôle de conduction tandis que les bronchioles participent en plus à la respiration dans un rapport variables selon les espèces. La trachée est une structure tubulaire fibrocartilagineuse s'étendant du cartilage cricoïde jusqu'à la bifurcation bronchique. Elle est composée d'anneaux cartilagineux incomplets en C qui se transforment progressivement en plaques cartilagineuses au fur et à mesure de la progression dans les bronches. Le muscle lisse effectue la jonction entre les deux extrémités fibro-cartilagineuses de la trachée puis va s'étendre en fines bandes de façon hélicoïdale à l'extérieur du cartilage puis de façon de plus en plus interne au fur et à mesure de la progression dans l'arbre bronchique (Martin 2004).

Le rôle principal du muscle est la bronchoconstriction dans le phénomène de la toux, le péristaltisme permettant l'évacuation des sécrétions ainsi que la régulation de l'espace mort (Widdicombe 1963).

## **2 Muscle lisse**

### **2.1 Histologie**

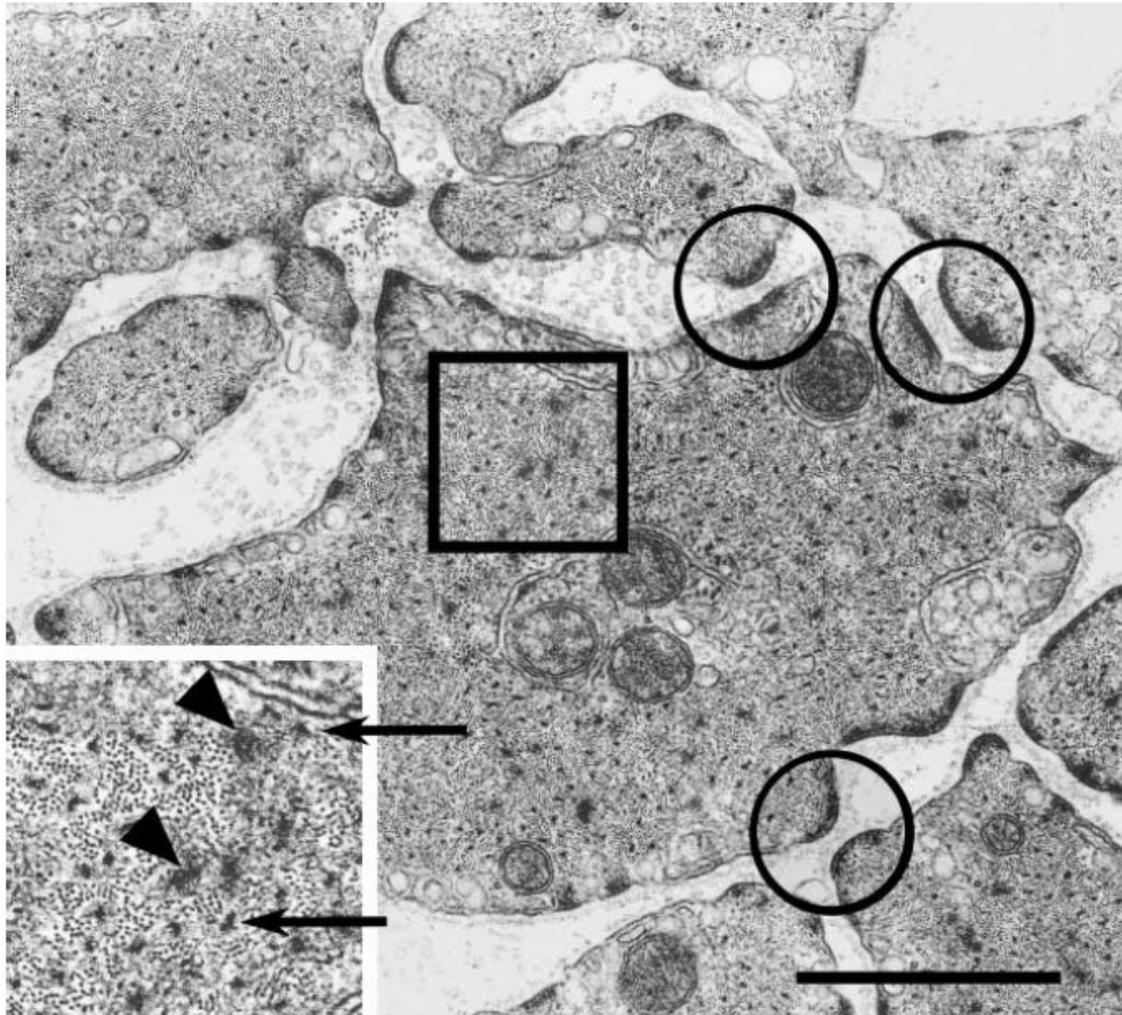
Le muscle lisse est constitué de petites cellules fusiformes d'un diamètre de +/- 5µm, d'une longueur de +/- 200 µm contre 200 à 200000 µm pour le muscle squelettique. Ces cellules sont disposées parallèlement entre elles selon leur axe longitudinale (Kuo and Seow 2004, Herrera, McParland et al. 2005). Elles sont reliées par un tissu conjonctif qui limite la capacité d'expansion radiale du muscle et donc indirectement son raccourcissement (Meiss 1999).



**Figure 1 : Organisation des cellules musculaires lisses**

(Kuo and Seow 2004)

Le muscle lisse présente une organisation irrégulière des myofibrilles, désordonnée par rapport au muscle strié (Small 1995, Small and Gimona 1998). Il ne possède pas de disque Z mais plutôt des corps denses, pouvant être considérés comme leur analogue. Les corps denses servent de point d'ancrage aux filaments d'actine et peuvent être attachés à la membrane cytoplasmique pour certains d'entre eux. Dans ce cas, ils lient mécaniquement les cellules entre elles et sont appelés plaques denses.



**Figure 2 : Microscopie électronique d'une coupe transverse de trachée**

Le cercle met en évidence des plaques denses, les flèches montrent les filaments de myosine entouré des filaments d'actine, tandis que les têtes de flèches indiquent des corps denses (Kuo and Seow 2004).

Divers types de filaments sont présents au sein de la cellule musculaire lisse. Les filaments épais de myosine (15-20 nm de diamètre) (Kuo, Herrera et al. 2003) sont moins fréquents que dans le muscle squelettique, alors que les filaments fins d'actine (6-8 nm) sont plus nombreux. Les filaments intermédiaires d'un diamètre de 10 nm, composés en majorité de vimentine forment avec les filaments d'alpha-smooth muscle-actine, la trame du cytosquelette (Morgan and Gangopadhyay 2001, Kuo, Herrera et al. 2003).

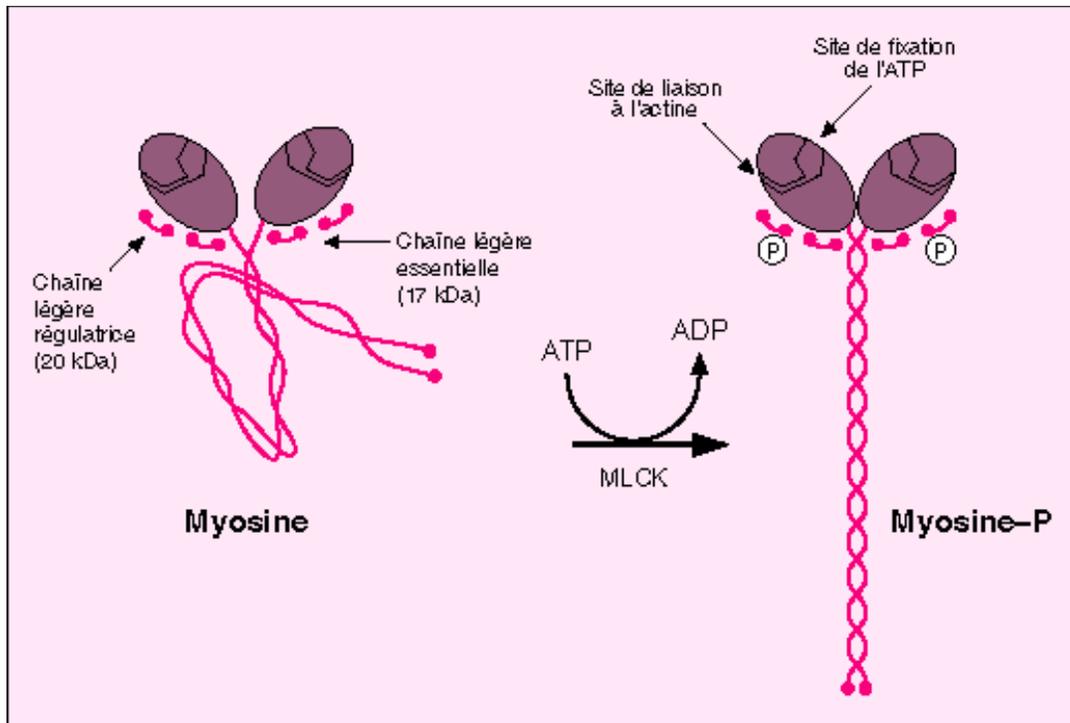
Les plaques denses sont ancrées dans la membrane cytoplasmique de chaque cellule, en regard l'une de l'autre, permettant ainsi une communication mécanique. L'espace entre ces deux plaques est occupé par des cadhérines assurant la liaison intercellulaire (Koch and Franke 1994); ensemble elles forment un desmosome. Les plaques denses et corps denses, riches en  $\alpha$ -sm-actine, sont reliés aux myofilaments ainsi qu'au cytosquelette via les filaments intermédiaires et fins. Des héli-desmosomes sont impliqués dans l'adhésion à la matrice extracellulaire. Les corps denses s'agrègent entre eux, et s'associent à des filaments intermédiaires qui les bordent, formant ainsi des câbles dans les cellules musculaires lisses (Seow and Fredberg 2011).

La longueur de ces différents filaments est non uniforme : 1.6 à 8  $\mu\text{m}$  pour les filaments de myosine et 1.35 à 4.5  $\mu\text{m}$  pour les filaments d'actine, (par conséquent les corps denses ne sont pas alignés lors d'une coupe transverse), notamment à cause de leur adaptation perpétuelle par ajout ou retrait d'unité contractile. L'unité contractile, moins bien définie qu'au sein du muscle squelettique, peut être déterminée comme l'entrevêchement entre deux corps denses des filaments d'actine et de myosine (Bond and Somlyo 1982).

## 2.2 Physiologie

La cellule musculaire lisse se contracte suite à une augmentation de la concentration cytoplasmique du  $\text{Ca}^{2+}$  résultant soit d'une modification du potentiel membranaire ou de la liaison d'un agoniste permettant la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire.

Le  $\text{Ca}^{2+}$  forme un complexe avec, entre autre, la calmoduline (4 molécules de Ca/calmoduline), induisant un changement de conformation de cette dernière, exposant ainsi deux pochettes hydrophobiques permettant sa liaison avec la Myosine Light Chain Kinase (MLCK) (Connolly, Smith et al. 2011).



**Figure 3: Phosphorylation de la myosine**

Image issue du site : <http://www.jle.com/e-docs/00/02/4A/6F/article.phtml?fichier=images.htm>

La MLCK alors activée par le complexe Ca/Calmoduline change alors de conformation, permettant l'exposition du site catalytique et donc la phosphorylation de la sérine 19 de la chaîne légère de la MLC (Means, Bagchi et al. 1991, Connolly, Smith et al. 2011). La fixation de la myosine phosphorylée sur l'actine va provoquer un changement de conformation de la myosine qui va " pivoter " et provoquer un glissement des filaments fins par rapport aux filaments épais. La force nécessaire est produite par l'activité ATPasique intrinsèque de la myosine. Ce changement de conformation va également libérer l'ADP et permettre la fixation d'un nouvel ATP.

La cellule musculaire lisse possède une extraordinaire plasticité. Elle est en remodelage constant s'adaptant ainsi sans cesse à la longueur adéquate pour son office. Les mécanismes qui interviennent dans ces changements ne sont pas encore tous élucidés. Cependant il a été déterminé que tout le cytosquelette est impliqué et subit un remodelage lorsqu'une contrainte cellulaire, qu'elle soit mécanique ou chimique, est exercée. On peut alors observer un renforcement du

cytosquelette consistant en une polymérisation rapide de l'actine, un attachement des filaments d'actine au corps denses et une augmentation de l'adhésion focale. Il en résulte une raideur du cytosquelette, une augmentation des forces de traction et une meilleure transmission des contraintes cellulaires aux cellules adjacentes ainsi qu'à la matrice extracellulaire. Le cytosquelette, ce cadre rigide, est le socle de la communication mécanique intercellulaire (Kuo and Seow 2004). Le remodelage n'est possible que si le cytosquelette possède une certaine fluidité en contrepoint, celle-ci dépend de la dépolymérisation de l'actine en réponse à un étirement par l'intermédiaire d'une perturbation de la liaison de la myosine. L'adaptation à la longueur s'effectue par ajout ou retrait d'unité contractile (Kuo, Herrera et al. 2003). Les filaments de myosine se polymérisent, et se dépolymérisent en retour lorsque les conditions sont statiques.

Les câbles de corps denses servent de support passif à la tension intrinsèque. Ils s'adaptent également aux variations de dimensions de la cellule. Ils seraient impliqués dans la rigidité cellulaire du muscle lisse observée même lors du stade relaxé (Zhang, Herrera et al. 2010). Les corps denses eux aussi ont une structure fluctuante, ainsi on observe lors d'une stimulation la mise en complexe de nombreuses protéines d'adhésions aux  $\beta$ -intégrines aux sites des corps denses. La taline, l' $\alpha$ -actinine, la  $\beta$ -actine, la calponine, la desmine entre notamment en jeu. On notera que plus la charge est importante plus la contraction maximale est longue à obtenir (Herrera, McParland et al. 2005)

### **3 Modifications observées chez les patients asthmatique**

#### **3.1 Au sein du muscle lisse**

Le collapsus des voies respiratoires est la conséquence d'une hypersensibilité (seuil de réaction abaissé à un bronchoconstricteur) ainsi que d'une hypercontractibilité du muscle lisse (augmentation de la réponse observée pour une même concentration d'un bronchoconstricteur déterminé). Ces deux phénomènes, rassemblés sous la dénomination « d'hyperréactivité bronchique », sont une caractéristique de l'asthme (Bjorck, Gustafsson et al. 1992, O'Byrne and Inman 2003) et du souffle (Leclere, Lavoie-Lamoureux et al. 2011). Différentes hypothèses ont été avancées afin d'expliquer l'obstruction respiratoire observée chez les asthmatiques : une

augmentation de la masse musculaire lisse bronchique, une diminution des forces radiales exercées sur les bronches par le parenchyme, et/ou des modifications du muscle lisse lui-même ou de son environnement.

Le muscle lisse est le premier acteur de l'obstruction des voies respiratoires. L'augmentation de la masse de muscle lisse peut, à elle seule, expliquer l'obstruction selon les modèles mathématiques (Lambert, Wiggs et al. 1993) notamment en raison de l'absence d'un plateau lors de la contraction chez les asthmatiques (Woolcock, Salome et al. 1984). L'obstruction complète par contraction n'est pas observée chez un patient sain, bien que le muscle ait la force nécessaire pour y parvenir mais il semble limité dans sa constriction par le parenchyme adjacent (Warner and Gunst 1992, Moore, Verburgt et al. 1997, Brown and Mitzner 1998, Moore, King et al. 1998). Des modifications au sein même du muscle lisse sont fortement subodorées étant donné la réponse variable du muscle lisse au bronchoconstricteur selon qu'il provienne d'un patient sain ou asthmatique (Goulet, Boulet et al. 1996, Ma, Cheng et al. 2002, Burgess, Johnson et al. 2003, Chin, Bosse et al. 2012).

Chez les patients asthmatiques, on observe une augmentation de la masse musculaire des voies respiratoires, allant de 25% à près de 300% dans les cas sévères (James 2005). L'augmentation de la masse est liée à une hyperplasie (Ebina, Takahashi et al. 1993, Benayoun, Druilhe et al. 2003, Hirst, Martin et al. 2004), ceci a également été mis en évidence chez le cheval (Herszberg, Ramos-Barbon et al. 2006, Leclere, Lavoie-Lamoureux et al. 2011), ainsi que d'une hypertrophie (Woodruff, Dolganov et al. 2004), qui serait accentuée avec la gravité de l'asthme. L'hyperplasie pourrait avoir plusieurs sources tels que : une migration des cellules méenchymateuses ou des fibroblastes et leur transformation en myocytes, une diminution de l'apoptose, ou encore une augmentation de la prolifération, malgré quelques controverses à ce sujet. L'augmentation de la masse musculaire serait indépendante de nombreux facteurs (âge, sexe, fumeurs ou non, de l'inflammation), sa corrélation avec la durée de la maladie est controversée (James, Bai et al. 2009, Kaminska, Foley et al. 2009). On notera que chez les chevaux atteints du souffle, la masse de muscle lisse atteint un plateau qui est maintenu dans un équilibre dynamique entre l'hyperplasie et l'augmentation de l'apoptose des myocytes (Herszberg, Ramos-Barbon et al. 2006, Leclere, Lavoie-Lamoureux et al. 2011).

La possibilité que les cellules musculaires bronchique dans l'asthme ne soient pas pleinement fonctionnelles a été soulevée (Bai 1990, Bjorck, Gustafsson et al. 1992). L'augmentation de force

peut être globale mais non proportionnelle à la taille de la cellule (Ma, Brown et al. 2011). De plus, le muscle lisse asthmatique présente une altération de sa réponse aux inspirations profondes. En effet chez l'individu sain, l'inspiration profonde induit une bronchodilatation protectrice ainsi que l'apparition d'une période réfractaire qui est perdue chez l'individu asthmatique (Jensen, Atileh et al. 2001, Crimi, Pellegrino et al. 2002, Connolly, Smith et al. 2011). Le mécanisme responsable de ce phénomène est inconnu pour le moment. L'interaction actine-myosine, le remodelage du cytosquelette et une augmentation de la quantité MLCK pourraient y contribuer (Slats, Janssen et al. 2008, Leguillette, Laviolette et al. 2009). Le muscle lisse asthmatique présente également une vitesse de constriction et une contraction isométrique augmentées par rapport à celui d'un patient sain (Ma, Cheng et al. 2002, Woodruff 2008). Cette vitesse musculaire accrue trouverait une partie de sa source dans un taux plus élevé de l'isoforme (+) de la SM-MHC (Leguillette, Gil et al. 2005). Une augmentation de la sensibilité au calcium est également avancée (Bergner and Sanderson 2002), entre autres hypothèses.

La progression de l'asthme s'accompagne d'une diminution de la capacité pulmonaire comme en témoigne la baisse du volume expiratoire forcé par seconde chez les asthmatiques comparé à celui d'individus sains (Lange, Parner et al. 1998). La gravité est également négativement corrélée à la quantité de fibroblaste et à la taille des cellules musculaires lisses (Benayoun, Druilhe et al. 2003). Le muscle lisse asthmatique présente une quantité augmentée de lymphocytes T et de mastocytes (Brightling, Bradding et al. 2002).

## **3.2 Modifications des tissus avoisinants**

### **3.2.1 Atteinte de l'épithélium respiratoire**

Chez les individus asthmatiques, on constate une prolifération de l'épithélium respiratoire bronchique consécutif à une croissance augmentée. Des cellules épithéliales vivantes sont également retrouvées dans la lumière des voies respiratoires, attribué à une plus grande fragilité de l'épithélium chez les asthmatiques (Trautmann, Kruger et al. 2005, Barbato, Turato et al. 2006, Siddiqui and Martin 2008). La proportion de cellules composant l'épithélium varie également, on observe une métaplasie des cellules à gobelet et une diminution du nombre de cellules ciliées (Montefort, Djukanovic et al. 1993).

### **3.2.2 Épaississement de la membrane basale**

Dans la membrane basale, des dépôts anormaux de collagènes de types I, III, V, (versus IV) et de laminine  $\alpha$ -2, ont été rapportés dans les bronches asthmatiques (Jeffery 1998, Saotome, Kanai et al. 2003). Une augmentation du nombre de fibres nerveuses, de vaisseaux sanguins, du nombre de fibroblastes et de myofibroblastes a également été constatée au pourtour de la membrane basale participant à cet épaississement (Holgate 2000). Il serait influencé par les cycles répétés d'injures et de réparation tissulaire. Une augmentation de la quantité de collagène a été positivement corrélée avec la maladie chez les chevaux atteints du souffle et ceci particulièrement dans les petites voies respiratoires (Setlakwe 2011).

### **3.2.3 Modification de la composition de la matrice extracellulaire**

La matrice extracellulaire joue le rôle de lien entre les différents tissus, et influence le processus inflammatoire, le remodelage et les altérations du muscle lisse. Elle agit comme un réservoir de médiateurs de l'inflammation et de facteurs de croissance qui peuvent être activés ou relâchés via l'action des métallo-protéinases matricielles. Leur champ d'action couvre la régulation de la migration, la prolifération, l'apoptose, l'attachement, la production de cytokine et des propriétés contractiles (Chan, Burgess et al. 2006, Salerno, Barbaro et al. 2009). La matrice extracellulaire des voies respiratoires présente une composition modifiée chez les asthmatiques (Pini, Hamid et al. 2007). Ainsi les protéoglycans suivants sont augmentés : versican, biglycan, lumican, glycoaminoglycan, hyaluronan, fibronectine, tenascine et ceci de façon plus marquée dans l'asthme modéré que sévère. Le dépôt de matrice extracellulaire s'observe surtout dans les petites voies respiratoires.

### **3.2.5 Conséquences physiologiques**

La perte de cellules ciliées combinée à l'hyperplasie des cellules à gobelet qui induit une production anormale de mucus, entraînent une diminution de l'efficacité de l'appareil muco-

ciliaire (Gerber, King et al. 2000). Combinés, ces deux facteurs contribuent également à l'obstruction de la lumière des voies respiratoires (Rogers 2004).

L'épaississement de la membrane basale décrit précédemment mène à une perte de complianse pulmonaire (Skloot, Permutt et al. 1995). Du point de vue musculaire, il est à noter qu'une augmentation de la couche musculaire est positivement corrélée avec une diminution de la réponse à la méthacholine (Niimi, Matsumoto et al. 2003). L'augmentation de la masse musculaire mène à une hypercontractibilité et à une relaxation incomplète du muscle lisse bronchique (Skloot, Permutt et al. 1995). L'asthme peut donc mener à une perte progressive de la fonction pulmonaire globale.

## 4 Phénotypes des cellules du muscle lisse

### 4.1 Phénotypes et expression protéiques

Les cellules du muscle lisse existent sous deux phénotypes, contractile ou synthétique, tout du moins lors de leur culture *in vitro*. Il est important de noter que ces états sont interchangeables dans le temps (Halayko, Salari et al. 1996) et que des profils mixtes sont sans doute communs. Comme sous-entendu par leur nom, le premier phénotype est associé à des caractéristiques permettant une contraction de la cellule, tandis que le deuxième est associé à la synthèse de matrice, de nombreux médiateurs et à une capacité de division cellulaire plus importante. De façon plus détaillée :

<b>Phénotype</b>	<b>Contractile</b> (Halayko, Salari et al. 1996; Woodruff 2008)	<b>Synthétique</b> (Chamley-Campbell, Campbell et al. 1979)
<b>Morphologie</b>	Allongée Généralement hypertrophiée	Réticulum endoplasmique très développé, de nombreux

		appareils de golgi, et ribosomes
<b>Appareil contractile</b>	Développé	Peu développé
<b>Protéines contractiles</b>	sm- $\alpha$ -actine h-caldesmon, cavéolin-1, smoothelin, sm-MHC	l-cadesmon non muscle-SMC
<b>Filaments intermédiaires</b>	Desmine	Vimentine
<b>Tableau I : Propriétés des phénotypes contractile et synthétique</b>		

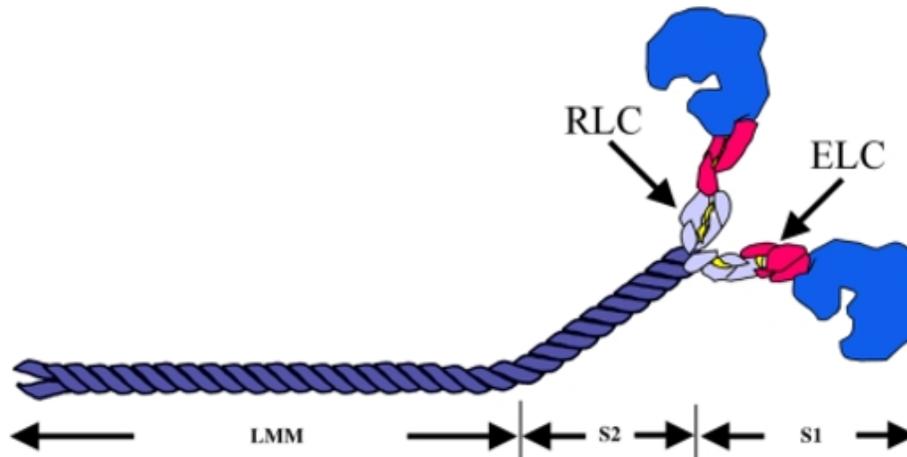
La coexistence et la proportion de chaque phénotype restent mal connues au sein du tissu *in vivo*, la différence entre les deux phénotypes étant essentiellement étudiée par comparaison de l'un à l'autre. Il est important de noter que l'étude de l'expression génique ne reflète pas nécessairement l'expression protéique en raison des nombreuses régulations post-transcriptionnelles (Zhou, Li et al. 2004). Les myofibroblastes sont un autre type cellulaire dont le phénotype est similaire à celui des cellules musculaires lisses, étant eux aussi capables de contraction et de synthèse. C'est donc naturellement qu'ils seront généralement inclus dans les considérations concernant le muscle lisse (Zhou, Wu et al. 2011).

La fonction motrice, et donc la régulation du diamètre des voies respiratoires, est échue au muscle lisse dans son phénotype contractile. Mais quel est le rôle du muscle lisse synthétique *in vivo*? Il reste mal défini et par analogie à ce qui est observé dans le muscle lisse vasculaire, il pourrait contribuer à la réparation tissulaire et à la modulation de l'inflammation via la production autocrine et paracrine de divers médiateurs mais également via une modification de la matrice extracellulaire (Hirst, Walker et al. 2000).

## 4.2 Protéines impliquées dans le phénotype contractile

### 4.2.1 Smooth-muscle Myosin Heavy Chain (sm-MHC)

Sous le terme myosine se retrouve une superfamille comprenant entre autre la myosine spécifique au muscle lisse. La myosine (**Figure 4**), au sens large, est une protéine hexamérique, composée de deux chaînes lourdes (dimère) de 2 000 acides aminés avec une tête N-terminale et une extrémité en bâtonnet C-terminal en hélice  $\alpha$ , auxquelles sont associées quatre chaînes légères : deux dites essentielles (ELC), et deux régulatrices (RLC) qui stabilisent la longue hélice près du domaine N-terminal, dans la région formant le ‘bras de levier’.



**Figure 4 : Constitution de la myosine**

RLC : Regulatory Light Chain, ELC : Essential Light Chain, LMM : Light Meromyosin ou queue de la myosine, la tête ou Heavy Meromyosine est composé de S1 (subfragment 1) et S2 (subfragment 2).

La myosine est une protéine contractile d'intérêt majeur, convertissant l'énergie chimique en énergie mécanique par hydrolyse de l'ATP. Différents isoformes de la myosine sont connus, des isoformes tissulaires entre autres (muscle squelettique, cardiaque, non musculaires), eux-même subdivisés par divers isoformes, associés pour certains d'entre eux à la vitesse de contraction. Il existe différents isoformes produits par épissage alternatif, dont pour les chaînes lourdes de myosine SM1 et SM2, tous deux subdivisibles en SM-A ou SM-B. Cette dernière induit une vitesse de contraction plus importante *in vitro* (Warshaw, Desrosiers et al. 1990, Somlyo and

Somlyo 1994, Leguillette and Lauzon 2008). La sm-MHC est jusqu'à présent supposée spécifique au muscle lisse.

Dans l'asthme, et dans le souffle, on retrouve une augmentation de l'isoforme SM-B de la chaîne lourde de la myosine (Leguillette, Laviolette et al. 2009, Boivin 2013).

#### **4.2.2 $\alpha$ -smooth muscle-actin ( $\alpha$ -sm-actine)**

L'actine appartient également à une grande famille comprenant 6 isoformes : alpha (3), bêta (2) et gamma (1). Ces isoformes sont, ou non, musculaires. L'action de cette famille est très conservée et s'effectue lors de la motilité cellulaire, dont elle est un des marqueurs largement utilisés. L'actine est une protéine globulaire (actin-G) qui peut se polymériser sous forme de filament (actin-F). L'isoforme alpha joue surtout un rôle dans la contractilité cellulaire alors que les isoformes bêta et gamma sont plutôt cytosquelettiques (Wong, Woodcock-Mitchell et al. 1998, Khaitlina 2001). Notre intérêt se portera sur l'isoforme alpha, présente dans le muscle lisse. Elle n'est pas spécifique au muscle lisse car elle est également fortement exprimée par les myofibroblastes (Wang, Zohar et al. 2006) et peut également être trouvée dans les fibroblastes (Halayko, Salari et al. 1996).

#### **4.2.3 Desmine**

La desmine est une protéine musculaire appartenant à la classe III des filaments intermédiaires. La desmine forme un réseau de filaments intra-cytoplasmiques interconnectés et en lien avec les myofibrilles. La desmine est exprimée en plus grande quantité lorsque les cellules expriment un phénotype contractile (Halayko, Salari et al. 1996, Tran, McNeill et al. 2006, Halayko, 1996 #34).

#### **4.2.4 MLCK**

La myosine light-chain kinase (MLCK) appartient à la famille des immunoglobulines. Elle permet la phosphorylation de la chaîne régulatrice de la myosine facilitant ainsi son interaction avec les filaments d'actine lors du mécanisme de contraction. Deux isoformes existent, l'un

musculaire et l'autre non-musculaire. Cette protéine est commune à toutes les cellules musculaires, bien que possédant divers isoformes (Weeds, Hall et al. 1975).

#### **4.2.5 Vimentine**

Comme la desmine, la vimentine est une protéine constitutive des filaments intermédiaires appartenant à la classe III, qui est présente dans toutes les cellules d'origine mésenchymateuse. La vimentine est fréquemment associée aux microtubules, elle contribue à la constitution du cytosquelette, à l'intégrité du cytoplasme et à la place des organites dans la cellule. Elle intervient dans les mécanismes d'attachement, de migration et de signalisation (Harvey Lodish 2004, Wang, Li et al. 2006). La vimentine est majoritairement exprimé dans les cellules présentant un phénotype synthétique.

### **4.3 Influence de l'environnement sur le phénotype**

Le phénotype qu'adoptent les cellules musculaires lisses est sous influence de nombreux facteurs. La composition de la matrice extracellulaire, les cytokines présentent dans l'environnement, ainsi que la contrainte mécanique sont parmi les principaux facteurs influençant le phénotype.

#### **4.3.1 Composition de la matrice extracellulaire**

La matrice extracellulaire a pour fonction première de fournir un support stable pour les cellules. Sa composition possède une influence importante sur les propriétés élastiques du tissu. Elle agit également comme un réservoir de médiateurs inflammatoires et de facteurs de croissance. Le phénotype du muscle lisse est donc fortement sous son influence. On peut noter entre autre que le collagène I et la fibronectine induisent un phénotype prolifératif en comparaison à la laminine qui favorise le phénotype contractile (Hirst, Twort et al. 2000). La laminine endogène, synthétisée par les cellules musculaires lisses est retrouvée au sein de la matrice et est un élément

indispensable à leur maturation (Tran, McNeill et al. 2006, Dekkers, Schaafsma et al. 2009, Dekkers, Bos et al. 2010).

#### 4.3.2 Autres facteurs influençant les phénotypes

Le phénotype contractile est favorisé :

- ⤴ En l'absence de facteur mitogène
- ⤴ En présence d'insuline (Halayko, Camoretti-Mercado et al. 1999, Schaafsma, McNeill et al. 2007, Dekkers, Schaafsma et al. 2009). La sm-MHC par exemple est augmentée d'un facteur 9 en présence d'insuline.
- ⤴ En présence de TGF- $\beta$ ; il induit une hypertrophie cellulaire accompagnée d'une accumulation de protéines contractiles et d'un raccourcissement cellulaire augmenté après une stimulation à l'acétylcholine (Goldsmith, Bentley et al. 2006). De même la présence de TGF $\beta$ 1 antagonise la diminution de prolifération liée à l'absence de sérum (Baker and Southgate 2008).
- ⤴ En l'absence de sérum, les cellules ont une vitesse de contraction plus importante que les cellules fraîchement isolées et possèdent également une force de contraction supérieure (Ma, Wang et al. 1998).

Il est défavorisé en présence de :

- ⤴ PDGF (Dekkers, Bos et al. 2011)
- ⤴ Histamine
- ⤴ Fibronectine

Une longue liste de facteurs favorise la mitose des cellules musculaires, sans pouvoir affirmer qu'ils défavorisent un phénotype : endothéline, takininine, histamine, molécules agonistes adrénergiques, FGF-2, EGF, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  (Hirst, Walker et al. 2000, Beamish, He et al. 2010). Les MT1-MMP induisent l'apparition des caractéristiques d'un phénotype contractile.

### **4.3.3 Contrainte mécanique**

Le muscle lisse dans son environnement usuel est soumis à des contraintes permanentes et en constante variation. *In vitro*, il fait preuve d'une grande capacité d'adaptation, entre autre en changeant de phénotype comme cela a été mis en évidence avec le muscle lisse vasculaire (Qu, Liu et al. 2007). Dans le muscle lisse des voies respiratoires, l'application d'une contrainte mécanique induit une augmentation de la quantité de MLCK, de sm-myosine (Smith, Moreno et al. 1997), de la contractilité du muscle lisse et de sa raideur (Maksym, Deng et al. 2005).

Les diverses applications en culture cellulaire de cette propriété seront développées dans le paragraphe correspondant.

## **5 Culture cellulaire**

La culture cellulaire peut être plus ou moins complexe et permet entre autre de se focaliser sur une propriété spécifique. Les modèles obtenus se rapprochent des conditions *in vivo* lors de coculture ou de la mise de culture en 3 dimensions. Elle permet d'investiguer les régulations et interactions entre les différents types cellulaires ainsi que la synthèse protéique. Cet environnement contrôlé présente un avantage pour étudier le comportement des divers types cellulaires impliqués dans une pathologie. L'expérimentation sur tissu vivant est alors la plus éthique possible et d'une grande disponibilité.

### **5.1 Principes généraux**

Les connaissances du comportement en culture des cellules musculaires lisses respiratoires sont peu connues par rapport à celles du muscle lisse vasculaire. Deux méthodes principales permettent l'obtention de cellules musculaires lisses: la culture à partir d'explants et la culture à partir de cellules disséminées.

Dans la méthode la plus brute d'explant, l'opérateur effectue une simple dissection puis dépose de petits fragments contenant du muscle lisse de 1x1 à 2x5 mm dans une flasque de culture et laisse

les cellules migrer avant de retirer l'explant. Une digestion enzymatique succincte à la collagénase, peut suivre la dissection, pour permettre une dissection des tissus conjonctifs avant d'utiliser comme explant les bandes de tissu musculaire lisse ainsi obtenues (Wong, Woodcock-Mitchell et al. 1998). Les cellules ayant ainsi migrées, sont trypsinées et mises en culture.

Les cellules musculaires sont le plus souvent extraites par une dissection macroscopique puis, par digestion enzymatique (collagénase, élastase et d'un inhibiteur de trypsine). Ceci est effectué à partir de dissection de trachée ou bronche ou biopsie de bronche (Panettieri 2001).

Lors de culture en deux dimensions, les cellules sont généralement ensemencées dans un milieu liquide dans une flasque à culture cellulaire à laquelle les cellules vont adhérer. Le milieu de culture le plus répandu est constitué de DMEM et Ham F-12 additionné de pénicilline, aminoglycoside et d'amphotéricine. Ce milieu est complété avec un pourcentage variable de FBS selon l'effet recherché. Le milieu est changé trois fois par semaine. Les cellules sont généralement étudiées entre le 3<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> passage (Halayko, Salari et al. 1996).

Les cultures peuvent également être effectuées sur diverses matrices. Le collagène ou la laminine sont alors les deux types les plus utilisés, bien que leurs propriétés diffèrent. Ces matrices peuvent être utilisées pour induire un effet plus physiologique, en incluant par exemple les cellules à l'intérieur du gel de collagène ou de laminine. Ces gels peuvent être utilisés pour former des feuillets, plus ou moins rigides selon leur quantité en eau, utilisables pour former des structures tubulaires. La mise en culture des cellules dans un environnement en trois dimensions influence leurs propriétés. Les interactions entre types cellulaires sont explorées au travers de modèle en coculture, les plus courantes étant épithélium-muscle lisse ou fibroblaste-muscle lisse (Nichol, Engelmayer et al. 2008, Sakamoto, Kiuchi et al. 2011).

## **5.2 Propriétés des cellules musculaires lisses en culture**

### **5.2.1 Effet de la mise en culture**

Le consensus général exprimé dans la littérature est que la culture induit une différenciation des cellules musculaires lisses vers le phénotype synthétique. Les cellules en culture se divisent

jusqu'à ce que la confluence soit atteinte, et à ce moment, le phénotype contractile tend à être exprimé de nouveau. Le phénomène au cours duquel la cellule musculaire lisse reprend des caractéristiques contractiles est dénommé « maturation ». On préférera le terme maturation à différenciation dans le sens où le tissu musculaire lisse est un tissu différencié (Chamley-Campbell, Campbell et al. 1979). Seul Halayko, Salari et al. (1996) semble avoir décrit le comportement phénotypique de cellules de muscle lisse respiratoire issues de trachée lorsque mise en culture. Wong, Woodcock-Mitchell et al. (1998) ont par ailleurs décrit des variations phénotypiques selon la confluence et la concentration en sérum.

La formation de jonctions communicantes est observée à partir du 6<sup>ème</sup> jour du premier passage (Chamley-Campbell, Campbell et al. 1979). Des différences ont été notées entre le phénotype contractile induit par privation de sérum et le phénotype contractile trouvé dans les tissus frais, l'expression de l'isotype B de la sm-MHC apparaît diminuée tandis que le taux de MLCK des cellules augmente ainsi que la contractilité; l'hypothèse de l'existence d'un phénotype hypercontractile a été avancée (Hirst, Walker et al. 2000). Les taux d' $\alpha$ -sm-actine et de myosine sont plus stables et augmentés lorsque la multiplication cellulaire est basse, que ceci soit lié à une haute densité cellulaire en raison de l'inhibition de contact ou à une privation de sérum (Wong, Woodcock-Mitchell et al. 1998). Lors de la prolifération cellulaire, l'expression de l'isoforme non musculaire de la myosine augmente tandis que l'expression de l' $\alpha$ -sm-actine, de la calponine et de la sm-MHC diminue. La sm-MHC est négativement corrélée au nombre de cellule exprimant le KI67, marqueur de la prolifération, ces deux faits renforçant l'idée que prolifération et phénotype synthétique sont intimement liés (Hirst, Twort et al. 2000).

### **5.2.2 Effet de la matrice**

Les cellules musculaires lisses reposent *in vivo* sur une membrane basale, composée principalement de collagène IV et de laminine. Celle-ci est essentielle au maintien du phénotype contractile (Beamish, He et al. 2010). La rigidité des cellules et leur contractilité est influencée par le substrat sur lequel elles se sont développées (fibronectine, laminine, collagène I IV ou V, plastique) (Hirst, Twort et al. 2000, Dekkers, Schaafsma et al. 2007, An, Kim et al. 2009).

### **5.2.3 Interaction entre les divers types cellulaires**

Différents types cellulaires sont susceptibles d'interagir avec les cellules du muscle lisse, et des effets précis ont déjà été mis en évidence pour certaines d'entre elles. Notamment, les fibroblastes favorisent l'alignement tissulaire et le remodelage du muscle lisse (Nichol, Engelmayr et al. 2008). La présence de mastocytes augmente la prolifération des cellules du muscle lisse (Ceresa, Knox et al. 2009).

### **5.2.4 Effet de la contrainte mécanique**

L'application d'une contrainte mécanique cyclique d'extension, mimant l'effet de la respiration, augmente l'alignement cellulaire, l'alignement du cytosquelette, sa réorganisation, la prolifération cellulaire, la capacité et la vitesse de contraction des cellules du muscle lisse (Smith, Garcia et al. 1997, Smith, Moreno et al. 1997, Smith, Roy et al. 1999, Matsumoto, Sasaki et al. 2007). L'application d'une contrainte est reconnue pour favoriser l'augmentation de la résistance du tissu obtenu, son élasticité et son organisation (Boccafroschi, Bosetti et al. 2012).

Guider le positionnement des cellules lors de leur croissance est un autre moyen d'exercer une contrainte. Un support en élastomère induit la synthèse de matrice extracellulaire ainsi que la formation spontanée d'une deuxième couche cellulaire qui présente une organisation semblable à celle observée dans les tissus natifs. Le feuillet présente une résistance à la déchirure deux fois supérieure à son contrôle obtenu à partir d'un support traditionnel (Guillemette, Cui et al. 2009).

## **5.3 Différences exprimées *in vitro* par les cellules musculaires lisses d'individus asthmatiques**

*In vitro*, une augmentation de la prolifération des cellules musculaires lisses provenant d'individus asthmatiques a été constatée comparée à celle de sujets sains (Johnson, Roth et al. 2001). Celle-ci a été corrélée positivement avec un défaut de la transcription du facteur C/EBP $\alpha$ , lequel inhibe la prolifération du muscle lisse (Roth, Johnson et al. 2004). Les glucocorticoïdes agissent entre autre via le complexe C/EBP $\alpha$ . Cette observation pourrait expliquer l'absence d'effet des glucocorticoïdes sur la prolifération des cellules musculaires lisses (Roth, Johnson et al. 2002).

Les cellules musculaires lisses provenant de patients asthmatiques lorsque mises en culture présentent également des quantités augmentées de phosphodiésterase 4, de nuclear factor respiratory 1, de fibronectine, de perlecan, eotaxin-1, de VEGF et de connective tissue growth factor, tandis qu'elles présentent moins de PGE<sub>2</sub>, de chondroïtine sulphate et de hyaluronane que celles d'individus normaux (Wright, Trian et al. 2012). Suite à une stimulation antigénique, les cellules asthmatiques synthétisent une quantité plus importante d'IL-5 et d'IL-13 (Jaffar, Roberts et al. 1999). Une augmentation de TGF- $\beta$  induit chez les cellules isolées de patients asthmatiques une augmentation de la production de connective tissue growth factor CTGF (Burgess, Johnson et al. 2003). Les cellules du muscle lisse provenant de patient asthmatique présentent donc de nombreux changements par rapport à leurs homologues provenant d'un patient sain.

Les cellules asthmatiques produisent également une plus grande quantité de collagène I alors que le perlecan, la laminine alpha-1 et le collagène IV sont diminués. Cette matrice extracellulaire modifiée agirait sur la vitesse de prolifération alors que les médiateurs solubles produits par les cellules asthmatiques ne peuvent d'induire une augmentation de la vitesse de prolifération (Johnson, Burgess et al. 2004). La contraction des gels de collagèneensemencés avec des cellules musculaires lisses provenant de patient asthmatique, comparée à celle obtenue à partir de cellules de patient sain est instructive : le gel de collagène présente une plus forte et rapide contraction lorsque les cellules musculaires proviennent de patient asthmatique (Matsumoto, Moir et al. 2007).

## Objectifs et hypothèses

Le souffle et l'asthme sont des pathologies invalidantes, répandues, à multiples composantes. Les connaissances concernant les cellules du muscle lisse, les actrices principales du bronchospasme, présentent des lacunes notamment en raison des difficultés rencontrées pour s'en procurer et de les maintenir en culture dans un état physiologique. Les organes viscéraux, comme les poumons, ont des fibroblastes distribués dans le muscle lisse. Une culture de ce type de tissu résulte nécessairement en un mélange de cellule musculaire lisse et de fibroblastes (Chamley-Campbell, Campbell et al. 1979).

Le muscle lisse présente un équilibre entre deux phénotypes connus comme synthétiques et contractiles ; cependant la morphologie du phénotype synthétique est reconnue pour être fortement similaire à celle des fibroblastes (Chamley-Campbell, Campbell et al. 1979, Tom-Moy, Madison et al. 1987). Afin de départager ces populations, l'utilisation de l'immunofluorescence avec des anticorps dirigé contre les protéines contractiles ont été largement utilisés. Si dans les années 90, il était admis que les fibroblastes n'exprimait pas l'alpha actine (Chamley-Campbell, Campbell et al. 1979, Avner, Delongo et al. 1981) il a été démontré depuis que cela pouvait être le cas (Goldring, Jones et al. 2002). Une population intermédiaire, les myofibroblastes, sont définis comme des fibroblastes pouvant exprimer à des niveaux variables des protéines contractiles telles l'alpha-actine, mais également la desmine et la myosine. Les myofibroblastes sont parfois définis comme des cellules musculaires lisses dédifférenciées (Avner, Delongo et al. 1981) ou au contraire une différenciation de fibroblastes (Hinz, Phan et al. 2007), qui se produiraient selon les besoins de la population et en réaction au milieu environnant pour maintenir un équilibre. L'isolation d'une population pure de muscle lisse devient donc utopique. Par conséquent l'accent doit être mis pour maintenir la population cellulaire obtenue dans l'équilibre où elle se trouve au moment de son prélèvement.

La règle générale en culture de cellule de muscle lisse est que la mitose s'effectue lorsque la cellule est en phénotype synthétique et que croissance et expression du phénotype contractile ne sont pas compatibles. En effet les observations antérieures démontrent une faible expression des protéines contractiles lors de la mise en culture. Comment maintenir cet équilibre ? Diverses

solutions ont été appliquées, la déprivation de sérum, l'ajout d'insuline, l'utilisation de co-culture, de modèle en trois dimensions ; toutes ces conditions favorisent la maturation cellulaire vers le phénotype contractile. Cependant l'étude d'une population cellulaire maintenue dans son équilibre initiale serait un apport inestimable, notamment car un changement de cet équilibre pourrait avoir un rôle crucial dans de nombreuses pathologies (Halayko and Stephens 1994). Notre étude s'applique à démontrer la possibilité d'obtenir des cellules musculaires lisses provenant de biopsies endobronchiques et à caractériser leur phénotype dans le temps lorsque mises en culture.

Le muscle lisse trachéal, aisé à obtenir, a été utilisé dans de nombreuses études. Cependant l'acteur du bronchospasme est le muscle lisse endobronchique. À rôles différents, il est à supposer des caractéristiques phénotypiques différentes. Par souci de précision, notre étude se focalise donc sur le muscle endobronchique. L'isolation de muscle lisse suffisamment pure est anticipée comme une étape cruciale dans la réalisation de ce projet.

**Los objectifs sont de :**

- Développer une technique d'isolation des cellules du muscle lisse à partir de biopsies endobronchiques de chevaux.
- Assurer un maintien du phénotype contractile des cellules musculaires lisses en culture.

**Les hypothèses liées à ces objectifs sont :**

- Les biopsies endobronchiques sont un matériel adéquat pour obtenir une culture des cellules du muscle lisse.
- Dans des conditions de culture adaptées, les cellules musculaires lisses bronchiques peuvent maintenir un phénotype contractile *in vitro*.

# Matériel et Méthodes

## 1 Introduction

Nos expériences ont été menées en deux étapes :

Dans un premier temps, nous avons étudié les cellules du muscle lisse provenant de trachée en raison de la grande disponibilité de ce tissu et de sa facilité à être disséqué des tissus environnants. Cette étape nous a permis de nous assurer de notre technique et de nos conditions de culture.

Dans un deuxième temps, nous avons réitéré nos expériences à partir de muscles lisses provenant de biopsies endobronchiques.

Une culture primaire de fibroblastes équins provenant d'une biopsie de peau a été utilisée comme contrôle négatif pour l'expression des protéines contractiles.

## 2 Plan expérimental et animaux

Afin de réaliser l'ensemble de l'expérience, 3 chevaux vivants ont été utilisés et 28 poumons ont été obtenus d'un abattoir local. Le protocole expérimental a obtenu l'approbation du comité d'éthique de l'utilisation des animaux de l'Université de Montréal.

Les poumons étaient prélevés sur des chevaux considérés sains à leur entrée à l'abattoir. Le poumon était récupéré immédiatement après l'entrée sur la chaîne d'abattage, placé sur glace et rapporté au laboratoire. Les trachées, bronches et biopsies ont été prélevées et disséquées dans les 2 heures post-mortem.

Les biopsies endobronchiques ont été obtenues à l'aide d'une pince (Pince à biopsie à usage unique Endojaw, #FB-243U, Olympus) insérée dans le canal d'un vidéoendoscope flexible (#CF-H180AL, Olympus). Les chevaux étaient tranquilisés (Xylazine 0.1mg/kg (Rompun, Bayer), Butorphanol 0.01mg/kg (Torbugésic Wyeth) et une instillation de Lidocaïne 0,5% (Lurocaine, Vétoquinol) dans les voies respiratoires était réalisée. Une dizaine de biopsies a été prélevée par

cheval en partant de la portion la plus distale du poumon où il était possible de se rendre avec l'endoscope. La procédure était très bien tolérée par les chevaux.

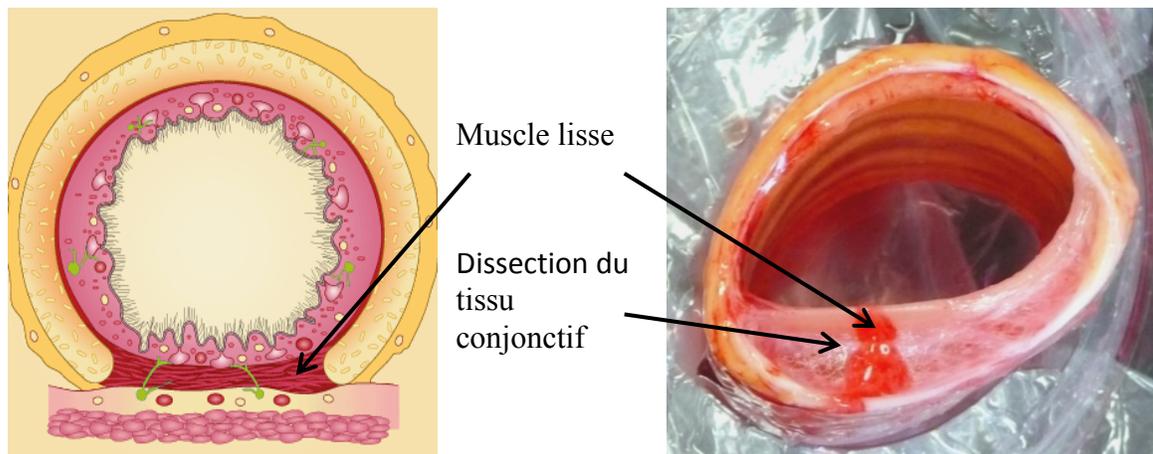
### **3 Isolement du muscle lisse**

Plusieurs étapes sont nécessaires à l'obtention d'une culture de cellules de muscle lisse : la dissection du tissu d'intérêt, sa digestion enzymatique et enfin l'ensemencement des cellules obtenues.

Le tissu d'intérêt (trachée, bronche, biopsie) est délicatement dégagé des tissus adjacents et placé dans du milieu sans sérum et sur glace. Les tissus sont lavés 3 fois avec du PBS (NaCl (80 g), KCl (2 g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (11.5 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2g), H<sub>2</sub>O stérile filtrée qsp 10 litres) contenant de la pénicilline/streptomycine (10000 U/ml) et de la fungizone (0,5 ug/ml) avant d'être disséqués.

#### **3.1 Obtention des muscles lisses issus de trachée**

Le muscle lisse, situé dorsalement et reliant les deux extrémités des cartilages, est prélevé d'un tronçon de trachée. Le muscle est séparé des tissus conjonctifs adjacents à l'aide d'une lame de scalpel (**Figure 5**). Le muscle est coupé de part et d'autre de ses insertions sur le cartilage.

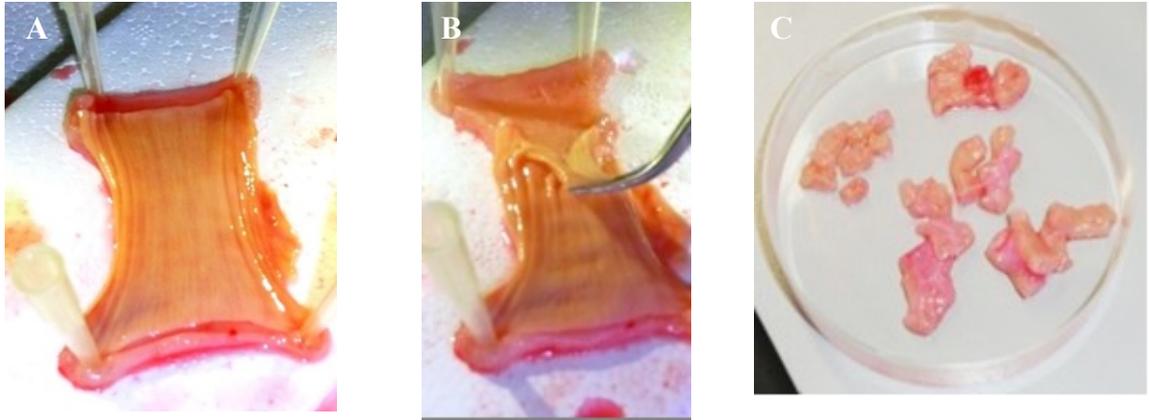


**Figure 5 : Localisation du muscle lisse trachéal prélevé**

Schéma issu du site : <http://www.admit-online.info/en/background-information-respiration/anatomy/microscopic-structures/trachea/>

L'échantillon mesure +/- 4-5 cm de large, pour une longueur variable selon le tronçon prélevé. Le tissu obtenu, si la dissection a été bien faite, est constitué de muscle lisse et de l'épithélium. Il est attaché à l'aide d'embouts à pipettes sur un support en polystyrène préalablement désinfecté (**Figure 6A**). L'épithélium est retiré à l'aide d'une pince courbe par traction, celui-ci se détache facilement en lambeau (**Figure 6B**). Le muscle lisse obtenu est réduit en petits morceaux d'environ 1 mm<sup>3</sup> (**Figure 6C**) à l'aide d'un scalpel.

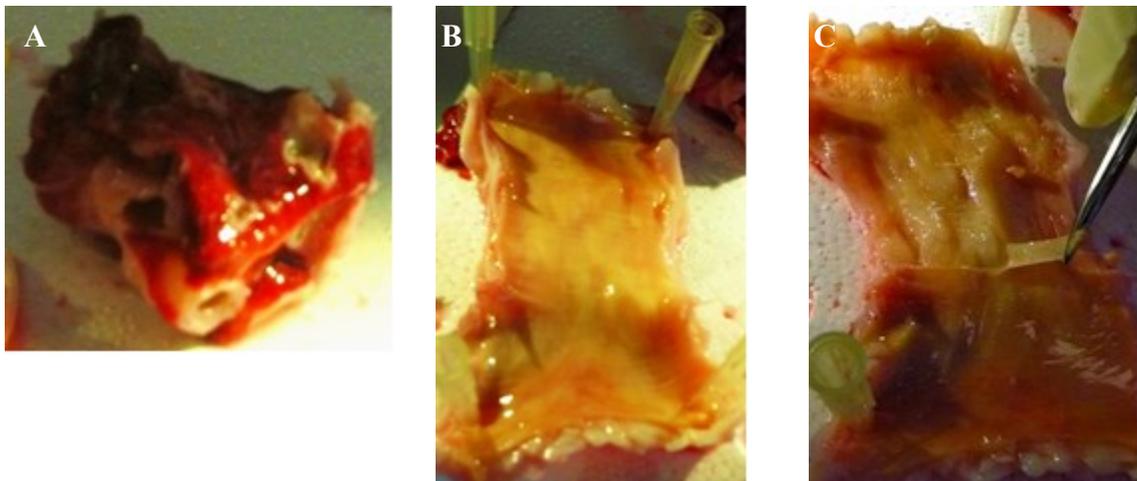
Lors du retrait de l'épithélium, le muscle peut s'étendre au-delà de ses capacités physiologiques. Par conséquent, il faut prendre garde à éviter cette extension ; le repositionnement régulier des attaches qui retiennent le muscle permet de diminuer l'allongement imposé au muscle.



**Figure 6 : Dissection du muscle lisse trachéal**

### 3.2 Obtention de muscles lisses issus de bronches

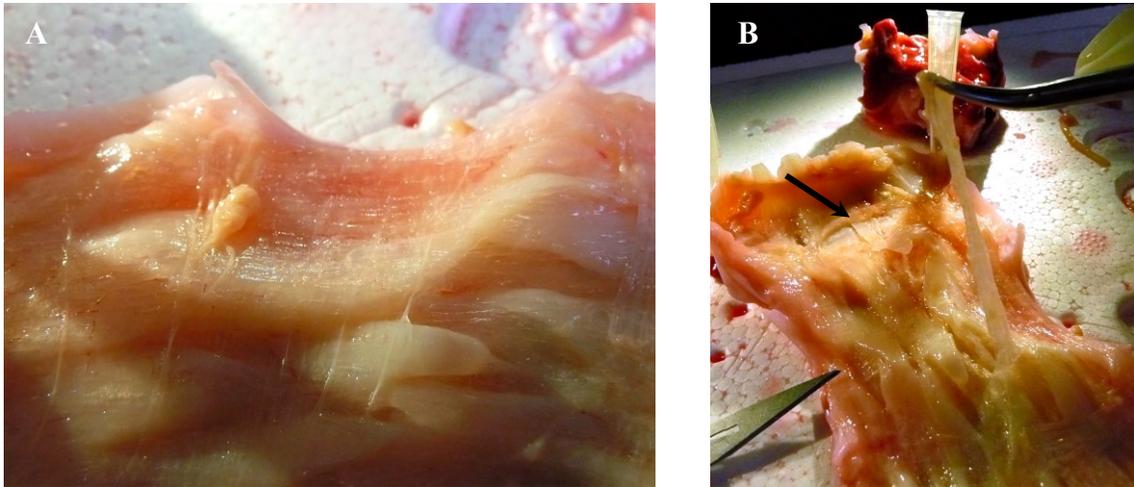
La bronche (**Figure 7A**) est sectionnée dans sa longueur et directement attachée au support en polystyrène (**Figure 7B**). L'épithélium est alors retiré sous une loupe binoculaire (**Figure 7C**).



**Figure 7 : Bronche et dissection du muscle lisse bronchique**

Une dissection attentive est nécessaire car de fins filaments restent souvent attachés au muscle (**Figure 8A**), et doivent être retirés. Il s'agit ensuite de séparer le muscle lisse des plaques de cartilages. Une section (**Figure 8B**, flèche) est effectuée au scalpel au travers du muscle lisse

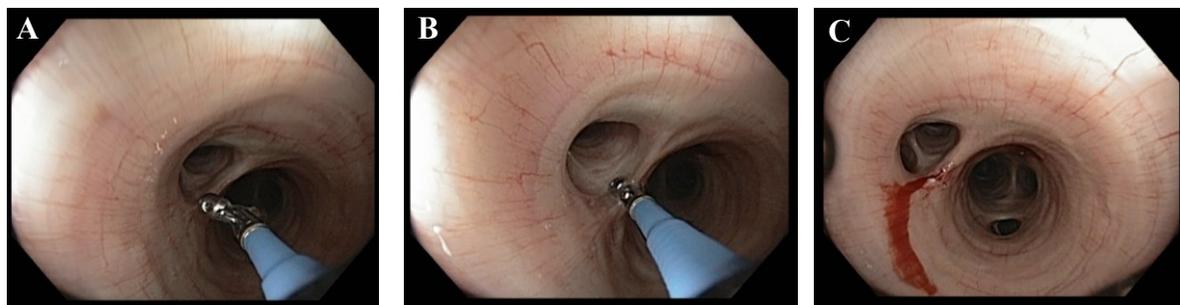
jusqu'au cartilage, le muscle lisse est ensuite soulevé et séparé du cartilage par dissection. Le muscle ainsi obtenu est alors réduit en morceau de 1 mm<sup>3</sup>.



**Figure 8 : Obtention du muscle lisse endobronchique**

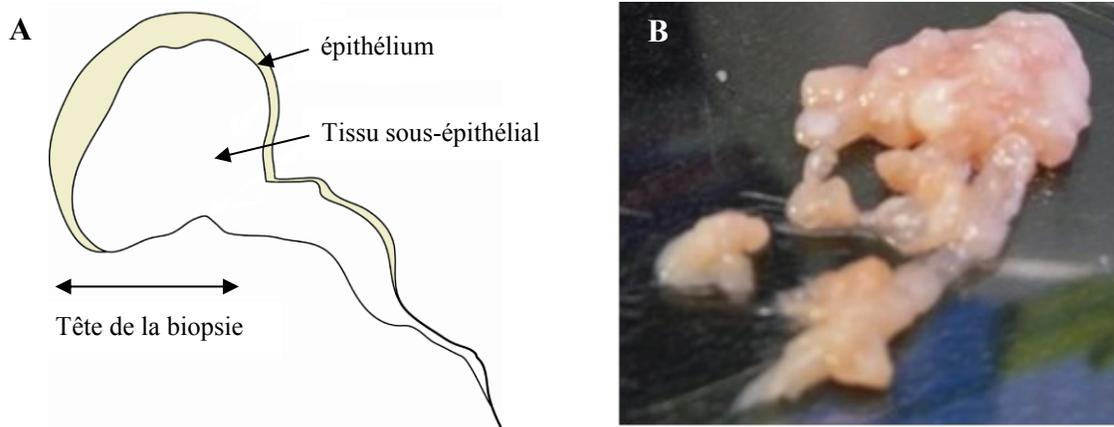
### **3.3 Obtention de muscles lisses issus de biopsies endobronchiques**

Pour prélever des biopsies, la pince est placée sur la carina bronchique et le mors est maintenu fermé au maximum durant +/- 5 secondes. Il est important de pré-couper la biopsie que l'on souhaite prendre (**Figure 9B**), on peut ensuite la prélever à proprement parler en tirant sur la pince d'un coup sec. Les biopsies contenant du cartilage sont difficilement dissécables et ne sont pas valables pour l'isolement du muscle lisse. Il est à l'avantage du manipulateur d'avancer l'endoscope le plus profondément possible dans le poumon, car il semble alors plus facile d'y obtenir des biopsies de taille et de forme appropriée. De plus sur un cheval vivant, on reculera l'endoscope progressivement pour éviter de se retrouver aveuglé par les saignements des sites biopsiés précédemment (**Figure 9C**). Sur les poumons d'abattoir, la même pince à biopsie était utilisée mais sans l'aide de l'endoscope.



**Figure 9 : Prélèvement de biopsies par endoscopie**

A l'aide d'une loupe binoculaire, l'épithélium est retiré de la biopsie avec une pince fine et un scalpel. L'épithélium apparaît légèrement jaunâtre lors de la dissection des échantillons et est situé au pourtour de la biopsie (**Figure 10A**). Du point de vue de la couleur, il faut être très attentif car cette teinte jaunâtre peut-être liée à l'épithélium ou à une superposition de tissu ; il est recommandé de déplier la biopsie, de l'étaler très délicatement afin de ne pas en modifier la forme donnée par la pince et de l'observer. Il est souvent nécessaire de retourner et de la replacer à plusieurs reprises afin de la positionner comme elle l'était dans la pince au moment du prélèvement. Il faut prendre soin de bien identifier la "tête" de la biopsie où se trouve l'épithélium (**Figure 10A**). Les biopsies avec une queue sont beaucoup plus faciles à placer et préférables. L'épithélium ainsi mis en évidence est retiré à l'aide d'une lame de scalpel (numéro 11). Au besoin, la biopsie sera réduite en morceaux d' $1\text{ mm}^3$  (**Figure 10B**). Il faut porter attention tout au long de la procédure à garder les biopsies dans un peu de milieu de culture pour éviter qu'elles ne sèchent.



**Figure 10 : Schéma et illustration de biopsies**

A. Aspect typique d'une biopsie endobronchique sous binoculaire. B. Amas de 20 biopsies

### 3.4 Digestion enzymatique

Le muscle lisse est placé dans un b cher stérile de 50mL contenant 10mL de solution enzymatique et un agitateur stérile. Le volume de la solution doit être suffisant pour couvrir totalement l'agitateur. La trachée fournit une grande quantité de muscle lisse, on utilisera donc préférentiellement une bouteille de 500mL contenant un agitateur magnétique. Il est préférable d'augmenter le volume de solution de digestion, si la solution devient opaque, semblable à un yaourt durant la digestion. Il existe des unités de trypsination qui contiennent un agitateur intégré cependant le b cher permet une meilleur digestion des tissus en raison de l'absence d'infractuosités.

La solution de digestion enzymatique est composée de milieu sans sérum avec de la collagénase (0.125U/ml, Roche), de l'élastase (1U/ml, Cederlane) et un inhibiteur de trypsine (1mg/mL, Biochemical). La solution de digestion est mise à 37 C une demi-heure avant usage. Une digestion de 6h pour la trachée est alors effectuée dans un incubateur (5% de CO<sub>2</sub>; 37 C) avec un mouvement de rotation continu, alors que 3h sont nécessaires pour les biopsies. Le temps de digestion peut être adapté en fonction de la présence ou non de morceaux encore visibles. Lorsque le temps d'incubation est écoulé, 10 mL de milieu de culture avec sérum sont ajoutés au milieu de digestion afin de bloquer toute réaction enzymatique.

## 4 Ensemencement

Les cellules ainsi obtenues sont ensemencées à une densité de 13000 par  $\text{cm}^2$ . Le milieu utilisé est composé de DME et F12 dans un rapport de 3 pour 1 et complété avec du sérum bovin fœtal. De la fungizone et de la pénicilline-streptomycine sont ajoutées au milieu suivant les concentrations précitées.

L'étape préalable essentielle est celle du comptage cellulaire, car il servira à déterminer la densité d'ensemencement. Le comptage manuel a été préféré au comptage automatisé dans cette étude puisqu'elle permet d'observer la morphologie des cellules, la présence des débris. Des différences majeures entre ces éléments peuvent être observées d'une digestion à l'autre.

Les cellules obtenues de dissections de trachées sont assez grosses sur notre cellule de comptage Mc Master, ceci est d'autant vrai que la digestion est courte. Elles ont la forme de vers plus ou moins repliés sur eux-mêmes et parfois presque dentelés. Plus la digestion est longue, plus elles perdent cette forme initiale, deviennent rondes et compactes. Les cellules musculaires lisses sont réfringentes à la lumière. Les cellules issues des biopsies ont un tout autre aspect. Elles sont rondes et petites, ayant jusqu'à 1/5 de la taille d'une cellule issue de trachée. Une cellule qui n'est pas bien ronde, qui présente des protrusions est exclue du comptage, car suspectée d'être peu apte à réussir son adhésion.

Il n'est pas rare que la majorité des cellules n'adhèrent pas ou mettent entre 24 et 48h à adhérer, surtout avec les cellules musculaires lisses provenant de biopsies.

## 5 Conditions de culture

Les cellules sont mises dans un incubateur à 37°C, humide avec 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu est changé tous les deux jours : la confluence, l'adhérence, la souffrance cellulaire (présence de vacuole), la morphologie et la taille des cellules sont alors évaluées de façon succincte et subjective.

Lorsque les cellules sont estimées être à 80% de confluence, une trypsination est effectuée. Pour ce faire, le milieu de culture est aspiré puis la flasque est rincée avec 2 mL de trypsine préchauffée à 37°C qui est immédiatement réaspirée. Cette étape permet de neutraliser l'effet du sérum contenu dans le milieu restant au fond de la flasque. 5 mL de trypsine sont déposés dans la flasque. La flasque est laissée 3 min dans l'incubateur puis le détachement cellulaire est vérifié au microscope, si nécessaire la flasque est replacée 1 min dans l'incubateur. Dès que les cellules sont décollées, le même volume de milieu complet est ajouté afin d'arrêter l'action de la trypsine. Les cellules peuvent alors être centrifugées, comptées et utilisées comme désiré.

Les cellules récupérées sont utilisées soit pour évaluer leur taux protéiques (Immunofluorescence, FACS, Immunobuvardage) soit pour être réensemencés. Les cellules obtenues après digestion et avant ensemencement ont été appelé P0, celles obtenues après le premier passage ont été dénommés P1, après le deuxième P2 et ainsi de suite.

Le milieu de culture utilisé est composé de (pour 4 litres) :

3 Sachets de DME (1L, Invitrogen, #12100-046), 1 sachet de Ham F12 (1L, Invitrogen, #21700075), 12.27g de NaHCO<sub>3</sub>, 0.097g d'adénine, 5ml d'HCl 2N, 45 mL d'H<sub>2</sub>O apyrogène, 40 mL d'acide pyruvique et d'H<sub>2</sub>O millipore afin de compléter jusqu'à 4 litres.

Le pH est ajusté à 7.1, le milieu est filtré (filtre 0.22 µm) et stocké dans des bouteilles stériles. 50 mL de FBS (Invitrogen, #10437-028), de la fugizone et de la pénicilline-streptomycine sont ajoutés au moment d'utiliser le milieu. Le milieu ainsi constitué est conservé une semaine à 4°C.

Un test de privation avec adjonction d'insuline a été effectué ; les cellules ont été passées à P2 puis ensemencées d'une part dans le milieu décrit précédemment mais ayant une concentration de 1% de FBS et additionné d'1µM d'insuline et d'autre part dans le milieu commercial de

DMEM-F12-FBS10%. Un test afin d'évaluer l'effet de la confluence sur le taux d'expression des protéines contractiles a également été effectué. Pour ce faire, une fois la confluence atteinte, la culture a été prolongée durant 5 jours au premier essai puis 10 jours lors du second.

## **6 Fibroblastes**

Des fibroblastes extraient d'une biopsie de peau de cheval par dissection et digestion enzymatique nous ont été fournis par Dubé J, d'après (Auger, Lopez Valle et al. 1995). Les conditions de culture étaient identiques à celle utilisées pour le muscle lisse.

## **7 Caractérisation du phénotype**

### **7.1 Immunofluorescence**

Les immunofluorescences ont été réalisées à partir de cytopréparation sur lames, puis fixées à l'acétone à -20°C durant 20 min. Les lames étaient ensuite gardées à 4°C dans du PBS 1X en attendant l'immunofluorescence (une journée à 6 semaines). Quatre lames à chaque passage étaient réalisées. Une double coloration  $\alpha$ -sm-actine/desmine était effectuée sur deux de ces lames et une coloration  $\alpha$ -sm-actine/sm-myosine était réalisée sur les deux autres. Environ 20000 cellules étaient présentes par lame.

Les lames sont rincées dans le PBS, l'excédent de liquide est retiré. Un trait au marqueur hydrophobe est réalisé autour des cellules.

Un blocage de 60 min est alors réalisé à l'aide d'une solution de blocage composée de 2,5mL de PBS de concentration 10X, 1,25mL de sérum de chèvre, 21,25 ml d'H<sub>2</sub>O et 75 $\mu$ L de triton X-100.

Les lames sont rincées (trois fois deux minutes) dans du PBS 1X. L'excédent de liquide est retiré.

La moitié des lames reçoivent l'anticorps contre l' $\alpha$ -sm-actine et la desmine, l'autre moitié contre l' $\alpha$ -sm-actine et la sm-myosine. La solution d'anticorps est composée de solution de blocage dans

laquelle a été ajouté l'anticorps dirigé contre l' $\alpha$ -sm-actine (1/250), la desmine (1/200) et la sm-myosine (1/300).

La première solution d'anticorps primaire, dirigée contre l' $\alpha$ -sm-actine, est appliquée à raison de 25 $\mu$ L par lame durant une heure dans une boîte maintenue humide afin d'éviter l'assèchement des lames. Les lames sont rincées (trois fois deux minutes) dans du PBS 1X. L'excédent de liquide est retiré.

Une deuxième solution d'anticorps primaire est appliquée à raison de 25 $\mu$ L par lame durant une heure pour la desmine et durant deux heures pour la myosine. Les lames sont rincées (trois fois deux minutes) dans du PBS 1X. L'excédent de liquide est retiré.

La solution d'anticorps secondaire, composé d'un anticorps anti-lapin couplé au fluorochrome Alexa 594 et anti souris couplé au fluorochrome Alexa 488, est alors appliquée à l'abri de la lumière durant une heure. La solution est composée de de 2,5mL de PBS 10X, 22,5 ml d'H<sub>2</sub>O et 75 $\mu$ L de Triton X-100 auxquelles sont ajoutés les anticorps secondaires, l'Alexa fluor 488 et 594, à une concentration de 1 pour 1000 pour chacun d'entre eux. Les lames sont rincées (trois fois deux minutes) dans du PBS 1X puis deux fois deux minutes dans de l'eau stérile. L'excédent de liquide est retiré.

Une solution de DAPI dilué dans du PBS 1X à une concentration de 1 $\mu$ g/mL est déposé sur la lame durant 5 minutes. Les lames sont rincées (deux fois cinq minutes) dans du PBS 1X. L'excès de liquide est retiré.

Le montage des lames est effectué avec une solution comprenant 6 mL de glycérol, 1.4 mL de PBS 10X, 12.6 mL d'eau distillée, 0.4g de gélatine et 0.02g d'azide de sodium.

Les lames sont mises pour 12h à 4°C à l'abri de la lumière puis stockées à -20°C.

Les lames sont ensuite prises en photo à l'aide de la caméra et de l'appareil du microscope. Les temps d'exposition sont contrôlés (4 ms pour le marquage au DAPI, 150ms pour le marquage avec l' $\alpha$ -sm-actine, 200ms pour le marquage de la sm-myosine et la desmine). La plage est prise au hasard avec une vérification préalable de la présence de cellules. Un comptage manuel a ensuite été effectué sur 400 cellules. Pour le comptage, le nombre de noyaux (DAPI) était compté puis la présence ou l'absence de marquage évaluée, l'absence de noyau étant une condition d'exclusion.

## 7.2 Cytométrie de flux

Les cellules musculaires lisses sont rincées au PBS, comptées et fixées 20 min à l'aide de la solution cytofix-cytoperm (BD Biosciences, ON, CA). Après trois rinçages dans le tampon de rinçage, les cellules sont marquées pour l'alpha-sm actine, la desmine, et la sm-myosine ( $10^6/100 \mu\text{l}$ ). Les mêmes anticorps et les mêmes concentrations que lors de l'immunofluorescence ont été utilisés pour la cytométrie de flux. Les étapes de marquages ont été réalisées à 4°C. Les cellules sont alors lavées 3 fois dans le tampon de rinçage et incubées avec les anticorps secondaires, un anticorps anti-lapin couplé au fluorochrome Alexa 594 et un anti souris couplé au fluorochrome Alexa 488 (Invitrogen, CA). Les cellules sont rincées deux fois puis resuspendues dans 400- $\mu\text{l}$  de PBS. La fluorescence est ensuite analysée (10 000 cellules) par cytométrie de flux (FACSCalibur) et analysée via le logiciel CellQuest Pro (BD Bioscience). Les anticorps IgM de souris et IgG de lapin (Invitrogen) ont été utilisés comme isotype contrôle. La fluorescence moyenne et le pourcentage de cellules positives ont été évalués.

## 7.3 Immunobuvardage

20  $\mu\text{g}$  d'extrait cellulaire ont été récupérés (bêta-mercaptoéthanol) après chaque passage et la concentration protéique a été déterminée en utilisant le kit BCA protein assay (Fisher Canada, Nepean, CA). Une migration sur un gel pré-moulé en polyacrylamide à 10% mini-protean TGX stain free (Bio-Rad, Mississauga, ON, CA) a été effectuée. Puis un transfert a été fait sur une membrane PDVF (Millipore; Etobicoke, ON, CA). Les membranes ont été bloquées avec de la poudre de lait 5% et incubées avec les même anticorps que précédemment dirigés contre l' $\alpha$ -sm-actine (1 :500), la desmine (1 :300) et la myosine (1 :300). Après plusieurs rinçages, les membranes ont été incubées avec la peroxidase de raifort (HRP) conjugué à l'anticorps (de chèvre) contre les IgG de lapin et de souris (1/10000, Cell Signaling, Danvers, MA). Le signal a été détecté par chemiluminescence (Dura Kit, Fisher Canada). Les images des membranes ont ensuite été numérisées avec le système Fusion FX7 (Montreal Biotech Inc., Montreal, CA) et l'intensité des bandes déterminées avec le logiciel d'acquisition d'image Quantity One 4.5.0.

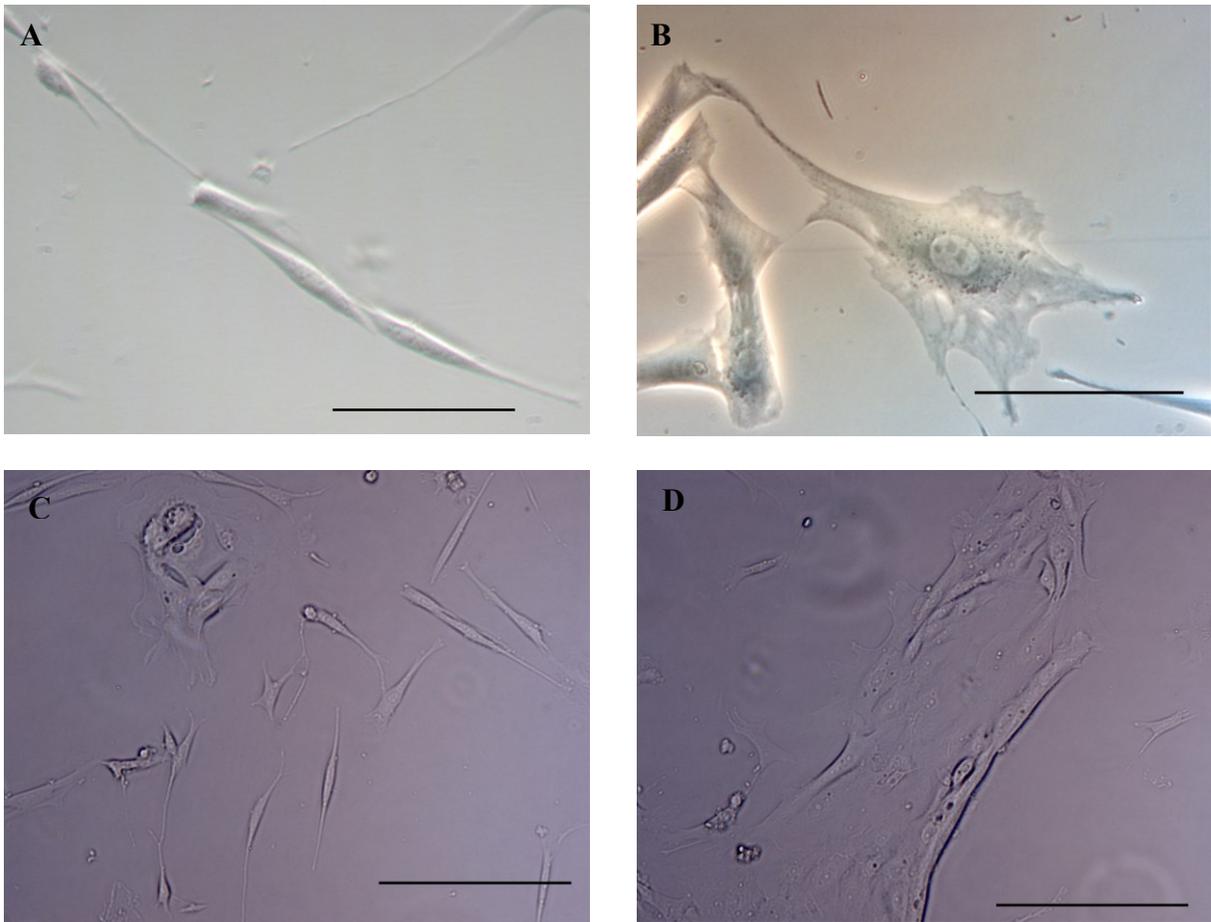
## 8 Statistiques

Les données ont été analysées par un modèle linéaire à mesure répétée avec un test post-hoc de Dunnett. Le logiciel SAS v.9.3 (Cary, N.C.) a été utilisé.  $p \leq 0.05$  a été considéré comme significatif.

# Résultats

## 1 Suivi des cultures

Différents types de cellules et comportements ont pu être observés.



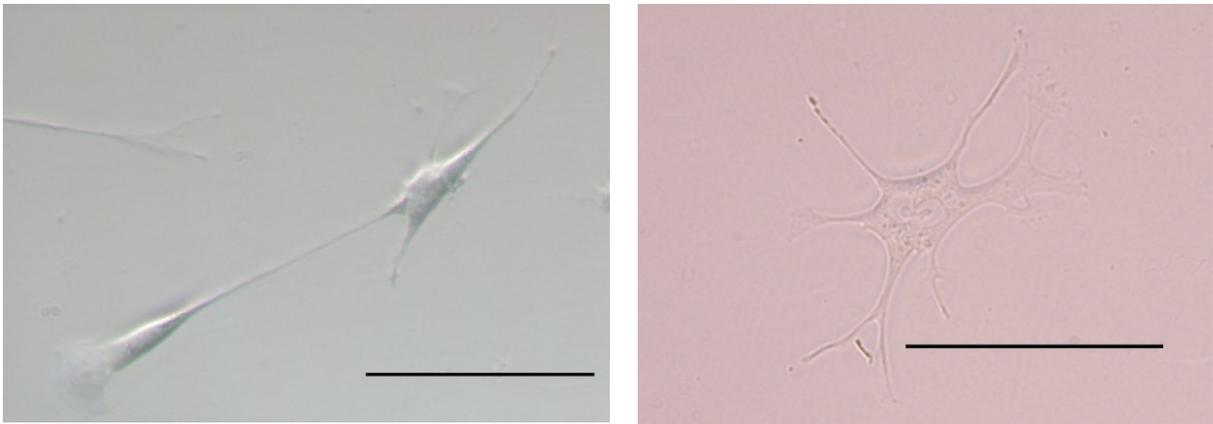
**Figure 11 : Les différents types de cellules issus de biopsies endobronchiques en culture**

A-C : Cellules fusiformes peu granuleuses présentant une répartition homogène. B-D : Cellules présentant une forme arrondie, un contenu granuleux, groupées et entourées d'une gangue de matrice.  
Échelle A et B : 50µm, C et D : 100µm.

Dans les 3 jours suivant l'ensemencement deux types cellulaires illustrés dans la **Figure 11** ont été observés. Le premier (**Figure 11A**) est fusiforme, peu granuleux, avec un noyau peu visible. Le deuxième type cellulaire (**Figure 11B**) présente une forme étalée, plus ronde et leur cytoplasme contient de nombreuses organelles actives.

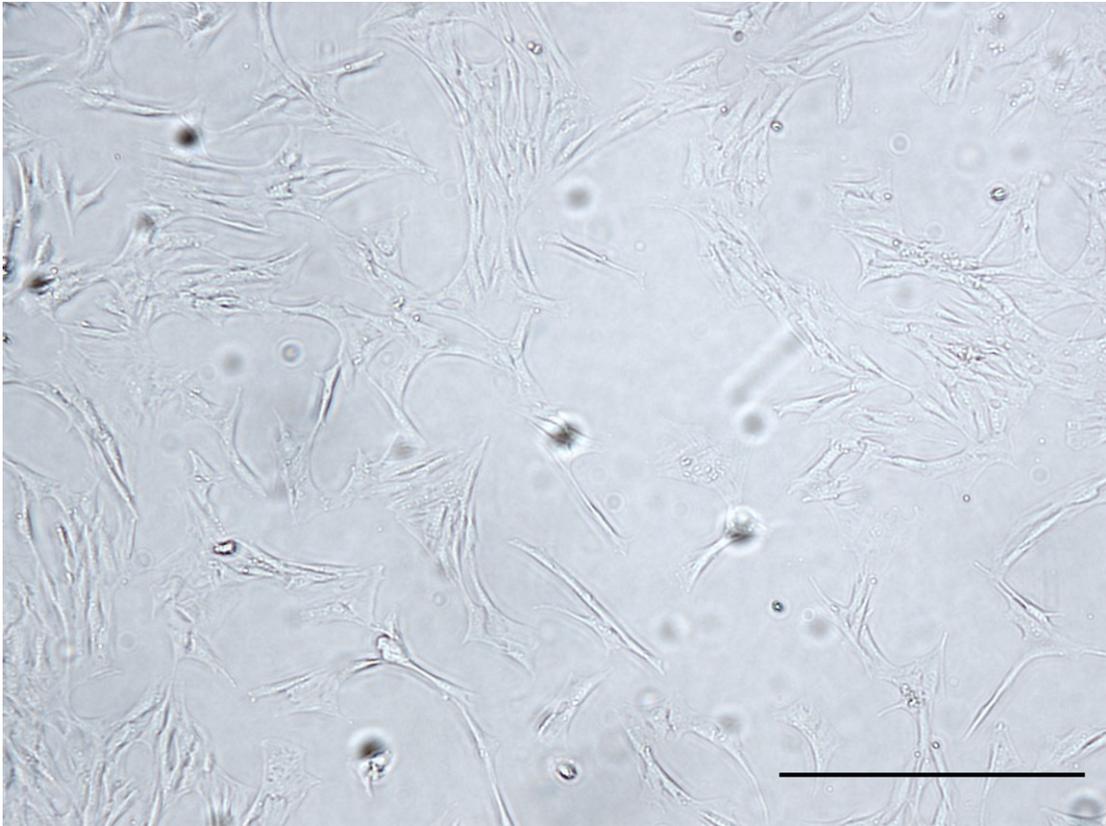
Ces deux types cellulaires présentent une organisation différente dans la flasque. Ainsi les cellules présentées à la **Figure 11A** vont être réparties de façon homogène sur l'ensemble de la surface (**Figure 11C**), tandis que les cellules présentées à la **Figure 11B** sont majoritairement retrouvées groupées, sécrétant de la matrice extracellulaire (**Figure 11D**). Le deuxième type cellulaire représentait en moyenne 15% des cellules observées.

Ces deux types cellulaires présentent un modèle de division différent. Lorsqu'une cellule mère du premier type se divise, la cellule fille n'adhère pas à son voisinage immédiat, elle se détache pour ensuite ré-adhérer. Après le changement de milieu, ces cellules apparaissent comme attachées par un filament à la flasque (comme un ballon par sa base ou par sa ficelle), elles sont généralement plus réfringentes que les autres. Des pseudopodes membranaires établissent des contacts intercellulaires (**Figure 12**) et ceci pour les deux types de cellules dès qu'elles se retrouvent sans contact direct avec une cellule. Une fois les connections établies, une population homogène dans sa répartition sur la flasque est observée (**Figure 13**), une confluence de 80% est rapidement atteinte.



**Figure 12 : Illustrations de pseudopodes**

Échelle 50µm.



**Figure 13 : Culture présentant une répartition homogène des cellules musculaires lisses**

Échelle 100µm.

Le deuxième type cellulaire, caractérisé par des cellules groupées, semble croître à partir d'un centre de division et s'étendre de manière concentrique. Ce deuxième type cellulaire correspond à la description des fibroblastes faite par Chamley-Campbell, Campbell et al. (1979), mais également à la description des cellules musculaires lisses avec un phénotype prolifératif (Halayko, Salari et al. 1996, Rensen, Doevendans et al. 2007).

Après quelques jours de culture, il devient difficile de les différencier. Lorsque la densité cellulaire augmente les cellules s'allongent. Les deux populations cellulaires se confondent petit à petit et l'organisation en « hill and valley » est observée. La confluence est atteinte en moyenne en 7 jours sauf pour le premier passage qui nécessite 11 jours. Lors de la poursuite de la culture, les

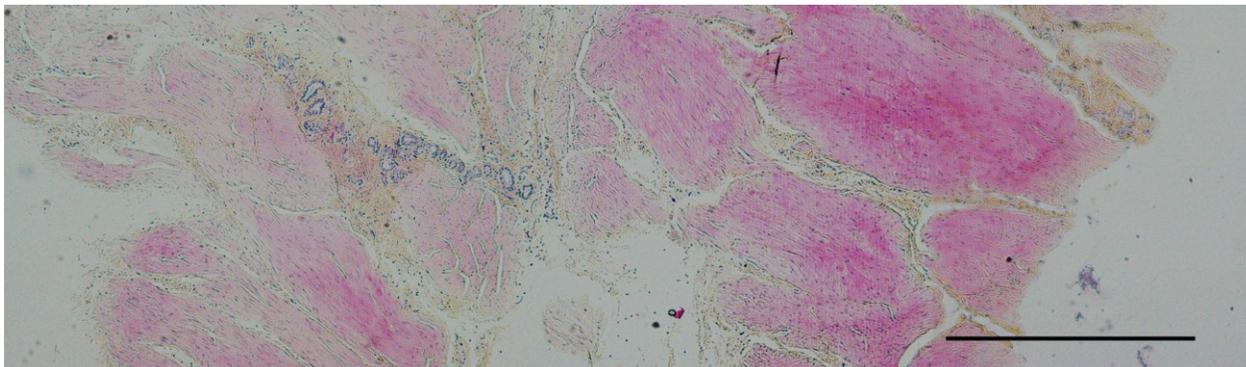
cellules s'organisent parfois en plusieurs couches et une organisation en forme de vague apparaît dans la flasque.

Le milieu est changé toutes les 48h. Il est important de respecter ce délai, notamment lors du premier changement de milieu après l'ensemencement. Le raccourcir apparaît être particulièrement délétère pour l'adhésion des cellules. Pour cette même raison, un changement délicat de milieu est recommandé de façon à ne pas retirer les cellules qui sont en cours d'attachement. Allonger ce délai mène visuellement à une accumulation importante de déchet dans la flasque et ne semble guère souhaitable.

## 2 Trachée

### 2.1 Histologie

Après dissection, l'examen histologique a permis de confirmer la prédominance de tissus fortement cellularisés caractéristiques du muscle lisse (**Figure 14**).

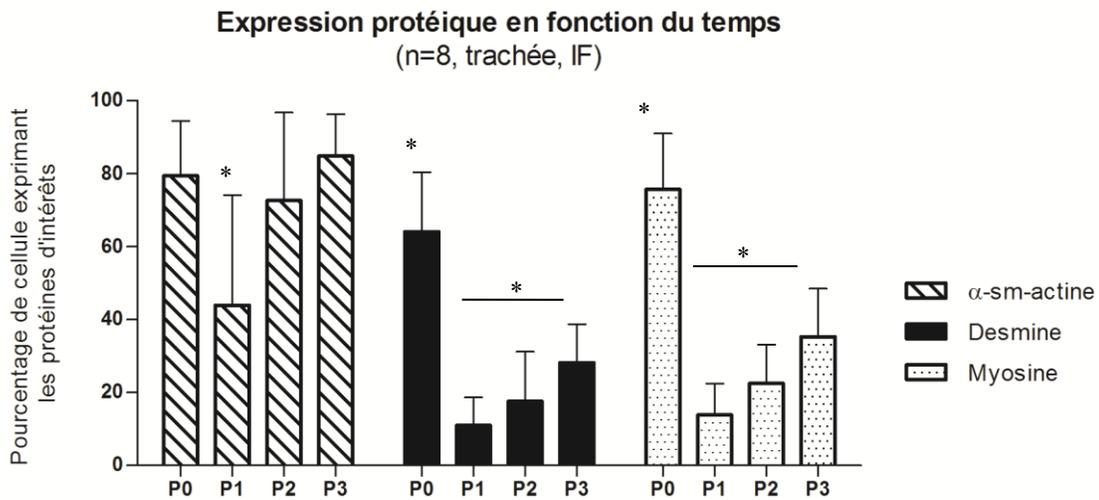


**Figure 14 : Histologie de la dissection effectuée sur du muscle lisse trachéal comprenant une majorité de muscle lisse (rose) ainsi que du tissu conjonctif (orangé).**

Coloration HBS. Échelle 1mm.

### 2.2 Immunofluorescence

Les cellules isolées du muscle lisse ont été caractérisées par immunofluorescence. Ceci a été effectuée à partir de cellules isolées de trachées provenant de 8 chevaux, les cellules ayant été cultivées pendant 3 passages. Un comptage à l'aveugle a été effectué par trois personnes différentes afin de vérifier la fiabilité du compte pour les 2 premières isolations avant d'entamer la série d'expérience.



**Figure 15 : Pourcentage d’expression de trois protéines d’intérêts dans le muscle trachéal par immunofluorescence.**

Comme nous pouvons le voir sur la **Figure 15**, nous obtenons à l’issue de la digestion 80% de cellules comprenant de l’alpha-actine, 64% et 75% de cellule exprimant la desmine et la myosine respectivement. Pour l’ $\alpha$ -sm-actine, P1 est significativement différent des autres passages ( $p < 0.02$ ). La présence de la desmine et de la myosine est fortement diminuée après un passage mais on observe une augmentation de ces deux protéines aux cours des passages. P0 est significativement différent des autres passages et P3 est significativement supérieur à P1 ( $p < 0.02$ ). L’augmentation de la croissance de protéine contractile nous a encouragé à poursuivre la culture cellulaire jusqu’au 7<sup>ième</sup> passage.

### **Effets de la durée de la digestion**

Afin de nous assurer de l’innocuité de la digestion du tissu par la collagénase sur les cellules, nous avons effectué une digestion fractionnée de manière à explorer la diminution d’expression des protéines contractiles qui pourrait expliquer la diminution très forte de desmine et myosine observée après un passage.

### *Démarche*

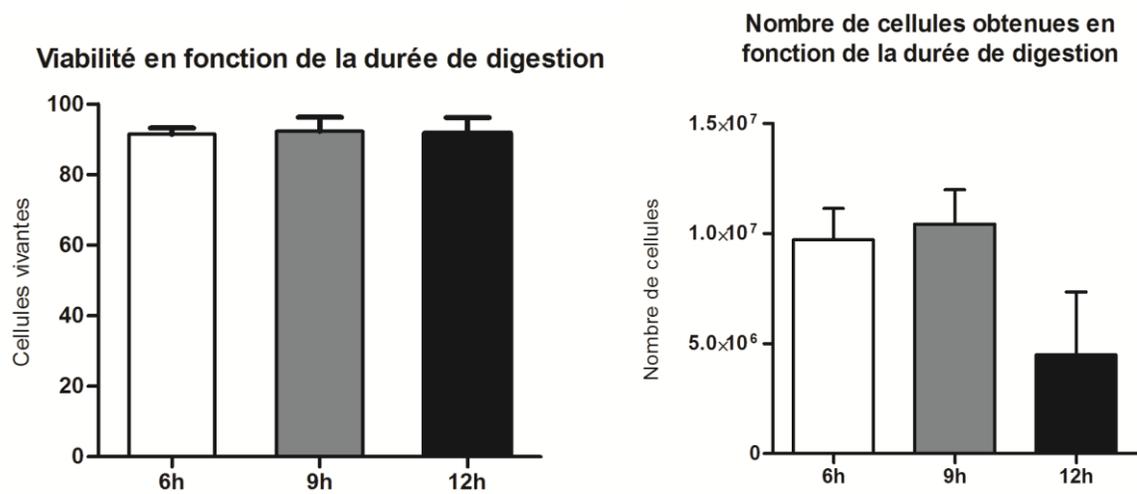
Trois trachées ont été utilisées pour ce test (non poolées). Le processus de digestion a été lancé comme habituellement, puis interrompu à 6h, 9h et 12h. A chaque interruption, 15 min de sédimentation ont été effectuées puis le tiers supérieur de la solution de digestion prélevé. Le volume prélevé a été remplacé par son équivalent en milieu de digestion et la digestion poursuivie. Le prélèvement a été centrifugé puis resuspendu afin de procéder à un comptage. La mortalité cellulaire a été évaluée à l'aide du bleu trypan et la morphologie cellulaire de visu. Une fois le comptage effectué, les cellules ont été ensemencées pour évaluer toute influence de la digestion sur la croissance ou le phénotype.

### *Résultats*

Caractéristiques des cellules obtenues

ID	Temps	Mortalité	Morphologie	Quantité recueillie
Noa	6h	10.71%	Filamenteuse, en forme de vers	12 544 000
	9h	12%	60% de cellules rondes	10 000 000
	12h	5.5%	75% de cellules rondes	1 440 000
Jo	6h	7.5%	Filamenteuse, en forme de vers	7 980 000
	9h	4.2%	60% de cellules rondes	7 960 000
	12h	13.3%	75% de cellules rondes	1 800 000
Lio	6h	7.6%	Filamenteuse, en forme de vers	8 582 000
	9h	6.9%	45% de cellules rondes	13 300 000
	12h	5.88%	50% de cellules rondes	10 200 000

**Tableau II : Caractéristiques des cellules obtenues**



**Figure 16 : Viabilité et nombre de cellules obtenues en fonction de la durée de la digestion**

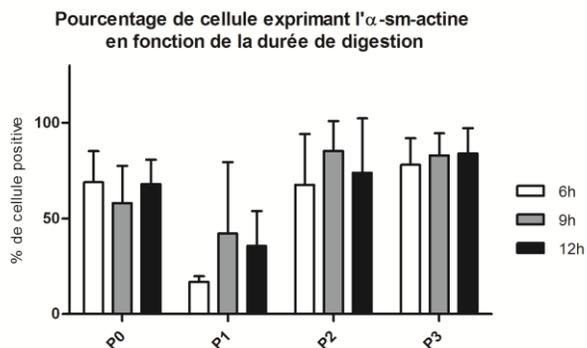
Statistiquement, il n'y a pas de différence significative entre 6, 9 ou 12h de digestion du point de vue de la viabilité et du nombre de cellules obtenues.

Visuellement les débris présents étaient moins nombreux après 6h de digestion.

Effets sur l'expression du phénotype (n=3)

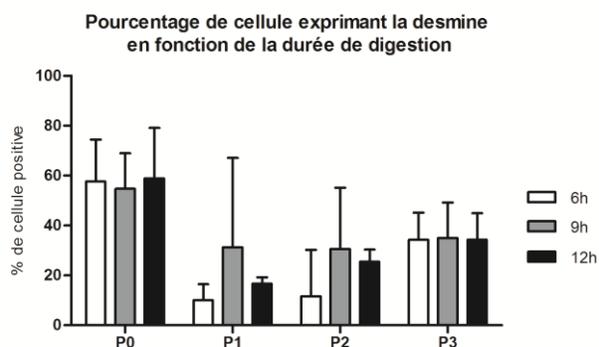
Moyenne à 6h de digestion

	$\alpha$ -sm-actine	desmine	myosine
P0	69%	58%	66%
P1	17%	10%	12%
P2	67%	12%	24%
P3	78%	34%	47%



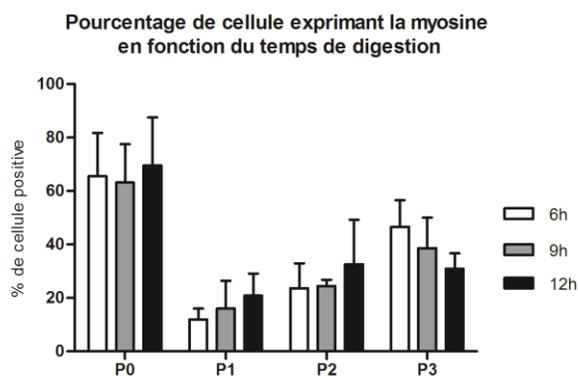
Moyenne à 9h de digestion

	$\alpha$ -sm-actine	desmine	myosine
P0	58%	55%	63%
P1	42%	31%	16%
P2	85%	31%	24%
P3	83%	35%	39%



Moyenne à 12h de digestion

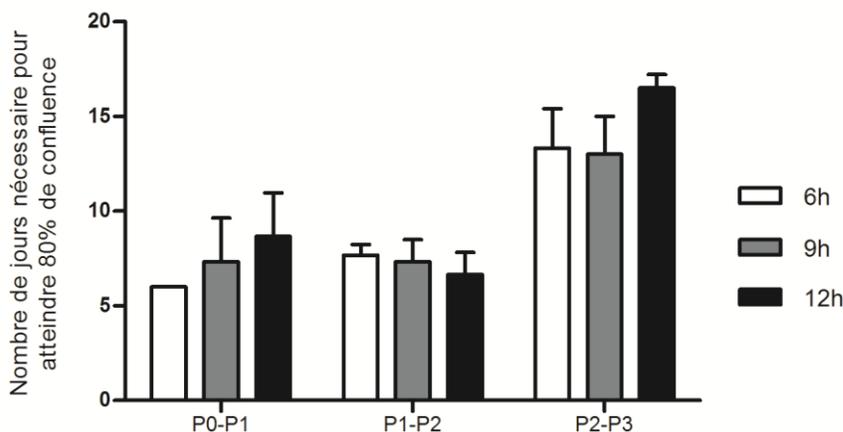
	$\alpha$ -sm-actine	desmine	myosine
P0	68%	59%	70%
P1	36%	17%	21%
P2	74%	25%	33%
P3	84%	34%	31%



**Figure 17 : Effet de la durée de la digestion sur l'expression des protéines d'intérêts**

Il n'y a pas de différence significative après 6, 9 ou 12h de digestion à P0, P1, P2 ou P3 que ce soit pour l' $\alpha$ -sm-actine, la desmine ou la myosine.

**Vitesse de prolifération en fonction de la durée de la digestion**



	6h	9h	12h
P0-P1	6j	7,33j	8,67j
P1-P2	7,67j	7,33j	6,67j
P2-P3	13,33j	13j	16,5j
Somme	27j	27,67j	31,83j

**Figure 18 : Vitesse de croissance des cellules musculaires lisses en fonction de la durée de la digestion**

Il n'y a pas de d'effet significatif sur la vitesse de prolifération. Cependant lors du premier changement de milieu, il y avait moins de cellules flottantes dans les flasques dont les cellules n'avaient subi que 6h de digestion.

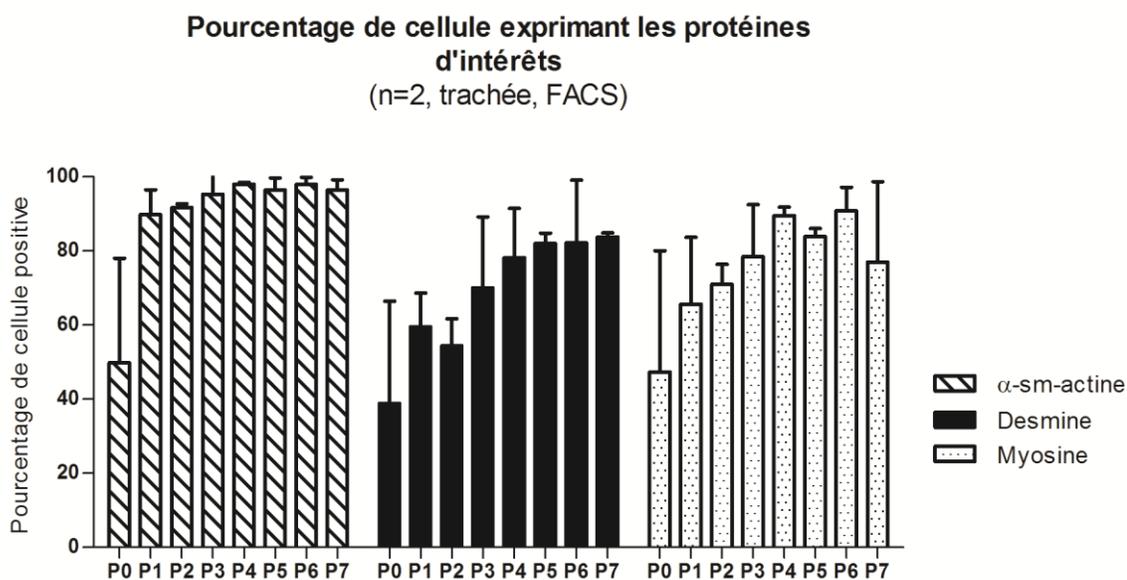
En conclusion, aucune pratique n'étant délétère, la durée de digestion a été fixée par simplicité à 6h pour les trachées. Nous pouvons également en déduire, que si 6h supplémentaires n'induisent pas de différence significative, il y a peu de chance que notre digestion soit agressive pour nos cellules.

Une digestion de 12h ne semble pas propice en raison du pourcentage de cellules récupérées qui avoisine par deux fois sur trois, seulement un million de cellules. Une période de 9h pourrait en revanche être intéressante du point de vue de la chute observée en P1. La forme en vers, plus proche de la morphologie fusiforme des cellules musculaires lisses, observée à 6h, et la moins grande proportion de cellules flottantes (data non montrées) nous ont encouragés à utiliser cette durée de digestion.

### 2.3 Cytométrie de flux

Afin d'améliorer l'objectivité et la sensibilité des analyses, une quantification du nombre de cellules exprimant les marqueurs des cellules musculaires lisses a été effectuée à l'aide de la cytométrie de flux. Le nombre de cellules comptées (10000 versus 400) ainsi qu'une évaluation quantitative (versus une évaluation subjective par un observateur) sont deux points forts de cette technique comparativement au comptage effectué suite à une immunofluorescence.

Nous avons donc corroboré nos résultats avec la cytométrie à partir des cellules isolées de deux nouveaux individus. Le pourcentage de cellules positives et la fluorescence moyenne de la population cellulaire ont été évalués.

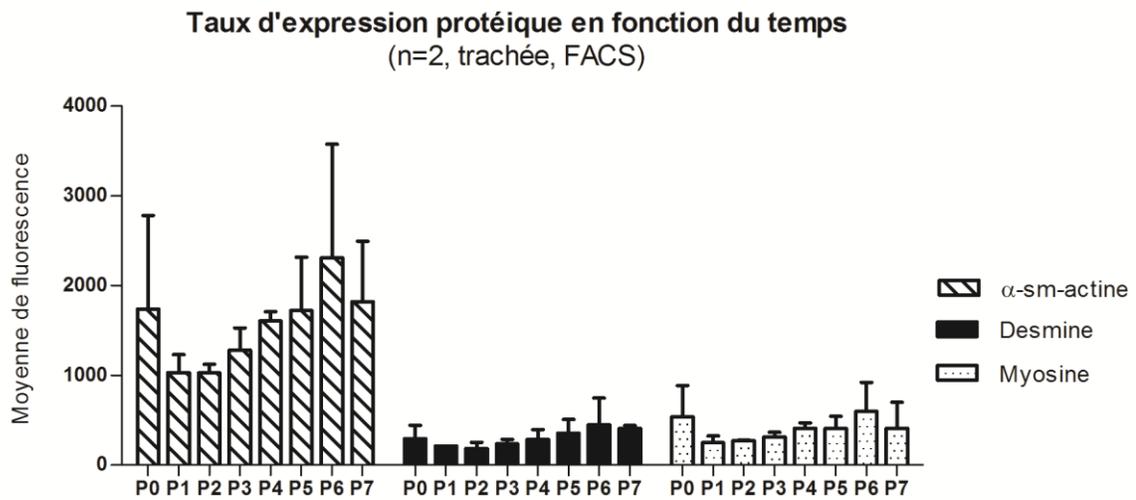


	$\alpha$ -sm-actine	desmine	myosine
P0	49.7%	38.8%	47.3%
P1	89.8%	59.6%	65.6%
P2	91.6%	54.4%	71%
P3	95.2%	70%	78.4%
P4	98.0%	78.2%	89.5%
P5	96.4%	82%	83.8%
P6	98%	82.1%	90.8%
P7	96.4%	83.8%	77%

**Figure 19 : Pourcentage de cellule exprimant les protéines contractiles d'intérêts par cytométrie de flux**

Après la digestion enzymatique (P0) 50% des cellules expriment l' $\alpha$ -sm-actine et la myosine, 40% la desmine (**Figure 19**). Ce pourcentage augmente progressivement au fur et à mesure des passages pour se stabiliser aux alentours de 96% d'expression d' $\alpha$ -sm-actine et 80% d'expression de desmine et de myosine. Nous en concluons que P0 comporte un biais important sans doute induit par la présence de nombreux déchets, de cellules lysées, et de noyaux isolés suite à la digestion.

Le phénotype tel que caractérisé à P1 se maintient dans le temps. Le nombre de sujets étudiés dans cette étude est trop faible pour effectuer des tests statistiques.

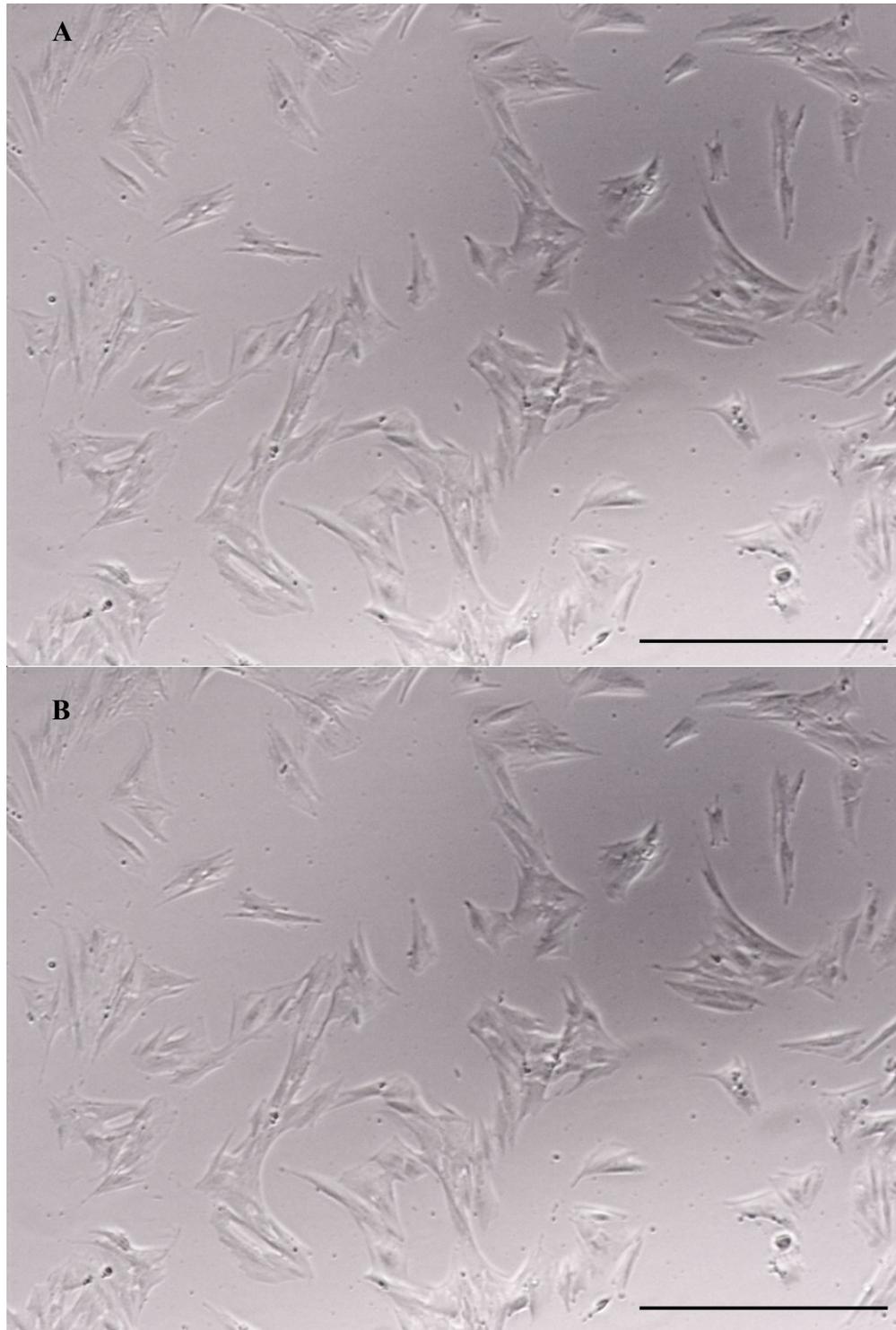


**Figure 20 : Fluorescence moyenne exprimée par la population cellulaire de muscle lisse trachéal pour les protéines d'intérêts**

A la lumière des résultats de la cytométrie, il semble que le pourcentage de cellules détecté positivement par immunofluorescence reflète la fluorescence moyenne (**Figure 20**) exprimée par la population cellulaire et non le pourcentage réel de cellule positive.

### **Confluences et test de déprivation avec adjonction d'insuline**

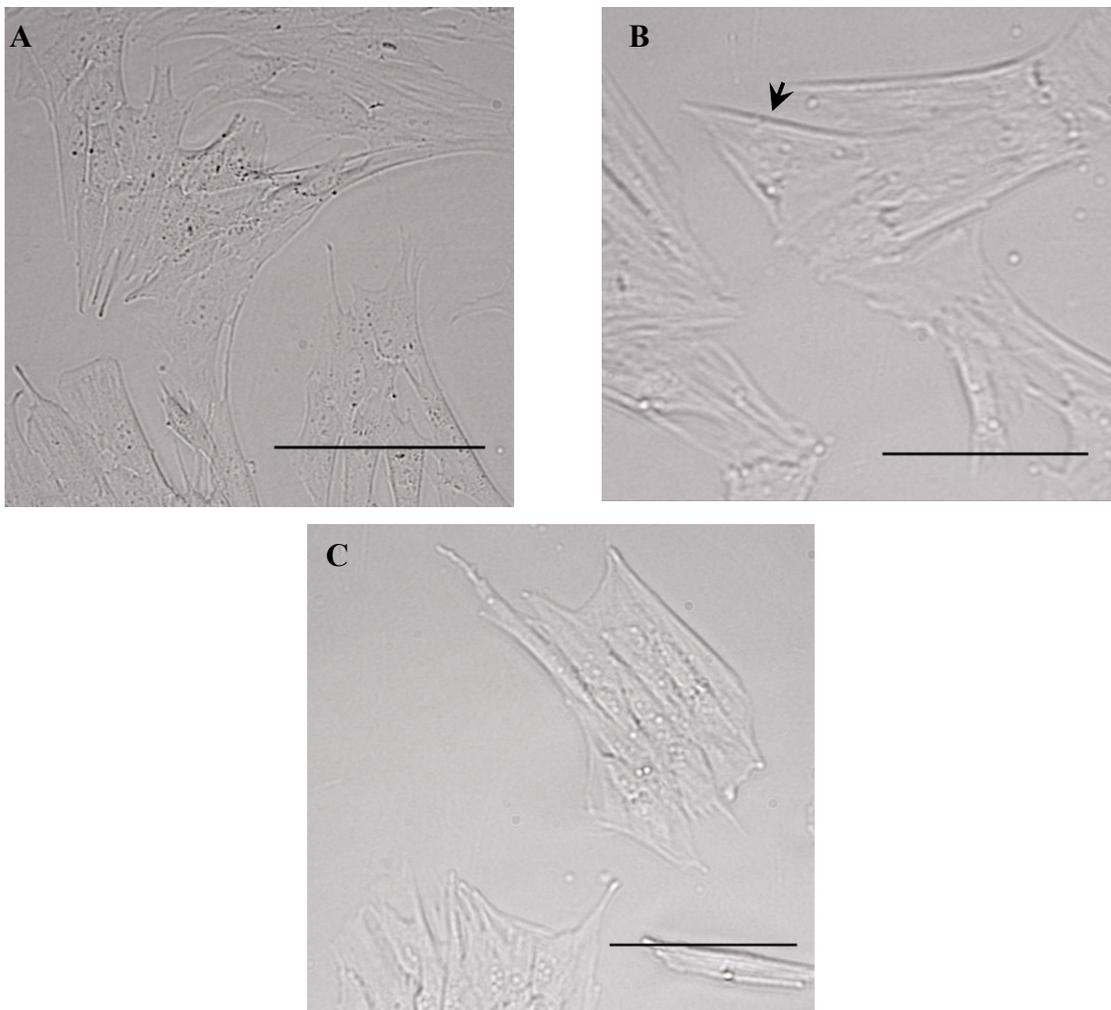
En raison de problèmes rencontrés lors de la culture, les résultats n'ont pu être complètement obtenus. En revanche des photos de culture ont pu être prises.



**Figure 21 : Photo de culture cellulaire dans différents milieux**

A. Cellule dans notre milieu. B. Milieu contenant 1% de FBS additionné d'insuline. Échelle 100µm.

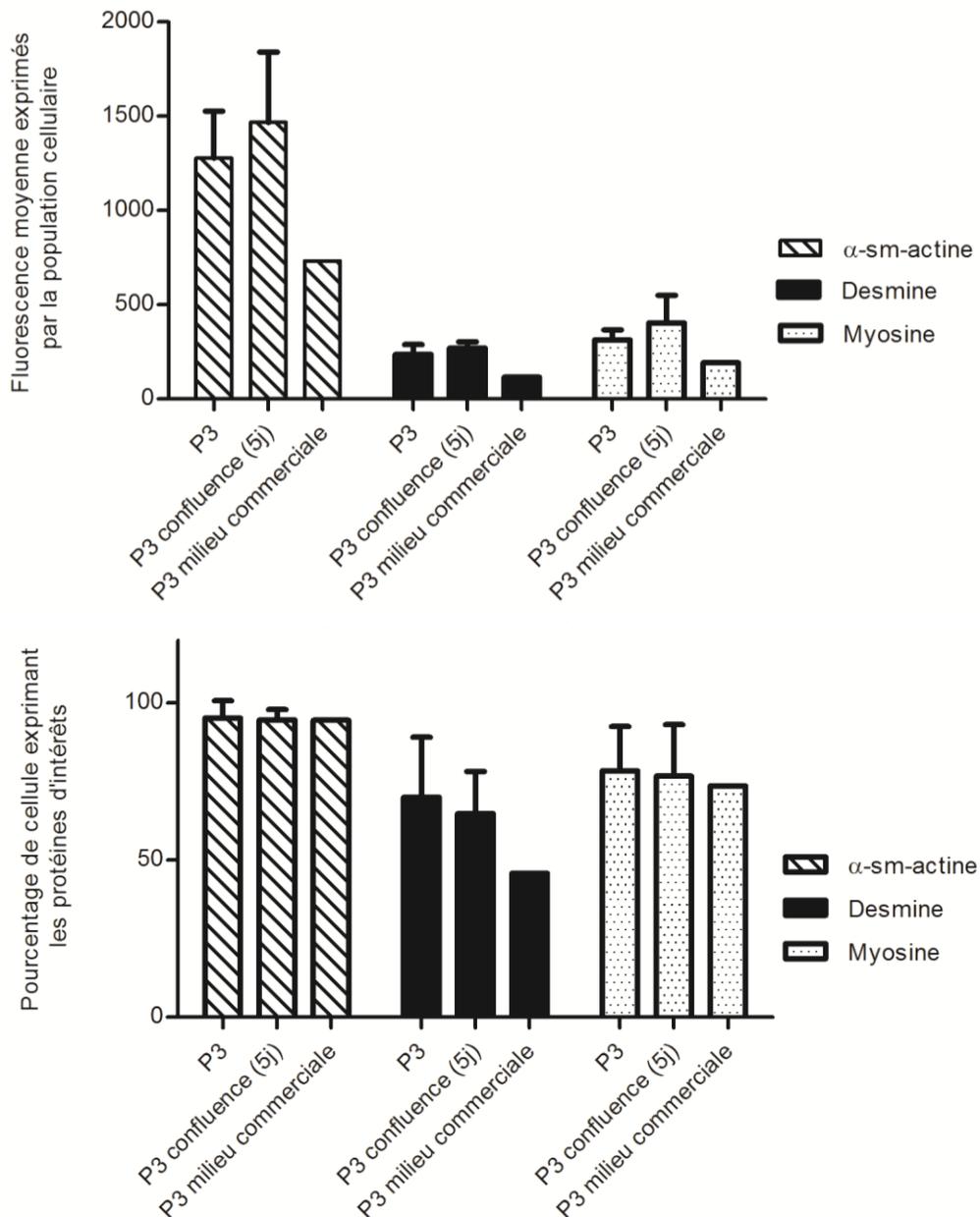
Les cellules dont le milieu contenait uniquement 1% de FBS et de l'insuline (concentration 1 $\mu$ M) sont plus grosses et présentent une forme plus carrée avec des lignes de stress (tête de flèche, **Figure 22B**) au pourtour de la cellule. Le milieu contenant 10% de FBS engendre la vitesse de croissance la plus rapide, tandis que le milieu rapporté dans la littérature (DMEM-F12 (1/1), 10% FBS également) donne un résultat intermédiaire, tant sur la forme des cellules que du point de vue de la vitesse de croissance, le milieu contenant 1% de FBS additionné d'insuline entraîne une croissance très lente.



**Figure 22 : Influence du milieu de culture sur la forme cellulaire**

A. Milieu 10%FBS. B. milieu contenant 1% de FBS additionné d'insuline. C. Milieu commerciale 1 :1 de DMEM-F12 avec 10% FBS. Echelle 50 $\mu$ m.

La confluence n'induit pas d'augmentation du pourcentage de cellules exprimant les protéines d'intérêts, mais contribue à augmenter leur fluorescence moyenne (Figure 23). Le milieu commercial (DMEM/F12 1:1) quant à lui, contribue à diminuer le pourcentage de cellule exprimant les protéines contractiles et l'intensité de la fluorescence.



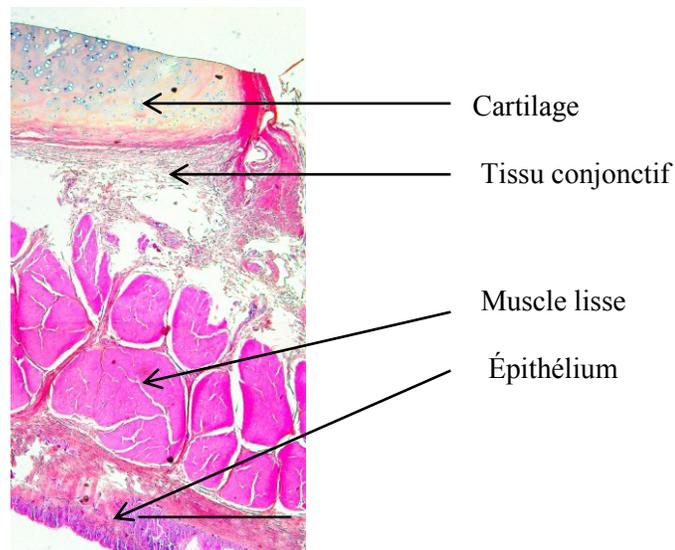
**Figure 23 : Effet de la confluence et du milieu commercial sur l'expression protéique (FACS, trachée)**

## 3 Bronches

Les cellules de muscle lisse de bronche ont été extraites à quelques reprises et ont rapidement été laissées de côté au profit des biopsies endobronchiques en raison de résultats mitigés.

### 3.1 Histologie

La méthode de dissection consiste à retirer l'épithélium, puis à décoller le muscle lisse. Le muscle lisse identifiable sur la **Figure 24** est ainsi facile à obtenir.



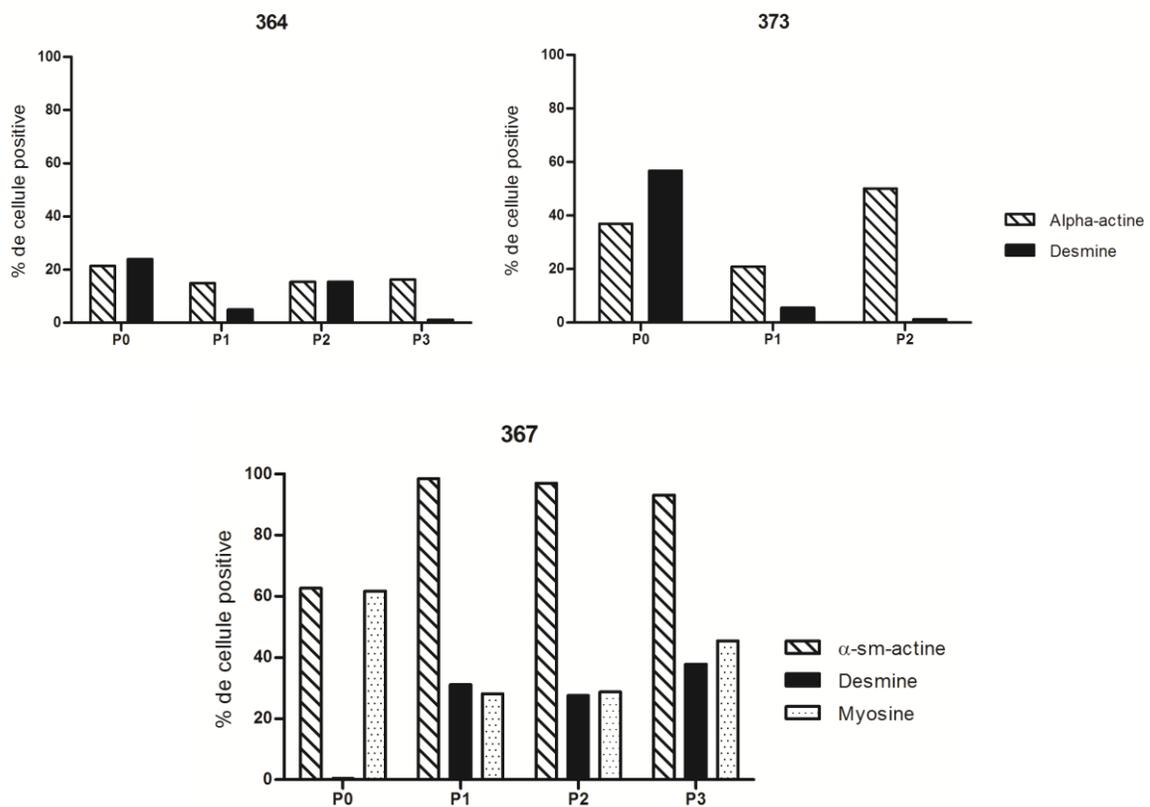
**Figure 24 : Histologie d'une coupe transverse de bronche avant dissection**

Coloration HBS. Échelle 1mm.

### 3.2 Immunofluorescence

Les résultats d'immunofluorescence étaient très hétérogènes et mitigés (**Figure 25**). Les expériences présentées ci-dessous ont été menées parallèlement aux essais à partir de trachée qui

leur ont été préférées. Pour les premiers essais, la myosine n'avait pas encore été sélectionnée comme marqueur pour cette étude. De nombreuses données sont donc manquantes. À P0, l' $\alpha$ -sm-actine est présente dans 20 à 60% des cellules. La desmine n'est pas présente à P0 pour un de nos individus et s'élève à 60%, dépassant l'expression de l' $\alpha$ -sm-actine chez l'individu 373. De plus, nous ne parvenons pas à maintenir le taux d'expression de la desmine sur deux de nos trois individus. La myosine présentait quant à elle un profil intéressant avec un pourcentage à P0 similaire à celui de l' $\alpha$ -sm-actine et un maintien acceptable.



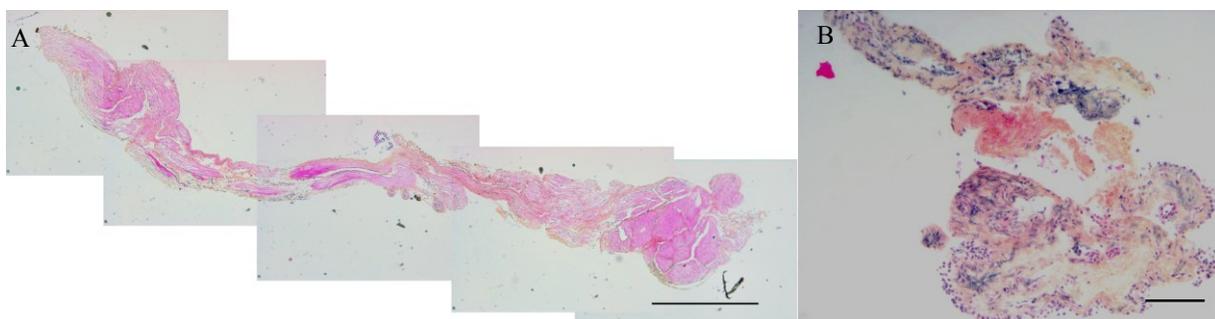
**Figure 25 : Pourcentage d'expression des protéines d'intérêts dans les cellules issues de muscle bronchique par immunofluorescence.**

## 4 Biopsies endobronchiques

Forts de ces observations, nous avons abordé le problème avec les biopsies. Nous avons caractérisé les protéines d'intérêts par histologie, immunofluorescence et cytométrie de flux, procédures auxquelles a été ajoutée une quantification par immunobuvardage, cette technique étant habituellement celle utilisée dans la littérature.

### 4.1 Histologie

L'échantillon a été soumis à l'histologie afin de vérifier la qualité de la dissection.



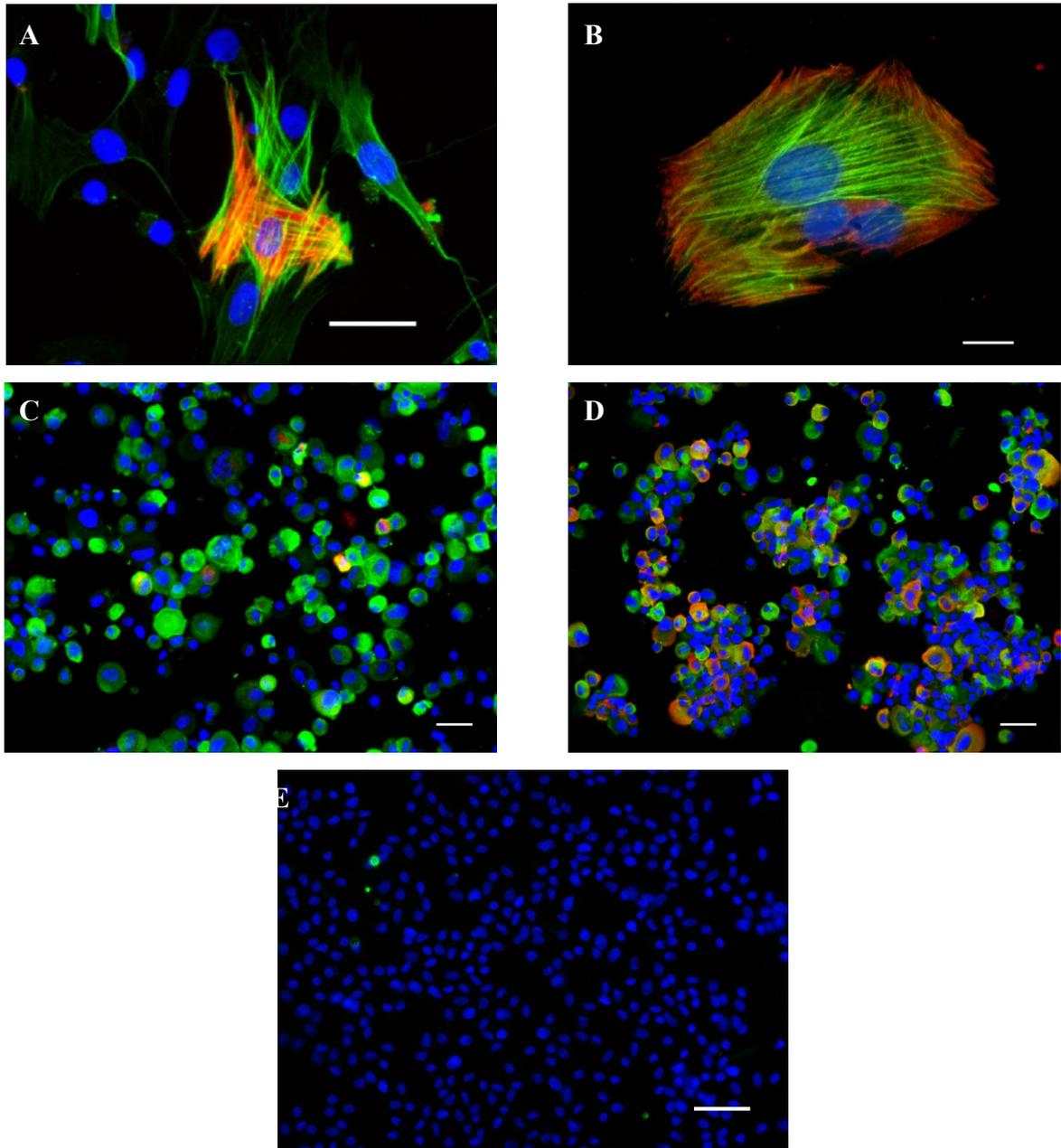
**Figure 26 : Histologie d'une coupe longitudinale de biopsie après dissection**

Coloration HBS. A : Biopsie disséquée présentant une majorité de muscle lisse et un peu de tissu conjonctif.

B : Portion retirée lors de la dissection essentiellement constituée d'épithélium. Échelle 1mm.

Les cellules ainsi obtenues après digestion de la biopsie disséquée, ont été caractérisées par immunofluorescence afin de détecter la présence des protéines d'intérêts. Le passage P0 n'a pas été évalué sur les biopsies, en raison du manque de représentativité de P0 observé avec les trachées et des déchets encore plus nombreux dans le cas des biopsies.

## 4.2 Immunofluorescence



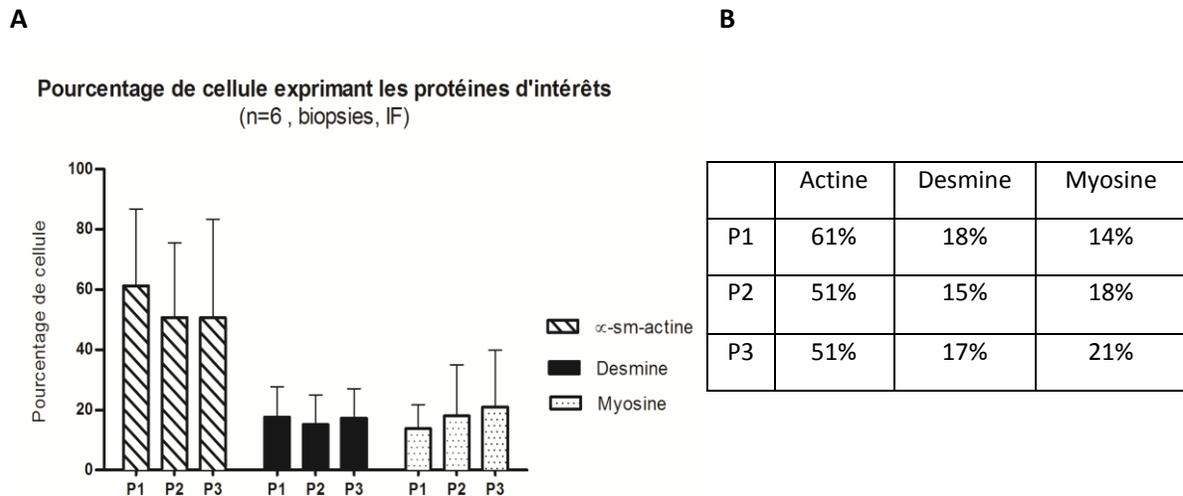
**Figure 27 : Images d'immunofluorescence réalisée sur des cellules musculaires lisses issues de biopsies endobronchiques**

$\alpha$ -sm-actine est marqué en vert tandis que la desmine (A-C) et la myosine (B-D) apparaissent en rouge.

A-B : Cellule musculaire en culture sur des lab-tek. C-D : Cellules musculaires après cytopspin.

E : Contrôle négatif à l'aide d'isotype contrôle. Échelle 5 $\mu$ m.

L'immunofluorescence effectuée sur les cellules issues de biopsies endobronchiques mettait en avant la présence de protéines contractiles (**Figure 27**). La desmine et la myosine ont une répartition intracellulaire différente; la desmine se retrouve de façon homogène à l'intérieur de la cellule (**Figure 27A**), tandis que la myosine est retrouvée au pourtour (**Figure 27B**). Moins visible, ceci reste valable pour les cellules colorées après cytopspin (**Figure 27C-D**).

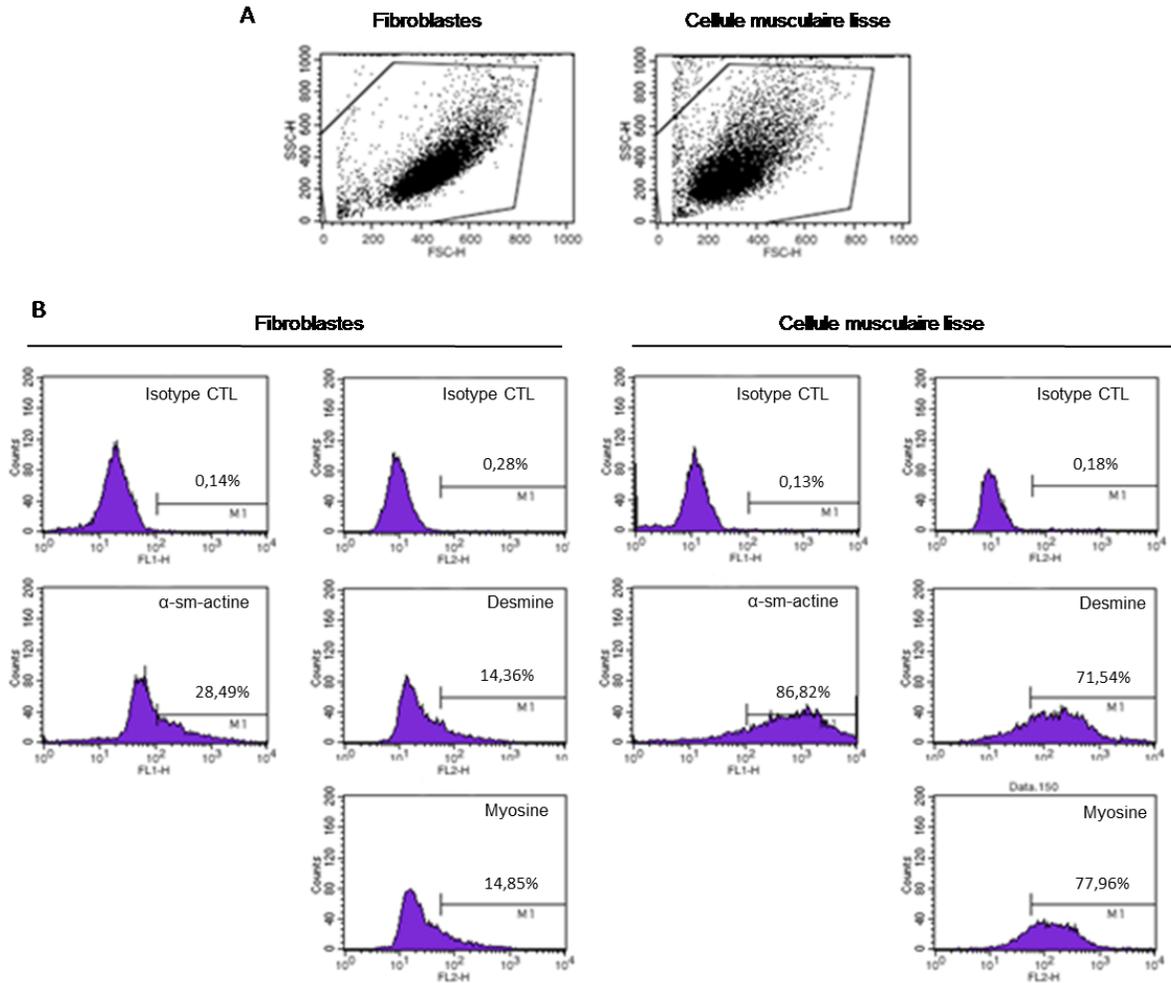


**Figure 28 : Pourcentage d'expression des protéines d'intérêts obtenu par immunofluorescence**

Il n'y avait pas de différence significative entre les différents temps et ceci pour aucune des protéines étudiées (**Figure 28A et B**).

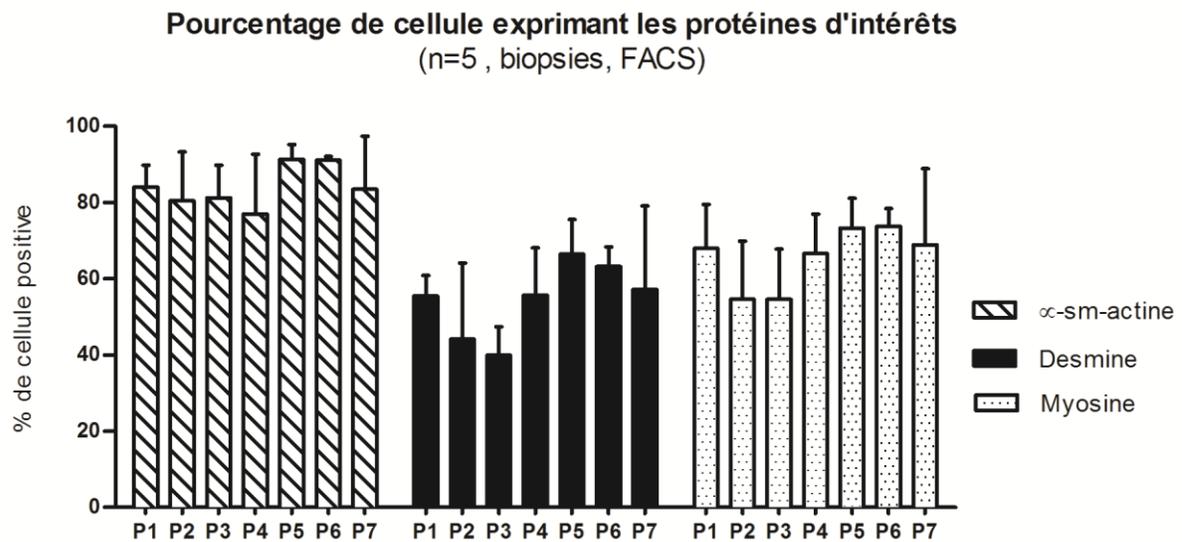
### 4.3 Cytométrie de flux

La culture a été poursuivie jusqu'au 7<sup>ième</sup> passage afin de vérifier la stabilité du phénotype des myocytes provenant de biopsies endobronchiques, et la quantification effectuée à l'aide de la cytométrie de flux.



**Figure 29 : Cytométrie de flux : fibroblastes et muscle lisse**

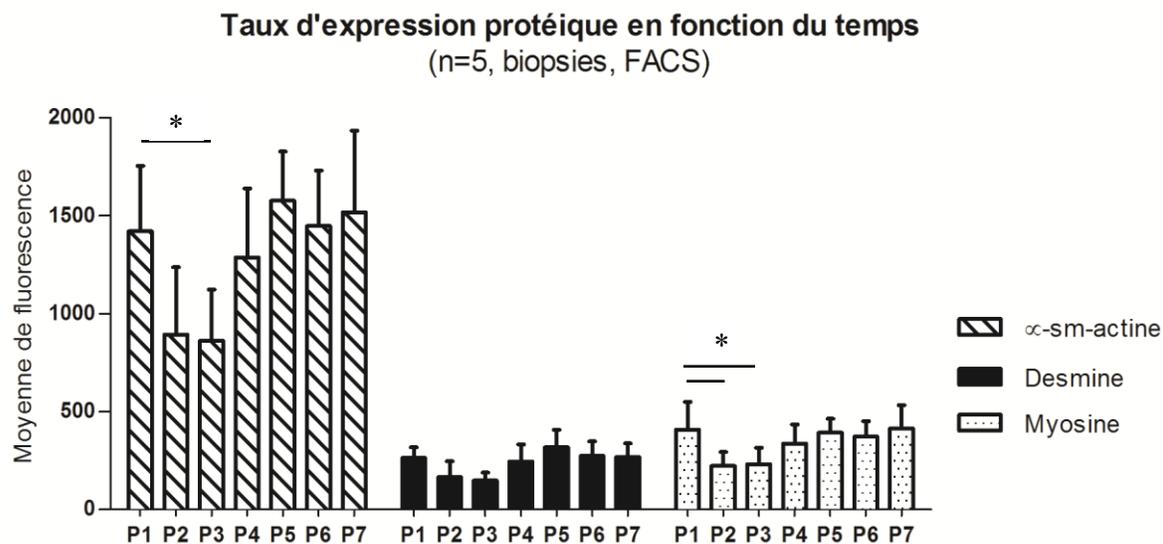
La spécificité de l'immunomarquage a été vérifiée à l'aide d'isotypes contrôles ; moins de 1% des cellules expriment alors les protéines d'intérêts. La **Figure 29** illustre les caractéristiques des cellules. Les cellules utilisées étaient à P1. Les cellules musculaires lisses forment un nuage de points compacts et se différencient des fibroblastes par leurs caractéristiques (FSC et SSC).



	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
$\alpha$ -sm-actine	84%	80%	81%	77%	91%	91%	84%
desmine	55%	44%	40%	56%	66%	63%	57%
myosine	68%	55%	55%	67%	73%	74%	69%

**Figure 30 : Pourcentage de cellules exprimant les protéines d'intérêts par cytométrie de flux à partir de biopsies endobronchiques**

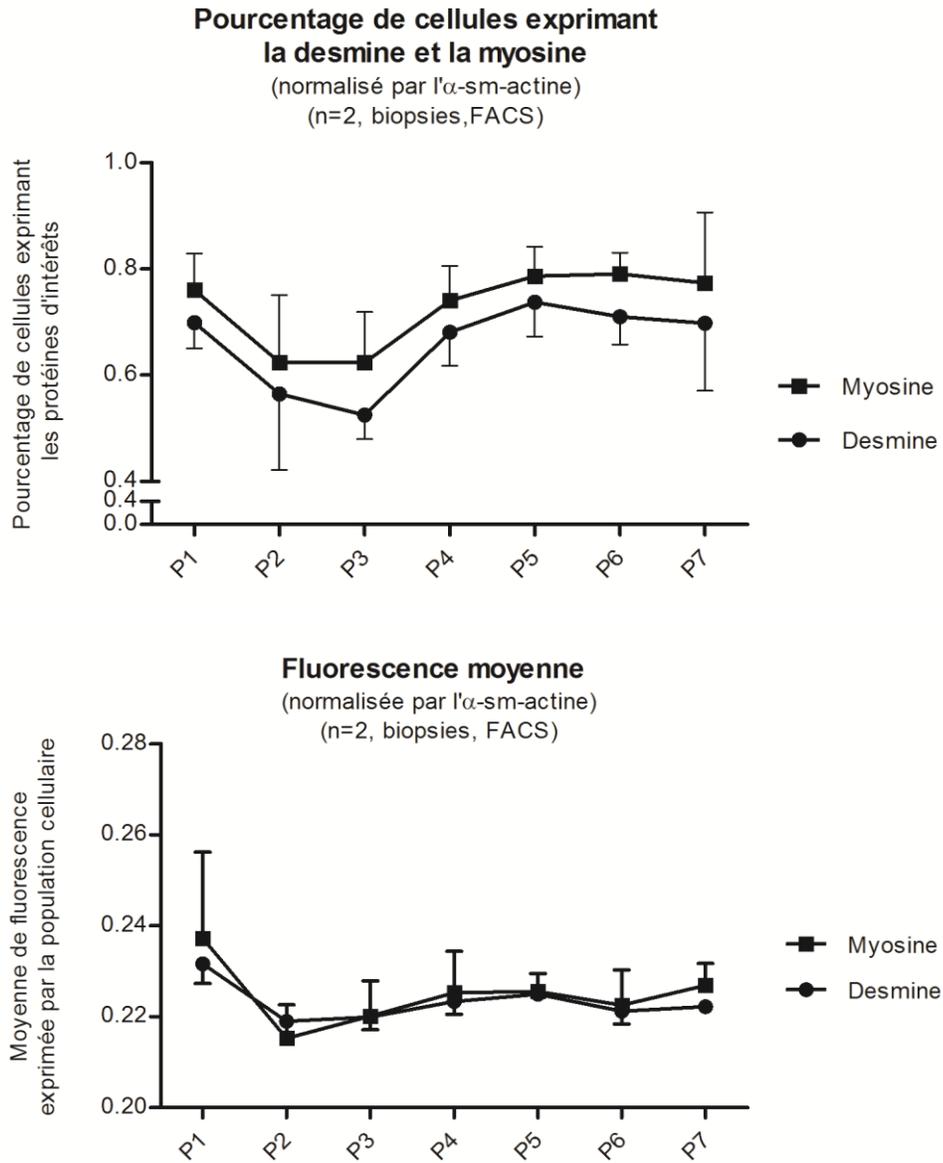
L'expression de l' $\alpha$ -sm-actine ne présentait pas de variation significative au cours des passages. Par ailleurs la desmine ( $p=0.02$ ) et la myosine ( $p=0.006$ ) présentaient une hétérogénéité au sein de leur moyenne, cependant le pourcentage de cellule exprimant la desmine et la myosine à P1 n'était pas significativement différent de celui des autres passages (**Figure 30**).



**Figure 31 : Intensité moyenne de fluorescence exprimée par la population cellulaire issue de biopsies endobronchiques.**

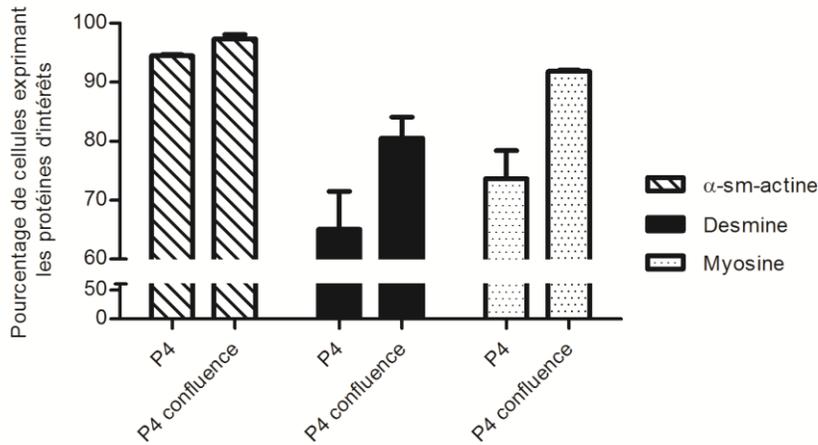
La fluorescence moyenne exprimée par notre population cellulaire, présente pour chacune des protéines d'intérêts une hétérogénéité dans leur moyenne. L' $\alpha$ -sm-actine ( $p=0.03$ ) présente également une différence significative entre P1 et P3. La desmine ( $p=0.01$ ) ne présente pas de différence significative avec P1, tandis que la myosine ( $p=0.005$ ), présente une différence significative entre P1 et P2, et P1 et P3.

L'expression de la desmine et la myosine évoluent de façon très similaire au cours des passages (**Figure 32**).

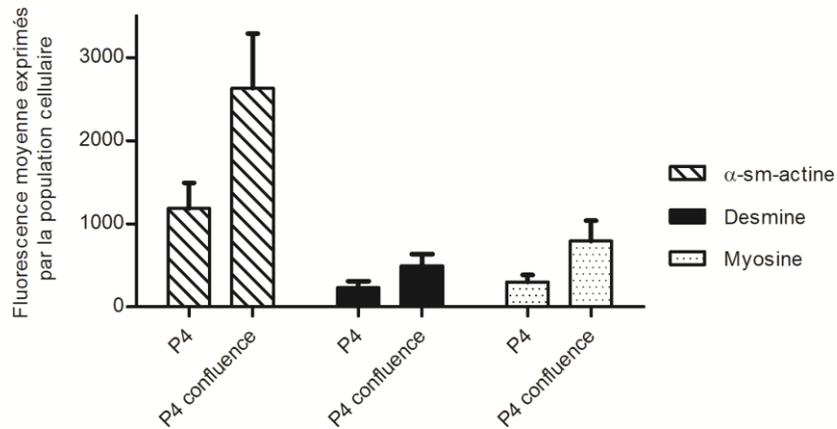


**Figure 32 : Comparaison de l'évolution de la desmine et de la myosine au cours du temps**

**Effet de la confluence sur le taux d'expression protéique**  
(n=2, biopsies, FACS)



**Effet de la confluence sur le taux d'expression protéique**  
(n=2, biopsies, FACS)



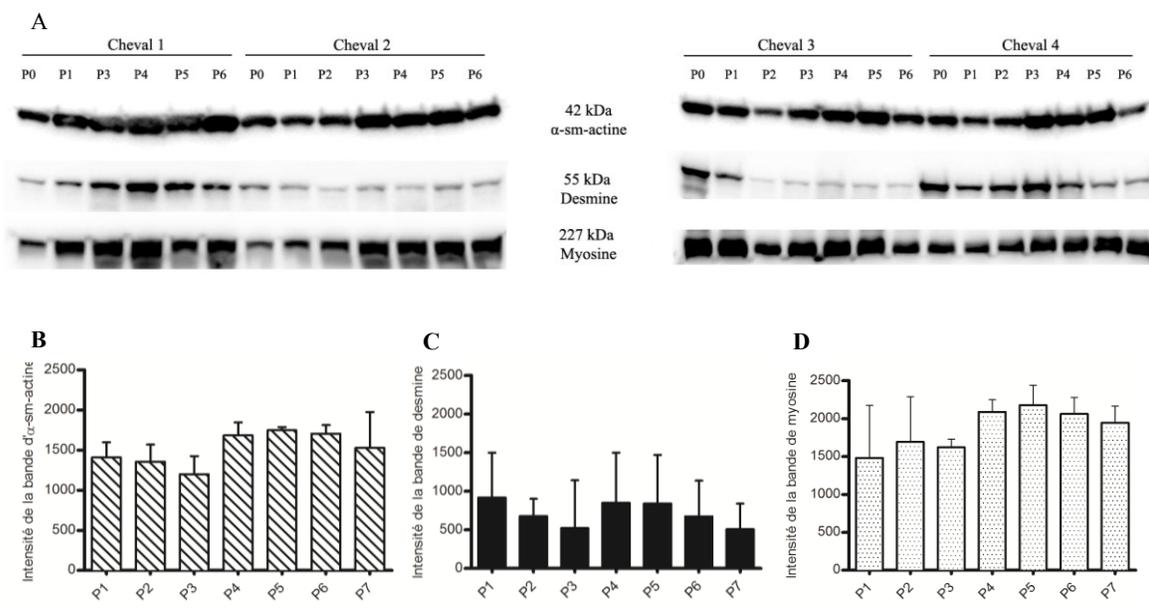
**Figure 33 : Effet de la confluence sur le taux d'expression protéique à P4**

P4 : passage à 80% de confluence, P4confluence : passage après 10 jours à 100% de confluence

La confluence induit une augmentation du pourcentage de cellules exprimant les protéines d'intérêts ainsi que la fluorescence moyenne exprimée par la population. Le nombre de populations testées étant trop faible, aucune analyse statistique n'a pu être effectuée.

## 4.4 Immunobuvardage

Une analyse par immunobuvardage a ensuite été réalisée afin de pouvoir comparer nos résultats à ceux de la littérature. Seul l' $\alpha$ -sm-actine présente une hétérogénéité entre les moyennes des différents passages ( $p=0.04$ ). Les valeurs obtenues à P1 ne sont pas significativement différentes de celle obtenues aux autres passages. La desmine et la myosine ne présente pas de différence significative entre les moyennes de leurs passages.

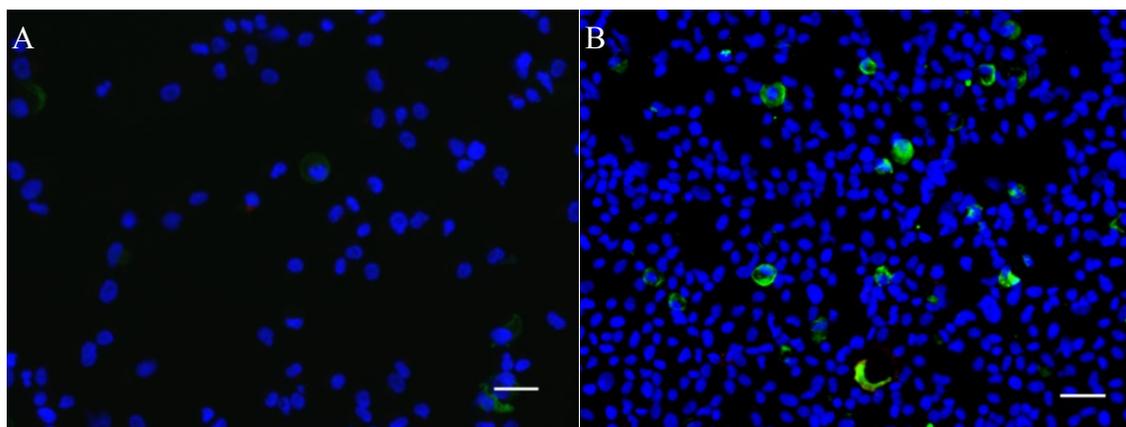


**Figure 34 : Mise en évidence et quantification des protéines d'intérêts par immunobuvardage**

n=4, cellules musculaires issues de biopsies endobronchiques.

## 5 Fibroblastes

### 5.1 Immunofluorescence



**Figure 35 : Image d'immunofluorescence de fibroblastes**

A Marquage de l' $\alpha$ -sm-actine (verte) et de la desmine (rouge). B Marquage de l' $\alpha$ -sm-actine (verte) et de la myosine (rouge). Échelle 5 $\mu$ m.

Les fibroblastes présentent une coloration restreinte pour l'alpha-actine (2.5%) et nulle pour la desmine et myosine.

### 5.2 Cytométrie de Flux

Les résultats obtenus par cytométrie de flux (**Figure 29**) présentent des différences par rapport à ceux obtenus par immunofluorescence; l'alpha-actine est exprimé par 28.49% des cellules tandis que la desmine et la myosine sont exprimés à hauteur de 14.36% et 14.85% respectivement.

## Discussion générale

Notre étude a permis de décrire une méthode d'isolation et de culture des cellules du muscle lisse à partir de biopsies endobronchiques chez le cheval, et leur comportement phénotypique en fonction du temps de culture. Le phénotype contractile a pu être maintenu durant deux mois à un niveau supérieur à celui attendu en regard de la littérature et a pu être caractérisé au cours du temps dans des conditions standardisés.

### Maintien du phénotype contractile

Il est commun dans la littérature de trouver que la culture, notamment à haut taux de FBS (10%), induit une différenciation du muscle lisse vers un phénotype synthétique (Chamley-Campbell, Campbell et al. 1979, Halayko, Salari et al. 1996, Ma, Wang et al. 1998, Hirota, Nguyen et al. 2009). Halayko, Salari et al. (1996) rapporte un pourcentage d' $\alpha$ -sm-actine et de sm-MHC inférieur à 20% avant que la confluence ne soit atteinte. Wong, Woodcock-Mitchell et al. (1998) et Ma, Wang et al. (1998) rapportent une amélioration du phénotype contractile en effectuant une privation de FBS. Seul Halayko, Salari et al. (1996) esquisse une caractérisation du phénotype en estimant un contenu relatif en protéine contractile à partir d'immunobuvardage. Toutefois, ces articles s'appuient essentiellement sur du muscle lisse provenant de trachée. Aucune donnée concernant le phénotype contractile du muscle lisse endobronchique n'a pu être trouvé.

Nos résultats ébranlent quelque peu ces fondements. A partir de muscle trachéal, nous parvenons en effet à obtenir des taux d'expression protéique d' $\alpha$ -sm-actine de 96.4%, accompagnés de taux de desmine et de myosine de 83.7% et 77%. Ces résultats ont été obtenus au 7<sup>ième</sup> passage et en présence de 10% de FBS, alors que les cellules avaient atteints seulement 80% de confluence (**Figure 19**). Ces résultats indiquent un maintien du phénotype contractile dans le temps au travers des mises en cultures successives et malgré la présence de FBS.

Les résultats que nous avons obtenus à partir de biopsies endobronchiques (**Figure 28**, **Figure 30**, **Figure 31**, **Figure 34**) fournissent quant à eux un support pour des études postérieures dans lesquelles le maintien du phénotype contractile serait requis.

Il est possible d'obtenir du muscle lisse en quantité suffisante pour effectuer une culture cellulaire à partir de 8 biopsies endobronchiques. Ce nombre de biopsies est facile à prélever chez le cheval, possible chez l'humain (Vijayanand, Durkin et al. 2010) et répétables dans le temps, ce qui permet de suivre des changements éventuels chez le patient ou d'étudier l'évolution d'une pathologie. La biopsie fournit un matériel composé de cellules dont 84% expriment l'alpha-sm-actine et 68% la myosine; les propriétés contractiles sont donc forts probables. Du point de vue du maintien du phénotype contractile, il n'existe pas de différence entre P1 et l'intervalle P4-P7: le taux d'expression d'alpha-actine varie de 77% à 91%, tandis que ceux de la desmine et de la myosine varient de 66 à 76% et de 67 à 74%, respectivement. Le taux d'expression des protéines contractiles est donc également maintenu élevé malgré la présence de FBS à 10 % dans le milieu. Suite à ces résultats nous proposons l'utilisation des cellules musculaires lisses entre le 4<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> passage, à défaut de pouvoir affirmer que le phénotype se maintient plus longtemps. Les cellules obtenues maintiennent un phénotype contractile et sont utilisables durant au moins 1 mois afin d'effectuer divers tests.

Comparées aux cellules musculaires lisses trachéales, les cellules musculaires lisses issues de biopsies endobronchiques ont un pourcentage de cellule exprimant les protéines d'intérêts inférieurs, le maintien dans le temps est plus difficile à atteindre. Les cellules trachéales ne présentent pas de diminution du pourcentage des protéines d'intérêts à P2-P3 à la cytométrie de flux alors que l'on observe cette baisse pour l'expression moyenne de fluorescence et à l'immunofluorescence. Les cellules issues du muscle lisse endobronchique présentent cette diminution à la cytométrie de flux pour les deux paramètres évalués et à l'immunofluorescence. Les cellules musculaires lisses issues de trachées présentaient post digestion une taille plus importante et une vitesse de croissance plus importante, cependant en culture aucune autre différence n'a pu être mise en évidence visuellement. Leur rôle physiologique et localisation anatomique étant différents, il paraît cohérent que des différences apparaissent d'un point de vue phénotypique.

Le milieu semble primordial dans l'obtention de ces résultats, le milieu commercial de DMEM-F12 (rapport 1 :1) fournissait des résultats inférieurs (**Figure 23**) à notre milieu contenant une DMEM-F12 dans un rapport 3 :1. La diminution du F12 semble donc être essentielle, cependant le milieu commercial n'ayant été testé qu'à une reprise il nous est difficile de conclure sur l'importance de ce paramètre. Le fait qu'il s'agisse d'un modèle équin pourrait être un autre

facteur d'explication du maintien du phénotype contractile, simple supposition aucun contrôle inter-espèce n'ayant été réalisé.

## Représentativité de P0

Les résultats de cette étude soulèvent un certain nombre de questions. L'histologie de la trachée confirme la prédominance de muscle lisse après dissection (**Figure 14**). Cependant nous n'obtenons que 80% de cellule exprimant l' $\alpha$ -sm-actine à l'immunofluorescence. Les autres 20% restant pourraient être composés de cellules épithéliales, de fibroblastes et de cellules immunitaires (lymphocytes et quelques neutrophiles et éosinophiles). Un tel pourcentage (20%) paraît cependant élevé et devient d'autant plus improbable que le pourcentage de cellules n'exprimant pas l' $\alpha$ -sm-actine monte à 50% lorsque évalué avec la cytométrie de flux (**Figure 19**). Lors de l'examen des flasques, le lendemain de l'ensemencement, de nombreux déchets cellulaires restent flottants dans la milieu, ces déchets comprenant un grand nombre de cellules n'ayant pas adhérees, parfois jusqu'à 50%. De nombreux déchets sont présent post-digestion, notamment dus à la lyse de cellules, des noyaux pouvant entre autre être présents hors des cellules, faussant l'estimation directement reliés au nombre de noyaux visibles par marquage au DAPI, et pourraient être à l'origine d'un biais. Visuellement sur les lames d'immunofluorescence aucune cellule polymorphonucléaire n'a pu être mise en évidence. L'évaluation des cellules à P0 ne semblant pas appropriée car faisant l'objet de trop de biais faussant les résultats, le phénotype des cellules musculaires lisses issues de biopsies ne fut évalué qu'à partir de P1. Divers temps de digestion ont été testés (6, 9 et 12h) aucune différence n'a pu être mise en évidence concernant la mortalité, la vitesse de croissance ou le taux d'expression protéique sur les trois premiers passages. Une tendance a tout de même été observée, la digestion de 6h permettant l'obtention d'une solution contenant moins de débris et une morphologie cellulaire plus fusiforme.

La chute de l'expression des marqueurs phénotypiques observée après le premier passage (P1) des cellules issues de trachée soulève également quelques questions (**Figure 15**, **Figure 20**). Une baisse moins marquée est observée avec les cellules issues de biopsies endobronchiques à P2 et P3. Diverses hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ces observations:

1) Il pourrait s'agir d'une conséquence retardée de la digestion, un laps de temps nécessaire aux cellules afin de retrouver un certain équilibre.

2) Il pourrait y avoir une sélection cellulaire, avec la baisse attendue de la population initiale avant qu'une autre population prenne le dessus. Cependant, cela paraît peu probable, aucun changement morphologique n'ayant été observé visuellement dans les flasques en quelques points que ce soit. De plus, le pourcentage de cellules exprimant les protéines d'intérêt à P7 est similaire à celui obtenu initialement.

Une digestion de 9h a tendance à atténuer la diminution d'expression des protéines contractiles à P1 mais ceci de façon non significative.

Une forte différence a été observée entre les résultats d'immunofluorescence et ceux obtenus par cytométrie de flux, et ce, que les cellules aient été prélevées de la trachée ou de biopsies endobronchiques. Nous croyons que la raison principale expliquant ce phénomène serait un manque de sensibilité de la détection de la fluorescence par microscopie. L'immunofluorescence reflétant la fluorescence moyenne par cellule, seule les cellules les plus fortement fluorescentes auraient été considérées positives.

## **Pureté de la population cellulaire obtenue : réflexions**

Un problème récurrent est la difficulté à obtenir une population pure de cellules de muscle lisse après dissection. S'il est aisé d'écartier l'épithélium par dissection (**Figure 14**, **Figure 26**) et par le milieu de culture (les cellules épithéliales requièrent un milieu différent), une contamination par des fibroblastes-myofibroblastes est inévitable. Les fibroblastes/myofibroblastes peuvent exprimer l' $\alpha$ -sm-actine et à un moindre niveau, la desmine (Goldring, Jones et al. 2002) ainsi que la myosine, ce que confirment nos résultats par cytométrie de flux (**Figure 29**). Il n'existe pas non plus de marqueurs permettant de différencier les myofibroblastes des cellules du muscle lisse, tous deux sont capables d'exprimer l' $\alpha$ -sm-actine, la desmine ou la myosine (Rice and Leinwand 2003). Les myofibroblastes ayant une capacité contractile et pouvant se différencier en muscle lisse (Hinz, Phan et al. 2007) sont à considérer comme des cellules du muscle lisse qui passeraient d'un phénotype synthétique à un phénotype contractile.

Il serait donc plus exact de parler d'une population de cellules contractiles provenant de biopsies endobronchiques dans laquelle fibroblastes, myofibroblastes et cellules musculaires lisses jouent leur rôle en équilibre. Ceci est d'autant plus vrai que les caractéristiques des myofibroblastes et les fibroblastes varient selon leur localisation (Kotaru, Schoonover et al. 2006). Des différences ont également été relevées selon la présence ou non d'une pathologie, ainsi les myofibroblastes et les fibroblastes issus de patient malade présentent une structure différente, sont plus invasifs et présentent un taux d'expression  $\alpha$ -sm-actine plus important (Karvonen, Lehtonen et al. 2012). Johnson and Burgess (2004) relèvent qu'il est possible que le muscle lisse lui-même soit un précurseur des myofibroblastes. Par conséquent, si l'intérêt d'une population de cellules de muscle lisse pur diminue dans l'optique de mieux comprendre le rôle du tissu musculaire dans les bronches, l'intérêt pour l'ensemble des cellules présentant le double rôle, synthétique et contractile, ainsi que l'équilibre entre ces deux types cellulaires, grandit.

La corrélation de la morphologie cellulaire avec le contenu protéique cellulaire a été envisagée à partir des lab-teks en immunofluorescence. Ceci s'est révélé irréalisable, la délimitation des cellules, même avec le brightfield, étant difficile et les essais de classification infructueux.

## **Test de déprivation avec ajout d'insuline et test de confluence**

Un premier essai effectué afin d'évaluer l'effet de la confluence sur les cellules du muscle lisse issues de trachée s'est soldé par des résultats non satisfaisants (**Figure 23**). Nous n'avons effectué que 5 jours de confluence versus 10 jours recommandés dans la littérature. Nous avons donc effectué un deuxième essai à partir de cellules issues de biopsies endobronchiques avec 10 jours de déprivation (**Figure 33**) ce qui nous a permis d'observer l'augmentation d'expression protéique précédemment décrite (Ma, Wang et al. 1998, Wong, Woodcock-Mitchell et al. 1998, Halayko, Camoretti-Mercado et al. 1999). Le pourcentage de cellules exprimant l' $\alpha$ -sm-actine augmente de quelques pourcents, tandis que celles exprimant desmine et myosine augmentent de 15% à 20% approximativement. L'expression de la myosine atteint presque celle de l' $\alpha$ -sm-actine. Cette augmentation indique l'induction préférentielle du phénotype contractile, plus de 85% des cellules exprimant alors ce phénotype (**Figure 33**). La fluorescence moyenne elle-même double,

traduisant, en plus d'une augmentation de 15% du nombre de cellule exprimant les protéines contractiles, une augmentation du contenu protéique des cellules exprimant préalablement ces protéines. Ceci soutient l'hypothèse que les deux phénotypes coexistent en équilibre dans une population cellulaire normale tout du moins *in vivo*. Le nombre d'individu impliqué dans ce test était cependant insuffisant pour effectuer des analyses statistiques.

## **Ouvertures et possibilités futures**

Diverses perspectives s'ouvrent en regard de ces résultats :

Tout d'abord, cette étude offre une large gamme de variante (variations du milieu du support de culture, des contraintes) afin de mieux définir les paramètres influençant le muscle lisse. L'étude pourrait être à nouveau effectuée à partir de biopsies endobronchiques de chevaux atteints de souffle, afin de définir s'il existe une différence intrinsèque du phénotype des cellules musculaires lisses qui se maintient au cours des cultures. Elle gagnerait à être complétée par les variations des marqueurs du phénotype synthétique telle la vimentine. Il est possible d'évaluer le comportement des cellules du muscle lisse en co-culture avec des cellules épithéliales provenant d'un cheval sain ou d'un cheval atteint de souffle. Ceci pourrait nous permettre de mettre en évidence l'importance de l'interaction de ces cellules chez les chevaux atteints de souffle et ainsi de par sa similitude avec l'asthme d'améliorer nos connaissances sur cette pathologie.

Afin de se diriger vers un modèle plus physiologique, la reconstruction d'une bronche en 3 dimensions avec l'ensemencement des cellules fibroblastes-myofibroblastes-muscles lisses dans un gel de collagène en co-culture avec un épithélium, semble indiquée. Des tests préliminaires effectués en collaboration avec la Dre Francine Goulet (Loex, Québec) indique la faisabilité du projet.

Dans un second temps, il serait intéressant de suivre les modifications phénotypiques des cellules du muscle lisse de chevaux atteints du souffle, en fonction du développement de la maladie et suite à l'administration des thérapies usuelles. Les biopsies endobronchiques présentent l'avantage d'être répétables dans le temps et fournissent donc la possibilité d'évaluer l'influence du développement et de la chronicité de la pathologie sur le muscle lisse et inversement.

## **Conclusion**

Les biopsies endobronchiques fournissent des cellules dont 90% sont à même d'exprimer un phénotype contractile. Sans contrainte, le phénotype de ces cellules est en équilibre entre phénotype contractile (75% des cellules) et phénotype synthétique (20%). Cette étude permet pour la première fois d'obtenir un maintien réel du phénotype contractile en culture sans manipulation extérieure (matrice, privation). L'étude de ce phénotype est crucial pour la compréhension de nombreuses pathologies tant au niveau du système respiratoire que vasculaire, digestif ou urinaire. Nous espérons donc que ces données permettront une meilleure compréhension du muscle lisse et serviront de base à des études sur le rôle du muscle lisse, l'équilibre de ses phénotypes et ses interactions avec la matrice environnante.

## Bibliographie

- An, S. S., J. Kim, K. Ahn, X. Trepas, K. J. Drake, S. Kumar, G. Ling, C. Purington, T. Rangasamy, T. W. Kensler, W. Mitzner, J. J. Fredberg and S. Biswal (2009). "Cell stiffness, contractile stress and the role of extracellular matrix." Biochem Biophys Res Commun **382**(4): 697-703.
- Auger, F. A., C. A. Lopez Valle, R. Guignard, N. Tremblay, B. Noel, F. Goulet and L. Germain (1995). "Skin equivalent produced with human collagen." In Vitro Cell Dev Biol Anim **31**(6): 432-439.
- Avner, B. P., J. Delongo, S. Wilson and A. J. Ladman (1981). "A method for culturing canine tracheal smooth muscle cells in vitro: morphologic and pharmacologic observations." Anat Rec **200**(3): 357-370.
- Bai, T. R. (1990). "Abnormalities in airway smooth muscle in fatal asthma." Am Rev Respir Dis **141**(3): 552-557.
- Baker, S. C. and J. Southgate (2008). "Towards control of smooth muscle cell differentiation in synthetic 3D scaffolds." Biomaterials **29**(23): 3357-3366.
- Barbato, A., G. Turato, S. Baraldo, E. Bazzan, F. Calabrese, C. Panizzolo, M. E. Zanin, R. Zuin, P. Maestrelli, L. M. Fabbri and M. Saetta (2006). "Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma." Am J Respir Crit Care Med **174**(9): 975-981.
- Beamish, J. A., P. He, K. Kottke-Marchant and R. E. Marchant (2010). "Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering." Tissue Eng Part B Rev **16**(5): 467-491.
- Benayoun, L., A. Druilhe, M. C. Dombret, M. Aubier and M. Pretolani (2003). "Airway structural alterations selectively associated with severe asthma." Am J Respir Crit Care Med **167**(10): 1360-1368.
- Bergner, A. and M. J. Sanderson (2002). "Acetylcholine-induced calcium signaling and contraction of airway smooth muscle cells in lung slices." J Gen Physiol **119**(2): 187-198.
- Bjorck, T., L. E. Gustafsson and S. E. Dahlen (1992). "Isolated bronchi from asthmatics are hyperresponsive to adenosine, which apparently acts indirectly by liberation of leukotrienes and histamine." Am Rev Respir Dis **145**(5): 1087-1091.
- Boccafroschi, F., M. Bosetti, C. Mosca, D. Mantovani and M. Cannas (2012). "The role of shear stress on mechanically stimulated engineered vascular substitutes: influence on mechanical and biological properties." J Tissue Eng Regen Med **6**(1): 60-67.
- Boivin, J. L.-L., A. Vargas, A.-M. Lauzon, J.-P. Lavoie (2013). "Contribution of smooth muscle myosin isoforms to airway obstruction in an equine model of bronchial asthma." Am J Respir Crit Care Med **187**(A4018).
- Bond, M. and A. V. Somlyo (1982). "Dense bodies and actin polarity in vertebrate smooth muscle." J Cell Biol **95**(2 Pt 1): 403-413.
- Brightling, C. E., P. Bradding, F. A. Symon, S. T. Holgate, A. J. Wardlaw and I. D. Pavord (2002). "Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma." N Engl J Med **346**(22): 1699-1705.
- Brown, R. H. and W. Mitzner (1998). "The myth of maximal airway responsiveness in vivo." J Appl Physiol **85**(6): 2012-2017.
- Burgess, J. K., P. R. Johnson, Q. Ge, W. W. Au, M. H. Poniris, B. E. McParland, G. King, M. Roth and J. L. Black (2003). "Expression of connective tissue growth factor in asthmatic airway smooth muscle cells." Am J Respir Crit Care Med **167**(1): 71-77.

Ceresa, C. C., A. J. Knox and S. R. Johnson (2009). "Use of a three-dimensional cell culture model to study airway smooth muscle-mast cell interactions in airway remodeling." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **296**(6): L1059-1066.

Chamley-Campbell, J., G. R. Campbell and R. Ross (1979). "The smooth muscle cell in culture." Physiol Rev **59**(1): 1-61.

Chan, V., J. K. Burgess, J. C. Ratoff, J. O'Connor B, A. Greenough, T. H. Lee and S. J. Hirst (2006). "Extracellular matrix regulates enhanced eotaxin expression in asthmatic airway smooth muscle cells." Am J Respir Crit Care Med **174**(4): 379-385.

Chin, L. Y., Y. Bosse, C. Pascoe, T. L. Hackett, C. Y. Seow and P. D. Pare (2012). "Mechanical properties of asthmatic airway smooth muscle." Eur Respir J.

Connolly, S. C., P. G. Smith, N. J. Fairbank, C. A. Lall, D. J. Cole, J. D. Mackinnon and G. N. Maksym (2011). "Chronic oscillatory strain induces MLCK associated rapid recovery from acute stretch in airway smooth muscle cells." J Appl Physiol.

Crimi, E., R. Pellegrino, M. Milanese and V. Brusasco (2002). "Deep breaths, methacholine, and airway narrowing in healthy and mild asthmatic subjects." J Appl Physiol **93**(4): 1384-1390.

Dekkers, B. G., I. S. Bos, A. J. Halayko, J. Zaagsma and H. Meurs (2010). "The laminin beta1-competing peptide YIGSR induces a hypercontractile, hypoproliferative airway smooth muscle phenotype in an animal model of allergic asthma." Respir Res **11**: 170.

Dekkers, B. G., I. S. Bos, J. Zaagsma and H. Meurs (2011). "Functional consequences of human airway smooth muscle phenotype plasticity." Br J Pharmacol.

Dekkers, B. G., D. Schaafsma, S. A. Nelemans, J. Zaagsma and H. Meurs (2007). "Extracellular matrix proteins differentially regulate airway smooth muscle phenotype and function." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **292**(6): L1405-1413.

Dekkers, B. G., D. Schaafsma, T. Tran, J. Zaagsma and H. Meurs (2009). "Insulin-induced laminin expression promotes a hypercontractile airway smooth muscle phenotype." Am J Respir Cell Mol Biol **41**(4): 494-504.

Ebina, M., T. Takahashi, T. Chiba and M. Motomiya (1993). "Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study." Am Rev Respir Dis **148**(3): 720-726.

Gerber, V., M. King, D. A. Schneider and N. E. Robinson (2000). "Tracheobronchial mucus viscoelasticity during environmental challenge in horses with recurrent airway obstruction." Equine Vet J **32**(5): 411-417.

Goldring, K., G. E. Jones, C. A. Sewry and D. J. Watt (2002). "The muscle-specific marker desmin is expressed in a proportion of human dermal fibroblasts after their exposure to galectin-1." Neuromuscul Disord **12**(2): 183-186.

Goldsmith, A. M., J. K. Bentley, L. Zhou, Y. Jia, K. N. Bitar, D. C. Fingar and M. B. Hersenson (2006). "Transforming growth factor-beta induces airway smooth muscle hypertrophy." Am J Respir Cell Mol Biol **34**(2): 247-254.

Goulet, F., L. P. Boulet, J. Chakir, N. Tremblay, J. Dube, M. Laviolette, M. Boutet, W. Xu, L. Germain and F. A. Auger (1996). "Morphologic and functional properties of bronchial cells isolated from normal and asthmatic subjects." Am J Respir Cell Mol Biol **15**(3): 312-318.

Guillemette, M. D., B. Cui, E. Roy, R. Gauvin, C. J. Giasson, M. B. Esch, P. Carrier, A. Deschambeault, M. Dumoulin, M. Toner, L. Germain, T. Veres and F. A. Auger (2009). "Surface topography induces 3D self-orientation of cells and extracellular matrix resulting in improved tissue function." Integr Biol (Camb) **1**(2): 196-204.

Halayko, A. J., B. Camoretti-Mercado, S. M. Forsythe, J. E. Vieira, R. W. Mitchell, M. E. Wylam, M. B. Hershenson and J. Solway (1999). "Divergent differentiation paths in airway smooth muscle culture: induction of functionally contractile myocytes." Am J Physiol **276**(1 Pt 1): L197-206.

Halayko, A. J., H. Salari, X. Ma and N. L. Stephens (1996). "Markers of airway smooth muscle cell phenotype." Am J Physiol **270**(6 Pt 1): L1040-1051.

Halayko, A. J. and N. L. Stephens (1994). "Potential role for phenotypic modulation of bronchial smooth muscle cells in chronic asthma." Can J Physiol Pharmacol **72**(11): 1448-1457.

Harvey Lodish, A. B., Paul Matsudaira, Chris A. Kaiser, James Darnell (2004). Biologie moléculaire de la cellule. Bruxelles, édition de Boeck Université.

Herrera, A. M., B. E. McParland, A. Bienkowska, R. Tait, P. D. Pare and C. Y. Seow (2005). "'Sarcomeres' of smooth muscle: functional characteristics and ultrastructural evidence." J Cell Sci **118**(Pt 11): 2381-2392.

Herszberg, B., D. Ramos-Barbon, M. Tamaoka, J. G. Martin and J. P. Lavoie (2006). "Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling." J Allergy Clin Immunol **118**(2): 382-388.

Hinz, B., S. H. Phan, V. J. Thannickal, A. Galli, M. L. Bochaton-Piallat and G. Gabbiani (2007). "The myofibroblast: one function, multiple origins." Am J Pathol **170**(6): 1807-1816.

Hirota, J. A., T. T. Nguyen, D. Schaafsma, P. Sharma and T. Tran (2009). "Airway smooth muscle in asthma: phenotype plasticity and function." Pulm Pharmacol Ther **22**(5): 370-378.

Hirst, S. J., J. G. Martin, J. V. Bonacci, V. Chan, E. D. Fixman, Q. A. Hamid, B. Herszberg, J. P. Lavoie, C. G. McVicker, L. M. Moir, T. T. Nguyen, Q. Peng, D. Ramos-Barbon and A. G. Stewart (2004). "Proliferative aspects of airway smooth muscle." J Allergy Clin Immunol **114**(2 Suppl): S2-17.

Hirst, S. J., C. H. Twort and T. H. Lee (2000). "Differential effects of extracellular matrix proteins on human airway smooth muscle cell proliferation and phenotype." Am J Respir Cell Mol Biol **23**(3): 335-344.

Hirst, S. J., T. R. Walker and E. R. Chilvers (2000). "Phenotypic diversity and molecular mechanisms of airway smooth muscle proliferation in asthma." Eur Respir J **16**(1): 159-177.

Holgate, S. T. (2000). "Epithelial damage and response." Clin Exp Allergy **30 Suppl 1**: 37-41.

Jaffar, Z., K. Roberts, A. Pandit, P. Linsley, R. Djukanovic and S. Holgate (1999). "B7 costimulation is required for IL-5 and IL-13 secretion by bronchial biopsy tissue of atopic asthmatic subjects in response to allergen stimulation." Am J Respir Cell Mol Biol **20**(1): 153-162.

James, A. (2005). "Airway remodeling in asthma." Curr Opin Pulm Med **11**(1): 1-6.

James, A. L., T. R. Bai, T. Mauad, M. J. Abramson, M. Dolhnikoff, K. O. McKay, P. S. Maxwell, J. G. Elliot and F. H. Green (2009). "Airway smooth muscle thickness in asthma is related to severity but not duration of asthma." Eur Respir J **34**(5): 1040-1045.

Jeffery, P. K. (1998). "Investigation and assessment of airway and lung inflammation: we now have the tools, what are the questions?" Eur Respir J **11**(3): 524-528.

Jensen, A., H. Atileh, B. Suki, E. P. Ingenito and K. R. Lutchen (2001). "Selected contribution: airway caliber in healthy and asthmatic subjects: effects of bronchial challenge and deep inspirations." J Appl Physiol **91**(1): 506-515; discussion 504-505.

Johnson, P. R. and J. K. Burgess (2004). "Airway smooth muscle and fibroblasts in the pathogenesis of asthma." Curr Allergy Asthma Rep **4**(2): 102-108.

Johnson, P. R., J. K. Burgess, P. A. Underwood, W. Au, M. H. Poniris, M. Tamm, Q. Ge, M. Roth and J. L. Black (2004). "Extracellular matrix proteins modulate asthmatic airway smooth muscle cell proliferation via an autocrine mechanism." J Allergy Clin Immunol **113**(4): 690-696.

Johnson, P. R., M. Roth, M. Tamm, M. Hughes, Q. Ge, G. King, J. K. Burgess and J. L. Black (2001). "Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma." Am J Respir Crit Care Med **164**(3): 474-477.

Kaminska, M., S. Foley, K. Maghni, C. Storness-Bliss, H. Coxson, H. Ghezzi, C. Lemiere, R. Olivenstein, P. Ernst, Q. Hamid and J. Martin (2009). "Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction." J Allergy Clin Immunol **124**(1): 45-51 e41-44.

Karvonen, H. M., S. T. Lehtonen, R. T. Sormunen, T. H. Harju, E. Lappi-Blanco, R. S. Bloigu and R. L. Kaarteenaho (2012). "Myofibroblasts in interstitial lung diseases show diverse electron microscopic and invasive features." Lab Invest **92**(9): 1270-1284.

Khaitlina, S. Y. (2001). "Functional specificity of actin isoforms." Int Rev Cytol **202**: 35-98.

Koch, P. J. and W. W. Franke (1994). "Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules." Curr Opin Cell Biol **6**(5): 682-687.

Kotaru, C., K. J. Schoonover, J. B. Trudeau, M. L. Huynh, X. Zhou, H. Hu and S. E. Wenzel (2006). "Regional fibroblast heterogeneity in the lung: implications for remodeling." Am J Respir Crit Care Med **173**(11): 1208-1215.

Kuo, K. H., A. M. Herrera and C. Y. Seow (2003). "Ultrastructure of airway smooth muscle." Respir Physiol Neurobiol **137**(2-3): 197-208.

Kuo, K. H., A. M. Herrera, L. Wang, P. D. Pare, L. E. Ford, N. L. Stephens and C. Y. Seow (2003). "Structure-function correlation in airway smooth muscle adapted to different lengths." Am J Physiol Cell Physiol **285**(2): C384-390.

Kuo, K. H. and C. Y. Seow (2004). "Contractile filament architecture and force transmission in swine airway smooth muscle." J Cell Sci **117**(Pt 8): 1503-1511.

Lambert, R. K., B. R. Wiggs, K. Kuwano, J. C. Hogg and P. D. Pare (1993). "Functional significance of increased airway smooth muscle in asthma and COPD." J Appl Physiol **74**(6): 2771-2781.

Lange, P., J. Parner, J. Vestbo, P. Schnohr and G. Jensen (1998). "A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma." N Engl J Med **339**(17): 1194-1200.

Leclere, M., A. Lavoie-Lamoureux, E. Gelinias-Lymburner, F. David, J. G. Martin and J. P. Lavoie (2011). "Effect of antigenic exposure on airway smooth muscle remodeling in an equine model of chronic asthma." Am J Respir Cell Mol Biol **45**(1): 181-187.

Leclere, M., A. Lavoie-Lamoureux and J. P. Lavoie (2011). "Heaves, an asthma-like disease of horses." Respirology.

Leguillette, R., F. R. Gil, N. Zitouni, S. Lajoie-Kadoch, A. Sobieszek and A. M. Lauzon (2005). "(+)Insert smooth muscle myosin heavy chain (SM-B) isoform expression in human tissues." Am J Physiol Cell Physiol **289**(5): C1277-1285.

Leguillette, R. and A. M. Lauzon (2008). "Molecular mechanics of smooth muscle contractile proteins in airway hyperresponsiveness and asthma." Proc Am Thorac Soc **5**(1): 40-46.

Leguillette, R., M. Laviolette, C. Bergeron, N. Zitouni, P. Kogut, J. Solway, L. Kachmar, Q. Hamid and A. M. Lauzon (2009). "Myosin, transgelin, and myosin light chain kinase: expression and function in asthma." Am J Respir Crit Care Med **179**(3): 194-204.

Ma, L., M. Brown, P. Kogut, K. Serban, X. Li, J. McConville, B. Chen, J. K. Bentley, M. B. Hershenson, N. Dulin, J. Solway and B. Camoretti-Mercado (2011). "Akt activation induces hypertrophy without contractile phenotypic maturation in airway smooth muscle." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **300**(5): L701-709.

Ma, X., Z. Cheng, H. Kong, Y. Wang, H. Unruh, N. L. Stephens and M. Laviolette (2002). "Changes in biophysical and biochemical properties of single bronchial smooth muscle cells from asthmatic subjects." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**(6): L1181-1189.

Ma, X., Y. Wang and N. L. Stephens (1998). "Serum deprivation induces a unique hypercontractile phenotype of cultured smooth muscle cells." Am J Physiol **274**(5 Pt 1): C1206-1214.

Maksym, G. N., L. Deng, N. J. Fairbank, C. A. Lall and S. C. Connolly (2005). "Beneficial and harmful effects of oscillatory mechanical strain on airway smooth muscle." Can J Physiol Pharmacol **83**(10): 913-922.

Martin, H., Shannon (2004). Physiological basis of respiratory disease.

Matsumoto, H., L. M. Moir, B. G. Oliver, J. K. Burgess, M. Roth, J. L. Black and B. E. McParland (2007). "Comparison of gel contraction mediated by airway smooth muscle cells from patients with and without asthma." Thorax **62**(10): 848-854.

Matsumoto, T., J. Sasaki, E. Alsberg, H. Egusa, H. Yatani and T. Sohmura (2007). "Three-dimensional cell and tissue patterning in a strained fibrin gel system." PLoS One **2**(11): e1211.

Means, A. R., I. C. Bagchi, M. F. VanBerkum and B. E. Kemp (1991). "Regulation of smooth muscle myosin light chain kinase by calmodulin." Adv Exp Med Biol **304**: 11-24.

Meiss, R. A. (1999). "Influence of intercellular tissue connections on airway muscle mechanics." Journal of Applied Physiology **86**(1): 5-15.

Montefort, S., R. Djukanovic, S. T. Holgate and W. R. Roche (1993). "Ciliated cell damage in the bronchial epithelium of asthmatics and non-asthmatics." Clin Exp Allergy **23**(3): 185-189.

Moore, B. J., G. G. King, Y. D'Yachkova, H. R. Ahmad and P. D. Pare (1998). "Mechanism of methacholine dose-response plateaus in normal subjects." Am J Respir Crit Care Med **158**(2): 666-669.

Moore, B. J., L. M. Verburgt, G. G. King and P. D. Pare (1997). "The effect of deep inspiration on methacholine dose-response curves in normal subjects." Am J Respir Crit Care Med **156**(4 Pt 1): 1278-1281.

Morgan, K. G. and S. S. Gangopadhyay (2001). "Invited review: cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins." J Appl Physiol **91**(2): 953-962.

Nichol, J. W., G. C. Engelmayr, Jr., M. Cheng and L. E. Freed (2008). "Co-culture induces alignment in engineered cardiac constructs via MMP-2 expression." Biochem Biophys Res Commun **373**(3): 360-365.

Niimi, A., H. Matsumoto, M. Takemura, T. Ueda, K. Chin and M. Mishima (2003). "Relationship of airway wall thickness to airway sensitivity and airway reactivity in asthma." Am J Respir Crit Care Med **168**(8): 983-988.

O'Byrne, P. M. and M. D. Inman (2003). "Airway hyperresponsiveness." Chest **123**(3 Suppl): 411S-416S.

Panettieri, R. A., Jr. (2001). "Isolation and culture of human airway smooth muscle cells." Methods Mol Med **56**: 155-160.

Pini, L., Q. Hamid, J. Shannon, L. Lemelin, R. Olivenstein, P. Ernst, C. Lemiere, J. G. Martin and M. S. Ludwig (2007). "Differences in proteoglycan deposition in the airways of moderate and severe asthmatics." Eur Respir J **29**(1): 71-77.

Qu, M. J., B. Liu, H. Q. Wang, Z. Q. Yan, B. R. Shen and Z. L. Jiang (2007). "Frequency-dependent phenotype modulation of vascular smooth muscle cells under cyclic mechanical strain." J Vasc Res **44**(5): 345-353.

Rensen, S. S., P. A. Doevendans and G. J. van Eys (2007). "Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity." Neth Heart J **15**(3): 100-108.

- Rice, N. A. and L. A. Leinwand (2003). "Skeletal myosin heavy chain function in cultured lung myofibroblasts." J Cell Biol **163**(1): 119-129.
- Rogers, D. F. (2004). "Airway mucus hypersecretion in asthma: an undervalued pathology?" Curr Opin Pharmacol **4**(3): 241-250.
- Roth, M., P. R. Johnson, P. Borger, M. P. Bihl, J. J. Rudiger, G. G. King, Q. Ge, K. Hostettler, J. K. Burgess, J. L. Black and M. Tamm (2004). "Dysfunctional interaction of C/EBPalpha and the glucocorticoid receptor in asthmatic bronchial smooth-muscle cells." N Engl J Med **351**(6): 560-574.
- Roth, M., P. R. Johnson, J. J. Rudiger, G. G. King, Q. Ge, J. K. Burgess, G. Anderson, M. Tamm and J. L. Black (2002). "Interaction between glucocorticoids and beta2 agonists on bronchial airway smooth muscle cells through synchronised cellular signalling." Lancet **360**(9342): 1293-1299.
- Sakamoto, N., T. Kiuchi and M. Sato (2011). "Development of an endothelial-smooth muscle cell coculture model using phenotype-controlled smooth muscle cells." Ann Biomed Eng **39**(11): 2750-2758.
- Salerno, F. G., M. P. Barbaro, O. Toungousova, E. Carpagnano, P. Guido and A. Spanevello (2009). "The extracellular matrix of the lung and airway responsiveness in asthma." Monaldi Arch Chest Dis **71**(1): 27-30.
- Saotome, A., N. Kanai, T. Nagai, T. Yashiro and S. Tokudome (2003). "Immunohistochemical classification of the localization of laminin in the thickened bronchial epithelial basement membrane of deceased bronchial asthma patients." Respir Med **97**(6): 688-694.
- Schaafsma, D., K. D. McNeill, G. L. Stelmack, R. Gosens, H. A. Baarsma, B. G. Dekkers, E. Frohwark, J. M. Penninks, P. Sharma, K. M. Ens, S. A. Nelemans, J. Zaagsma, A. J. Halayko and H. Meurs (2007). "Insulin increases the expression of contractile phenotypic markers in airway smooth muscle." Am J Physiol Cell Physiol **293**(1): C429-439.
- Seow, C. Y. and J. J. Fredberg (2011). "Emergence of airway smooth muscle functions related to structural malleability." J Appl Physiol **110**(4): 1130-1135.
- Setlakwe, E. L. (2011). Subepithelial collagen content in the peripheral airways of heaves-affected and control horses. Master en sciences vétérinaires, Université de Montréal.
- Siddiqui, S. and J. G. Martin (2008). "Structural aspects of airway remodeling in asthma." Curr Allergy Asthma Rep **8**(6): 540-547.
- Skloot, G., S. Permutt and A. Togias (1995). "Airway hyperresponsiveness in asthma: a problem of limited smooth muscle relaxation with inspiration." J Clin Invest **96**(5): 2393-2403.
- Slats, A. M., K. Janssen, A. van Schadewijk, D. T. van der Plas, R. Schot, J. G. van den Aardweg, J. C. de Jongste, P. S. Hiemstra, T. Mauad, K. F. Rabe and P. J. Sterk (2008). "Expression of smooth muscle and extracellular matrix proteins in relation to airway function in asthma." J Allergy Clin Immunol **121**(5): 1196-1202.
- Small, J. V. (1995). "Structure-Function-Relationships in Smooth-Muscle - the Missing Links." Bioessays **17**(9): 785-792.
- Small, J. V. and M. Gimona (1998). "The cytoskeleton of the vertebrate smooth muscle cell." Acta Physiol Scand **164**(4): 341-348.
- Smith, P. G., R. Garcia and L. Kogerman (1997). "Strain reorganizes focal adhesions and cytoskeleton in cultured airway smooth muscle cells." Exp Cell Res **232**(1): 127-136.
- Smith, P. G., R. Moreno and M. Ikebe (1997). "Strain increases airway smooth muscle contractile and cytoskeletal proteins in vitro." Am J Physiol **272**(1 Pt 1): L20-27.

Smith, P. G., C. Roy, J. Dreger and F. Brozovich (1999). "Mechanical strain increases velocity and extent of shortening in cultured airway smooth muscle cells." Am J Physiol **277**(2 Pt 1): L343-348.

Somlyo, A. P. and A. V. Somlyo (1994). "Signal transduction and regulation in smooth muscle." Nature **372**(6503): 231-236.

Subbarao, P., P. J. Mandhane and M. R. Sears (2009). "Asthma: epidemiology, etiology and risk factors." CMAJ **181**(9): E181-190.

Tom-Moy, M., J. M. Madison, C. A. Jones, P. de Lanerolle and J. K. Brown (1987). "Morphologic characterization of cultured smooth muscle cells isolated from the tracheas of adult dogs." Anat Rec **218**(3): 313-328.

Tran, T., K. D. McNeill, W. T. Gerthoffer, H. Unruh and A. J. Halayko (2006). "Endogenous laminin is required for human airway smooth muscle cell maturation." Respir Res **7**: 117.

Trautmann, A., K. Kruger, M. Akdis, D. Muller-Wening, A. Akkaya, E. B. Brocker, K. Blaser and C. A. Akdis (2005). "Apoptosis and loss of adhesion of bronchial epithelial cells in asthma." Int Arch Allergy Immunol **138**(2): 142-150.

Vijayanand, P., K. Durkin, G. Hartmann, J. Morjaria, G. Seumois, K. J. Staples, D. Hall, C. Bessant, M. Bartholomew, P. H. Howarth, P. S. Friedmann and R. Djukanovic (2010). "Chemokine receptor 4 plays a key role in T cell recruitment into the airways of asthmatic patients." J Immunol **184**(8): 4568-4574.

Wang, J., R. Zohar and C. A. McCulloch (2006). "Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction." Exp Cell Res **312**(3): 205-214.

Wang, R., Q. Li and D. D. Tang (2006). "Role of vimentin in smooth muscle force development." Am J Physiol Cell Physiol **291**(3): C483-489.

Warner, D. O. and S. J. Gunst (1992). "Limitation of maximal bronchoconstriction in living dogs." Am Rev Respir Dis **145**(3): 553-560.

Warshaw, D. M., J. M. Desrosiers, S. S. Work and K. M. Trybus (1990). "Smooth muscle myosin cross-bridge interactions modulate actin filament sliding velocity in vitro." J Cell Biol **111**(2): 453-463.

Weeds, A. G., R. Hall and N. C. Spurway (1975). "Characterization of myosin light chains from histochemically identified fibres of rabbit psoas muscle." FEBS Lett **49**(3): 320-324.

Widdicombe, J. G. (1963). "Regulation of tracheobronchial smooth muscle." Physiol Rev **43**: 1-37.

Wong, J. Z., J. Woodcock-Mitchell, J. Mitchell, P. Rippetoe, S. White, M. Absher, L. Baldor, J. Evans, K. M. McHugh and R. B. Low (1998). "Smooth muscle actin and myosin expression in cultured airway smooth muscle cells." Am J Physiol **274**(5 Pt 1): L786-792.

Woodruff, P. G. (2008). "Gene expression in asthmatic airway smooth muscle." Proc Am Thorac Soc **5**(1): 113-118.

Woodruff, P. G., G. M. Dolganov, R. E. Ferrando, S. Donnelly, S. R. Hays, O. D. Solberg, R. Carter, H. H. Wong, P. S. Cadbury and J. V. Fahy (2004). "Hyperplasia of smooth muscle in mild to moderate asthma without changes in cell size or gene expression." Am J Respir Crit Care Med **169**(9): 1001-1006.

Woolcock, A. J., C. M. Salome and K. Yan (1984). "The shape of the dose-response curve to histamine in asthmatic and normal subjects." Am Rev Respir Dis **130**(1): 71-75.

Wright, D. B., T. Trian, S. Siddiqui, C. D. Pascoe, O. O. Ojo, J. R. Johnson, B. G. Dekkers, S. Dakshinamurti, R. Bagchi, J. K. Burgess and V. Kanabar (2012). "Functional phenotype of airway myocytes from asthmatic airways." Pulm Pharmacol Ther.

Zhang, J., A. M. Herrera, P. D. Pare and C. Y. Seow (2010). "Dense-body aggregates as plastic structures supporting tension in smooth muscle cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **299**(5): L631-638.

Zhou, L., J. Li, A. M. Goldsmith, D. C. Newcomb, D. M. Giannola, R. G. Vosk, E. M. Eves, M. R. Rosner, J. Solway and M. B. Hersenson (2004). "Human bronchial smooth muscle cell lines show a hypertrophic phenotype typical of severe asthma." Am J Respir Crit Care Med **169**(6): 703-711.

Zhou, X., W. Wu, H. Hu, J. Milosevic, K. Konishi, N. Kaminski and S. E. Wenzel (2011). "Genomic Differences Distinguish the Myofibroblast Phenotype of Distal Lung from Airway Fibroblasts." Am J Respir Cell Mol Biol.

## Annexe I : Produits et matériels

### Concernant le milieu :

Pénicilline-Steptomycine	Sigma P4333
DMEM	Invitrogen 12100-046
Ham's F12 nutrient mixture powder	Invitrogen 21700075
Fungizone	Bristol Myers Squibb
FBS Fetal Bovine Serum	Invitrogen 10437-028
MEM Sodium pyruvate solution	Invitrogen 11360-070

### Concernant la digestion et la trypsination :

Collagenase H	Roche 11074059001
Elastase	Cedarlane LS006365
Trypsin inhibitor	Sigma T6522-250MG
Trypsin, 1-300	Biochemical 103140
EDTA	Fisher

### Fournitures:

Tissue culture flask	BD 353109 et 353136
Lab-tek	BD 354114

### Anticorps :

Anticorps primaire dirigé contre $\alpha$ -sm-actine	Sigma : A2547 (mouse)
Anticorps secondaire dirigé contre les anticorps de souris ( $\alpha$ -sm-actine)	Invitrogen : A-11029 (Alexa 488)
Anticorps primaire dirigé contre la desmine	ABCAM ab15200 rabbit polyclonal
Anticorps secondaire dirigé contre les anticorps de lapin (desmine/myosine)	Invitrogen: A-11037 (Alexa 594)

Anticorps dirigé contre la myosine

Biomed TechnologiesBT 562

Concernant les cytopins:

Fisherbrand superfrost + white

Fisher 12-550-15

