

Université de Montréal

**Influence de l'interleukine-4 sur le recrutement des neutrophiles équins
dans un modèle inflammatoire sous-cutané**

par

MIREILLE GODBOUT

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 sciences (M. Sc.)
en sciences vétérinaires option sciences cliniques

Septembre 2015

©Mireille Godbout, 2015

Résumé

Plusieurs conditions allergiques, dont certains phénotypes d'asthme et le souffle équin, sont caractérisées par une infiltration neutrophilique. L'interleukine-4 (IL-4), une cytokine clé de la réponse allergique, pourrait contribuer au recrutement de ces cellules inflammatoires lors de ces pathologies. L'objectif de cette étude était d'évaluer si l'administration sous-cutanée d'IL-4 chez des chevaux sains favorise une réponse neutrophilique locale.

Trois études ont été réalisées pour 1) évaluer l'effet de concentrations cytokiniques différentes (10 ng, 250 ng et 500 ng) et 2) évaluer l'effet de la durée d'incubation (3 h, 6 h, 12 h, 48 h et 7 jours) sur le recrutement des neutrophiles chez 18 chevaux sains. Le matrigel, une matrice protéique solubilisée, a servi de véhicule pour l'administration des cytokines. Un grade histologique semi-quantitatif a été élaboré pour évaluer la neutrophilie tissulaire pour toutes les études, mais nous avons, en outre, ajouté une analyse par cytométrie de flux dans la troisième étude pour valider les grades histologiques.

Nos résultats démontrent que 1) l'IL-4 ne parvient pas à induire une migration neutrophilique significative dans les tissus sous-cutanés de chevaux sains ; 2) la cytométrie de flux s'est révélée être une méthode plus fiable pour estimer la migration des neutrophiles en comparaison avec l'analyse moins sensible des scores histologiques. Nous avons de plus observé que 3) le matrigel entraîne une réaction inflammatoire potentiellement de nature immunogène chez les chevaux.

Cette étude est la première incorporant le matrigel et IL-4 dans un protocole *in vivo* impliquant des chevaux. Ces données suggèrent que l'IL-4 seule ne permet pas le recrutement sous-cutané de neutrophiles chez des chevaux sains.

Mots clés : neutrophiles, IL-4, matrigel, équins, asthme

Abstract

Many allergic conditions, including asthma and equine heaves, are characterized by a neutrophilic inflammation. Interleukin-4 (IL-4) is a cytokine that plays a key role in allergic responses that may contribute to the recruitment of inflammatory cells in these diseases. The objective of this study was to assess the neutrophilic response following a subcutaneous administration of IL-4 in healthy horses.

Three studies were conducted to evaluate the effects 1) of different cytokine concentrations (10 ng, 250 ng and 500 ng) and 2) incubation times (3 h, 6 h, 12 h, 48 h and 7 days) on neutrophil recruitment in 18 healthy horses. A semi-quantitative histological score was developed to assess tissue neutrophilia for all three studies. Flow cytometry analysis was also performed in study 3 in order to validate the histological scoring method.

Our results demonstrate that 1) IL-4 fails to induce significant neutrophilic migration and 2) flow cytometry has proved to be a more reliable method in estimating neutrophil migration when compared to histological scoring, which lacked sensitivity. We also observed that 3) matrigel causes an inflammatory reaction in horses, possibly of immunogenic nature.

These are the first studies incorporating matrigel and IL-4 in an in vivo protocol involving horses. Our data suggests that IL-4 alone does not induce neutrophil recruitment in the skin of healthy horses.

Key words : neutrophils, IL-4, matrigel, equine, asthma

Table des matières

RÉSUMÉ	II
ABSTRACT	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VIII
REMERCIEMENTS	XII
INTRODUCTION	1
RECENSION DES ÉCRITS	4
LE SOUFFLE	5
<i>Définition, signes et symptômes</i>	5
<i>Histopathologie et cytologie</i>	6
<i>Profil inflammatoire</i>	6
LE NEUTROPHILE	8
<i>Granulopoïèse et types de granules</i>	8
<i>Recrutement, activation et processus de dégranulation</i>	11
<i>Chimiotaxie et molécules</i>	15
Chimiokines et récepteurs.....	16
Toll-like receptors (TLR).....	17
Formyl peptide receptors (FPR).....	18
<i>Cinétique</i>	18
<i>Clairance</i>	19
<i>Neutrophiles équins</i>	20
L'INTERLEUKINE-4 (IL-4)	22
<i>Rôles de l'IL-4</i>	23
<i>IL-4 et neutrophile</i>	26
CORNING® MATRIGEL® BASEMENT MEMBRANE MATRIX	28
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	31
ARTICLE	32
ABSTRACT	34
KEYWORDS	35
HIGHLIGHTS	35
1. INTRODUCTION	36
2. MATERIAL AND METHODS	38
2.1 Animals	38
2.2 Reagents	38
2.3 In vivo sub-study 1	38
2.4 In vivo sub-study 2	39

2.5 <i>In vivo</i> sub-study 3	40
2.6 Histology and quantification of neutrophil response	40
2.7 Flow cytometry	43
2.8 Statistical analysis.....	44
3. RESULTS	44
3.1 Technical variables.....	44
3.2 Clinical response.....	45
3.3 Sub-study 1	46
3.4 Sub-study 2	48
3.5 Sub-study 3	49
4. DISCUSSION	52
5. ACKNOWLEDGEMENTS	59
REFERENCES.....	60
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	66
CINÉTIQUE CELLULAIRE ET RÉPONSE AUX CYTOKINES	67
MATRIGEL ET MODÈLE SOUS-CUTANÉ.....	70
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	73
BIBLIOGRAPHIE	76

Liste des tableaux

Tableau I. Sommaire des protocoles d'administration d'IL-4 <i>in vivo</i>	69
----------------------------------------------------------------------------------------	----

Liste des figures

Figure 1. Granulopoïèse du neutrophile	9
Figure 2. Molécules d'adhésion et de transmigration	13
Figure 3. Les étapes du processus de transmigration	14
Figure 4. Polarisation du neutrophile.....	15
Figure 5. Chimiokines du neutrophile	17
Figure 6. Structure de l'IL-4 humaine	22

Liste des abréviations

ALI	Acute lung injury / syndrome de détresse respiratoire aiguë
bFGF	Basic fibroblast growth factor / facteur de croissance de base des fibroblastes
BPI	Bactericidal/permeability-increasing protein / protéine accentuant l'activité bactéricide
C/EBP α	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
C5a	Complement component 5a / fragment du complément C5a
CD	Cluster of differentiation / cluster de différenciation
CMH	Major histocompatibility complex / complexe majeur d'histocompatibilité
CR1	Complement-receptor 1 / récepteur du complément-1
Cys	Cystein / cystéine
EGF	Epidermal growth factor / facteur de croissance épidermique
ELANE	Neutrophilic elastase / élastase neutrophilique
ELAM	Endothelial-leukocyte adhesion molecule / E-sélectine
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay / méthode immuno-enzymatique ELISA
ELR+	Glutamin-leucin-arginin motif / motif glutamine-leucine-arginine
ESAM	Endothelial selective adhesion molecule / molécule sélective d'adhésion endothéliale
FGF	Fibroblast growth factor / facteur de croissance des fibroblastes
FMLP	Formyl-methionyl-leucyl-phenilalanine
FPR	Formylated peptide receptor / récepteur aux peptides formylés
FPRL	Formylated peptide receptor-like / récepteur semblable au récepteur de peptides formylés
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor / stimulant de colonies granulocytes
GFI-1	Growth factor independent transcription repressor / répresseur indépendant de la transcription du facteur de croissance
GLYCAM-1	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule / molécule d'adhésion cellulaire dépendante de la glycosylation
GM-CSF	Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor / stimulant de colonies granulocytes-macrophages
HGF	Hepatocyte growth factor / facteur de croissance des hépatocytes

ICAM	Intracellular adhesion molecule / molécule d'adhésion intra-cellulaire
Ig	Immunoglobulin / immunoglobuline
IGF	Insuline-like growth factor / facteur de croissance analogue à l'insuline
IL	Interleukin / interleukine
ILC2	Innate lymphoid cells-2 / cellule lymphoïde innée-2
INF- γ	Interferon gamma
IRM	Imagerie par resonance magnétique
JAMS	Junctional adhesion molecules / molécule d'adhésion jonctionnelle
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LEF-1	Lymphoid enhancer-binding factor 1 / facteur 1 renforçant la fixation lymphoïde
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1 / antigène 1 associé à la fonction lymphocytaire
LPS	Lipopolysaccharide
Lt	Leukotriene / leukotriène
MAC-1	Macrophage-1 antigen / antigène macrophage-1
MAPK	Mitogen activated protein kinase / protéine kinase active par un mitogène
MCP	Monocyte chemoattractant protein / protéine chimiotactique pour les monocytes
MIP	Macrophage inflammatory protein / protéine inflammatoire des macrophages
MMP	Matrix Metalloproteinase / métalloprotéinases matricielles
MPO	Myeloperoxydase / myélopéroxydase
MPOC	Maladie pulmonaire obstructive chronique
NET	Neutrophil extracellular trap / pièges extracellulaires du neutrophile
PAF	Platelet activation factor / facteur d'activation plaquettaire
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule / molécule d'adhésion des cellules endothéliales-plaquettaires
PFC	Perfluorocarbon / perfluorocarbone
PGP	Proline-glycine-proline
PRR	Peptide recognition receptor / récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1 / glycoprotéine ligand-1 de P-sélectine

PVR	Poliovirus receptor / récepteur de poliovirus
RAO	Recurrent airway obstruction / obstruction récurrente des voies aériennes
reqIL-4	Recombinant equine interleukine-4 / interleukine-4 recombinante équine
reqIL-8	Recombinant equine interleukine-8 / interleukine-8 recombinante équine
s.c.	Sub-cutaneous / sous-cutané
TCR	T-cell receptor / récepteur des cellules T
Th	Lymphocyte T-helper / lymphocyte T-auxiliaire
TIMP	Tissue inhibitors of metalloprotease / inhibiteur tissulaire des métalloprotéases
TLR	Toll-like receptor / récepteur de type Toll
TNF	Tumor necrosis factor / facteur de nécrose tumorale
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin / lymphopoïétine stromale thymique
VCAM	Vascular cell adhesion molecule / molécule d'adhésion cellulaire vasculaire
VEGF	Vascular endothelial growth factor / facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

« The Mad Hatter: Have I gone mad?

*Alice: I'm afraid so. You're entirely
bonkers. But I'll tell you a secret...*

All the best people are »

Remerciements

J'aimerais, en premier lieu, remercier mon directeur de recherche, Dr Jean-Pierre Lavoie, pour m'avoir donné la chance de rejoindre son équipe et de mener à terme un projet qui m'a beaucoup tenu à cœur. J'admire votre rigueur scientifique, votre soif de connaissances et votre cheminement professionnel, tant en recherche qu'en clinique. Merci pour votre confiance, votre écoute, votre humanité et votre disponibilité à (quasi) toute heure du jour! Ce projet, avec ses hauts et ses bas, a forgé mon cheminement académique et a révélé chez moi une persévérance insoupçonnée. Ma carrière vétérinaire sera sans aucun doute empreinte des expériences que j'ai acquises au cours de ces quatre années passées au laboratoire, et je vous en suis éternellement reconnaissante.

Un énorme merci à mes collègues du laboratoire, présents et passés, pour leur gentillesse, leurs conseils, leur soutien et leur écoute : Amandine, pour ton dévouement, ta bonne humeur, ton esprit rassembleur et le fait que tu sois toujours là pour prêter main forte. Michela, pour avoir été ma référence dans tout ce qui constituait les tâches plus cliniques, pour ta discipline et ton esprit terre à terre, pour ton amour des chevaux et parce que tu as su m'aider maintes et maintes fois malgré ton horaire chargé. Catheryna, Mylène et Yoana, je n'aurais pu réussir ce projet sans votre aide à la ferme! Anouk, merci pour l'étincelle du départ. Émilie, merci pour ton amitié et pour ta complicité. Roxane, tes desserts ont égayé tellement de lundis! Isabelle, Véronique, Paméla, Alex, Mohammed et Patricia, merci!

Aux collaborateurs du projet, Dr Pierre Hélie et Guy Beauchamp, pour leurs conseils, leur temps et leur expertise, sincères remerciements.

Je remercie les organismes subventionnaires, sans qui l'avancement de la recherche ne serait pas possible. Vous m'avez permis de parfaire mes connaissances et de développer des compétences professionnelles qui me seront utiles tout au long de ma carrière, merci.

Un merci tout spécial et chaleureux à mes amis que j'aime tant. C'était prévisible, j'écris ces mots non sans verser quelques larmes. Jessica, Marie-Pier, Laurianne, Caro, Kim, Anne-Elyse, Catherine, Florence, Marie-Claude : nos folies, nos rires partagés, votre soutien inconditionnel et vos encouragements ont fait toute la différence. Phil, Phil et Guillaume : sans cette maîtrise, nous ne serions sans doute pas aussi complices! Chabod : comment te remercier assez? Malgré

nos chemins qui se sont séparés, je ne serais pas la personne que je suis sans toi. Ta patience, ta compréhension et ta générosité sans bornes ont fait en sorte que j'écris ces mots présentement. Merci du fond du cœur.

Merci enfin à mes parents, Denis et Camilla, pour leur amour à tous les instants, pour leurs encouragements, leur écoute et pour avoir cru en mes projets fous. Vous m'avez fait le plus beau des cadeaux, celui de toujours croire en moi, et de me laisser tracer mon propre chemin, malgré mes mille et un détours, la tête un peu dans les nuages. « I will write it on the walls of the world, so that the sun won't fade away, the words I say to you: I love you ».

Je vous aime.

Introduction

Les maladies respiratoires chroniques affectent des centaines de millions de personnes quotidiennement et, selon l'Organisation mondiale de la Santé, 235 millions d'entre elles souffrent d'asthme¹. Souvent difficile à traiter, l'asthme sévit partout dans le monde - c'est d'ailleurs la maladie chronique la plus répandue chez les enfants. Les éléments caractéristiques de l'asthme sont bien décrits, à savoir une hyperréactivité bronchique, une inflammation chronique et un remodelage tissulaire au niveau des voies respiratoires, un profil inflammatoire principalement de type Th2 et la production subséquente d'IgE, puisque la majorité des cas d'asthme sont associés à une réponse allergique. Une proportion substantielle de ces patients démontre une infiltration neutrophilique marquée des voies respiratoires. Les symptômes associés à ce sous-type d'asthme sont généralement plus sévères, ce qui diminue grandement la qualité de vie des patients affectés. En dépit des caractéristiques cliniques similaires, les différents phénotypes d'asthme ne répondent pas de la même façon aux traitements - ainsi, les asthmatiques neutrophiliques sont souvent peu sensibles aux thérapies conventionnelles, et leurs options de traitement sont limitées.

Parallèlement, une pathologie affectant les chevaux partage plusieurs aspects de l'asthme. Le cheval atteint du souffle est alors proposé comme modèle animal de l'asthme pour plusieurs raisons : 1) le souffle est une pathologie naturelle chez cette espèce, ce qui permet l'étude de changements structuraux complexes et chroniques, 2) la taille du cheval et le volume pulmonaire équin sont importants et facilitent l'étude de plusieurs de ses composantes simultanément, 3) la longévité de l'espèce permet des études à long terme, 4) la rémission peut être induite, et 5) la neutrophilie pulmonaire est caractéristique du souffle.

La prédominance des neutrophiles dans les voies respiratoires des chevaux atteints du souffle et de certains patients asthmatiques, ainsi que les dommages tissulaires qui lui sont associés nous amènent à vouloir comprendre davantage les éléments responsables du recrutement des neutrophiles et de leur activation. Bien que classiquement peu associées avec le neutrophile, les cytokines impliquées dans la cascade inflammatoire allergique Th2 se sont avérées une piste intéressante : notre groupe a récemment démontré que l'interleukine-4 (IL-4), une cytokine au rôle prédominant du profil Th2, active le neutrophile *ex vivo*. De plus, l'expression de cytokines de type Th2 est augmentée au niveau des lymphocytes pulmonaires de

¹ Organisation mondiale de la Santé, Affections respiratoires chroniques, 2013

chevaux atteints du souffle par rapport aux chevaux contrôlés, ce qui corrobore l'hypothèse du profil inflammatoire allergique. Par contre, il n'en demeure pas moins que le rôle de l'IL-4 dans le recrutement des neutrophiles demeure peu étudié.

Le contexte de cette recherche a donc pour but de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents au recrutement neutrophilique et, plus précisément, de définir le rôle de l'IL-4 dans cette réponse. Compte tenu de la forte neutrophilie pulmonaire observée chez les chevaux atteints du souffle et la présence d'IL-4 dans leur poumon, nous avons émis l'hypothèse que le neutrophile fait partie de l'éventail de cellules stimulées par l'IL-4 et qu'il répondra à l'effet chimiotactique de cette cytokine. Plus spécifiquement, nous voulons :

1. Déterminer le rôle chimiotactique de l'IL-4 tissulaire chez des chevaux sains
2. Élaborer un protocole d'administration de cytokines pro-inflammatoires chez des chevaux vivants afin de permettre l'étude de l'IL-4 de façon sécuritaire et efficace.

Recension des écrits

Le Souffle

Définition, signes et symptômes

Le souffle (*heaves, recurrent airway obstruction, RAO*) est l'une des pathologies respiratoires chroniques les plus communes qui afflige naturellement le cheval adulte vivant en région tempérée, notamment en Amérique du Nord et en Europe. Les causes exactes de son développement ne sont pas encore connues et, bien que les études épidémiologiques se font rares, on estime sa prévalence à environ 14% en Grande-Bretagne [1]. À l'instar de l'asthme chez l'homme, son caractère spontané en fait un problème de santé respiratoire significatif et fort étudié. La maladie semble d'ailleurs, elle aussi, résulter d'interactions complexes combinant une prédisposition génétique à des facteurs environnementaux [2-4], dans des proportions mal connues, le tout menant à une réaction inflammatoire de type allergique chronique [5-8]. En effet, on croit que certains individus seraient génétiquement susceptibles de développer la maladie et que, advenant les conditions propices, un environnement riche en antigènes, par exemple, on verrait alors apparaître les symptômes du souffle.

La maladie comporte des signes et symptômes lui conférant son phénotype typique (revu dans [9, 10]). Elle est caractérisée par une inflammation et une obstruction récurrente des voies respiratoires inférieures ainsi qu'une réponse exagérée à divers antigènes (*airway hyper-responsiveness, AHR*) [11]. Chez les chevaux susceptibles de développer la maladie ou chez les individus déjà atteints, les signes cliniques sont d'ailleurs déclenchés, entretenus, voire aggravés par une exposition à des particules poussiéreuses, retrouvées dans les écuries, particulièrement celles associées au foin et aux moisissures. Dans les débuts du développement pathologique, on remarque généralement une toux et une intolérance croissante à l'exercice. S'en suit un effort respiratoire qui devient de plus en plus marqué au repos en raison de l'inflammation, des bronchospasmes et d'une accumulation de mucus. Lorsque la maladie progresse, les nasaux se dilatent, le cou s'allonge, les muscles abdominaux sont plus proéminents, l'animal perd du poids, les écoulements nasaux sont plus importants et les épisodes de toux, plus fréquents. Il va sans dire que la pathologie en est une de domestication de par son lien étroit entre l'exacerbation des signes cliniques et la régie d'écurie. On note d'ailleurs une réversibilité des symptômes lorsque l'environnement du patient est adapté adéquatement; le degré de rémission variant selon l'âge de l'individu atteint, la sévérité de ses signes cliniques ainsi que le temps écoulé depuis le diagnostic. À cet effet, le retrait de la source antigénique s'avère primordial à la

rémission puisqu'elle est en grande partie responsable de l'avènement du souffle. On a souvent recours à la mise au pâturage, ou, si le cheval y a un accès restreint, à une litière de copeaux de bois (versus paille) et au foin en cubes texturés (versus foin traditionnel). Une pathologie moins étudiée, mais similaire au souffle, le "summer pasture-associated obstructive pulmonary disease" (SPAOPD), est quant à elle rencontrée chez les chevaux au pâturage en été. Suivant une tendance saisonnière, on l'associerait aux conditions environnementales (chaudes et humides) ainsi qu'à des allergènes retrouvés en plus grande proportion durant les mois d'été (pollen, fongi, etc) [12]. Les signes cliniques et les compositions cellulaires inflammatoires pulmonaires étant similaires, on suppose des mécanismes pathologiques communs avec le souffle [13].

Histopathologie et cytologie

Typiquement, pour caractériser les éléments qui interviennent dans la pathologie et les changements structuraux au poumon chez les chevaux atteints du souffle, on étudie, entre autres, la cytologie des lavages bronchoalvéolaires (LBA) et les coupes histologiques de tissus bronchiques. La cytologie du LBA, procédure effectuée de routine dans un contexte clinique, présente généralement un pourcentage de neutrophiles >25% (normal \leq 5%) (revu dans [9, 10]) [14]. Plusieurs changements histologiques pulmonaires ont été rapportés (revu dans [9, 10]). Lorsque les chevaux sont en période exacerbée de la maladie, en plus des neutrophiles, la lumière des bronchioles et des alvéoles présente une accumulation de mucus. Cet amas mucoïde semble corrélé de façon positive avec l'état inflammatoire pulmonaire, tout comme la métaplasie/hyperplasie des cellules caliciformes [15-17]. De plus, les cellules bronchiolaires exocrines (*club cells*) perdent leurs granules [15] et il y a métaplasie des cellules épithéliales. L'espace péribronchiolaire, quant à lui, voit sa population lymphocytaire et plasmocytaire augmenter, subit des dépôts de collagène (fibrose) [18] et une augmentation de masse de muscle lisse [19, 20].

Profil inflammatoire

Lorsqu'on s'interroge sur les causes de l'inflammation, plusieurs antigènes semblent jouer un rôle dans le développement de la pathologie, dont des moisissures, des endotoxines, des acariens et des composés inorganiques (revu dans [9]). Cependant, il n'est pas clair si l'hyper-réactivité bronchique est inhérente à l'exposition aux particules poussiéreuses ou si, en revanche, c'est l'inflammation des voies aériennes qui provoque cette sensibilisation accrue.

Le cheval atteint du souffle présente généralement des concentrations plus élevées d'IgE dans les LBA [21] et le sérum [22], ce qui corrobore la conception de réaction allergique énoncée précédemment, plus précisément celle d'hypersensibilité de type I. En réalité, la classification ne semble pas aussi nette, puisque malgré la présence de ces immunoglobulines caractéristiques, le cheval atteint du souffle ne manifeste pas de réaction immédiate lorsqu'on l'expose aux antigènes (en comparaison aux chevaux sains) [23]. En temps normal, il y a libération rapide - entre 10 et 20 minutes - des facteurs induisant la réaction allergique aiguë, telle l'histamine, ce qui n'est pas observé dans le souffle. Le recrutement neutrophilique observé environ 4 à 6 heures post-exposition [24], pourrait s'expliquer par une réponse semi-retardée de type 1, laquelle ne requiert pas nécessairement de phase aiguë, tel que précédemment reconnue [25]. Le profil d'hypersensibilité de type III, souvent décrit par la maladie du poumon du fermier (*farmer's lung disease*) a aussi été suggéré de par son lien avec l'exposition au foin riche en moisissures, la production d'IgG et l'invasion neutrophilique retardée identifiées chez le souffle. Malgré ces similarités, le souffle n'est pas caractérisé par de la fièvre ou le développement de granulomes pulmonaires [26]. De plus, les complexes antigène-anticorps (précipitines) révélés typiquement dans la maladie du poumon de fermier, ne le sont pas dans le souffle [27].

Les lymphocytes T-auxiliaires (*T-helper, Th*) semblent aussi avoir un rôle important à jouer dans la pathologie, notamment dans le processus inflammatoire. Les cellules T activées sécrètent des cytokines qui stimulent, à leur tour, d'autres lymphocytes. Dans le souffle, une réaction inflammatoire de type Th2 semble prédominer [5, 6]. L'IL-4, IL-5 et IL-13, des cytokines produites par les Th2, ont d'ailleurs été associées à l'inflammation allergique. L'augmentation de l'expression d'ARNm d'IL-4, IL-5, et la diminution d'IFN- γ (*interféron gamma*) a été confirmée en analysant les lymphocytes recueilli dans les LBA de chevaux atteints du souffle; ces données renforcent donc l'hypothèse avancée associant le souffle à une réaction inflammatoire allergique [5, 6, 13]. Inversement, d'autres études ont démontré un profil plutôt de type Th1, avec augmentation d'expression d'ARNm d'IFN- γ mais sans changements de l'IL-4 ou de l'IL-13 [7, 28, 29]. Les résultats contradictoires pourraient être le résultat de méthodologies et protocoles différents, ou d'une immunopathologie complexe et variée. En ce sens, une augmentation de l'expression d'ARNm d'IL-17 a également été observée chez les chevaux atteints de souffle en crise, ce qui permet de croire qu'une réponse Th17 contribue aussi à la pathologie [30, 31].

Le neutrophile

Lorsqu'un pathogène traverse la barrière cutanée ou une muqueuse, et pénètre l'organisme, tout un arsenal de défense se met en place pour l'éliminer. Le neutrophile, un type leucocytaire de la famille des granulocytes - qui comprend aussi l'éosinophile et le basophile - fait partie de cette première ligne de défense du système immunitaire inné. Telle une sentinelle, le neutrophile répond à l'appel très rapidement et effectue deux tâches importantes : 1) la neutralisation d'agents infectieux par la sécrétion de protéines cytotoxiques ou par phagocytose, et 2) la sécrétion de cytokines pour, en outre, amplifier la réponse immunitaire. Par contre, c'est une arme à double tranchant : l'accumulation et la suractivation des neutrophiles peut causer des dommages tissulaires, voire être fatale dans certains cas. Étant la cellule leucocytaire la plus abondante dans la circulation sanguine, le neutrophile est retrouvé en proportion de 60-75% chez les carnivores, et environ 50% chez le cheval. D'une grosseur de 10 à 20 μm , il comprend un noyau multi-lobulé, un petit appareil de Golgi, parfois un petit réticulum endoplasmique rugueux et quelques mitochondries, en plus des granules caractéristiques [32]. Sa présence prépondérante dans la maladie du souffle ainsi que les dommages tissulaires qui lui sont associés nous amènent à vouloir comprendre davantage les éléments responsables de son recrutement et de son activation.

Granulopoïèse et types de granules

Le neutrophile, tout comme ses granulocytes homologues, origine d'une cellule souche myéloïde - le myéloblaste - qui dérive d'une cellule souche pluripotente donnant naissance à tous les leucocytes (**Figure 1**). Il se développe, dans la moelle osseuse et passe par plusieurs formes cellulaires immatures à partir du myéloblaste : promyélocyte, myélocyte, métamyélocyte, neutrophile immature non segmenté (*band form*) et finalement le neutrophile mature, dans l'ordre [33](revu dans[34]). Le processus est continu afin d'assurer un flot constant de cellules. Les étapes de différenciation, le taux de production et l'expression des gènes myéloïdes sont régulés par des effets combinés de facteurs de croissance hématopoïétiques, dont des facteurs de transcription ($C/EBP\alpha$, Gfi1, LEF-1, etc) [35], des cytokines (G-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-6, etc) [36-39] et, semble-t-il, des micro-ARN (miR-181, miR-142, miR-223, miR-27) [40, 41].

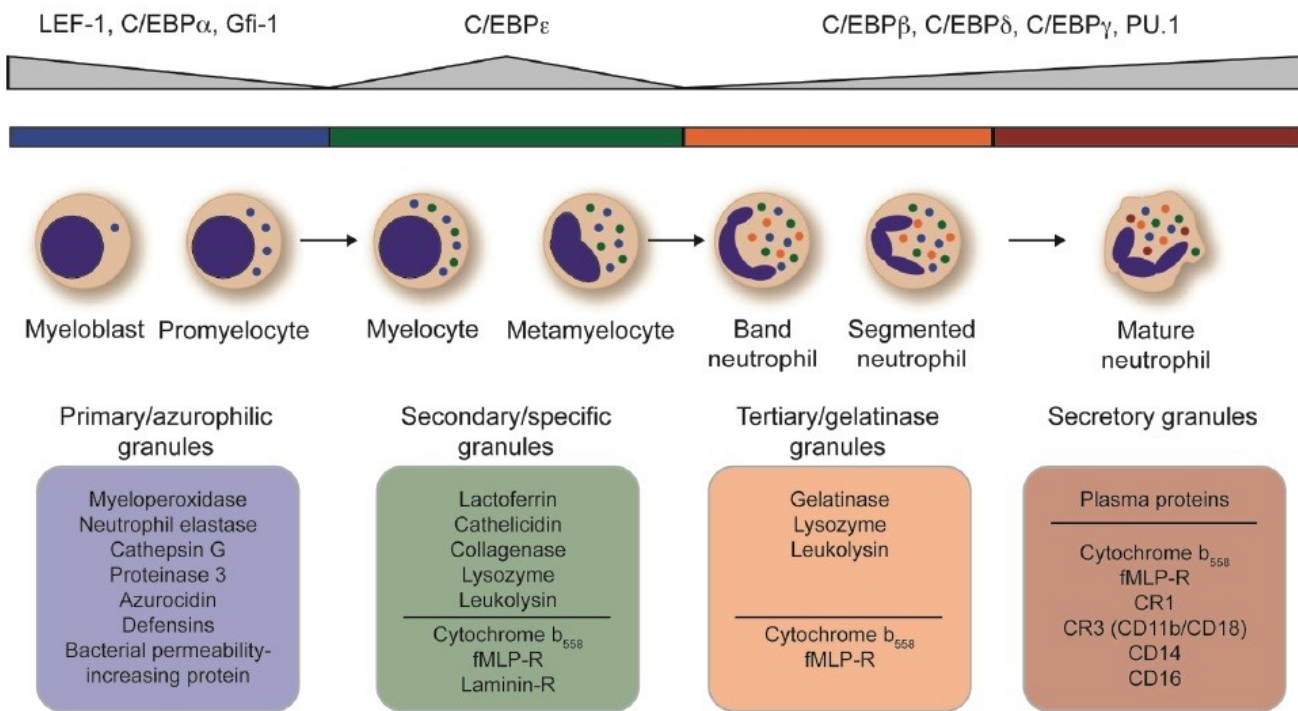


Figure 1. Granulopoïèse du neutrophile

Séquence de synthèse des protéines contenues dans les différents types de granules et les facteurs de transcription impliqués à chaque étape.

Tiré de Fiedler et Brunner, 2012 [35]

Les granules et leurs protéines associées (**Figure 1**), en plus de leurs propriétés antimicrobiennes et cytotoxiques chez le neutrophile mature, ont aussi un rôle important lors des étapes de différenciation de la cellule dans la moelle osseuse. Elles sont classifiées selon leur contenu protéinique (dont la biosynthèse dépend de l'étape de différenciation du neutrophile) ainsi qu'en regard de leur hiérarchie d'exocytose à la suite de l'activation de la cellule, à savoir quelles granules sont libérées plus facilement ou en premier [42-45]. Le neutrophile qui passe du myéloblaste au promyélocyte perd sa capacité de division et commence la formation granules primaires dites azurophiles. Ces granules se développent lorsque les vésicules de transport immatures se détachent de l'appareil de Golgi et fusionnent [46]. Elles sont définies par une teneur élevée en myéloperoxydase (*MPO*), BPI (*Bactericidal/permeability-increasing protein*), défensines, et une famille de sérine-protéases, incluant la cathepsine G, l'élastase neutrophilique (*ELANE*) et la protéinase 3 [35, 47]. L'exocytose des granules primaires est généralement limitée [42] et on a longtemps cru qu'elles contribuaient essentiellement à la

dégradation intracellulaire de micro-organismes dans le phagolysosome [47]. En plus de leur activité bactéricide, cependant, on a récemment mis en lumière que ses sérine-protéases auraient un rôle important lors de processus inflammatoires non-infectieux, notamment pour moduler la réponse immunitaire en interagissant de concert avec des chimiokines et en activant certains récepteurs cellulaires [47].

La production de MPO entraîne la transition promyélocyte/myélocyte et les granules qui seront produites à partir de cette étape en seront donc dépourvues. On en distingue deux types : les granules secondaires (ou "spécifiques") et les granules tertiaires (ou "gélatinases"). Le développement des myélocytes et métamyélocytes est défini par le début de la segmentation nucléaire ainsi que des granules secondaires, lesquelles seront produites jusqu'au stade du neutrophile segmenté. Pour ces raisons, elles ont des protéines communes à celles des granules tertiaires, qui sont formées chez le neutrophile segmenté. Les granules spécifiques contiennent des concentrations importantes de lactoferrine, de cathélicidine, de collagénase, en plus de leukolysine et de lysozyme [35, 47]. Elles ont principalement des effets antimicrobiens [46].

Les granules tertiaires, pour leur part, sont formées lors des dernières étapes de différenciation cellulaire, au moment où le noyau est bien segmenté [35]. Leur exocytose est la plus facile, et elles sont avant tout caractérisées par leur contenu élevé en gélatinase, en leukolysine et en lysozyme [35]. Plus simplement, elles sont riches en enzymes capables de dégrader de la matrice extracellulaire et riches en récepteurs membranaires requis lors de processus d'extravasation et de diapédèse [46].

La gélatinase (*MMP-9*), retrouvée principalement dans les granules tertiaires, fait partie de la famille des métalloprotéinases (*MMP*) retrouvées chez le neutrophile (comprenant aussi la collagénase (*MMP-8*) et la leukolysine (*MMP-25*)). Les *MMP* neutrophiliques sont les principales responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire, dont le collagène, la fibronectine, les protéoglycanes, la laminine et la gélatine. On leur accorde donc un rôle capital dans la dégradation des structures vasculaires et interstitielles associées à la migration neutrophilique, ce qui peut évidemment contribuer aux dommages et remodelages tissulaires lors d'inflammation chronique [48, 49]. Les *MMP* promeuvent aussi l'angiogénèse, souvent associée au remodelage [50, 51]. Heureusement, l'activité protéolytique des *MMP* est contrôlée par des inhibiteurs physiologiques, les *TIMP* (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) qui possèdent également des propriétés trophiques ou, à l'inverse, apoptiques [48]. La rupture de l'équilibre

TIMP - MMP est en outre un élément prédominant dans certaines maladies pulmonaires inflammatoires, dont l'asthme, la fibrose pulmonaire, le syndrome de détresse respiratoire aiguë [52] et l'ALI (*acute lung injury*) [53]. Certaines MMP semblent également être impliquées dans le souffle [54, 55].

Une fois à maturité, une portion des neutrophiles migre vers la circulation, mais la plupart demeure dans la moelle osseuse comme réserve (revu dans [56]). Dans les vaisseaux sanguins, là aussi, une part des neutrophiles circulants seront plaqués contre les parois vasculaires et ainsi "entreposés" dans les lits capillaires de certains tissus et organes, notamment dans la rate, le foie et le poumon (revu dans [57]). C'est ce qu'on appelle les secteurs marginaux de neutrophiles (*marginated pools*). Ces réserves neutrophiliques permettent une mobilisation rapide et importante des cellules advenant une situation de stress ou d'infection [58]. Semerad *et al.* estiment qu'en moyenne, environ 1-2% des neutrophiles totaux sont en circulation chez la souris, dans des conditions basales [58]. Chez l'homme, Athens *et al.*, avancent pour leur part que 65×10^7 granulocytes/kg sont en circulation, dont environ la moitié seraient dans ces secteurs marginaux. Divers facteurs peuvent influencer la proportion de neutrophiles retrouvés dans chaque compartiment, dont le stress, une infection, l'exercice et des substances exogènes tels les glucocorticoïdes [59].

Le secteur marginal pulmonaire nous intéresse spécialement étant donné le rôle prédominant de cet organe dans la maladie du souffle, ainsi que l'effet potentiellement destructeur et inflammatoire que peut causer la migration massive de neutrophiles dans les tissus pulmonaires [60]. Le réseau perfusant le poumon, avec ses quelques 1000 segments vasculaires par alvéole [61], est l'un des plus importants de l'organisme. Le diamètre des capillaires étant souvent plus petit que la taille des neutrophiles, on comprend vite le transit ralenti et le trafic important de neutrophiles à travers ces tissus (revu dans [60, 62]). Par contre, l'importance, voire l'existence du secteur marginal pulmonaire est controversée puisqu'aucune technique n'a été éprouvée pour évaluer son contenu neutrophilique sans biais. La revue la plus récente conclue que le *pool* existe, mais qu'il n'est peut-être pas aussi important qu'on le prétend et qu'il peut varier selon les espèces (revu dans [63]).

Recrutement, activation et processus de dégranulation

Le neutrophile parcourt les lits vasculaires à l'affût de messages chimiques inflammatoires transmis par les cellules endothéliales, principalement au niveau des veinules

post-capillaires, mais aussi dans les capillaires pulmonaires [64]. Pour ce faire, il roule lâchement sur les parois des vaisseaux. Lorsqu'une cellule endothéliale est stimulée par des médiateurs inflammatoires, elle libère le contenu de ses granules à sa surface. Les ligands endothéliaux (dont CD34, GlyCAM-1) [65, 66] sont alors exposés et entrent en contact avec les L-sélectines du neutrophile. Ces interactions entre les molécules d'adhésion sont réversibles et marquent le début du processus de transmigration afin d'amener le neutrophile au site endommagé ou infecté [67] (**Figures 2 et 3**). La réversibilité de l'adhésion provient surtout du fait que les L-sélectines du neutrophile sont naturellement et successivement rompues, de sorte que plus le neutrophile est âgé, moins il en a. Parallèlement, des bloqueurs de L-sélectine empêchent l'adhésion des neutrophiles à la paroi, mais dépendamment de la force de stimulus inflammatoire, ne limitent pas nécessairement la transmigration [68]. Puis, des ligands constitutifs au neutrophile, PSGL-1, renforcent la liaison et interagissent plus fortement avec la P-sélectine endothéliale, permettant aux cellules de ralentir peu à peu leur vitesse de roulement et d'adhérer plus fermement à la paroi. Des interactions entre PSGL-1 et les L-sélectines ont aussi lieu directement entre les neutrophiles activés sur la paroi vasculaire et les neutrophiles circulants, ce qui amène un recrutement "secondaire" de cellules [69]. Au même moment, la cellule endothéliale exprime l'E-sélectine qui entretient davantage le lien entre le neutrophile et la paroi vasculaire [65].

La deuxième étape, l'adhésion ferme, s'amorce lorsque les cellules endothéliales libèrent des facteurs activant les neutrophiles adhérents, et lorsque le roulement des neutrophiles s'arrête. Des chimiokines, principalement l'IL-8, et des molécules chimiotactiques, dont PAF (*platelet-activating factor*), complément C5a, leucotriène LTB₄, Peptides formylés dérivés de bactéries (ex: *fMLP*) [67], MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), MIP-1 β (*macrophage inflammatory protein-1*), GM-CSF [64] ou lipopolysaccharide (*LPS*) [70] agissent de concert et induisent une activation et une adhésion rapide du neutrophile. L'adhésion faible médiée par les L-sélectines est alors convertie en adhésion ferme grâce aux intégrines constitutives du neutrophile [Mac-1 (α M β 2; CD11b/CD18), LFA-1 (α L β 2; CD11a/CD18) et parfois VLA-4 (α 4 β 1)] pouvant maintenant être exprimées, qui se lient à des molécules d'adhésion de la famille des immunoglobulines [ICAM-1, ICAM-2 (*Intercellular Adhesion Molecule 1 et 2*), VCAM-1 (*Vascular cell adhesion protein 1*)] sur l'endothélium [64, 67].

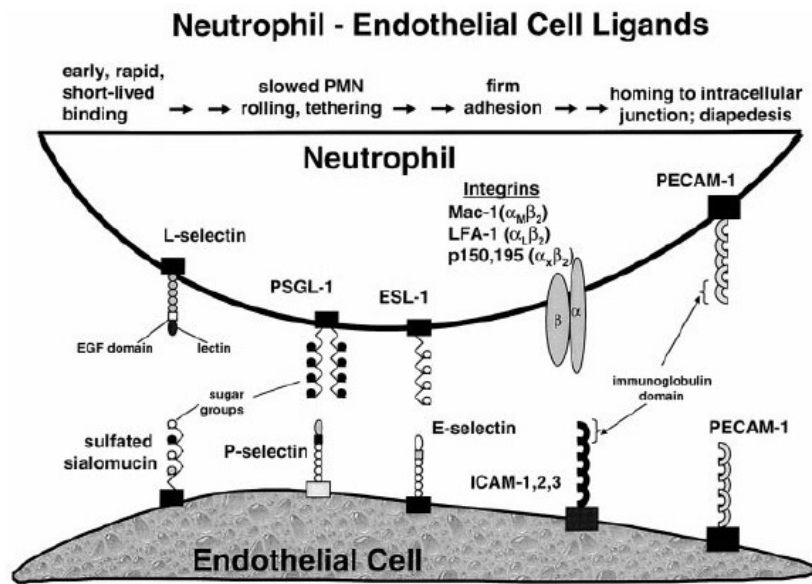


Figure 2. Molécules d'adhésion et de transmigration
 Interactions principales impliquées selon l'étape de transmigration.
 Tiré de Wagner et al., 2000 [68]

L'activation des neutrophiles se traduit par des changements phénotypiques et l'exocytose de ses granules, comme mentionné précédemment. C'est d'ailleurs le processus de dégranulation qui permet aux vésicules sécrétrices, une forme de réservoir de récepteurs membranaires, d'exposer les intégrines à la surface du neutrophile, en plus d'une variété d'autres récepteurs qui serviront, notamment, à reconnaître et phagocyter les microorganismes au site inflammatoire (CR1 (*complement receptor 1*), FPR (*formylated peptide receptor*), CD14 (*LPS/lipoteichoic acid-receptor*), FcγIII receptor CD16, etc) [46].

Une fois le neutrophile bien adhérent à la paroi, une vitesse nulle et la dégranulation entamée, le processus de transmigration commence. Le neutrophile "rampe" le long de la paroi endothéliale grâce à ses intégrines Mac-1 et LFA-1 à la recherche d'un site optimal à la diapédèse [67], soit une jonction cellule-cellule, préférentiellement. La migration paracellulaire fait intervenir diverses molécules d'adhésion afin de, rappelons-le, permettre au neutrophile de traverser la barrière endothéliale. Les cadhérines endothéliales (*VE-cadherins*) des jonctions adhérentes constituent l'obstacle principal au passage des neutrophiles. Des études démontrent que des lacunes transitoires se forment pendant la diapédèse [67, 71]. Les jonctions serrées, pour leur part, sont constituées surtout de JAMs (*junctional adhesion molecules*). Outre leur

propension à interagir de manière homophile, les JAMs peuvent servir de contre-récepteurs aux intégrines - JAM-A se lie plus facilement à LFA-1 et JAM-C, à Mac-1 [67]. Les molécules d'adhésion PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule; CD31*) sont exprimées par les neutrophiles, les plaquettes et l'endothélium [67, 68, 71]. Leur adhésion homophile est l'une des plus importantes et les mieux étudiées dans le processus de transmigration - en vertu de leur regroupement aux jonctions intercellulaires, PECAM-1 signalerait entre autres aux neutrophiles les sites propices à la transmigration [68]. Récemment, de nouvelles molécules ont été rapportées avoir un rôle à jouer dans le mécanisme : ESAM (Endothelial selective adhesion molecule), CD99, et PVR/CD155 [72].

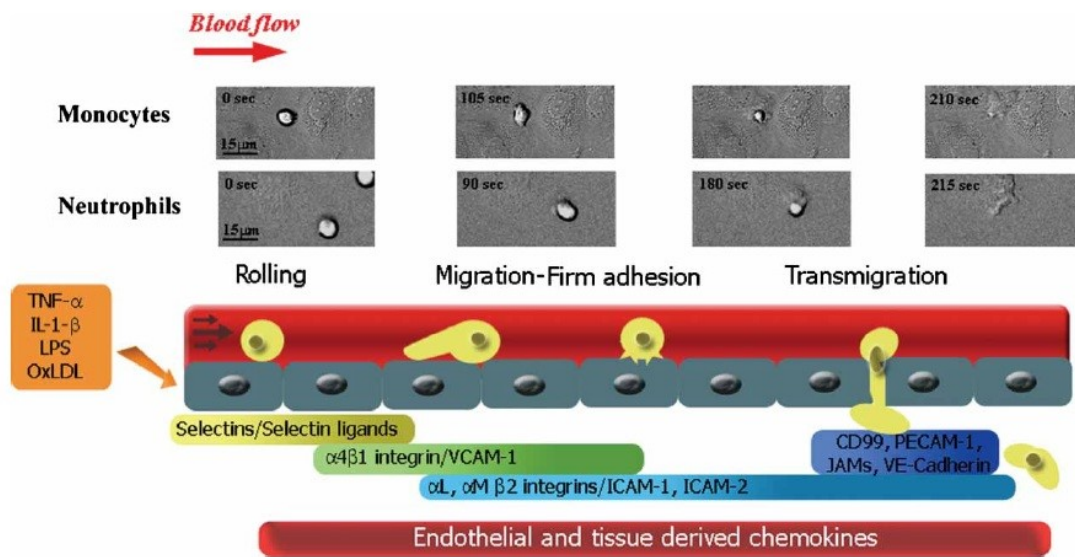


Figure 3. Les étapes du processus de transmigration

Séquence chronologique et molécules impliquées

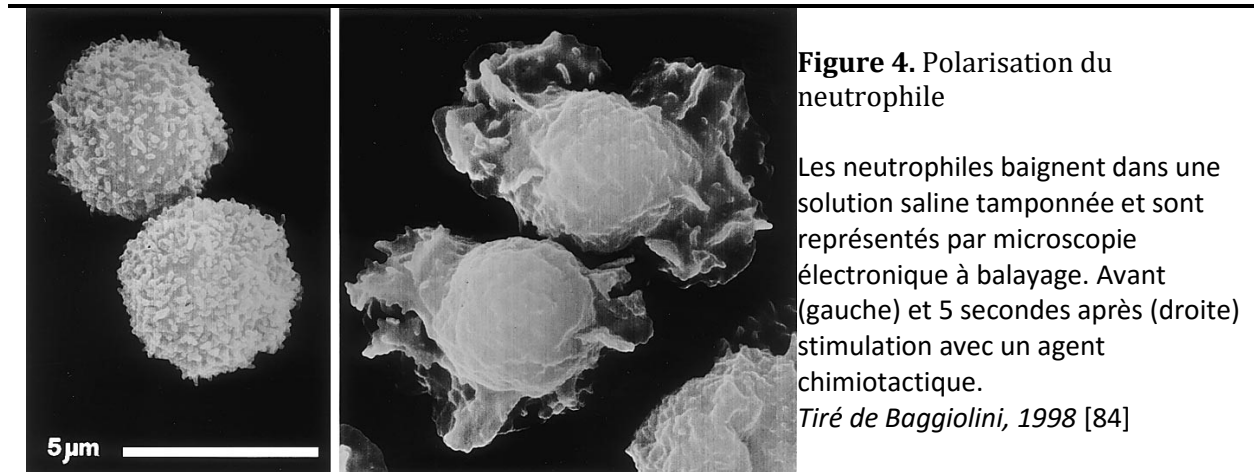
Tiré de Alcaide et al. 2009 [71]

In vivo comme *in vitro*, on a démontré que la transmigration paracellulaire était la plus fréquente, mais qu'une proportion des neutrophiles emprunte toutefois la voie transcellulaire [73, 74]. Le choix de la voie empruntée est probablement influencée par l'état d'activation et la forme des cellules endothéliales, la composition de sa membrane basale, la stabilité des jonctions intercellulaires et le flot sanguin local, entre autres [71]. L'union de l'ICAM-1 endothélial à LFA-1 du neutrophile induit la formation de projections endothéliales semblables à des microvillosités qui enveloppent le neutrophile [75] et qui concorde avec le moment de diapédèse [76]. Bien qu'il ne soit pas clair si l'engouffrement amène simplement le neutrophile à

la jonction intercellulaire la plus près, on croit au contraire que ce serait un signe du mécanisme transcellulaire [77]. Une fois dans l'espace extravasculaire, les neutrophiles migrent en amont selon un gradient chimiotactique généré par les médiateurs libérés aux sites inflammatoires.

Chimiotaxie et molécules

Contrairement à la chimiocinétique (ou chimiokinèse), où il y a accélération du mouvement cellulaire sans orientation précise, la chimiotaxie désigne la capacité des cellules à migrer vers un gradient chimiotactique établi. Ce processus nécessite la polarisation du neutrophile (**Figure 4**), soit un réarrangement coordonné et directionnel du cytosquelette, médié par la polymérisation de F-actine, et produisant des pseudopodes au niveau de sa face antérieure (dans la direction du mouvement) [78, 79]. À l'arrière, la membrane cellulaire se rétracte, créant ainsi une petite queue contractile grâce à la myosine : l'uropode [80, 81]. Ces changements phénotypiques se manifestent lorsque le neutrophile est exposé à des agents chimiotactiques, et permettent à la cellule de se mouvoir plus efficacement et plus rapidement [82, 83].



Les neutrophiles sont hautement spécialisés dans la détection et la discrimination d'une panoplie de substrats chimiotactiques produits par les bactéries, les cellules hôtes endommagées et d'autres cellules, grâce aux nombreux récepteurs qu'ils possèdent. Parmi ceux exprimés, mentionnons les formyl peptide receptors (*FPR*) [85], les récepteurs de chimiokines (*CC* et *CXC*) [86, 87] et tous les Toll-like receptors (*TLR*) sauf *TLR3* [87, 88].

Chimiokines et récepteurs

Les chimiokines (des cytokines ayant des propriétés chimiotactiques) sont des protéines homologues de petite taille subdivisées en quatre groupes (C, CC, CXC et CX₃C) selon la position relative des résidus cystéine (Cys) présents dans l'extrémité N-terminale de la protéine [84, 89]. Près de 50 molécules sont répertoriées [90]. Certaines chimiokines CXC sont définies plus spécifiquement comme étant les médiateurs principaux du recrutement neutrophilique; CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7 et 8 sont caractérisées par la présence d'un motif tripeptidique ELR⁺ (Glu-Leu-Arg) situé aussi dans la portion N-terminale [91]. Les récepteurs de chimiokines, pour leur part, comprennent deux grandes classes définies par leur capacité à se lier aux chimiokines CXC ou CC [89, 92]. Plusieurs chimiokines sont capables de se lier à plus d'un récepteur, et seulement quelques récepteurs n'interagissent qu'avec un seul ligand, de sorte que ces propriétés permettent un niveau élevé de redondance dans l'activation et la fonction desdits récepteurs, en particulier lors de réponse inflammatoire. Traditionnellement, les neutrophiles expriment fortement deux récepteurs, soient CXCR1 et CXCR2. Ils sont activés par divers ligands ELR⁺ selon une spécificité et une sensibilité propre à chacun (CXCR1: CXCL6, 7, 8 ; CXCR2: CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7, 8). Certains produits de dégradation de la matrice extracellulaire, dont les proline-glycine-proline (PGP) et les N- α -PGP expriment aussi des motifs CXC qui sont chimiotactiques pour les neutrophiles et qui semblent agir via leur récepteur CXCR2 [93, 94]. L'IL-8 (CXCL-8), puissant agent chimiotactique pour les neutrophiles et sécrété entre autres par les neutrophiles eux-mêmes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales des voies respiratoires, est le ligand ayant la plus grande affinité avec ces deux récepteurs, bien que CXCR2 soit aussi fortement activé par CXCL1 [89]. À cet effet, une surexpression de l'IL-8 et CXCL1 a été démontrée chez les patients asthmatiques et MPOC (*maladie pulmonaire obstructive chronique*) en lien avec la neutrophilie observée chez certains de ces individus [95-97]. Similairement, l'analyse des cytokines exprimées par les cellules isolées de LBA de chevaux atteints du souffle [29, 98] a permis de démontrer une augmentation dans l'expression de l'IL-8, principalement dans les cas d'exposition chronique aux particules antigéniques. Vu le rôle prépondérant de ces deux récepteurs, des anticorps monoclonaux pour contrer l'IL-8, des inhibiteurs allostériques des CXCR1 et CXCR2 et des antagonistes de l'IL-8 (notamment SB656933 et Sch527123) ont été développés avec succès, dans le but d'empêcher l'invasion neutrophilique [91, 99, 100], et demeurent une stratégie à approfondir.

Ceci étant dit, les neutrophiles expriment/produisent, de façon constitutive ou induite, une variété d'autres récepteurs et de molécules en lien avec leur chimiotaxie et le recrutement de cellules subséquentes lors de processus inflammatoire (**Figure 5**). Vu le nombre considérable de neutrophiles aux sites inflammatoires, la production de cytokines associées peut être elle aussi importante.

Toll-like receptors (TLR)

Comme mentionné précédemment, les neutrophiles humains expriment tous les TLR sauf TLR3. Ces récepteurs transmembranaires de type 1 sont associés à la réponse immunitaire innée et la reconnaissance de pathogènes [101]. L'activation du neutrophile par le biais de ces récepteurs entraîne la production d'IL-8, le clivage de ses L-sélectines, le conditionnement pour la production de réactifs de l'oxygène (médié par fMLP), augmente la phagocytose, et diminue l'effet de chimiotaxie induit par l'IL-8. De plus, l'expression de TLR2 et TLR9 est amplifiée lorsque les neutrophiles sont mis en contact avec GM-CSF. CpG, un agoniste de TLR9 semble d'ailleurs requérir une activation préalable par GM-CFS afin de générer ses effets [88].

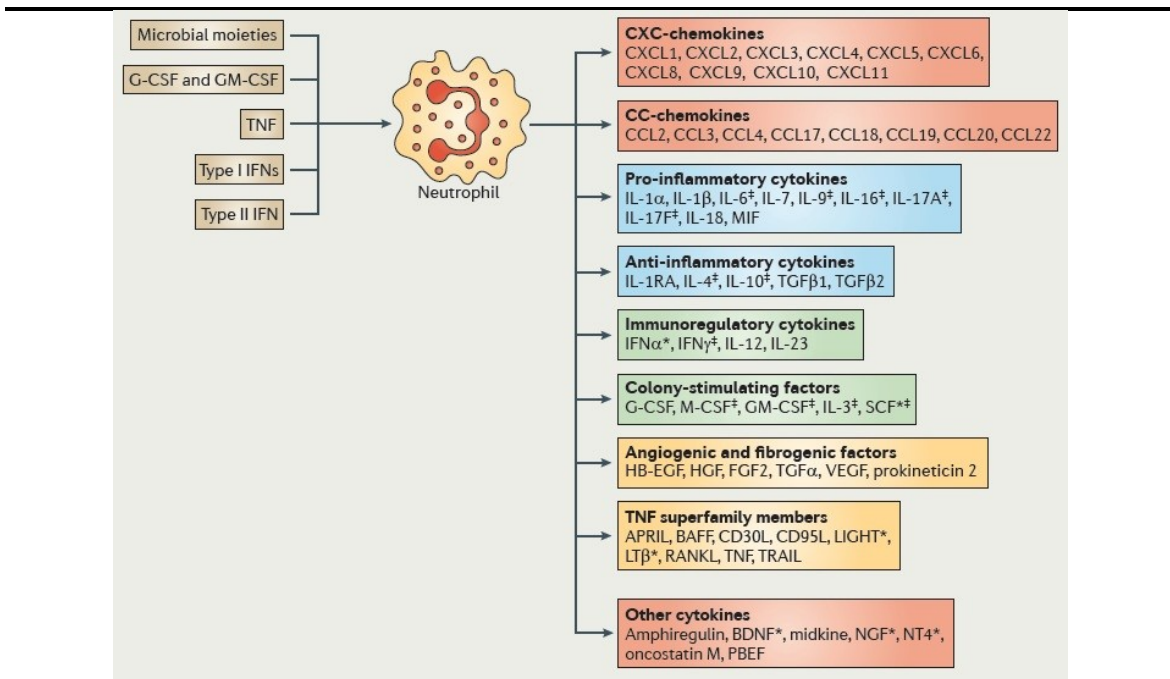


Figure 5. Chimiockines du neutrophile

Expression et/ou production d'une variété de molécules par les neutrophiles. *Études au stade de l'ARNm seulement. ‡ Données controversées pour les neutrophiles humains.

Tiré de Mantovani et al., 2011 [87]

Formyl peptide receptors (FPR)

Les récepteurs de peptides formylés (FPR) sont connus comme étant un site de liaison à la surface des neutrophiles ayant une forte affinité avec les peptides bactériens N-formylés (fMLP ou fMLF), dérivés de la synthèse protéique bactérienne et mitochondriale. Les neutrophiles expriment aussi FPRL-1 (*Formyl peptide receptor-like 1*). Puissantes molécules chimiotactiques, les fMLP requièrent le groupe formyle afin d'avoir une affinité suffisante avec FPR, permettant ainsi son activation. De façon générale, fMLP entraîne le chimiotactisme des neutrophiles, la sécrétion d'enzymes protéolytiques et de médiateurs pro-inflammatoires, l'exocytose des granules ainsi que l'activation du métabolisme oxydatif. Plus récemment, des agonistes non formylés, voire même lipidiques, ont été identifiés. Étrangement, on a aussi démontré l'effet parfois anti-inflammatoire de ligands des FPR qui inhiberaient les neutrophiles et désensibiliseraient certains récepteurs à l'IL-8 et PAF. Cette double action par les mêmes interactions ligand-récepteur n'est pas bien comprise [102, 103].

Cinétique

Il est bien connu que le neutrophile est l'une des premières cellules à se rendre au site inflammatoire. Les étapes de recrutement, d'activation et de transmigration ont été étudiées exhaustivement et sont plutôt bien acceptées dans la littérature. La cinétique d'apparition des neutrophiles et la durée de leur présence au site inflammatoire des différentes études sont assez comparables et ce, même entre les différentes espèces étudiées.

Chez l'humain, l'étude de biopsies endobronchiques de patients asthmatiques atopiques après stimulation antigénique ont révélé une neutrophilie marquée après 6 h, mais variable d'un individu à l'autre [104]. Une étude similaire étudiant les cellules du LBA a démontré une neutrophilie à 4 h chez les asthmatiques et un retour aux valeurs de base à 24 h [105]. Dans un modèle d'inflammation pulmonaire induit par la poussière de maïs comparant l'homme et la souris, le pic de recrutement neutrophilique dans les LBA des humains a été atteint à 4 h, et chez les souris à 1 h post-stimulation. La persistance des neutrophiles s'est poursuivie jusqu'à 96 h chez l'homme et 48 h chez la souris [106].

Une cinétique un peu différente a été étudiée dans les LBA de rats (*Brown Norway rats*) sensibilisé à l'ovalbumine - l'infiltration neutrophilique a débuté 3 h post-stimulation, a été statistiquement significative à 14h et a atteint son pic d'intensité à 24 h. Leur nombre a ensuite subi un déclin rapide pour revenir aux valeurs de base après 6 jrs (temps évalués : 3 h, 14 h, 24

h, 48 h, 72 h, 6 jrs, 13 jrs post-stimulation). La cinétique d'infiltration neutrophilique dans le parenchyme pulmonaire a aussi été étudiée par quantification de l'activité de la myéloperoxidase chez ces mêmes rats. L'influx était présent et significatif après 3 h, le pic atteint à 24h et le retour aux valeurs de base à 6 jrs [107]. Dans un modèle de réaction d'hypersensibilité cutanée retardée chez des rats, les neutrophiles prédominaient entre 1 et 8 h post stimulation [108].

Le cheval étant naturellement un modèle d'asthme, on s'est aussi penché sur la chronologie neutrophilique aux poumons. Des LBA de chevaux atteints du souffle ont été récoltés 10 jours pré-stimulation antigénique (chevaux asymptomatiques). Suivant une exposition au foin pendant 5 h, les LBA furent récoltés 5 h, 24 h, 4 jrs, 7 jrs et 14 jrs, post-stimulation (chevaux symptomatiques). Il y avait une augmentation substantielle du compte neutrophilique absolu à 5 h et 24 h, mais le déclin était encore une fois très rapide (même à 24 h), et les concentrations étant revenues à l'état basal après 7 jrs [109].

Les différents stimuli inducteurs utilisés dans les études, le site ciblé, la durée du stimulus, les variations individuelles, la méthode d'isolation des cellules, les pathologies sous-jacentes et le peu d'études évaluant spécifiquement ce mécanisme expliquent peut-être partiellement les disparités entre les modèles. Somme toute, la réponse est rapide et transitoire, ce qui suggère que l'intensité des signaux chimiotactiques faiblit rapidement, et que la clairance cellulaire des neutrophiles apoptotiques est bien orchestrée.

Clairance

L'homéostasie neutrophilique est maintenue grâce à un équilibre délicat entre le taux de production, le taux de libération par la moelle osseuse, et le retrait des neutrophiles de la circulation sanguine (revus dans [56]). Dans des conditions basales chez l'homme, on estime la demi-vie des neutrophiles circulants entre 6-8 heures (revus dans[56])[110], allant parfois jusqu'à 16 heures [111], après quoi ils sont éliminés. Plus récemment, cependant, Pillay et al. ont démontré que ce laps de temps était sous-estimé et qu'en réalité, la demi-vie de ces granulocytes humains pourrait passer à près de 3.8 jours [112]. Bien que la technique de marquage au $^2\text{H}_2\text{O}$ lui a valu certaines critiques [113], l'estimation murine d'environ 12 heures couramment citée dans la littérature serait exacte selon cette même méthode [112]. Bien que controversées, ces données remettent en question le modèle murin dans les études de cinétique neutrophilique chez l'humain, en plus d'ouvrir la porte à la nécessité de déterminer

ces éléments chez le cheval, considérant la présence de différences inter-espèces. La clairance neutrophilique, dans des conditions physiologiques, a lieu principalement au foie, dans la rate et dans la moelle osseuse. Une augmentation de l'expression du récepteur CXCR4 aurait été rapportée chez les neutrophiles sénescents afin de les rediriger vers la moelle osseuse pour y être éliminés. Au foie, les cellules de Kupffer qui bordent les parois des sinusoides, phagocytes les neutrophiles sénescents ou morts à la suite d'un processus inflammatoire [114]. La réaction est initiée par l'interaction entre les récepteurs CD31 du neutrophile et du macrophage [32]. Les neutrophiles apoptotiques peuvent aussi être récupérés par les cellules dendritiques. Tant au niveau des cellules de Kupffer que des cellules dendritiques, les signaux cellulaires seraient médiés principalement par l'axe IL-23/IL-17/G-CSF, stimulant en même temps la production de nouveaux neutrophiles dans la moelle osseuse [114].

En contexte inflammatoire, le neutrophile peut réaliser un mécanisme suicide où il projette dans l'environnement interstitiel un contenu intracellulaire composé de chromatine, d'histones et de granules protéiques antimicrobiennes appelé NETs (*Neutrophil extracellular traps*). Ancré au neutrophile qui l'a largué, le NET a une structure qui rappelle une toile d'araignée, capturant ainsi les microorganismes pathogènes. Il n'est pas clair si cette capture détruit l'envahisseur ou ne fait que l'inactiver - cela pourrait dépendre du pathogène en question [115]. Somme toute, il reste beaucoup à découvrir sur ce mécanisme suicide des neutrophiles, tant sur son fonctionnement que sur la clairance subséquente des neutrophiles ayant largué leur NET [114, 115].

Neutrophiles équins

Bien que les neutrophiles équins se comportent dans l'ensemble comme leur homologue humain, ils présentent certaines composantes particulières, ce qui semble normal pour la majorité des cellules propres à chaque espèce. L'adhésion ferme des neutrophiles équins est très dépendante des intégrines $\beta 2$, et ce, très tôt dans le processus de transmigration (5 à 10 min), contrairement aux neutrophiles humains (20 à 45 min). De plus, lorsqu'exposés aux anticorps anti-intégrine $\beta 2$ et suite à une stimulation par un complexe antigène-anticorps, les neutrophiles équins sont incapables de générer une augmentation significative de leur métabolisme oxydatif [116]. LFA-1 pourrait présenter des épitopes distinctes puisque les anticorps monoclonaux humains de la sous-unité α n'ont pas engendré de réaction croisée avec la sous-unité α de leur homologue équin (contrairement aux anticorps monoclonaux de la sous-

unité β). Il est également possible que plus d'une forme de LFA-1 existe [117]. De même que chez l'humain, LTB₄, PAF et l'IL-8 sont des médiateurs chimiotactiques bien établis des neutrophiles équins [118]. La capacité de phagocytose et la production de l'anion superoxyde ont été tous deux augmentés dans les neutrophiles équins par PAF, même à des concentrations de 0,1 et 1,0 nM, respectivement [119]. Ces observations coïncident avec une augmentation transitoire de Ca²⁺ intracellulaire, ce qui laisse supposer que PAF est un puissant activateur de neutrophiles [119]. TNF et IL-1 β stimulent directement le métabolisme oxydatif de neutrophiles équins isolés, contrairement aux neutrophiles humains chez qui TNF n'a qu'un rôle de pré-stimulateur (*priming*) [120]. Un modèle *in vivo* d'endométrite a démontré que la migration des neutrophiles était 15 fois plus élevée chez la jument que chez la vache, malgré l'utilisation d'une concentration quatre fois plus faible d'IL-8 comme stimulant [121]. Ces études suggèrent que les neutrophiles de chevaux adultes sont peut-être particulièrement sensibles aux chimiokines locales. Par contre, l'IL-8 semble réguler à la baisse la réponse migratoire au PAF (mais pas LTB₄), et cet effet serait médié par CXCR2 [118]. *In vitro*, le LPS active aisément le neutrophile équin puisqu'on rapporte une augmentation de l'expression de CD11/CD18, la dégranulation, et une diminution de sa déformabilité. L'effet ne semble néanmoins pas influencé par PAF - le LPS agirait donc peut-être indirectement via la sécrétion de certains médiateurs par le neutrophile, le monocyte, ou les deux [122]. De plus, il semblerait y avoir une action synergique entre le LPS et le TNF, puisque l'administration concomitante de ces médiateurs dans un modèle de sang équin entier a augmenté la libération de myéloperoxydases (MPO) comparativement à leur administration indépendante [123]. Les neutrophiles équins expriment l'ARNm du TLR4 [124], du TLR5 [125] et du TLR9 [126]. Au niveau des signaux intracellulaires, l'inhibition de p38 MAPK perturbe la capacité de polarisation des neutrophiles équins en réponse à LTB₄ et PAF, abolissant leur migration ultérieure vers les tissus [127]. Cela suggère une hiérarchie de signalisation différente lors du processus de transmigration induite par des agents chimiotactiques. Finalement, l'une des plus grandes différences avec les neutrophiles humains se rapporte à l'interaction avec fMLP. Chez le cheval, fMLP est un agent chimiotactique qui provoque très peu de réactions. De plus, l'exposition concomitante des neutrophiles au LPS n'est pas en mesure de moduler cette absence de réponse [128].

L'interleukine-4 (IL-4)

L'interleukine-4 (IL-4) est une petite cytokine compacte et globulaire constituée de quatre hélices antiparallèles juxtaposées et de deux boucles liées par un feuillet bêta (**Figure 6**). Sa structure est stabilisée par trois ponts disulfures [129]. Cytokine au rôle clé, on l'associe à la différenciation des cellules T CD4+ naïves (Th0) en cellules Th2, ce qui permet classiquement l'activation des cellules B et la production subséquente d'IgE. L'activation IgE-dépendante des mastocytes induite par l'IL-4 dans les réactions d'hypersensibilité de type I renforce aussi l'association entre cette dernière et l'inflammation de type allergique. L'étude de cette cytokine dans le contexte du souffle et de l'asthme prend alors tout son sens.



Figure 6. Structure de l'IL-4 humaine

L'IL-4 humaine est composée de quatre hélices antiparallèles juxtaposées et de deux boucles liées par un feuillet bêta. Sa structure est stabilisée par trois ponts disulfures.

Tiré de wikipédia

Le gène d'IL-4 est composé de 4 exons - le 2^e étant le plus court, et il y a de nombreuses évidences d'épissage alternatif menant à la suppression de ce 2^e exon. La transcription résultante mène à l'isoforme IL-4 δ 2 dont les fonctions ne sont pas encore tout à fait éclaircies. Cet épissage alternatif se produit naturellement chez plusieurs espèces, dont l'homme, ce qui suggère que IL-4 δ 2 a probablement un rôle fonctionnel et similaire à celui de l'IL-4 traditionnel, en plus de pouvoir se lier aux mêmes récepteurs (revu dans [130]). Chez des patients asthmatiques, l'IL-4 δ 2 est produite naturellement par les lymphocytes T contrairement aux patients contrôles, mais il n'y avait pas de différence significative de l'expression de l'ARNm.

Le récepteur membranaire de l'IL-4 (IL-4R) est d'abord composé d'une chaîne α (IL-4R α), ayant une forte affinité pour l'IL-4 et essentielle à la transduction du signal. IL-4R α se lie à, soit une chaîne commune γ_c , formant ainsi un complexe de récepteur hétérodimère exclusif à l'IL-4 (IL-4R type 1), ou encore à la sous-unité IL-13R α 1, qui forme un complexe pouvant lier tant l'IL-4 que l'IL-13 (IL-4R type 2). Ces deux cytokines sont d'ailleurs connues pour être sécrétées conjointement lors d'inflammation allergique dans le contexte du profil Th2. Le récepteur de type 1 prédomine dans les cellules hématopoïétiques - c'est le principal récepteur d'IL-4 des lymphocytes T - tandis que le type 2 est également retrouvé dans les cellules non-hématopoïétiques, notamment au niveau de l'épithélium des voies respiratoires [131, 132]. De plus, bien que l'IL-4R α doive former un complexe avec l'une des deux chaînes pour activer la cascade de signalisation, elle est capable d'interagir avec l'IL-4, de par sa forte affinité, avant que ledit complexe ne soit formé [132]. La liaison de l'IL-4 avec son récepteur entraîne l'activation de protéines kinases de la famille des Janus (*Jaks*), initiant des signaux intracellulaires en phosphorylant des résidus de tyrosine dans le domaine cytoplasmique de la chaîne IL-4R α . Le facteur de transcription STAT6 est alors recruté et, suivant sa translocation au noyau, permet l'activation de gènes en réponse à l'IL-4 [131]. À un moindre degré, les facteurs STAT1-3 et 5 peuvent aussi être activés.

Rôles de l'IL-4

Il est fermement établi que l'IL-4 module les lymphocytes T CD4⁺ activés à acquérir des fonctionnalités du profil Th2, y compris la sécrétion d'IL-4 subséquente pour entretenir cette réponse. En plus de son rôle au début de la réponse immunitaire, l'IL-4 est également responsable d'évènements en aval de la cascade Th2, menant entre autres à la différenciation et à l'activation des cellules effectrices. Elle est aussi produite par les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles (revus dans [130]). Les connaissances sur l'IL-4 s'approfondissent rapidement, si bien qu'il est devenu évident que les fonctions biologiques initiales qui lui ont été attribuées doivent être ajustées pour tenir compte des nombreuses subtilités liées aux signaux suscitant sa production, ses effets pléiotropiques, ainsi que l'arsenal de cellules qu'elle stimule.

De plus en plus d'études remettent en question l'importance de l'IL-4 et sa voie de signalisation STAT6 dans les phases initiales de différenciation des Th0 en Th2 *in vivo*. La source initiale de l'IL-4 dans ce processus demeure inconnue, si bien que jusqu'à tout récemment, les difficultés à mesurer l'IL-4 *in situ* ont gêné l'étude plus approfondie du rôle de cette cytokine

dans la modulation du profil Th2. Il est possible que les cellules lymphoïdes innées de type 2 (innate lymphoid cells ; ILC2) participent à la différenciation du profil Th2 localement suite à une exposition antigénique [133].

L'extrapolation des conclusions *in vitro* - où l'IL-4 demeure essentielle, certes - au modèle *in vivo* ne semble pas refléter la réalité puisque suite à une infection du nématode *Nippostrongylus brasiliensis*, la suppression de l'IL-4 ou de STAT6 chez des souris *knockout* n'a pas eu d'incidence sur le nombre de lymphocytes totaux, de cellules T CD4+ ou de cellules Th2 marquées à la protéine fluorescente verte (green fluorescent protein ; GFP) isolés de nœuds lymphatiques au pic de réponse, pas plus que sur la cinétique d'apparition/disparition des cellules [134]. D'autres études aux méthodes moins directes concluent les mêmes résultats [135-137]. En bref, il semble que l'IL-4 et STAT6 n'aient pas le rôle prédominant qu'on leur accordait dans le développement des cellules T CD4+, ni dans l'induction ou la différenciation du profil Th2 dans les nœuds lymphatiques.

Les disparités entre les résultats *in vitro/in vivo* pourraient être attribuées au fait que la stimulation seule du récepteur des cellules T (*T-cell antigen receptor, TCR*) *in vitro* contourne la voie *in vivo* du très sensible complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) présentant le peptide antigénique au TCR. Ce faisant, la réponse ne permet pas d'exprimer l'influence apparente du vaste répertoire de TCR et l'affinité qu'il a pour certains antigènes - l'empêchant ainsi de moduler la réponse immunitaire qui en découle [138]. Dans le même ordre d'idée, le microenvironnement *in vitro* ne permet pas non plus d'apprécier la richesse et la complexité des signaux du milieu vivant, notamment l'activation de cascades à travers les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*peptide recognition receptors ; PRRs*) des cellules du système immunitaire inné, l'influence des autres cytokines ou encore de la lymphopoïétine stromale thymique (*thymic stromal lymphopoietin ; TSLP*), qui joue un rôle dans la maturation des cellules T à travers l'activation de cellules présentatrices d'antigènes [138]. Il est aussi possible que la simple absence de sécrétion d'IL-12 - cytokine prédominante du profil Th1 - par un parasite ou le TSLP, par exemple, induise par défaut la réponse Th2 [138].

Ceci dit, il y a tout de même des étapes où l'IL-4 demeure indispensable. La commutation isotypique des IgM vers les IgE suivant l'activation des cellules B et l'éosinophilie

des voies respiratoires s'est avérée complètement dépendante de l'IL-4 et de STAT6 [139, 140], et ces deux effets sont des composantes clés de la réponse Th2. De plus IL-4/STAT6 sont essentiels dans l'accumulation de lymphocytes T exprimant l'IL-4 - perpétuant ainsi la réponse Th2 - dans les tissus périphériques, et plus particulièrement la peau, ce qui n'est pas le cas dans les nœuds lymphatiques [141]. Considérant le fait que les cellules effectrices Th2 orchestrent les réponses aux infections parasitaires et sont les médiateurs de la réponse allergique, il semble logique que leur activité se déroule principalement dans les muqueuses et les tissus. Une étude de modèle d'asthme murin a aussi constaté que toutes les caractéristiques typiques de l'asthme, y compris l'accumulation de cellules Th2 (aussi dans [142]), l'éosinophilie des voies aériennes (aussi dans [142]), la production subséquente de cytokines Th2 par ces cellules (IL-4, IL-5, IL-13), la production de mucus et l'hyperréactivité bronchique, étaient absentes chez les souris déficientes en STAT6 [143]. Pris dans leur ensemble, ces données laissent supposer que, lors d'inflammation allergique, les cellules Th2 migrent vers les tissus périphériques en réponse à des chimiokines induites par STAT6 et générées par les cellules résidentes pulmonaires [138]. Finalement, il semblerait aussi que l'IL-4/STAT6 ait un rôle à jouer davantage au niveau des cellules effectrices et la modulation de la réponse Th2 plutôt que dans l'induction de cette dernière [138].

En plus d'amplifier la sécrétion d'IgE par les cellules B pour promouvoir l'inflammation allergique, l'IL-4 induit l'expression de molécules d'adhésion endothéliales comme VCAM-1 (et non ICAM-1 ou ELAM-1). À son tour, VCAM-1 interagit avec son ligand spécifique, l'intégrine β 1 VLA-4 (CD49d/CD29) afin d'orchestrer les interactions moléculaires qui régissent la migration de leucocytes à travers la barrière endothéliale, plus particulièrement celle des éosinophiles [144-146] et des basophiles [145]. En ce qui a trait aux neutrophiles, il n'est pas clair s'ils expriment VLA-4 puisque les études se contredisent à cet effet [67, 144, 145]. D'autres cytokines telles l'IL-5, l'IL-6, l'IL-9 et l'IL-13 [147-149] ainsi que des molécules chimiotactiques pour les éosinophiles comme l'éotaxine-1, -2, -3 [150-152] voient leur expression augmentée en réponse à l'IL-4, caractérisant davantage le profil Th2. Dans un contexte de pathologie pulmonaire, on a démontré que les fibroblastes de poumons humains peuvent se comporter comme des cellules inflammatoires suite à une activation par l'IL-4 et l'IL-13. Les résultats suggèrent qu'ils peuvent également contribuer à déclencher et maintenir le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires. Donc, en plus d'avoir un rôle dans les processus de remodelage du poumon, les

fibroblastes stimulés par l'IL-4 et l'IL-13 agirait aussi comme des cellules effectrices dans la pathogenèse de l'asthme [152].

Il y a de plus en plus d'évidences qui suggèrent que les macrophages, notamment les macrophages alvéolaires, sont aussi capables de produire de l'IL-4 en plus d'être stimulés par cette cytokine. La notion d'activation des macrophages en phénotypes M1 et M2, coïncide avec la polarisation des Th0 en profil Th1 ou Th2 et il semble que l'IL-4 induise aussi le phénotype M2 (revu dans [130]). Les macrophages M2 sont un groupe de cellules hautement spécialisées possédant une expression génique caractéristique, un large inventaire de médiateurs immunitaires, et des fonctions qui comprennent la réparation tissulaire, la clairance parasitaire et la régulation de l'inflammation ; son importance n'est donc pas à négliger dans l'analyse des cellules effectrices de l'IL-4.

IL-4 et neutrophile

Une question demeure, cependant : qu'en est-il du neutrophile, dans ce portrait ? En considérant les cytokines Th2 exprimées dans les LBA de chevaux atteints du souffle (augmentation d'IL-5, d'IL-4) et la diminution des cytokines type Th1 (INF- γ), ainsi que la nature de la pathologie, on corrobore l'hypothèse émise précédemment d'une réponse inflammatoire allergique. Or, il est quelque peu incohérent d'observer une neutrophilie pulmonaire chez ces chevaux, puisque les théories actuelles n'associent pas, classiquement, ces granulocytes à la cascade inflammatoire Th2 et à l'IL-4; les voies de signalisation qui les réunissent ne sont que partiellement déchiffrées. Un autre point à considérer est l'effet biologique controversé de l'IL-4, où certaines études lui attribuent un rôle inhibiteur de la fonction neutrophilique, et d'autres, un rôle activateur. *In vitro*, plusieurs ont cherché à caractériser les effets de l'IL-4 sur des neutrophiles incubés ou activés avec une grande variété de composés microbiens ou de cytokines pro-inflammatoires [153-155], et les effets rapportés sont généralement de nature anti-inflammatoire.

Il est connu que l'IL-4 retarde l'apoptose [156], améliore la phagocytose, la dégranulation et l'activité oxydative des neutrophiles [157], augmente leur production de LTB4 [158] et augmente l'expression du CMH de classe II à leur surface [159], leur conférant ainsi un rôle de cellule présentatrice d'antigène. Par contre, très peu d'études existent sur la capacité de l'IL-4 à promouvoir une réponse neutrophilique *in vivo*, et leurs résultats sont aussi

contradictoires. Dans les modèles murins, l'administration intraveineuse d'IL-4 dans un contexte de syndrome d'ischémie/reperfusion pulmonaire chez le rat a diminué la perméabilité vasculaire et l'expression de MPO au poumon, suggérant que l'IL-4 aurait un rôle protecteur et qu'elle diminuerait la sévérité des dommages [160]. L'IL-4 participerait à la métaplasie des cellules caliciformes pulmonaires, mais n'entraînerait aucune augmentation significative des cellules inflammatoires 24 h suivant son instillation intranasale [161]. À l'inverse, dans un modèle où l'IL-4 était injectée dans une poche d'air sous-cutanée créée au niveau du dos aurait révélé un pic de recrutement leucocytaire après 9 h d'incubation et dont 60% des cellules étaient des neutrophiles [162]. Par contre, l'IL-4 inhibait aussi la migration des polymorphonucléaires stimulés à l'IL-1 β . Selon leurs données, l'IL-4 agirait indirectement via l'expression de MCP-1/CCL2, une chimiokine produite par certaines cellules résidentes dont l'expression est sept fois plus élevée suivant l'administration d'IL-4 (après 6 h). Plus récemment, une étude menée chez des rats asthmatiques Wistar a évalué la neutrophilie pulmonaire suite à l'instillation d'IL-4 par nébulisation [163]. Après évaluation des LBA, ils ont noté que l'IL-4 n'agirait pas directement sur le recrutement neutrophilique pulmonaire de ces rats, mais qu'elle pourrait y participer en favorisant la libération de CINC-1 (CXCL-1), une chimiokine médiatrice du recrutement neutrophilique, et d'ICAM-1, une molécule d'adhésion nécessaire au processus de transmigration endothéliale.

Chez l'homme, une étude a été réalisée en vue de quantifier les doses tolérées d'IL-4 administrées par voie sous-cutanée. Bien que le but était davantage d'en développer l'utilisation chez des patients atteints de cancers (vu les effets potentiellement antitumoraux et immunomodulateurs rapportés par les auteurs), une élévation modeste des neutrophiles sanguins a été observée chez les sujets [164]. La pertinence de cet article, cependant, réside dans le fait qu'il a permis d'identifier des effets secondaires variables selon les individus (léthargie, céphalées, éruptions cutanées, grelottements, sudation, arthralgie, épistaxis, nausées, hallucinations, etc) ; des effets adverses qui, d'ailleurs, n'étaient pas toujours dose-dépendants. La dose maximale d'IL-4 suggérée se situe entre 1 et 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ [164].

Chez les équins, les interactions entre les neutrophiles et l'IL-4 *in vivo* n'ont pas encore été mises en lumière. Ce que l'on sait, par contre, est que l'IL-4 seule ne provoque pas la migration des neutrophiles équins *in vitro* [8]. Plutôt, elle induit des changements morphologiques des neutrophiles (polarisation) et les stimule à libérer l'IL-8 qui, rappelons-le,

est un puissant facteur chimiotactique. Le profil cytokinique observé est mixte puisqu'on note aussi une augmentation de TNF- α et une baisse d'IL-1 β , une cytokine proinflammatoire. L'IL-4 active STAT6 et semble réguler les facteurs de transcription MAPK P38 et PI3K des neutrophiles puisque leur activité est corrélée avec l'augmentation de l'expression d'ARNm de CD23 (*Fc ϵ R* ; *récepteur FC liant les IgE*). L'effet de l'IL-4 est par ailleurs plus important chez les neutrophiles de chevaux atteints du souffle que chez les sujets contrôles [8]. Les cellules endothéliales équines stimulées à l'IL-4 libèrent de l'IL-8 également et augmentent leur expression de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et d'E-sélectine - des facteurs qui pourrait contribuer au chimiotactisme des neutrophiles [165].

Manifestement, la réponse des neutrophiles à l'IL-4 ne peut être réduite à une simple équation de type A+B=C ; le résultat semble dépendre d'un éventail de facteurs intrinsèques qui modulent la réponse. Considérées dans leur ensemble, ces données laissent supposer qu'une voie autocrine incluant l'IL-4 stimulerait les neutrophiles à produire des facteurs chimiotactiques, leur conférant entre autres les changements morphologiques décrits précédemment en plus de promouvoir la migration de nouvelles cellules au site, entretenant ainsi l'état inflammatoire de type Th2 de façon plus ou moins chronique. De plus, les résultats contradictoires de plusieurs études réitérent le besoin d'investiguer le rôle de cette cytokine en relation avec l'activité des neutrophiles.

Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix

Matrigel est le nom commercial d'une matrice protéique gélatineuse solubilisée extraite du sarcome murin Engelbreth-Holm-Swarm, une tumeur riche en protéines de la matrice extracellulaire composée principalement de laminine, de collagène IV, de protéoglycanes à héparane-sulfate, de nidogène/entactine [166, 167]. Matrigel contient aussi des facteurs de croissance tels TGF- β , le facteur de croissance ressemblant à l'insuline (*IGF; insulin-like growth factors*), le facteur de croissance épidermique (*EGF; epidermal growth factor*), les facteurs de croissance des fibroblastes (*FGF; fibroblast growth factor*), l'activateur tissulaire du plasminogène, etc [168]. Par contre, plusieurs compositions sont offertes, dont une réduite en facteurs de croissances. Stérile, Matrigel est exempt de bactéries, de fongis, de mycoplasmes et d'endotoxines et la concentration protéique peut être ajustée selon l'utilisation prévue.

Matrigel est à l'état liquide sous les 4°C, ce qui permet d'y suspendre une variété de cellules et de molécules. En l'exposant à des températures au-dessus de 22°C, la chaleur déclenche sa gélification rapide, lui conférant des propriétés de matrice extracellulaire tridimensionnelle et permettant de séquestrer les cellules qui y ont préalablement été intégrées. Grâce à cette propriété, Matrigel est largement utilisé dans des travaux de différenciation et de culture cellulaires, et ce, principalement lorsque les types cellulaires ont besoin d'un bon ancrage (neurones [169], hépatocytes [170], endothélium vasculaire [171], etc). De plus, il constitue la base de plusieurs études d'invasion de cellules tumorales [172, 173], d'angiogenèse [174, 175], et peut être utilisé dans des travaux de métabolisme et de toxicologie, principalement en ce qui a trait au foie [176]. Ces études ont été réalisées tant *in vitro* qu'*in vivo*. À l'inverse des timbres externes ou des injections intradermiques qui se dispersent systématiquement, Matrigel peut être injecté sans procédures chirurgicales invasives dans le but d'implanter des cellules ou des molécules *in vivo*, offrant ainsi une meilleure incorporation dans les tissus de l'hôte. En ce sens, l'utilisation d'un véhicule à base de biomatériaux peut être avantageuse puisqu'il protège aussi les cellules des conditions *in vivo* parfois hostiles, améliorant ainsi leur viabilité et leur rétention au site d'injection.

Une fois sous la peau, Matrigel maintient son intégrité en formant un « bouchon » gélifié dans les tissus, facilitant son excision pour une étude subséquente des cellules et médiateurs qui y ont migré ou de ce qui s'y est différencié pendant l'incubation. Corning assure que ce « bouchon » demeure stable au moins une semaine *in vivo*, ce qui semble bien correspondre avec ce qui est retrouvé dans la littérature [177-179]. On voit même certaines incubations qui durent jusqu'à un mois [180, 181], et le Matrigel est encore facilement identifiable (non sans infiltration tissulaire, vasculaire et cellulaire, par contre). Éventuellement, de par sa composition, le Matrigel est dégradé par l'organisme. Une fois excisé, il peut être fixé et est compatible avec les colorations histochimiques standards autant que l'immunohistochimie. Dans les cas où l'on veut récupérer les cellules ayant migré dans le Matrigel, on peut le dégrader avec des enzymes protéolytiques telles la dispase (qui dégrade préférentiellement le collagène IV). La viabilité des cellules étant conservée pendant ce processus, les cellules recrutées chez l'animal peuvent ensuite être mises en culture *in vitro* [182].

Plus spécifiquement en lien avec notre contexte de recherche, Matrigel a été utilisé *in vivo*, enrichi de facteurs biologiquement actifs ou chimiques en vue d'influencer une migration cellulaire et d'évaluer la cinétique inflammatoire. D'ailleurs, comme beaucoup d'autres cellules, les neutrophiles sont capables de traverser le Matrigel [183]. Deux études s'illustrent quant à la similarité de leur protocole avec notre sujet. La première utilise la sangsue (*Hirudo medicinalis*) comme modèle animal pour décrire les populations cellulaires recrutées dans du Matrigel supplémenté d'IL-8, une cytokine connue pour son pouvoir chimiotactique chez les neutrophiles, tel que mentionné précédemment. Différentes concentrations ainsi que différents temps d'incubation ont été évalués. L'infiltration tissulaire était évaluée par morphométrie en analysant par microscopie standard et électronique, des coupes histologiques du matrigel retirée après incubation. L'infiltration était caractérisée principalement par des cellules vaso-fibreuses et vaso-centrales (l'équivalent des myofibroblastes chez les vertébrés, impliqués dans la réparation tissulaire) propres aux annélides. Plus la concentration d'IL-8 était élevée, plus l'infiltration était importante, le pic étant atteint avec 100 ng. Curieusement, il y avait moins de cellules avec 150 ng d'IL-8, mais il est possible qu'une dose trop concentrée de cytokines puisse avoir un effet inhibiteur sur le recrutement cellulaire (tel que rapporté dans [184]). Une évaluation immunohistochimique suite à une semaine d'incubation et une concentration d'IL-8 de 100 ng a révélé que les cellules infiltrantes exprimaient plusieurs marqueurs dont CD11b, CD34, et CD45, mais pas certains marqueurs myéloïdes tels que CD14 et CD11c. Elles présentaient aussi des granules cytoplasmiques semblables à celles retrouvées chez les granulocytes des vertébrés. Plus l'incubation était longue (jusqu'à un mois), elles formaient peu à peu un tissu vasofibreux dont les cellules étaient mieux différenciées et dépourvues de granules. Tant après une semaine qu'un mois d'incubation, les injections de Matrigel sans IL-8 n'ont engendré aucune réaction, et l'infiltration cellulaire mentionnée y était donc absente. L'hypothèse émise était que, comme chez les vertébrés, ces cellules granulocytaires étaient recrutées vers les sites inflammatoires par des agents chimiotactiques tels l'IL-8, rapidement polarisées, et ensuite destinées à l'apoptose, participant ainsi à la résolution de l'inflammation et limitant l'insulte tissulaire [180]. Fait intéressant, après 7 jours d'incubation, les quantités d'IL-8 encore présentes dans le Matrigel ont été évalué par ELISA : elles n'avaient que très peu diminuées, ce qui indique que le Matrigel séquestre efficacement les agents qui y ont été suspendus pendant au moins une semaine.

La deuxième étude a voulu déterminer la cinétique d'infiltration neutrophilique et monocyttaire à la suite d'une stimulation au LPS suspendu dans du Matrigel (les doses variant de 1 à 50 µg) et injecté sous la peau de souris jusqu'à la résolution de l'inflammation. Une inflammation focale autour du Matrigel + LPS s'est développée avec un pic à 24 h, et une résolution en 20 jours. Les concentrations de LPS dans le Matrigel ont diminué lentement et de façon constante au cours de cette période. Le degré d'inflammation et les cellules prédominantes infiltrant le Matrigel ont été évalués par l'administration intraveineuse du milieu de contraste PFC (perfluorocarbone) et dont le signal a été interprété par imagerie par résonance magnétique (IRM). Suite aux IRM, certains bouchons de Matrigel ont été excisés, digérés et analysés par cytométrie de flux, d'autres excisés et analysés par coupes histologiques, le but étant de confirmer macroscopiquement et au niveau moléculaire ce que l'IRM démontrait en terme de cellules inflammatoires infiltrantes. La cytométrie de flux a, en outre, permis de mieux caractériser la cinétique cellulaire et de différencier les macrophages des neutrophiles et des lymphocytes, par exemple. Les bouchons contrôles ne démontraient qu'une légère infiltration en comparaison à ceux auxquels on avait ajouté du LPS. Les neutrophiles étaient prédominants à 24 h pour ensuite décliner jusqu'à 20 jours et les macrophages, bien que retrouvés en moins grande quantité, sont apparus plus tard, soit vers 5 à 7 jours [181].

L'ensemble de ces études semble démontrer l'utilité et la compatibilité du Matrigel dans l'évaluation de la cinétique neutrophilique à la suite d'une stimulation cytokinique. Le fait que les capsules de Matrigel sans ajout de cytokine n'aient provoqué aucune infiltration cellulaire indique peu de réactions de la part de l'hôte. L'utilisation d'un milieu stable, facilement repérable, pouvant être récupéré *in vivo* pour fins d'analyses et qui n'intervient pas dans la réponse inflammatoire est évidemment un critère essentiel dans l'élaboration de notre protocole.

Hypothèse et objectifs

En considérant les éléments énoncés précédemment, nous avons entrepris d'approfondir le rôle de l'IL-4 dans le chimiotactisme neutrophilique. Notre hypothèse de recherche était que l'administration sous-cutanée d'IL-4 induit un appel neutrophilique localement.

De façon plus spécifique, les objectifs du projet visaient à 1) déterminer si l'administration d'IL-4 dans la peau de chevaux sains entraînait une neutrophilie tissulaire ; 2) élaborer un protocole sécuritaire et efficace pour administrer des cytokines pro-inflammatoires chez des chevaux vivants puisque, tel que rapporté dans la recension des écrits, cette procédure pouvait occasionner des effets adverses quelque peu imprévisibles, et ne semble avoir jamais été réalisée chez le cheval.

Article

Présentation sous forme d'article.

Article en vue d'être soumis au « American Journal of Veterinary Immunology and Immunopathology ».

Article soumis le : 16 décembre 2015

Dans le cadre de cette étude, j'ai contribué à l'élaboration du protocole de recherche, j'ai mené à terme toutes les phases expérimentales, j'ai participé à l'analyse des résultats et des statistiques et j'ai rédigé l'entièreté de l'article.

Influence of interleukin-4 on the recruitment of equine neutrophils *in vivo* using biopolymers as a delivery system.

Mireille Godbout^a, Amandine Vargas^a, Pierre Hélie^b, Michela Bullone^a, and Jean-Pierre Lavoie^{a*}

^a Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada.

^b Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada.

* Corresponding author: Jean-Pierre Lavoie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200, rue Sicotte, Saint-Hyacinthe (Quebec), J2S 2M2; Tel (450) 773 8521 #8292

Abstract

A growing body of evidence presents neutrophils as key regulatory cells in allergic lung diseases, where they release various pro-inflammatory cytokines and chemokines, leading to airway injury and remodeling. Recent findings indicate that heaves (*recurrent airway obstruction; RAO*) is associated with a T-helper type 2 (Th2)-biased cytokine profile and that interleukin-4 (IL-4) may contribute to neutrophil chemotaxis towards the airways. However, pathways and interactions between neutrophils and IL-4 remain unclear. In the present study, we developed an equine subcutaneous model to assess neutrophil migration in response to IL-4 *in vivo*. Matrigel, an injectable biopolymer serving as vehicle supplemented with IL-4 or IL-8 as positive control was administered subcutaneously in the neck of 18 horses. Different concentrations (10ng, 250ng and 500ng) and incubation time-points (3 h, 6 h, 12 h, 48 h and 7 days) were evaluated, after which matrigel pellets were harvested with a biopsy punch. Using a semi-quantitative histological scoring method or flow cytometry, we demonstrated that IL-4 fails to induce a significant neutrophil migration in this model. Furthermore, neutrophils and mononuclear cells infiltrates were common in the negative controls, suggesting that matrigel is chemoattractant in horses. Lastly, flow cytometry was a more reliable method to estimate neutrophil migration when compared to histological score analysis, which lacked sensitivity. To our knowledge, this was the first study incorporating matrigel as well as IL-4 in an *in vivo* protocol involving horses.

Keywords

equine neutrophils, IL-4, chemotaxis, matrigel matrix, heaves

Highlights

- IL-4 does not trigger neutrophil chemotaxis in equine subcutaneous tissues
- Matrigel causes an inflammatory response in horses.
- Flow cytometry is more reliable in assessing neutrophilia than histological scoring

1. Introduction

T-helper type 2 (Th2) cytokine profile is recognized as the main orchestrator in allergic inflammation (Wills-Karp, 1999). This response is classically associated with an inflammatory profile largely mediated by immunoglobulin E (IgE) and a resulting eosinophilic infiltrate (Romagnani, 2000). However, in heaves (*recurrent airway obstruction ; RAO*), a spontaneous occurring condition of horses characterized by chronic airflow obstruction, bronchial hyper-responsiveness and remodeling of the airways (Leclere et al., 2011), neutrophils are the predominant inflammatory cells infiltrating the airways. In addition, our previous work has shown that neutrophils are closely associated with a predominant T-helper type 2 (Th2) cytokine profile (Lavoie et al., 2001).

Indeed, previous studies have demonstrated that a greater proportion of lymphocytes expressing Th2-type cytokines (IL-4, IL-5) and a decreased expression of a Th1-type cytokine (INF- γ) were found in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of heaves-affected horses using *in situ* hybridization (Lavoie et al., 2001; Cordeau et al., 2004). As IL-4 is one of the main effectors modulating activated CD4 + T cells to acquire Th2-profile characteristics (Nelms et al., 1999), various reports have investigated its role in neutrophil recruitment and activation. Equine pulmonary artery endothelial cells stimulated with IL-4 express IL-8, vascular endothelial growth factor (VEGF) and E-selectin (Huang et al., 2007), which are factors known to contribute to neutrophil chemotaxis and migration into inflamed tissues (Huber et al., 1991; Baggiolini and Clark-Lewis, 1992). Similarly, IL-4 activates equine neutrophils *in vitro* by inducing morphological changes known as polarization and activating STAT6 (Lavoie-Lamoureux et al., 2010). IL-4 also appears to regulate the transcription factors p38 MAPK and PI3K in neutrophils, as their activity is correlated with an up-regulation of mRNA for CD23 (an IgE binding receptor) (Lavoie-Lamoureux et al., 2010). Murine and rat models reveal an

indirect mechanism by which IL-4 may participate in neutrophil recruitment, via increasing the expression of MCP-1/CCL2 (Ratthe et al., 2009), CINC-1 (Guo et al., 2013), neutrophil chemokines, and ICAM-1 (Guo et al., 2013), an adhesion molecule required in the neutrophil's transmigration process. These findings support the hypothesis that IL-4 may contribute to the activation of neutrophils in allergic inflammation, as it seems to occur in heaves. Nonetheless, pathways leading to airway neutrophilia in chronic inflammatory diseases, neutrophil activation and interactions between neutrophils and Th2 cytokines remain incompletely understood.

Thus, the aim of the present study was to explore the neutrophil response to IL-4 *in vivo* as, to the best of our knowledge, it has not been studied in horses. Using cytokine-supplemented matrigel, an injectable biopolymer used as a vehicle for the inflammatory stimulus, we developed a subcutaneous (s.c.) model that allows the monitoring of neutrophil migration. Matrigel, an extract of the murine Engelbreth–Holm–Swarm (EHS) tumor rich in basement membrane components (laminin, collagen IV, nidogen, and perlecan) (Kleinman et al., 1986) has been widely used in murine (Passaniti et al., 1992; Ohashi et al., 2000), canine (Kang et al., 2012), rabbit (Luo et al., 2012) and annelid models (Grimaldi et al., 2011). More specifically, it has been used in drug-delivery applications (Lee et al., 2000; Giordano et al., 2009) and in the recruitment of specific cell infiltrates (Grimaldi et al., 2011), including neutrophils (Hirche et al., 2004; Temme et al., 2014).

2. Material and methods

2.1 Animals

Sixteen healthy standardbred mares and two mixed-breed gelding ponies (7.8 ± 4.2 yr, mean \pm SD) from the equine research and teaching herds of the Faculty of Veterinary Medicine (Université de Montréal) were included in the study. Horses were randomly assigned to one of our 3 sub-studies, for a total of 6 horses per sub-study. They were stabled on wood shavings, fed good quality hay and grain twice a day. The study was approved by the Animal Care Committee of the Université de Montréal (Protocol Rech-1324) and conducted in compliance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

2.2 Reagents

2.2.1 Recombinant equine IL-4 (reqIL-4; Pierce, Rockford, IL, USA) and recombinant equine IL-8 (reqIL-8; Pierce) were individually reconstituted under aseptic conditions with filtered pure water, and stored at -80 °C until use.

2.2.2 Corning matrigel® matrix - growth factor reduced, high concentration (Corning; Bedford, MA, USA) at 20 mg/ml was kept frozen at -20 °C. Before use, it was thawed slowly on ice at 4 °C for 48 h.

2.3 *In vivo* sub-study 1

Three horses and the 2 ponies were studied. Cytokine preparations were as follows: on ice and in aseptic conditions, matrigel was diluted with RPMI medium 1640 (Invitrogen; Burlington, ON, Canada) to reach a concentration of 15 mg/ml and split into 9 aliquots of 100 μ l. ReqIL-4, reqIL-8, serving as a positive control, or DPBS (Invitrogen) as negative control were mixed into the matrigel aliquots to achieve a final cytokine concentration of 10 ng per sample, and a total of 3 aliquots per condition. The 9 aliquots were loaded into

1 ml syringes and 21G 1 inch needle (Fisher; Nepean, ON, Canada), and kept on ice until injection, which was performed in a 1 h delay.

Prior to injection, the horses' left necklines were shaved and cleaned with a chlorhexidine scrub to limit contamination. Each horse was injected s.c. with the matrigel aliquots described previously, in a pattern of 3 columns of 3 injections, sites at least 3 cm apart from one another. Each column was comprised by an injection of matrigel and reqIL-4, matrigel and reqIL-8, and matrigel and DPBS. The columns were randomly assigned to a biopsy time (6 h, 24 h or 7 days post-injection). Monitoring of inflammation was done by measuring the degree of swelling at injection sites with a caliper every 2 h for the first 12 h, followed by daily measurements. Prior to matrigel plug excisions, horses were sedated with xylazine (Bayer animal health; Mississauga, ON, Canada; 0.1 mg/kg, IV) and lidocaine (Vetoquinol; Lavaltrie, QC, Canada; 1 ml per site, s.c.) was injected as a local anesthetic in an inverted L-shape manner at a distance of approximately 0.5 cm around each site. Biopsies were performed with a 6 mm diameter punch, incisions were sutured with a simple interrupted stitch (Supramid 0; Serag-Weissner; Naila, Germany) and tissues were fixed in formalin for histology analysis.

2.4 *In vivo* sub-study 2

Cytokine preparations, injection and biopsy protocols in 6 additional horses were as described in sub-study 1 with the following modifications: matrigel was diluted at 8 mg/ml, cytokine quantities increased to 250 ng per sample, and RPMI medium 1640 replaced DPBS as negative control. Two rows of 3 injections of 100 µl were performed and assigned to different biopsy times (3 h and 12 h post-injection), for a total of 6 sites per horse.

2.5 *In vivo* sub-study 3

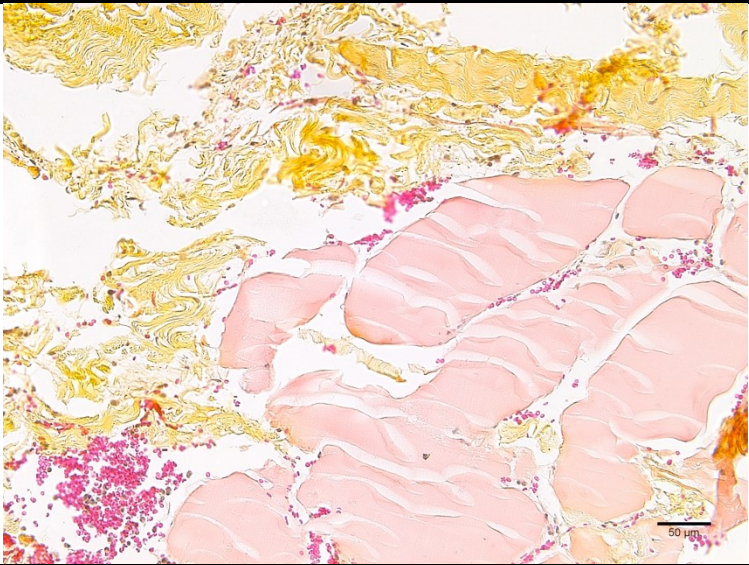
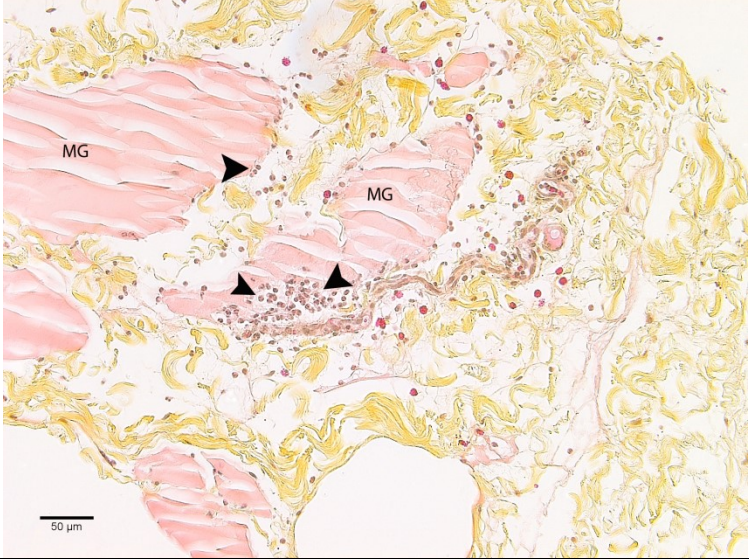
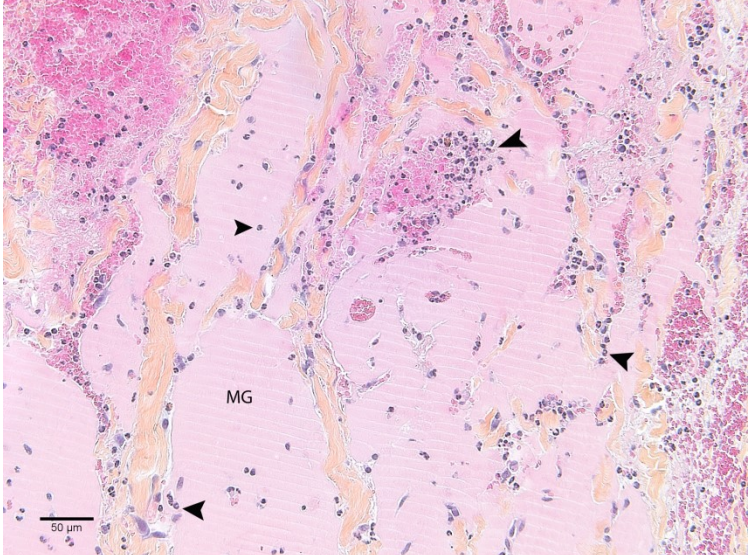
Cytokine preparations, injection and biopsy protocols in 6 additional horses were as described in sub-study 1 with the following modifications: matrigel dilution was maintained at 8 mg/ml; cytokine quantities increased to 500 ng of reqIL-4 and 1 µg of reqIL-8 per sample, and RPMI medium 1640 served as negative control. Two rows of 3 injections were performed on the left neckline, and 1 row of 3 injections of the right (250 µl per site, for a total of 9 sites per horse). The 6 sites on the left were excised after 3 h: 3 biopsies were fixed in formalin for histological analysis, and the other 3 were maintained in sterile phosphate buffer saline (PBS) (Invitrogen) before being processed by flow cytometry. The sites on the right side were excised after 6 h of incubation and were processed immediately and analyzed by flow cytometry.

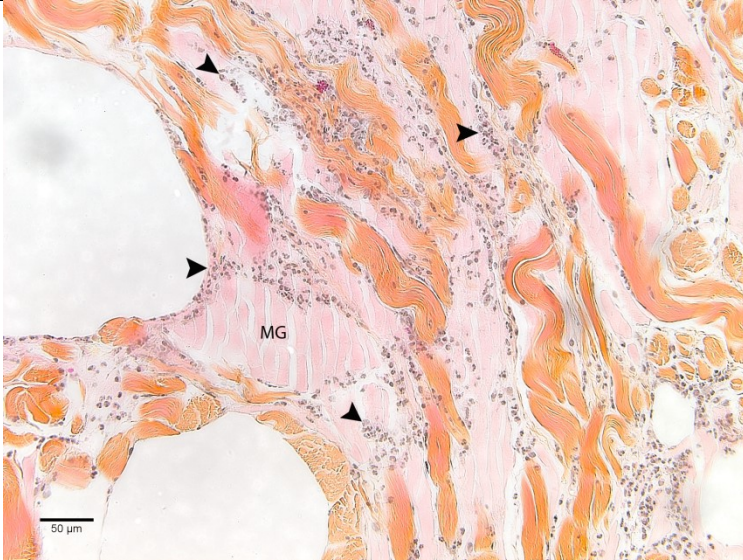
2.6 Histology and quantification of neutrophil response

Excised plugs destined to histology analysis were fixed overnight with 10 % neutral buffered formalin and embedded in paraffin. In sub-study 1, plugs were cut in half before formalin processing, and a 4 µm section near the center of each biopsy was processed with HPS (hematoxylin-phloxin-saffron) staining.

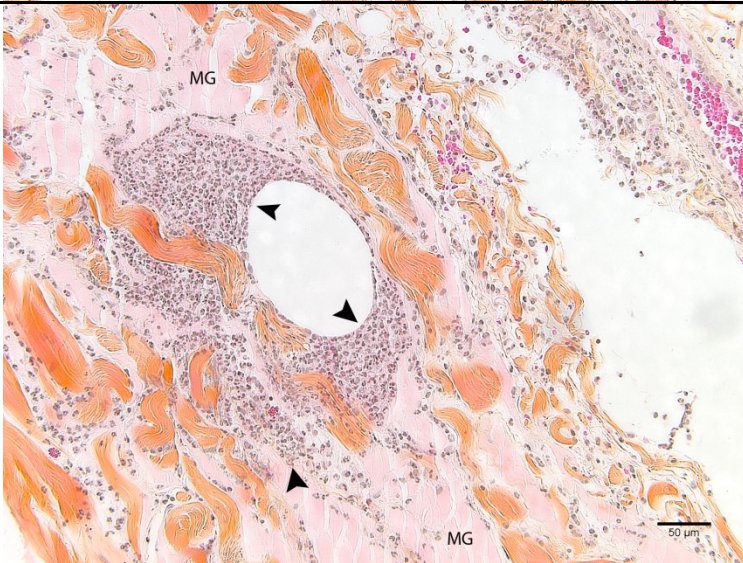
In sub-study 2 and 3, and in an attempt to reduce data variations observed in sub-study1, five randomly selected slides per biopsy were evaluated. Sections were cut at 200 µm intervals throughout the whole biopsy and HPS-stained.

For all studies, the totality of the section was evaluated through a 20X-objective and a board-certified veterinary pathologist (PH) assessed cellular infiltration blindly, on a qualitative scale of 0 to 5 as depicted in **figure 1**. The median score of the 5 examined slides was used for statistical analysis of each biopsy in sub-studies 2 and 3.

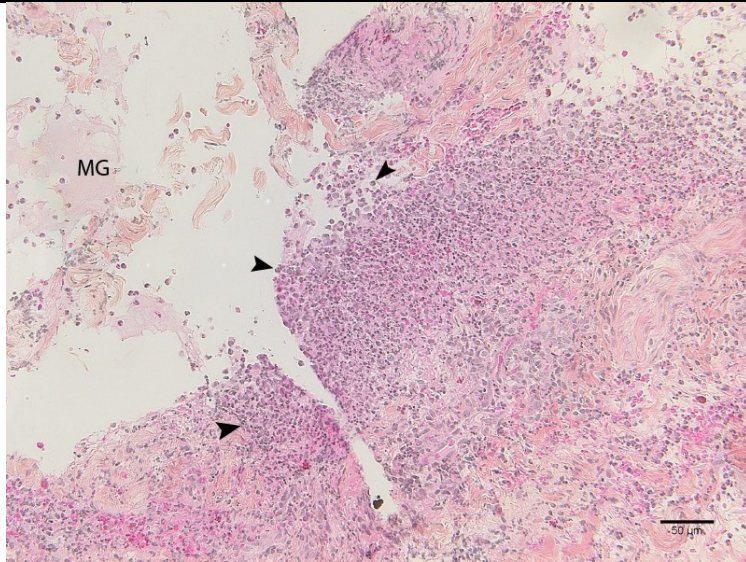
Biopsy sample	Score	Description
	0	Absence of neutrophils
	1	Rare neutrophils
	2	Occasional neutrophils



3 Moderate infiltration



4 Strong infiltration



5 Dense infiltration,
generally into
matrigel and
surrounding tissue

Figure 1. Histologic neutrophil scoring of biopsies. Histological examination shows matrigel as a homogenous, bright pink substance surrounded by host tissue and collagen fibers, colored by the saffron-yellow to orange hues. Neutrophil (arrowheads) infiltration was evaluated on a qualitative scale from 0 (no neutrophils visible) to 5 (dense infiltration). Bar is scaled at 50 µm, MG = matrigel.

2.7 Flow cytometry

Epidermis and dermis were removed from excised biopsies, and the remaining tissue weighed. The biopsies were washed in sterile phosphate buffer saline (PBS) (Invitrogen), and isolation of sequestered cells was performed by enzymatic digestion (RPMI medium 1640 supplemented with 1.2 mg of collagenase D (Roche Diagnostics; Laval, QC, Canada) and 100 µl of dispase II (Sigma-Aldrich; Oakville, ON, Canada; dilution 10 mg/ml)) under rotational movement for 2 h in a humidified incubator at 37 °C with 5 % CO₂. To generate a single-cell suspension, the mixtures were then passed through a 70-µm cell strainer (BD Biosciences; Mississauga, ON, Canada). Cells were washed twice in cold sterile PBS containing 0.5 % BSA (Sigma Aldrich) and 0.5 mM EDTA (Invitrogen), and fixed for 20 min in a 2 % paraformaldehyde solution (PFA). After three washes (PBS - 0.5 % BSA), cells were stained for myeloperoxidase for 1 h with

anti-MPO (Dako; Burlington, ON, Canada; dilution 1/200) in a staining buffer (0.1 % Triton X-100 in PBS). All incubation steps were performed at 4 °C. Cells were then washed 3 times in PBS and incubated 30 min in the dark with Alexa Fluor®488 goat anti-rabbit as secondary antibody (Invitrogen; dilution 1/1 000). Cells were washed twice and suspended in 400 µl PBS before flow cytometry acquisition of 10 000 events and analysis using CellQuest Pro software on a FACSCalibur instrument (BD Biosciences). Isotype-matched control antibody (Rabbit IgG, I-1000, Vector Laboratories) was used as control. Staining was evaluated by the mean percentage of positive cells. In addition to obtaining the proportion of neutrophils per sample via flow cytometry, total cell concentration was evaluated with a hemocytometer. By combining both parameters, final neutrophil count was revealed for each biopsy. Neutrophil counts were normalized according to the weight of each biopsy.

2.8 Statistical analysis

The effect of time and the effect of each cytokine on neutrophil infiltration for histological findings were evaluated using the Cochran-Mantel-Haenszel test. Slides where matrigel was not visible were excluded from the analysis. Flow cytometry data was analyzed by two-way ANOVA. Statistical analyses were performed with Prism 5 (Graphpad software; La Jolla, CA, USA) and SAS/STAT v.9.4 (Cary, NC, USA) Differences were considered significant when $p < 0.05$ between groups.

3. Results

3.1 Technical variables

Because of its highly viscous properties at 20 mg/ml, matrigel was diluted with RPMI medium 1640 to facilitate manipulation and pipetting. Cytokine-supplemented matrigel was injected s.c., while the mixtures were still fluid, as matrigel rapidly gels above 10 °C, forming a polymerized pellet and sequestering mixed-in cytokines under the skin. Once injected, sites were generally recognized by their papule-like shape, and marked with a

sterile surgical marker (**figure 2A**). As the inflammatory response started to occur, swelling of some sites, but not all, rapidly made them hard to distinguish from surrounding tissue (**figure 2B**). This complicated matrigel harvesting on some occasions and not all biopsies were thus considered successful upon histological examination. Fifty-four biopsies were harvested in sub-study 1, 36 in sub-study 2, and 54 in sub-study 3, for a total of 144 biopsies during the three study periods. Of these, 14, 7 and 2 biopsies in sub-study 1 to 3, respectively, were considered inconclusive due to the absence of matrigel on the examined slides. In total, 85 biopsies were analyzed by histology, and 36 by flow cytometry.

A.



B.



Figure 2. Visual appearance of matrigel plugs after injection. (A) Typical papule-like shape of sites immediately after injection in sub-study 2 (6 injections). **(B)** Inflammation and swelling 12 h post injection caused sites to be less visible, hence complicating the excision process (lower row had been harvested at 6 h).

3.2 Clinical response

Biopsy procedures were well tolerated by most horses and no major complication occurred. Five of the 6 horses in sub-study 3 were administered 20 mg of dexamethasone (Dominion; Winnipeg, MB, CAN) *per os* the day following matrigel

harvest due to excessive swelling and discomfort during palpation surrounding excision sites. This may have been due to an increase in cytokine concentrations in sub-study 3 when compared to sub-study 1 and 2.

3.3 Sub-study 1

In order to determine the general cellular kinetics in response to administered cytokines and to confirm the ability of reqIL-4 and reqIL-8 to influence mobilization of equine neutrophils *in vivo*, a broad time-course was chosen in the first sub-study. A final matrigel volume of 100 μ l containing 10 ng of reqIL-4 and reqIL-8 was injected s.c.. ReqIL-8, a potent chemoattractant for neutrophils (Mukaida, 2003; Brooks et al., 2011), served as positive control, and expected to trigger a marked local neutrophilia, at least at the earlier times evaluated. Instead, as seen in **figure 3A**, the Cochran-Mantel-Haenszel test revealed no significant score differences between groups ($p=0.66$ at 6 h, $p=0.88$ at 48 h and $p=0.73$ at 7 days), nor effect of time on these scores ($p=0.08$ for control, $p=0.79$ for reqIL-4 and $p=0.62$ for reqIL-8). In addition, the infiltration appeared similar in all groups upon visual assessment, slightly decreasing at each time-point.

Mononuclear infiltration was similar in all groups but increased gradually at each time-point (**figure 3B**), where it was the predominant cell-type after 7 days (mononuclear data was given as mean \pm SD; no statistical analysis of these values was performed), as expected. Some biopsies were so densely infiltrated by inflammatory cells that host tissue and matrigel were undistinguishable (**figure 4**). Finally, a moderate inflammatory cell infiltration was observed in control plugs.

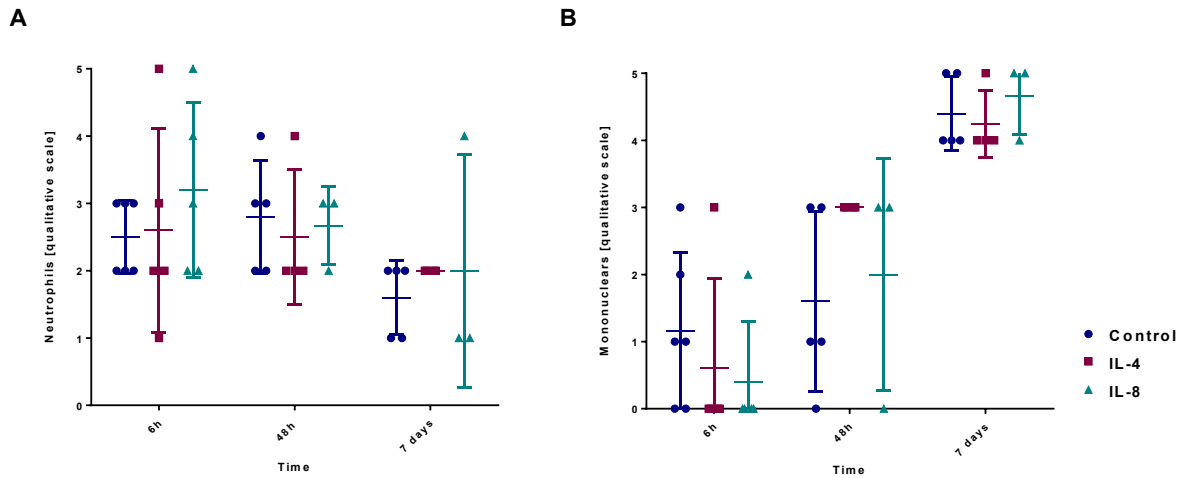


Figure 3. Sub-study1: Histological analysis of cellular migration into the matrigel plugs.

Matrigel plugs supplemented with 100 ng of reqIL-4, reqIL-8 or control medium were excised at 6 h, 48 h and 7 days after inoculation and HPS-stained. Neutrophil (A) and mononuclear (B) infiltration was evaluated on a qualitative scale from 0 (no neutrophils visible) to 5 (dense infiltration). Results are shown for each group at all 3 time-points. Each point represents the neutrophil score attributed to each biopsy. Slides where no matrigel was visible were excluded from the analysis. Mean \pm SD.

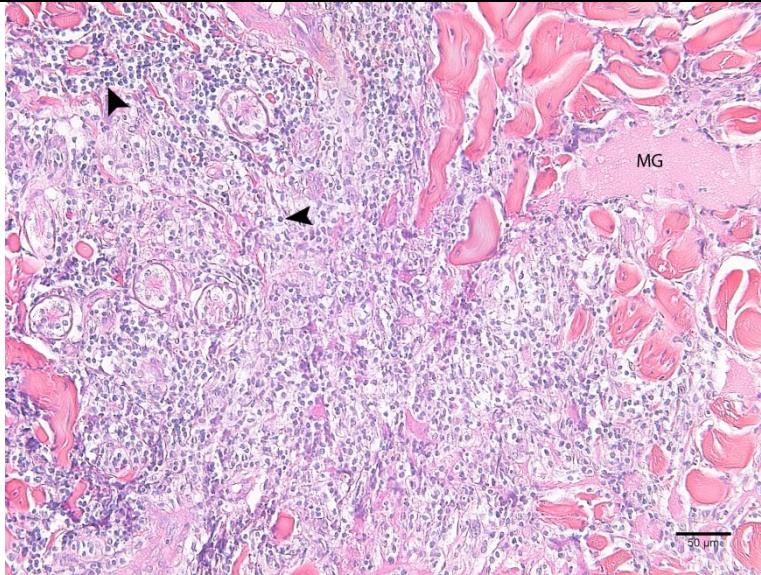


Figure 4. Mononuclear infiltration in sub-study 1 after 7 days of incubation *in vivo*.

reqIL-4 biopsy after HPS staining, illustrating mononuclear infiltration (arrowheads), with matrigel hardly distinguishable from host tissue. Bar is scaled at 50 μm, MG = matrigel.

3.4 Sub-study 2

In view of sub-study 1 results, and because the primary aim of the study was to monitor neutrophil migration in regards to IL-4, focus was oriented towards a shorter time-course and injected cytokine quantities were increased. To ensure that the neutrophil and mononuclear infiltrations observed in the matrigel control plugs were not due to DPBS, matrigel was diluted with RPMI 1640 as recommended by the manufacturer. **Figure 5** shows neutrophil scores infiltration for each group, at both time-points. Results were consistent with those obtained in sub-study 1: although there was a general increase in neutrophilia, probably concomitant with the concentration of cytokine-doped matrigel plugs increased to 250 ng, reqIL-8 and reqIL-4 failed to generate a response different from that of control pellets as no significant differences were found between groups ($p=0.33$ at 3 h, and $p=0.92$ at 12 h). In contrast to sub-study 1, neutrophil score variability among each group was less pronounced. Using the median neutrophil score

based on 5 slides rather than the score of a single slide may have helped in normalizing data.

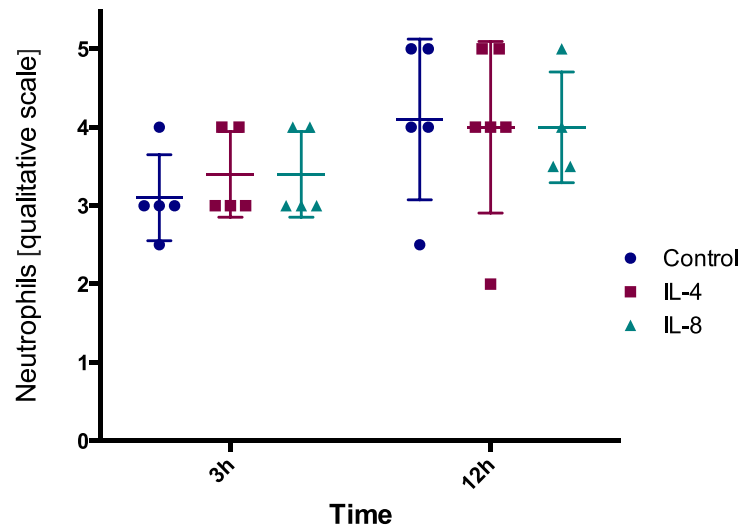


Figure 5. Sub-study 2: Histological analysis of neutrophil migration into the matrigel plugs.

Matrigel plugs supplemented with 250 ng of reqIL-4, reqIL-8 or control medium were excised at 3 h, and 12 h after inoculation and HPS-stained. Neutrophil infiltration was evaluated on a qualitative scale from 0 (no neutrophils visible) to 5 (dense infiltration), and results are shown for each group at both time-points. Each point represents the neutrophil score attributed to each biopsy. Slides where no matrigel was visible were excluded from the analysis. Mean \pm SD.

3.5 Sub-study 3

In view of the lack of neutrophil infiltration even in IL-8 containing matrigel, cytokine concentrations were increased to 500 ng for reqIL-4 and 1 μ g for reqIL-8 mixed in 250 μ l of matrigel per injection. Eighteen biopsies were harvested for histological analysis, and only 2 of those failed to reveal matrigel upon examination. Thirty-six additional biopsies were harvested and all analyzed by flow cytometry.

Biopsies intended for histological analyses were excised at 3 h. Neutrophil score results are illustrated in **figure 6**. One horse had 2 out of 3 poor quality biopsies, hence was excluded from the analysis. All biopsies from the remaining five horses were analyzed. Control biopsies revealed slightly variable score results, whereas neutrophilia in response to reqIL-4 and reqIL-8 was more constant. Overall scores were generally lower than at 3 h in sub-study 2 for all 3 conditions. The Cochran-Mantel-Haenszel test revealed a significant score difference between groups ($*p=0.049$) with a trend attributed to increased neutrophil scores for reqIL-8 compared to controls ($p=0.059$).

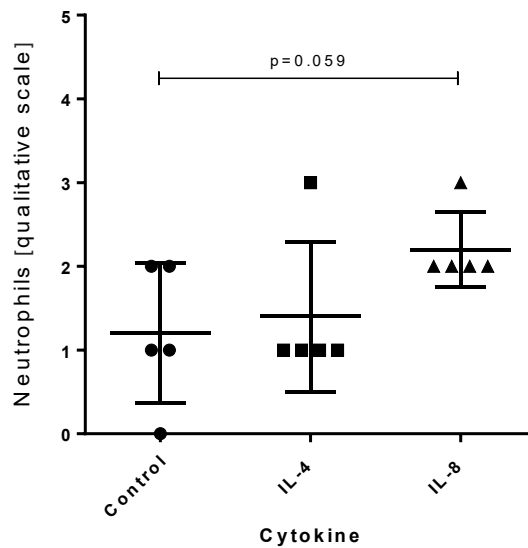


Figure 6. Sub-study 3: Histological analysis of neutrophil migration into the matrigel plugs.

Matrigel plugs supplemented with 500 ng of reqIL-4, 1 µg of reqIL-8 or control medium were excised at 3 h after inoculation and HPS-stained. Neutrophil infiltration was evaluated on a qualitative scale from 0 (no neutrophils visible) to 5 (dense infiltration). Each point represents the neutrophil score attributed to each biopsy. One horse was completely excluded from the analysis due to poor biopsy quality. A significant difference was found between groups ($*p=0.049$) and a trend attributed to increased neutrophil scores for reqIL-8 compared to controls ($p=0.059$). Mean \pm SD.

Biopsies processed by flow cytometry were harvested at 3 h and 6 h, and final neutrophil count was revealed for each biopsy (**figure 7**). A log scale was used to limit asymmetry between data as considerable variability between subjects for reqIL-4 and control values were observed. ReqIL-8 triggered the neutrophilic infiltrate expected of a positive control at both time-points. A two-way ANOVA revealed a significant difference between groups ($p=0.0025$), and Fisher's LSD post-test revealed a significant difference between reqIL-8 and control neutrophil counts ($p=0.032$) at 3 h (**figure 7A**), but not between reqIL-4 and

control plugs ($p=0.92$). At 6 h (**figure 7B**), neutrophilia was still generally greater in reqIL-8 plugs, but it was not quite significantly different from that of control biopsies ($p=0.054$). There was still no significant effect of reqIL-4 compared to control plugs ($p=0.73$).

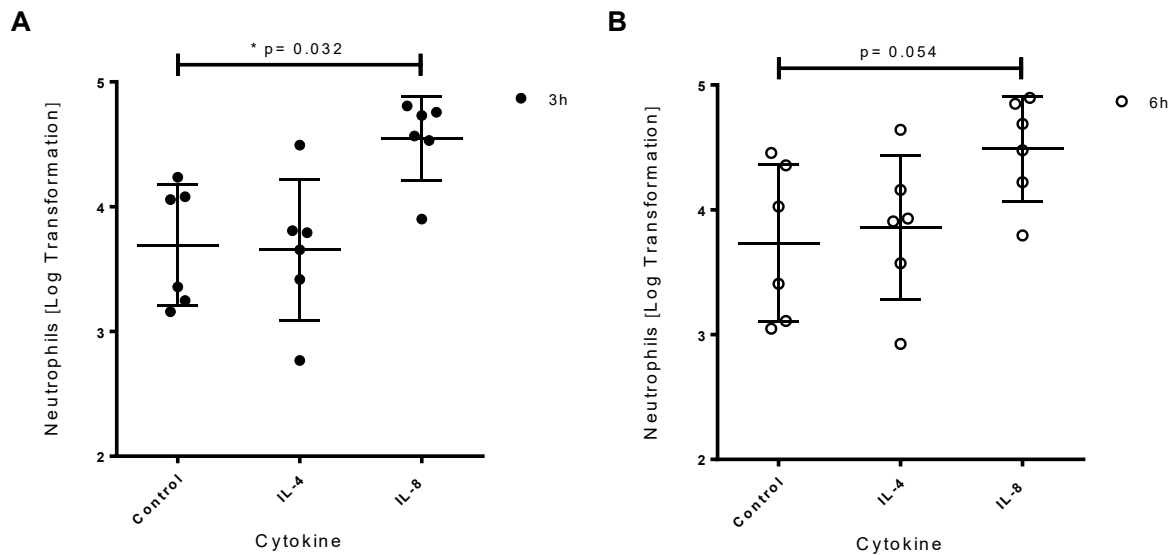


Figure 7. Sub-study 3: Flow cytometry analysis of neutrophil migration into the matrigel plugs. Matrigel plugs supplemented with 500ng of reqIL-4, 1 μ g of reqIL-8 or control medium were excised at 3 h and 6 h after inoculation. After plug excision and digestion, cells were stained using anti-MPO antibodies and revealed by flow cytometry. Significant differences were found between reqIL-8 and control neutrophil counts at 3 h ($p=0.032$) and a strong trend was found at 6 h ($p=0.054$).

4. Discussion

In the present study, we developed a model to assess the ability of reqIL-4 to induce neutrophilia in sub-cutaneous tissues of horses. Our model made it possible to demonstrate a neutrophilic response to reqIL-8, our positive control, but in contrast to

what we had postulated, not to reqIL-4. Moreover, unlike what is reported in other species, matrigel itself induced an inflammatory response in many of our horses, which could have limited our ability to measure neutrophil migration in response to reqIL-4, had it been subtle. Therefore, in our model, reqIL-4 does not trigger neutrophil chemotaxis in s.c. tissues in healthy horses.

To characterize the inflammation process on a cellular level, we aimed at developing a protocol entailing a local, cytokine-rich microenvironment that could easily be monitored, that allowed reliable tissue retrieval and that did not alter the inflammation process. In preliminary experiments, we first evaluated the effects of intradermal administration of reqIL-4 and reqIL-8. However, 10 ng of these cytokines resulted in discomfort, profuse sweating and shivering observed approximately 30 minutes after injection in a horse (*data no shown*). Studies have similarly reported adverse effects to intravenous or s.c. administration of IL-4 but at doses greater than those we investigated. In human patients, predominant signs included flu-like symptoms, gastrointestinal upset, lethargy, transient hypotension, headache and elevated liver enzymes, but more severe signs of toxicity such as vascular leak syndrome, epistaxis and hallucinations have also been reported (Gilleece et al., 1992; Sosman et al., 1994; Tulpule et al., 1997). We therefore aimed at limiting the systemic distribution of these cytokines to attenuate side effects. Matrigel supplemented with specific cytokines and mediators, including IL-8 (Grimaldi et al., 2011) and other cytokines (Dentelli et al., 1999; Amin et al., 2010; Pickens et al., 2010), lipopolysaccharide (LPS) (Temme et al., 2014), basic fibroblast growth factor (bFGF) and hepatocyte growth factor (HGF) (Barbero et al., 2001) implanted *in vivo*, offers an appropriate microenvironment for the recruitment of various cell infiltrates, including neutrophils (Temme et al., 2014). Models were mostly of murine origin, but matrigel has been used *in vivo* in dogs (Kang et al., 2012), rabbits (Luo et al., 2012) and

leeches (*Hirudo medicinalis*) (Grimaldi et al., 2011) and was reported to be well tolerated. As we anticipated matrigel was a convenient vehicle for reqIL-4 and reqIL-8, allowing a safer use of these mediators in our horses.

Because IL-4 itself fails to induce direct neutrophil migration (Lavoie-Lamoureux et al., 2010; Guo et al., 2013) the current hypothesis was that the release of mediators by resident cells in response to IL-4 would lead to neutrophil recruitment. These mediators could have autocrine/paracrine effects on neutrophils found in the inflammatory *milieu* (Cassatella, 1995), perpetuating the ongoing recruitment and activation of neutrophils in affected tissues, as it is seen in the airways of heaves-affected horses. Moreover, in addition to our previous findings linking neutrophils and IL-4 (Huang et al., 2007; Lavoie-Lamoureux et al., 2010), IL-4 mRNA expressed by BALF cells of heaves-affected horses develops concurrently with neutrophil recruitment (Lavoie et al., 2001; Cordeau et al., 2004). Taken together, this led us to believe that IL-4 and neutrophils play a key role in the pathogenesis of this heaves. We hypothesized that reqIL-8 would trigger a rapid and massive neutrophilic infiltrate into the matrigel plugs, followed by a later reqIL-4 response of lesser intensity. The neutrophilic inflammation we observed was much lower than expected, even for reqIL-8. We studied inflammation at 6 h, 48 h and 7 days in sub-study 1, as chemokines are known to diffuse rapidly from matrigel to culture media into which the matrigel pellet is incubated, where diffusion carries on steadily for at least 7 days (Grimaldi et al., 2011). A possible explanation for the observed lack of neutrophilic inflammation was that infiltration was perhaps just commencing at 6 h and had already started to decline at 48 h, which led us to evaluate 3h and 12h time points in sub-study 2. However, as expected (Iversen, 1989), neutrophils migrated towards matrigel soon after injection, consistent with the acute phase, followed by mononuclear cells taking on the role of predominant cells later in the resolution process, even though neutrophils

remained present.

In sub-study 2, the quantity of cytokines injected was increased to 250 ng to enhance neutrophil chemotaxis. Even though earlier time-points were evaluated, neutrophil response to reqIL-4 and reqIL-8 did not reach statistical differences when compared to the control plugs. Also, studying 5 randomly selected slides per biopsy instead of 1, as in sub-study 1, while reducing score variability, did not allow us to draw significant conclusions. Lastly, replacing DPBS by RPMI medium 1640 as negative control, did not attenuate neutrophil infiltration in the negative controls.

The neutrophil scoring method based on histological analysis had its limitations as it relies on subjective assessment of the biopsies. Moreover, a proportion of slides were excluded from histological analysis due to the absence of matrigel, which, consequently, further reduced the sample size. As flow cytometry offered the advantage of direct cell count, thus eliminating subjective bias, we decided to compare both methods in sub-study 3. Also, in an attempt to limit the number of biopsies excluded from the study because they lacked matrigel on their evaluated slides, we chose to inject larger volumes of matrigel. Finally, as an immunogenic response was thought to be responsible for control plugs infiltrated with inflammatory cells, we chose to shorten incubation times. Using this method, recovery was improved as only 2/18 biopsies were inconclusive upon histological examination. Nevertheless, while a trend was observed for reqIL-8, our positive control, histological scores did not reach significance. However, flow cytometry analysis, identified significant neutrophil infiltration with reqIL-8 when compared to the control plugs at 3 h. These findings suggest that flow cytometry is more relevant than histological analysis in detecting neutrophil migration.

Interestingly, histological scores in all three conditions in sub-study 3 were generally

lower than those obtained in sub-study 2 at 3 h, with 2 to 3 fold differences observed for both reqIL-4 and reqIL-8. Greater cytokine concentrations in sub-study 3 should have triggered a more potent neutrophil response than in sub-study 2, but various reports have shown that cells often respond to chemokines in a bell-shaped manner. Just as low doses fail to generate a response, high doses and/or steep gradients of IL-8, for example, not only decrease chemotactic neutrophil response, but can even induce a phenomenon known as chemorepulsion; a persistent, directionally biased movement away from that same chemokine (Ben-Baruch et al., 1997; Tharp et al., 2006). It is also possible that the larger volume of injected matrigel reduced the contact area between cytokines and subcutaneous tissues, diminishing the expected response.

The reasons behind a failed reqIL-4-induced neutrophilic response remain unclear. The controversial yet pleiotropic biological effects of IL-4 complicate our analysis. Indeed, studies characterize IL-4 as either an activator or inhibitor of neutrophil function. IL-4 generally has anti-inflammatory properties in *in vitro* studies conducted on neutrophils activated with microbial compounds or proinflammatory cytokines (Marie et al., 1996b, a; Niiro et al., 1997). However, our recent work suggests that IL-4 rather induces a mixed inflammatory profile characterized by an increased expression of IL -8 and TNF- α , and decreased IL-1- β in equine neutrophils stimulated with a low dose (40 U/ml of reqIL-4) for 5 h (Lavoie-Lamoureux et al., 2010). *In vivo*, in human and murine models, both neutropenic (Tulpule et al., 1997; Farivar et al., 2003) and neutrophilic (Gilleece et al., 1992; Prendiville et al., 1993), often in an indirect manner (Ratthe et al., 2009), has been reported in response to IL-4 administration, whereas other failed to find altered neutrophil trafficking (Dabbagh et al., 1999). These apparent divergent results may have been due in part to the state of cell activation prior to IL-4 administration. Indeed, as human patients enrolled in these clinical trials were either confirmed with malignancy or

HIV-seropositive, it is possible that their pathological context and/or prescribed medication may have altered neutrophil and IL-4 interactions, thus explaining these contradicting results. These divergent findings suggest that several cytokines and chemotactic factors are involved in the recruitment of neutrophils and that resident cells, the state of pre-activation of neutrophils, or the *milieu* in which these interactions take place appear to have an influence on the response. Indeed, neutrophils isolated for heaves-affected horses show increased responsiveness and alterations in gene expression relative to neutrophils of healthy subjects (Lavoie-Lamoureux et al., 2010). These findings have also been reported in human neutrophils in the context of atopy (Renz et al., 1992; Hershey et al., 1997). As our studies were conducted in healthy horses, it is possible that their response to reqIL-4 was different.

In addition, apparent reaction to matrigel is another aspect to consider when analyzing our results. Unexpectedly, matrigel appears to induce inflammation in horses, as infiltrations of both neutrophils and other leukocytes were observed in the negative controls. The extent of this interference in the interactions between reqIL-4 and neutrophils remain to be elucidated, but seeing as reqIL-8 also caused a modest neutrophilic response, which is unusual for such a potent neutrophil chemoattractant, we must consider bias caused by matrigel. First, its biocompatibility or immunogenicity is not explicitly known, in that it has not been formally studied. A proteomic analysis of matrigel (Hughes et al., 2010) revealed a complex protein mixture consisting of structural proteins, growth factors and their binding proteins as well as other proteins. Matrixes extracted from living cells such as matrigel are commonly used for growing cells that are sensitive to culture conditions, probably due to the presence of these essential growth factors and cytokines, which offers a more suitable environment (Fouad et al., 2005). However, this entails that component variations can be observed amongst batches, and

that some signaling pathways participating in cell growth or cell recruitment may not always be known (Hughes et al., 2010). Matrigel's murine origin is a second aspect to take into consideration. *In vivo* studies being most often conducted on mice, it's no surprise that immunological rejections are essentially non-existent in this species. Ocular toxicity in rabbits has been reported (Hwang et al., 2013), and the incorporation of matrigel in diffusion chambers of a bioartificial endocrine pancreas may be incompatible in dogs, due to excessive fibrous tissue proliferation and macrophage infiltration (Edamura et al., 2001). These two studies yielded divergent results in regards to matrigel compatibility, as opposed to previous work done on these same species (Kang et al., 2012; Luo et al., 2012). In the latter, though, matrigel was used for reasons other than the assessment of the inflammation process. Therefore, conflicting results could be attributed to the context of the assays, or the fact that there was no information available regarding an inflammatory cell invasion that may have been present. Given that small sample sizes were used in these conflicting studies, just as our own, data should be interpreted cautiously to avoid extrapolating conclusions in regards to matrigel biocompatibility in species other than mice, but it may nonetheless help clarify the cellular infiltrate observed in our control plugs. As reqIL-8, a potent neutrophil chemoattractant, also failed to generate a significantly different infiltration than that of negative controls in the two first sub-studies, perhaps cytokine concentrations were simply too low to trigger an *in vivo* response. Finally, in parallel to these three sub-studies, seeing as matrigel caused an inflammatory response in horses, we sought a different matrix to act as a vehicle for our cytokines and performed a trial on one horse that was not included in our sub-studies (*data not shown*). Puramatrix, a synthetic hydrogel composed of repeating amino acid sequences of Arginine-Alanine-Aspartic Acid-Alanine, also caused an inflammatory response similar to that of matrigel in the negative control. As this matrix is composed of close to 99% water and amino acids

(Zhang S, 2005), as opposed to murine components, we were surprised to observe what seemed to be yet another immunogenic reaction. Overall, our data suggests that perhaps the equine species is exceedingly sensitive to any exogenous reagents.

In conclusion, our results reveal that reqIL-4 fails to generate neutrophil migration in an equine subcutaneous model. This could be attributed to a variety of factors: its lack of direct neutrophilic chemotactic activity, a required pre-activation of neutrophils or of other structural or inflammatory cells, or that this subcutaneous model lacks sensitivity to assess mild neutrophilic inflammation. Matrigel caused an inflammatory response, limiting its usefulness in horses, and additional investigations are needed regarding its immunoreactive effect in this species. Furthermore, flow cytometry proved to be a more reliable method to estimate neutrophil migration when compared to histological score analysis.

5. Acknowledgements

The authors thank Guy Beauchamp for statistical analysis. Funding was provided by a discovery grant from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (JPL # RGPIN-2014-06-198) and a scholarship from le Fonds du Centenaire (MG).

References

- Amin, M.A., Rabquer, B.J., Mansfield, P.J., Ruth, J.H., Marotte, H., Haas, C.S., Reamer, E.N., Koch, A.E., 2010. Interleukin 18 induces angiogenesis in vitro and in vivo via Src and Jnk kinases. *Annals of the rheumatic diseases* 69, 2204-2212.
- Baggiolini, M., Clark-Lewis, I., 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS letters* 307, 97-101.
- Barbero, A., Benelli, R., Minghelli, S., Tosetti, F., Dorcaratto, A., Ponzetto, C., Wernig, A., Cullen, M.J., Albini, A., Noonan, D.M., 2001. Growth factor supplemented matrigel improves ectopic skeletal muscle formation--a cell therapy approach. *Journal of cellular physiology* 186, 183-192.
- Ben-Baruch, A., Grimm, M., Bengali, K., Evans, G.A., Chertov, O., Wang, J.M., Howard, O.M., Mukaida, N., Matsushima, K., Oppenheim, J.J., 1997. The differential ability of IL-8 and neutrophil-activating peptide-2 to induce attenuation of chemotaxis is mediated by their divergent capabilities to phosphorylate CXCR2 (IL-8 receptor B). *Journal of immunology* 158, 5927-5933.
- Brooks, A.C., Rickards, K.J., Cunningham, F.M., 2011. CXCL8 attenuates chemoattractant-induced equine neutrophil migration. *Veterinary immunology and immunopathology* 139, 141-147.
- Cassatella, M.A., 1995. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunology today* 16, 21-26.
- Cordeau, M.E., Joubert, P., Dewachi, O., Hamid, Q., Lavoie, J.P., 2004. IL-4, IL-5 and IFN-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Veterinary immunology and immunopathology* 97, 87-96.
- Dabbagh, K., Takeyama, K., Lee, H.M., Ueki, I.F., Lausier, J.A., Nadel, J.A., 1999. IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *Journal of immunology* 162, 6233-6237.
- Dentelli, P., Del Sorbo, L., Rosso, A., Molinar, A., Garbarino, G., Camussi, G., Pegoraro, L., Brizzi, M.F., 1999. Human IL-3 stimulates endothelial cell motility and promotes in vivo new vessel formation. *Journal of immunology* 163, 2151-2159.
- Edamura, K., Ohgawara, H., Nasu, K., Iwami, Y., Sato, A., Ishikawa, S., Matsuki, N., Ono, K., Ogawa, H., Sasaki, N., 2001. Effect of the extracellular matrix on pancreatic endocrine cell function and its biocompatibility in dogs. *Cell transplantation* 10, 493-498.
- Farivar, A.S., Krishnadasan, B., Naidu, B.V., Woolley, S.M., Verrier, E.D., Mulligan, M.S., 2003. Endogenous interleukin-4 and interleukin-10 regulate experimental lung ischemia reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 76, 253-259.
- Fouad, K., Schnell, L., Bunge, M.B., Schwab, M.E., Liebscher, T., Pearse, D.D., 2005. Combining Schwann cell bridges and olfactory-ensheathing glia grafts with chondroitinase promotes locomotor recovery after complete transection of the spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 1169-1178.

- Gilleece, M.H., Scarffe, J.H., Ghosh, A., Heyworth, C.M., Bonnem, E., Testa, N., Stern, P., Dexter, T.M., 1992. Recombinant human interleukin 4 (IL-4) given as daily subcutaneous injections--a phase I dose toxicity trial. *Br J Cancer* 66, 204-210.
- Giordano, C., Albani, D., Gloria, A., Tunesi, M., Batelli, S., Russo, T., Forloni, G., Ambrosio, L., Cigada, A., 2009. Multidisciplinary perspectives for Alzheimer's and Parkinson's diseases: hydrogels for protein delivery and cell-based drug delivery as therapeutic strategies. *The International journal of artificial organs* 32, 836-850.
- Grimaldi, A., Banfi, S., Vizioli, J., Tettamanti, G., Noonan, D.M., de Eguileor, M., 2011. Cytokine loaded biopolymers as a novel strategy to study stem cells during wound-healing processes. *Macromolecular bioscience* 11, 1008-1019.
- Guo, Y.L., Huang, H., Zeng, D.X., Zhao, J.P., Fang, H.J., Lavoie, J.P., 2013. Interleukin (IL)-4 induces production of cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINCs) and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in lungs of asthmatic rats. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban* 33, 470-478.
- Hershey, G.K., Friedrich, M.F., Esswein, L.A., Thomas, M.L., Chatila, T.A., 1997. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *The New England journal of medicine* 337, 1720-1725.
- Hirche, T.O., Atkinson, J.J., Bahr, S., Belaouaj, A., 2004. Deficiency in neutrophil elastase does not impair neutrophil recruitment to inflamed sites. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30, 576-584.
- Huang, H., Lavoie-Lamoureux, A., Moran, K., Lavoie, J.P., 2007. IL-4 stimulates the expression of CXCL-8, E-selectin, VEGF, and inducible nitric oxide synthase mRNA by equine pulmonary artery endothelial cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 292, L1147-1154.
- Huber, A.R., Kunkel, S.L., Todd, R.F., 3rd, Weiss, S.J., 1991. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254, 99-102.
- Hughes, C.S., Postovit, L.M., Lajoie, G.A., 2010. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* 10, 1886-1890.
- Hwang, Y.S., Chiang, P.R., Hong, W.H., Chiao, C.C., Chu, I.M., Hsiue, G.H., Shen, C.R., 2013. Study in vivo intraocular biocompatibility of in situ gelation hydrogels: poly(2-ethyl oxazoline)-block-poly(epsilon-caprolactone)-block-poly(2-ethyl oxazoline) copolymer, matrigel and pluronic F127. *PLoS one* 8, e67495.
- Iversen, O.H., 1989. The cell kinetics of the inflammatory reaction. Introduction and overview. *Current topics in pathology. Ergebnisse der Pathologie* 79, 1-5.
- Kang, B.J., Ryu, H.H., Park, S.S., Kim, Y., Woo, H.M., Kim, W.H., Kweon, O.K., 2012. Effect of matrigel on the osteogenic potential of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 74, 827-836.

- Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Hassell, J.R., Star, V.L., Cannon, F.B., Laurie, G.W., Martin, G.R., 1986. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* 25, 312-318.
- Lavoie-Lamoureux, A., Moran, K., Beauchamp, G., Muel, S., Steinbach, F., Lefebvre-Lavoie, J., Martin, J.G., Lavoie, J.P., 2010. IL-4 activates equine neutrophils and induces a mixed inflammatory cytokine expression profile with enhanced neutrophil chemotactic mediator release ex vivo. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 299, L472-482.
- Lavoie, J.P., Maghni, K., Desnoyers, M., Taha, R., Martin, J.G., Hamid, Q.A., 2001. Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *American journal of respiratory and critical care medicine* 164, 1410-1413.
- Leclere, M., Lavoie-Lamoureux, A., Lavoie, J.P., 2011. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology* 16, 1027-1046.
- Lee, K.Y., Peters, M.C., Anderson, K.W., Mooney, D.J., 2000. Controlled growth factor release from synthetic extracellular matrices. *Nature* 408, 998-1000.
- Luo, E., Hu, J., Bao, C., Li, Y., Tu, Q., Murray, D., Chen, J., 2012. Sustained release of adiponectin improves osteogenesis around hydroxyapatite implants by suppressing osteoclast activity in ovariectomized rabbits. *Acta biomaterialia* 8, 734-743.
- Marie, C., Pitton, C., Fitting, C., Cavaillon, J.M., 1996a. IL-10 and IL-4 synergize with TNF-alpha to induce IL-1ra production by human neutrophils. *Cytokine* 8, 147-151.
- Marie, C., Pitton, C., Fitting, C., Cavaillon, J.M., 1996b. Regulation by anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13, TGFbeta) of interleukin-8 production by LPS- and/ or TNFalpha-activated human polymorphonuclear cells. *Mediators of inflammation* 5, 334-340.
- Mukaida, N., 2003. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 284, L566-577.
- Nelms, K., Keegan, A.D., Zamorano, J., Ryan, J.J., Paul, W.E., 1999. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annual review of immunology* 17, 701-738.
- Niino, H., Otsuka, T., Izuhara, K., Yamaoka, K., Ohshima, K., Tanabe, T., Hara, S., Nemoto, Y., Tanaka, Y., Nakashima, H., Niho, Y., 1997. Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood* 89, 1621-1628.
- Ohashi, K., Marion, P.L., Nakai, H., Meuse, L., Cullen, J.M., Bordier, B.B., Schwall, R., Greenberg, H.B., Glenn, J.S., Kay, M.A., 2000. Sustained survival of human hepatocytes in mice: A model for in vivo infection with human hepatitis B and hepatitis delta viruses. *Nature medicine* 6, 327-331.
- Passaniti, A., Taylor, R.M., Pili, R., Guo, Y., Long, P.V., Haney, J.A., Pauly, R.R., Grant, D.S., Martin, G.R., 1992. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 67, 519-528.

- Pickens, S.R., Volin, M.V., Mandelin, A.M., 2nd, Kolls, J.K., Pope, R.M., Shahrara, S., 2010. IL-17 contributes to angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Journal of immunology* 184, 3233-3241.
- Prendiville, J., Thatcher, N., Lind, M., McIntosh, R., Ghosh, A., Stern, P., Crowther, D., 1993. Recombinant human interleukin-4 (rhu IL-4) administered by the intravenous and subcutaneous routes in patients with advanced cancer--a phase I toxicity study and pharmacokinetic analysis. *European journal of cancer* 29A, 1700-1707.
- Ratthe, C., Ennaciri, J., Garces Goncalves, D.M., Chiasson, S., Girard, D., 2009. Interleukin (IL)-4 induces leukocyte infiltration in vivo by an indirect mechanism. *Mediators of inflammation* 2009, 193970.
- Renz, H., Jujo, K., Bradley, K.L., Domenico, J., Gelfand, E.W., Leung, D.Y., 1992. Enhanced IL-4 production and IL-4 receptor expression in atopic dermatitis and their modulation by interferon-gamma. *The Journal of investigative dermatology* 99, 403-408.
- Romagnani, S., 2000. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 85, 9-18; quiz 18, 21.
- Sosman, J.A., Fisher, S.G., Kefer, C., Fisher, R.I., Ellis, T.M., 1994. A phase I trial of continuous infusion interleukin-4 (IL-4) alone and following interleukin-2 (IL-2) in cancer patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 5, 447-452.
- Temme, S., Jacoby, C., Ding, Z., Bonner, F., Borg, N., Schrader, J., Flogel, U., 2014. Technical advance: monitoring the trafficking of neutrophil granulocytes and monocytes during the course of tissue inflammation by noninvasive 19F MRI. *Journal of leukocyte biology* 95, 689-697.
- Tharp, W.G., Yadav, R., Irimia, D., Upadhyaya, A., Samadani, A., Hurtado, O., Liu, S.Y., Munisamy, S., Brainard, D.M., Mahon, M.J., Nourshargh, S., van Oudenaarden, A., Toner, M.G., Poznansky, M.C., 2006. Neutrophil chemorepulsion in defined interleukin-8 gradients in vitro and in vivo. *Journal of leukocyte biology* 79, 539-554.
- Tulpule, A., Joshi, B., DeGuzman, N., Espina, B.M., Mocharnuk, R., Prakash, O., Templeton, D., Levine, A.M., Gill, P.S., 1997. Interleukin-4 in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 8, 79-83.
- Wills-Karp, M., 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annual review of immunology* 17, 255-281.
- Zhang S, E.-B.R., Zhao X, Spirio L., 2005. Self-assembling peptide nanofiber scaffolds., In: Elisseff PX, M.J. (Ed.) *Scaffolding in Tissue Engineering*. CRC, Boca Raton (FL), pp. 217-238.

Discussion générale

Ce mémoire avait pour but de déterminer si l'administration d'IL-4 entraînerait un appel neutrophilique dans la peau de chevaux. Nos résultats révèlent qu'elle n'aurait peut-être pas le rôle prépondérant qu'on lui accordait en ce qui a trait à ses effets chimiotactiques, tout au moins chez des chevaux sains. Voici néanmoins quelques aspects que nous avons mis en lumière, en plus des résultats présentés dans l'article.

Cinétique cellulaire et réponse aux cytokines

Dans le but de mieux caractériser la cinétique neutrophilique à court, moyen et long terme, nous avons évalué plusieurs temps d'incubation différents au cours des trois sous-études. Il est bien établi que le neutrophile fait partie de l'arsenal cellulaire recruté au début du processus inflammatoire, correspondant à la phase aiguë de la réponse [185]. Conformément, ils ont été observés, infiltrant le matrigel ou au pourtour de celui-ci, dès 3 h suivant l'injection des cytokines, et leur infiltration a perduré jusqu'à 7 jours post-injection, même si une légère diminution a été notée au cours du temps. Dans plusieurs modèles inflammatoires décrits dans la littérature, il est rare d'observer des neutrophiles pour une période aussi prolongée, leur déclin étant rapide dès 24-48 h après la stimulation. Les valeurs sont de retour à la normale généralement 6 jours plus tard [107, 109], mais parfois aussi tôt que 96 h [106] voire 24 h [105], du moins dans les modèles pulmonaires. Leur persistance tissulaire pourrait être expliquée par le fait que le matrigel libère en petites concentrations, de façon relativement constante les facteurs qui y ont été mélangés et ce, pendant au moins 7 jours [180]. Dès lors, le stimulus inflammatoire étant perpétré, il serait normal d'observer un afflux neutrophilique lui aussi persistant. Outre ce fait, la réaction indéniable, probablement de nature immunogène, chez la majorité de nos sujets en réponse au matrigel seul pourrait aussi expliquer la persistance des neutrophiles, indépendamment de la présence des cytokines. D'ailleurs, lors de la sous-étude 1, nous nous sommes aussi attardés à l'infiltration des mononucléaires. Ces derniers ont connu une infiltration croissante et ils étaient prédominants après 7 jours d'incubation. Les effets de l'IL-4 sur la modulation des lymphocytes T CD4+ activés à acquérir des fonctionnalités du profil Th2 [138], en plus de recruter d'autres lymphocytes [186, 187], pourraient être l'une des raisons expliquant la présence de cellules mononucléaires. Similairement, il semble que l'IL-8 puisse aussi avoir des effets chimiotactiques directs sur le recrutement lymphocytaire [188], mais aussi indirects [189] via la libération de facteurs chimiotactiques par les neutrophiles stimulés. Cette réponse apparaît d'ailleurs après celle des neutrophiles [189].

Ceci dit, si la cinétique cellulaire était telle qu'attendue avec les neutrophiles comme première ligne de défense, suivis des mononucléaires à plus long terme, elle semblait peu dépendante de l'effet des cytokines étudiées (IL-4 et IL-8), du moins lors des sous-études 1 et 2, puisque comme il a été mentionné précédemment, une infiltration similaire a été observée dans les contrôles négatifs. À cause des différentes doses de cytokines utilisées au cours des 3 sous-études, il est difficile de tirer un portrait exact de la cinétique neutrophilique à travers le temps. Néanmoins, il convient de dire que de façon générale, l'infiltration était croissante jusqu'à environ 12 h, puis avait commencé à décroître graduellement à 48 h et encore à 7 jours.

Lors de la sous-étude 3, les biopsies analysées par cytométrie de flux étaient récoltées à 3 h et 6 h. Une échelle logarithmique a été utilisée pour limiter l'asymétrie entre les données puisqu'une variabilité considérable était observée entre les sujets, surtout pour les conditions d'IL-4 et des contrôles. L'IL-8 a cette fois-ci provoqué l'infiltrat neutrophilique attendu d'un contrôle positif aux deux temps. Une différence significative entre les groupes, et entre le nombre de neutrophiles issus du groupe IL-8 par rapport aux contrôles à 3 h, mais pas entre l'IL-4 et les contrôles a été observé. À 6 h, une plus forte tendance neutrophilique était observée dans le groupe IL-8, mais la différence n'était pas tout à fait significativement différente du groupe contrôle. Il n'y avait toujours pas d'effet significatif de l'IL-4 par rapport au groupe témoin. À l'histologie, une différence significative a été révélée entre les groupes à 3 h, mais la différence entre l'IL-8 et les contrôles n'était pas significative, contrairement à ce que la cytométrie de flux a fait ressortir au même temps. Ces résultats suggèrent que l'analyse histologique ne semble pas offrir le même degré de sensibilité que la cytométrie de flux pour évaluer la migration neutrophilique.

Quant à l'IL-4, les raisons expliquant son activité biologique en deçà de nos attentes demeurent nébuleuses. En effet, l'IL-4 utilisée dans le cadre de nos recherches a été préalablement incubée avec des neutrophiles équins *in vitro* pour confirmer son activité biologique sur ces derniers (résultats non présentés dans ce mémoire). Nous avons noté un changement morphologique après quelques heures d'incubation avec l'interleukine en comparaison à la condition contrôle. Plus précisément, des protrusions membranaires ont été observées, similairement à la polarisation rapportée dans la littérature. Les mononucléaires ont également présenté des changements morphologiques notables (protrusion plus importante). Au départ, comme l'IL-8 ne provoquait elle aussi qu'une infiltration modeste, nous avons

postulé que les concentrations cytokiniques étaient tout simplement insuffisantes pour déclencher une réponse. Le **tableau I** présente une série d'études *in vivo* qui illustre la grande variabilité dans les doses d'IL-4 utilisées ainsi que la voie d'administration choisie.

	Étude	Espèce	Doses d'IL-4	Administration
Systémique	Gilleece et al. 1992	Humain (cancer)	0.5, 1 ou 5 µg/kg/jour	Sous-cutanée
	Tulpule et al. 1997	Humain (SIDA)	1µ/kg/jour	Sous-cutanée
	Farivar et al. 2003	Rat	10 µg	Intra-veineuse
	Ratthé et al. 2009	Souris	250ng	Poche d'air dans le dos
Pulmonaire	Shi et al. 1998	Humain (asthmatiques)	20 mg	Inhalée par nébuliseur
	Dabbagh et al. 1999	Souris	250 ng	Intranasale
	Dittrich et al. 2008	Souris	1µg	Intranasale
	Mulligan et al. 1993	Rat	10, 50, 100 ou 250 ng	Cathéter intratrachéal
	Guo et al. 2013	Rat	2, 4 ou 8 µg	Intranasale

Tableau I. Sommaire des protocoles d'administration d'IL-4 *in vivo*
Tiré des articles [160-164, 190-193]

Certaines de ces études ont signalé divers effets adverses suite à l'administration de l'IL-4 chez les patients humains [164, 190]. Les doses utilisées étaient beaucoup plus importantes que celles que nous avons prévu administrer dans le cours de nos essais cliniques, notamment parce que notre but n'était pas d'évaluer la dose maximale d'IL-4 tolérée chez les chevaux, mais aussi parce que nous voulions éviter d'entraîner des signes cliniques importants. De plus, bien que le but de ces études n'était pas toujours d'étudier les interactions entre l'IL-4 et les neutrophiles, les effets biologiques de l'IL-4 ont été significatifs à des doses de l'ordre des nanogrammes [161, 162, 193]. En outre, étant donné que la dose de 10 ng avait provoqué des

effets secondaires évidents chez une jument dans le cadre de nos essais préliminaires, nous croyions que cette dose serait aussi suffisante pour entraîner une réponse neutrophilique significative. Dans leur ensemble, ces données expliquent pourquoi nous avons choisi la dose initiale de 10 ng de reqIL-4 dans le cadre de la sous-étude 1. Or, il semblerait que, tout comme les doses subséquentes de 250 et 500 ng de reqIL-4, elle n'a pas été en mesure de provoquer une infiltration neutrophilique significativement différente de celle des contrôles négatifs. Étant donné les divergences entre nos résultats et les études préalables illustrant les effets de l'IL-4 sur les neutrophiles équins *in vitro*, il est possible que plusieurs cytokines et facteurs chimiotactiques soient impliqués dans le recrutement des neutrophiles et que les cellules résidentes, l'état de pré-activation des neutrophiles, ou le milieu dans lequel ces interactions ont lieu puissent moduler la réponse. Les méthodes que nous utilisons pour isoler les neutrophiles ont peut-être aussi un effet activateur, ce qui les sensibiliserait à répondre d'une manière différente à diverses cytokines ou médiateurs, dont l'IL-4. De plus, la réaction inflammatoire occasionnée par le matrigel pourrait avoir masqué une neutrophilie de faible intensité qui aurait eu lieu en réponse à la reqIL-4. Vu la nature légèrement variable du matrigel et sa source murine, nous ne pouvons exclure le fait qu'il contienne potentiellement des inhibiteurs d'IL-4. Par contre, il importe de mentionner que lors de la sous-étude 3, la dose de reqIL-4 (500 ng) était inférieure à celle de reqIL-8 (1 µg) en raison d'une erreur d'étiquetage des aliquots de reqIL-4. Il est donc impossible de savoir quel aurait été l'effet observé si les mêmes concentrations avaient été administrées. Quoiqu'il en soit, la dose d'IL-4 était quand même bien au-delà des concentrations physiologiques rapportées dans la littérature du moins en ce qui a trait aux sécrétions d'IL-4 dans les voies respiratoires de patients asthmatiques et non-asthmatiques, suite à une stimulation antigénique (117.2 pg/ml (médiane) [194] et environ 200 pg/ml (moyenne) [195] chez des patients asthmatiques).

Matrigel et modèle sous-cutané

De prime abord, nous avons choisi d'incorporer le Matrigel à notre protocole pour limiter la distribution systémique des cytokines, vu les effets secondaires rapportés chez l'humain ainsi que chez la jument de nos essais préliminaires, mais aussi puisque le matrigel offre des propriétés gélifiantes une fois injecté sous la peau, permettant ainsi de faciliter la récupération du tissu vers lequel les neutrophiles auraient migré. Or, matrigel ne fut pas une panacée, tel que nous l'avions souhaité, et le premier obstacle rencontré fut sa manipulation en

laboratoire. De nature très visqueuse, il fallait le diluer avec du milieu de culture afin de faciliter son utilisation. Les quantités prélevées à même la fiole étaient impossibles à pipetter avant que le matrigel ne soit dilué; une seringue graduée de 1 ml a donc été utilisée, aspirant ainsi un volume moins précis qu'une pipette l'aurait fait. Les volumes injectés étaient donc plus ou moins de 100 μ l et 250 μ l, selon la sous-étude. Bien qu'au final ces légères variations n'ont certainement pas eu d'effet sur nos résultats, ajouter un réactif afin de diluer le matrigel (le RPMI 1640 dans le cas présent) a peut-être pu influencer la réponse inflammatoire.

Par la suite, l'injection sous-cutanée a aussi apporté son lot de complications. La polymérisation du matrigel se faisait parfois en petite boule compacte facilement perceptible à la surface de la peau, alors que d'autres sites étaient complètement plats et difficilement détectables. La réaction cutanée semblait elle aussi assez aléatoire; chez tous les chevaux, certains sites réagissaient très fortement, caractérisés par de l'œdème, de la chaleur et de la sensibilité au toucher alors que d'autres demeuraient neutres, et ce, souvent indépendamment du fait qu'une cytokine y était incorporée ou non. Bien entendu, la mauvaise polymérisation du matrigel ainsi que la présence d'œdème masquaient certains sites et influençaient certainement notre capacité à réaliser les biopsies au bon endroit, ce qui pourrait expliquer pourquoi certaines d'entre-elles ne présentaient aucun matrigel sur lames.

Concernant l'évaluation des lames histologiques, là encore, quelques anicroches ont fait surface. Au départ, nous nous attendions à observer un bouchon compact et bien défini entre les couches de tissu sous-cutané au microscope. La plupart du temps, cependant, le matrigel était entremêlé de fibres de collagène et dispersé à travers les tissus. Il était donc difficile de déterminer comment interpréter l'infiltration neutrophilique : devons-nous tenir compte de seulement ceux infiltrant le matrigel? Qu'en était-il des neutrophiles péri-vasculaires, qui se retrouvaient en périphérie du matrigel ou ailleurs dans les tissus? Au final, nous avons considéré l'entièreté de chaque lame pour en déterminer le score, puisque, surtout aux temps d'incubation courts (3 h et 6 h), il semblait normal de les observer davantage en périphérie plutôt que dans le matrigel; leur migration ne faisant que commencer. La distribution variable du matrigel sur lame ainsi que des neutrophiles est aussi une des raisons pourquoi nous avons choisi d'évaluer les biopsies selon un score histologique plutôt que par morphométrie. D'autant plus, tel que démontré sur les photos insérées dans l'article, les lames fortement infiltrées par

des neutrophiles l'étaient parfois si densément qu'il aurait été impossible de procéder à un comptage cellulaire de chacune des lames.

Dans la sous-étude 1, nous avons choisi d'évaluer qu'une seule lame par biopsie, dont la coupe était prélevée au centre de cette dernière. Cette décision fut basée sur des études similaires à la nôtre rapportées dans la littérature qui évaluaient divers processus en réponse à des cytokines ou des facteurs biologiquement actifs, injectées avec du matrigel ou autre matrice tridimensionnelle. Beaucoup d'entre-elles n'évaluaient qu'une seule lame par biopsie [196, 197], mais le nombre de lames évaluées n'était pas toujours précisé [180, 198-200]. Après n'avoir observé aucune différence significative entre les groupes, et puisque les scores histologiques étaient aussi très variables dans un même groupe, nous nous sommes questionnés à savoir si une seule lame pouvait vraiment représenter fidèlement l'entièreté de chaque biopsie. Nous avons donc décidé d'évaluer 5 lames par biopsie, prélevées au hasard, pour les sous-études suivantes, et d'utiliser la médiane de ces 5 lames pour représenter le score final de chaque biopsie. Certes, cette méthode a réduit la variabilité entre les scores, mais de façon générale, elle n'a pas permis de tirer des conclusions beaucoup plus significatives, du moins dans la sous-étude 2.

En parallèle à la sous-étude 3, et puisque le matrigel occasionnait une réaction inflammatoire, nous avons fait des essais avec un autre type de matrice tridimensionnelle, Puramatrix®, elle aussi distribuée par Corning. Cette matrice nous a été recommandée par le soutien technique de Corning suite à nos discussions concernant les problématiques du matrigel. D'ailleurs, nous les avons contactés à plusieurs reprises au cours de nos essais cliniques avec le matrigel. Ils ont proposé quelques changements à notre protocole (le remplacement du DPBS par le RPMI 1640 comme contrôle négatif ainsi que d'essayer différentes concentrations ou volumes de matrigel, par exemple) afin de contrer nos problèmes de réaction inflammatoire. Au final, ils semblaient du même avis que nous en ce qui avait trait à la possible réaction inflammatoire/immunogène et ils nous ont donc suggéré le Puramatrix. Cet hydrogel entièrement synthétique et résorbable est composé d'une séquence de 4 acides aminés : arginine-alanine-acide-aspartique-alanine, préparés dans une solution aqueuse. Contrairement au matrigel qui se polymérise en fonction de la température, les nanofibres de puramatrix se gélifient en réponse aux concentrations de sels. La concentration des peptides peut être ajustée afin de rendre le gel plus ou moins perméable. À l'instar du matrigel, puramatrix semble avoir

plusieurs applications cliniques, y compris le largage de drogues *in vivo* [201, 202], et il peut aussi être enrichi de facteurs biologiquement actifs ou chimiques en vue d'influencer une migration cellulaire [203]. Là encore, aucune réaction adverse suite à son utilisation *in vivo* n'avait été rapportée, au meilleur de nos connaissances, et puramatrix a passé une série de tests rigoureux en ce qui a trait à sa biocompatibilité et l'absence de résidus toxiques [204]. Étant donné son origine synthétique composée à 99% d'eau, et considérant le fait qu'il n'était pas sensé provoquer de réaction inflammatoire, nous avons fait l'essai du puramatrix chez une jument qui n'était pas incluse dans nos études. Cent-cinquante µl de puramatrix seul ainsi que 150 µl de puramatrix supplémenté de 250 ng de reqIL-8 comme contrôle positif ont été injectés en suivant notre protocole de matrigel, et incubé sous la peau 4 h. Les biopsies obtenues ont été analysées comme celles du matrigel aussi. À notre grande surprise, l'infiltration neutrophilique était similaire entre les conditions contrôles et de reqIL-8. De plus elle était aussi importante, voire plus, que l'infiltration des contrôles négatifs de matrigel. Bref, puramatrix a lui aussi occasionné une réaction inflammatoire chez cette jument, et nous avons donc cessé de l'utiliser. Contrairement au matrigel, lorsqu'on considère son origine murine qui pourrait expliquer une réaction de nature immunogène chez le cheval, nous voyons mal comment le puramatrix aurait pu faire de même. L'espèce équine est peut-être excessivement sensible à tout produit exogène, ou peut-être réagit-elle au trauma lié à l'injection, si minime soit-il. Somme toute, ces données portent à croire que le modèle sous-cutané, du moins, au niveau de l'encolure, n'est peut-être pas approprié dans un contexte d'évaluation de la cinétique inflammatoire. Chose certaine, le matrigel et tout véhicule étranger devraient être utilisés avec précaution chez l'espèce équine.

Conclusion et perspectives

Ce mémoire a permis d'explorer les effets de l'IL-4 dans la peau de chevaux sains. Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que :

- § *L'IL-4 n'entraîne pas une neutrophilie cutanée significativement différente de celle du matrigel chez des chevaux en santé.*
- § *Le matrigel cause des réactions inflammatoires variables selon l'individu, mais non négligeables, potentiellement de nature immunogène.*
- § *Le modèle sous-cutané pour évaluer la neutrophilie tissulaire comporte des obstacles significatifs.*
- § *Les scores histologiques ne sont pas appropriés dans l'évaluation de la neutrophilie cutanée.*
- § *Le modèle d'analyse par cytométrie de flux permet de bien détecter les neutrophiles ayant migrés dans le matrigel.*

Les études préalables de notre laboratoire ont illustré à plusieurs reprises l'effet biologique de l'IL-4 sur l'activité des neutrophiles équins *in vitro*, lui conférant un rôle activateur. Il nous semblait donc pertinent de confirmer si l'IL-4 possédait les mêmes propriétés *in vivo*, étant donné leur implication soupçonnée dans l'exacerbation de pathologies allergiques telles que l'asthme et le souffle. Or, nos données en témoignent autrement et quelques pistes peuvent expliquer ces résultats contradictoires. Premièrement, le microenvironnement *in vitro* ne permet pas d'apprécier la richesse et la complexité des signaux du milieu vivant et la réponse à l'IL-4 comporte certainement plusieurs éléments modulateurs. *In vivo*, le rôle de l'IL-4 dans le chimiotactisme neutrophilique varie possiblement selon le contexte pathologique ou le milieu tissulaire dans lequel se déroulent les interactions. De plus, étant donné l'interférence du matrigel dans la réaction inflammatoire, il est difficile de dresser un portrait réel et sans biais de l'effet de l'IL-4 dans notre étude. Tel que mentionné précédemment, il est possible qu'une modeste réponse à l'IL-4 ait été masquée par celle occasionnée par le matrigel. Rétrospectivement, il n'est donc pas surprenant d'observer autant de résultats divergents dans la littérature et il semble rester bon nombre d'éléments à mettre en lumière sur cette cytokine.

Ensuite, le modèle sous-cutané s'est avéré plus complexe qu'on ne l'aurait cru, vu les obstacles rencontrés, surtout en ce qui a eu trait à la distribution systémique des cytokines sans véhicule, les réactions liées à différents véhicules et le manque de sensibilité des scores histologiques. L'utilisation d'implants sous-cutanés à libération lente telles que les pompes Alzet® pourrait éventuellement être envisagée, mais, de façon générale, il semble peu avantageux de développer ce modèle davantage, du moins pour des études de cinétique cellulaire.

Lors de futures études, il pourrait être intéressant d'évaluer plus explicitement et formellement la biocompatibilité du matrigel chez l'espèce équine en comparant l'infiltration cellulaire avec d'autres composés tels que le LPS, puissant facteur chimiotactique neutrophilique, le RPMI 1640 seul, afin de voir s'il avait un rôle à jouer dans la contamination de nos contrôles négatifs, de la saline, contrôle négatif par excellence ou encore avec le simple trauma d'injection sans véhicule. Nous devons aussi nous pencher sur ce qui suscite l'augmentation d'ARNm d'IL-4 dans les poumons de chevaux atteints du souffle et son rôle dans cette pathologie. En effet, vu la réponse décevante à l'IL-4 dans notre modèle, il est possible que son rôle soit autre que celui du chimiotactisme neutrophilique direct proprement parlant. Préciser les effets pléiotropiques de l'IL-4 et ce qui influence la cascade de signalisation se doit aussi d'être exploré. Plus spécifiquement, la prochaine étape pourrait être d'évaluer la réponse pulmonaire suivant l'instillation d'IL-4 chez des chevaux sains et des chevaux atteints du souffle. Après tout, déchiffrer la pathophysiologie du souffle et, par extension, celle de l'asthme, demeure essentielle pour le développement de cibles thérapeutiques efficaces et durables.

Bibliographie

1. Hotchkiss, J.W., S.W. Reid, and R.M. Christley, *A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: Risk factors for recurrent airway obstruction.* Equine Vet J, 2007. **39**(4): p. 301-8.
2. Ewart, S.L. and N.E. Robinson, *Genes and respiratory disease: a first step on a long journey.* Equine Vet J, 2007. **39**(3): p. 270-4.
3. Jost, U., et al., *A region on equine chromosome 13 is linked to recurrent airway obstruction in horses.* Equine Vet J, 2007. **39**(3): p. 236-41.
4. Gerber, V., et al., *Mixed inheritance of equine recurrent airway obstruction.* J Vet Intern Med, 2009. **23**(3): p. 626-30.
5. Lavoie, J.P., et al., *Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(8 Pt 1): p. 1410-3.
6. Cordeau, M.E., et al., *IL-4, IL-5 and IFN-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves.* Vet Immunol Immunopathol, 2004. **97**(1-2): p. 87-96.
7. Horohov, D.W., et al., *Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction.* Vet Immunol Immunopathol, 2005. **108**(1-2): p. 237-45.
8. Lavoie-Lamoureux, A., et al., *IL-4 activates equine neutrophils and induces a mixed inflammatory cytokine expression profile with enhanced neutrophil chemotactic mediator release ex vivo.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010. **299**(4): p. L472-82.
9. Leclere, M., A. Lavoie-Lamoureux, and J.P. Lavoie, *Heaves, an asthma-like disease of horses.* Respirology, 2011. **16**(7): p. 1027-46.
10. Robinson, N.E., *International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University 16-18 June 2000.* Equine Vet J, 2001. **33**(1): p. 5-19.
11. Lowell, F.C., *Observations on Heaves. An Asthma-Like Syndrome in the Horse.* J Allergy, 1964. **35**: p. 322-30.
12. Costa, L.R., et al., *Temporal clinical exacerbation of summer pasture-associated recurrent airway obstruction and relationship with climate and aeroallergens in horses.* Am J Vet Res, 2006. **67**(9): p. 1635-42.
13. Bowles, K.S., et al., *A novel model for equine recurrent airway obstruction.* Vet Immunol Immunopathol, 2002. **87**(3-4): p. 385-9.
14. Jean, D., et al., *Evaluation of variations in bronchoalveolar lavage fluid in horses with recurrent airway obstruction.* Am J Vet Res, 2011. **72**(6): p. 838-42.
15. Kaup, F.J., et al., *Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). II: Pathomorphological changes of the terminal airways and the alveolar region.* Equine Vet J, 1990. **22**(5): p. 349-55.
16. Range, F., L. Mundhenk, and A.D. Gruber, *A soluble secreted glycoprotein (eCLCA1) is overexpressed due to goblet cell hyperplasia and metaplasia in horses with recurrent airway obstruction.* Vet Pathol, 2007. **44**(6): p. 901-11.
17. Lugo, J., et al., *Airway inflammation is associated with mucous cell metaplasia and increased intraepithelial stored mucosubstances in horses.* Vet J, 2006. **172**(2): p. 293-301.
18. Lanctôt-Setlakwe, E., *Subepithelial collagen content in the peripheral airways of heaves-affected and control horses in Mémoire de maîtrise, Sciences Vétérinaires.* 2011, Université de Montréal.
19. Herszberg, B., et al., *Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling.* J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(2): p. 382-8.

20. Leclere, M., et al., *Effect of antigenic exposure on airway smooth muscle remodeling in an equine model of chronic asthma*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. **45**(1): p. 181-7.
21. Halliwell, R.E., et al., *Local and systemic antibody production in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease*. Vet Immunol Immunopathol, 1993. **38**(3-4): p. 201-15.
22. Scharrenberg, A., et al., *IgE, IgGa, IgGb and IgG(T) serum antibody levels in offspring of two sires affected with equine recurrent airway obstruction*. Anim Genet, 2010. **41 Suppl 2**: p. 131-7.
23. Deaton, C.M., et al., *Early onset airway obstruction in response to organic dust in the horse*. J Appl Physiol, 2007. **102**(3): p. 1071-7.
24. Fairbairn, S.M., et al., *Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure*. Clin Exp Allergy, 1993. **23**(10): p. 821-8.
25. Watanabe, A., et al., *Transfer of allergic airway responses with antigen-primed CD4+ but not CD8+ T cells in brown Norway rats*. J Clin Invest, 1995. **96**(3): p. 1303-10.
26. Dales, R.E. and P.W. Munt, *Farmer's Lung Disease*. Can Fam Physician, 1982. **28**: p. 1817-20.
27. Lawson, G.H., et al., *The presence of precipitating antibodies in the sera of horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD)*. Equine Vet J, 1979. **11**(3): p. 172-6.
28. Giguere, S., et al., *Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate*. Vet Immunol Immunopathol, 2002. **85**(3-4): p. 147-58.
29. Ainsworth, D.M., et al., *Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN-gamma and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells*. Vet Immunol Immunopathol, 2003. **96**(1-2): p. 83-91.
30. Debrue, M., et al., *Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells*. Vet Immunol Immunopathol, 2005. **105**(1-2): p. 25-31.
31. Ainsworth, D.M., et al., *Effects of in vitro exposure to hay dust on expression of interleukin-17, -23, -8, and -1beta and chemokine (C-X-C motif) ligand 2 by pulmonary mononuclear cells isolated from horses chronically affected with recurrent airway disease*. Am J Vet Res, 2007. **68**(12): p. 1361-9.
32. Tizard, I.R., *Veterinary immunology : an introduction*. 7th ed. 2004, Philadelphia: Saunders. xvi, 494 p.
33. Walker, R.I. and R. Willemze, *Neutrophil kinetics and the regulation of granulopoiesis*. Rev Infect Dis, 1980. **2**(2): p. 282-92.
34. Seely, A.J., J.L. Pascual, and N.V. Christou, *Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance*. Crit Care, 2003. **7**(4): p. 291-307.
35. Fiedler, K. and C. Brunner, *The role of transcription factors in the guidance of granulopoiesis*. Am J Blood Res, 2012. **2**(1): p. 57-65.
36. Metcalf, D., et al., *Effects of purified bacterially synthesized murine multi-CSF (IL-3) on hematopoiesis in normal adult mice*. Blood, 1986. **68**(1): p. 46-57.
37. Metcalf, D., et al., *Hemopoietic responses in mice injected with purified recombinant murine GM-CSF*. Exp Hematol, 1987. **15**(1): p. 1-9.
38. Pojda, Z. and A. Tsuboi, *In vivo effects of human recombinant interleukin 6 on hemopoietic stem and progenitor cells and circulating blood cells in normal mice*. Exp Hematol, 1990. **18**(9): p. 1034-7.

39. Richards, M.K., et al., *Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway*. *Blood*, 2003. **102**(10): p. 3562-8.
40. Chen, C.Z., et al., *MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation*. *Science*, 2004. **303**(5654): p. 83-6.
41. Hager, M., J.B. Cowland, and N. Borregaard, *Neutrophil granules in health and disease*. *J Intern Med*, 2010. **268**(1): p. 25-34.
42. Sengelov, H., L. Kjeldsen, and N. Borregaard, *Control of exocytosis in early neutrophil activation*. *J Immunol*, 1993. **150**(4): p. 1535-43.
43. Kjeldsen, L., et al., *Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation*. *Blood*, 1993. **82**(10): p. 3183-91.
44. Arnljots, K., et al., *Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells*. *Leukemia*, 1998. **12**(11): p. 1789-95.
45. Borregaard, N., et al., *Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation*. *Blood*, 1995. **85**(3): p. 812-7.
46. Fauschou, M. and N. Borregaard, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation*. *Microbes Infect*, 2003. **5**(14): p. 1317-27.
47. Pham, C.T., *Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(7): p. 541-50.
48. Owen, C.A. and E.J. Campbell, *The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis*. *J Leukoc Biol*, 1999. **65**(2): p. 137-50.
49. Kang, T., et al., *Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(24): p. 21960-8.
50. Ardi, V.C., et al., *Neutrophil MMP-9 proenzyme, unencumbered by TIMP-1, undergoes efficient activation in vivo and catalytically induces angiogenesis via a basic fibroblast growth factor (FGF-2)/FGFR-2 pathway*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(38): p. 25854-66.
51. Bekes, E.M., et al., *Tumor-recruited neutrophils and neutrophil TIMP-free MMP-9 regulate coordinately the levels of tumor angiogenesis and efficiency of malignant cell intravasation*. *Am J Pathol*, 2011. **179**(3): p. 1455-70.
52. Cederqvist, K., et al., *Matrix metalloproteinases-2, -8, and -9 and TIMP-2 in tracheal aspirates from preterm infants with respiratory distress*. *Pediatrics*, 2001. **108**(3): p. 686-92.
53. Abraham, E., *Neutrophils and acute lung injury*. *Crit Care Med*, 2003. **31**(4 Suppl): p. S195-9.
54. Simonen-Jokinen, T., et al., *Effect of composition and different fractions of hay dust suspension on inflammation in lungs of heaves-affected horses: MMP-9 and MMP-2 as indicators of tissue destruction*. *Equine Vet J*, 2005. **37**(5): p. 412-7.
55. Nevalainen, M., et al., *Inhalation of organic dusts and lipopolysaccharide increases gelatinolytic matrix metalloproteinases (MMPs) in the lungs of heaves horses*. *Equine Vet J*, 2002. **34**(2): p. 150-5.
56. Christopher, M.J. and D.C. Link, *Regulation of neutrophil homeostasis*. *Curr Opin Hematol*, 2007. **14**(1): p. 3-8.
57. Summers, C., et al., *Neutrophil kinetics in health and disease*. *Trends Immunol*, 2010. **31**(8): p. 318-24.

58. Semerad, C.L., et al., *G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood*. *Immunity*, 2002. **17**(4): p. 413-23.
59. Athens, J.W., et al., *Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects*. *J Clin Invest*, 1961. **40**: p. 989-95.
60. Hogg, J.C., *Neutrophil kinetics and lung injury*. *Physiol Rev*, 1987. **67**(4): p. 1249-95.
61. Staub, N.C. and E.L. Schultz, *Pulmonary capillary length in dogs, cat and rabbit*. *Respir Physiol*, 1968. **5**(3): p. 371-8.
62. Hogg, J.C. and C.M. Doerschuk, *Leukocyte traffic in the lung*. *Annu Rev Physiol*, 1995. **57**: p. 97-114.
63. Peters, A.M., *Just how big is the pulmonary granulocyte pool?* *Clin Sci (Lond)*, 1998. **94**(1): p. 7-19.
64. Simon, S.I. and C.E. Green, *Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2005. **7**: p. 151-85.
65. McEver, R.P., *Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow*. *Curr Opin Cell Biol*, 2002. **14**(5): p. 581-6.
66. Dwir, O., et al., *GlyCAM-1 supports leukocyte rolling in flow: evidence for a greater dynamic stability of L-selectin rolling of lymphocytes than of neutrophils*. *Cell Adhes Commun*, 1998. **6**(4): p. 349-70.
67. Choi, E.Y., S. Santoso, and T. Chavakis, *Mechanisms of neutrophil transendothelial migration*. *Front Biosci*, 2009. **14**: p. 1596-605.
68. Wagner, J.G. and R.A. Roth, *Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature*. *Pharmacol Rev*, 2000. **52**(3): p. 349-74.
69. Bargatze, R.F., et al., *Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells*. *J Exp Med*, 1994. **180**(5): p. 1785-92.
70. Lacy, P., *Mechanisms of degranulation in neutrophils*. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2006. **2**(3): p. 98-108.
71. Alcaide, P., S. Auerbach, and F.W. Lusinskas, *Neutrophil recruitment under shear flow: it's all about endothelial cell rings and gaps*. *Microcirculation*, 2009. **16**(1): p. 43-57.
72. Vestweber, D., *Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium*. *Immunol Rev*, 2007. **218**: p. 178-96.
73. Nourshargh, S. and F.M. Marelli-Berg, *Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function*. *Trends Immunol*, 2005. **26**(3): p. 157-65.
74. Carman, C.V. and T.A. Springer, *A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them*. *J Cell Biol*, 2004. **167**(2): p. 377-88.
75. Carman, C.V., et al., *Endothelial cells proactively form microvilli-like membrane projections upon intercellular adhesion molecule 1 engagement of leukocyte LFA-1*. *J Immunol*, 2003. **171**(11): p. 6135-44.
76. Luu, N.T., G.E. Rainger, and G.B. Nash, *Kinetics of the different steps during neutrophil migration through cultured endothelial monolayers treated with tumour necrosis factor-alpha*. *J Vasc Res*, 1999. **36**(6): p. 477-85.
77. Engelhardt, B. and H. Wolburg, *Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house?* *Eur J Immunol*, 2004. **34**(11): p. 2955-63.
78. Pollard, T.D. and G.G. Borisy, *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*. *Cell*, 2003. **112**(4): p. 453-65.

79. Zhelev, D.V., A.M. Alteraifi, and D. Chodniewicz, *Controlled pseudopod extension of human neutrophils stimulated with different chemoattractants*. *Biophys J*, 2004. **87**(1): p. 688-95.
80. Eddy, R.J., et al., *Ca²⁺-dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration*. *J Cell Sci*, 2000. **113 (Pt 7)**: p. 1287-98.
81. Xu, J., et al., *Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils*. *Cell*, 2003. **114**(2): p. 201-14.
82. Van Haastert, P.J. and P.N. Devreotes, *Chemotaxis: signalling the way forward*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(8): p. 626-34.
83. Smith, L.A., et al., *Neutrophil traction stresses are concentrated in the uropod during migration*. *Biophys J*, 2007. **92**(7): p. L58-60.
84. Baggiolini, M., *Chemokines and leukocyte traffic*. *Nature*, 1998. **392**(6676): p. 565-8.
85. Migeotte, I., D. Communi, and M. Parmentier, *Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006. **17**(6): p. 501-19.
86. Murdoch, C. and A. Finn, *Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases*. *Blood*, 2000. **95**(10): p. 3032-43.
87. Mantovani, A., et al., *Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(8): p. 519-31.
88. Hayashi, F., T.K. Means, and A.D. Luster, *Toll-like receptors stimulate human neutrophil function*. *Blood*, 2003. **102**(7): p. 2660-9.
89. Koelink, P.J., et al., *Targeting chemokine receptors in chronic inflammatory diseases: an extensive review*. *Pharmacol Ther*, 2012. **133**(1): p. 1-18.
90. Nomenclature, I.W.S.o.C., *Chemokine/chemokine receptor nomenclature*. *Cytokine*, 2003. **21**(1): p. 48-9.
91. Bizzarri, C., et al., *ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets*. *Pharmacol Ther*, 2006. **112**(1): p. 139-49.
92. Murphy, P.M., *Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1996. **7**(1): p. 47-64.
93. Lin, M., et al., *Matrix metalloproteinase-8 facilitates neutrophil migration through the corneal stromal matrix by collagen degradation and production of the chemotactic peptide Pro-Gly-Pro*. *Am J Pathol*, 2008. **173**(1): p. 144-53.
94. Overbeek, S.A., et al., *N-acetylated Proline-Glycine-Proline induced G-protein dependent chemotaxis of neutrophils is independent of CXCL8 release*. *Eur J Pharmacol*, 2011. **668**(3): p. 428-34.
95. Traves, S.L., et al., *Increased levels of the chemokines GROalpha and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD*. *Thorax*, 2002. **57**(7): p. 590-5.
96. Hacievliyagil, S.S., et al., *Association between cytokines in induced sputum and severity of chronic obstructive pulmonary disease*. *Respir Med*, 2006. **100**(5): p. 846-54.
97. Shannon, J., et al., *Differences in airway cytokine profile in severe asthma compared to moderate asthma*. *Chest*, 2008. **133**(2): p. 420-6.
98. Franchini, M., et al., *Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay*. *Am J Vet Res*, 2000. **61**(11): p. 1369-74.
99. Lazaar, A.L., et al., *SB-656933, a novel CXCR2 selective antagonist, inhibits ex vivo neutrophil activation and ozone-induced airway inflammation in humans*. *Br J Clin Pharmacol*, 2011. **72**(2): p. 282-93.

100. Holz, O., et al., *SCH527123, a novel CXCR2 antagonist, inhibits ozone-induced neutrophilia in healthy subjects*. Eur Respir J, 2010. **35**(3): p. 564-70.
101. Underhill, D.M. and A. Ozinsky, *Toll-like receptors: key mediators of microbe detection*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(1): p. 103-10.
102. Le, Y., et al., *Receptors for chemotactic formyl peptides as pharmacological targets*. Int Immunopharmacol, 2002. **2**(1): p. 1-13.
103. Fu, H., et al., *Ligand recognition and activation of formyl peptide receptors in neutrophils*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(2): p. 247-56.
104. Montefort, S., et al., *Bronchial biopsy evidence for leukocyte infiltration and upregulation of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules 6 hours after local allergen challenge of sensitized asthmatic airways*. J Clin Invest, 1994. **93**(4): p. 1411-21.
105. Metzger, W.J., et al., *Bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic patients following allergen bronchoprovocation*. Chest, 1986. **89**(4): p. 477-83.
106. Deetz, D.C., et al., *The kinetics of grain dust-induced inflammation of the lower respiratory tract*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **155**(1): p. 254-9.
107. Schneider, T., et al., *Kinetics and quantitation of eosinophil and neutrophil recruitment to allergic lung inflammation in a brown Norway rat model*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **17**(6): p. 702-12.
108. Lemanske, R.F., Jr. and M.A. Kaliner, *The experimental production of increased eosinophils in rat late-phase reactions*. Immunology, 1982. **45**(3): p. 561-8.
109. Brazil, T.J., et al., *Kinetics of pulmonary neutrophil recruitment and clearance in a natural and spontaneously resolving model of airway inflammation*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(7): p. 854-65.
110. Lord, B.I., et al., *Myeloid cell kinetics in mice treated with recombinant interleukin-3, granulocyte colony-stimulating factor (CSF), or granulocyte-macrophage CSF in vivo*. Blood, 1991. **77**(10): p. 2154-9.
111. Price, T.H., G.S. Chatta, and D.C. Dale, *Effect of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil kinetics in normal young and elderly humans*. Blood, 1996. **88**(1): p. 335-40.
112. Pillay, J., et al., *In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days*. Blood, 2010. **116**(4): p. 625-7.
113. Tofts, P.S., et al., *Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days*. Blood, 2011. **117**(22): p. 6050-2; author reply 6053-4.
114. Kolaczowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.
115. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
116. Jones, S.L., Y. Sharief, and C.D. Chilcoat, *Signaling mechanism for equine neutrophil activation by immune complexes*. Vet Immunol Immunopathol, 2001. **82**(1-2): p. 87-100.
117. Zhang, C.H., et al., *The equine homologue of LFA-1 (CD11a/CD18): cellular distribution and differential determinants*. Vet Immunol Immunopathol, 1998. **62**(2): p. 167-83.
118. Brooks, A.C., K.J. Rickards, and F.M. Cunningham, *CXCL8 attenuates chemoattractant-induced equine neutrophil migration*. Vet Immunol Immunopathol, 2011. **139**(2-4): p. 141-7.
119. Muehlmann, L.A., et al., *PAF increases phagocytic capacity and superoxide anion production in equine alveolar macrophages and blood neutrophils*. Res Vet Sci, 2012. **93**(1): p. 393-7.

120. Benbarek, H., et al., *Direct stimulation of the oxidative activity of isolated equine neutrophils by TNF-alpha and IL-1beta*. Vet Immunol Immunopathol, 2008. **121**(1-2): p. 101-6.
121. Zerbe, H., et al., *Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares*. Theriogenology, 2003. **60**(2): p. 209-23.
122. Weiss, D.J. and O.A. Evanson, *Evaluation of lipopolysaccharide-induced activation of equine neutrophils*. Am J Vet Res, 2002. **63**(6): p. 811-5.
123. Ceusters, J.D., et al., *An in vitro whole blood model to test the effects of different stimuli conditions on the release of myeloperoxidase and elastase by equine neutrophils*. Vet Immunol Immunopathol, 2012. **150**(3-4): p. 221-7.
124. Singh Suri, S., et al., *Expression of toll-like receptor 4 and 2 in horse lungs*. Vet Res, 2006. **37**(4): p. 541-51.
125. Kwon, S., et al., *Disparities in TLR5 expression and responsiveness to flagellin in equine neutrophils and mononuclear phagocytes*. J Immunol, 2011. **186**(11): p. 6263-70.
126. Schneberger, D., et al., *Expression of toll-like receptor 9 in horse lungs*. Anat Rec (Hoboken), 2009. **292**(7): p. 1068-77.
127. Eckert, R.E., Y. Sharief, and S.L. Jones, *p38 mitogen-activated kinase (MAPK) is essential for equine neutrophil migration*. Vet Immunol Immunopathol, 2009. **129**(3-4): p. 181-91.
128. Brazil, T.J., et al., *Priming induces functional coupling of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine receptors in equine neutrophils*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(3): p. 380-8.
129. Mueller, T.D., et al., *Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**(3): p. 237-50.
130. Luzina, I.G., et al., *Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives"*. J Leukoc Biol, 2012. **92**(4): p. 753-64.
131. Chatila, T.A., *Interleukin-4 receptor signaling pathways in asthma pathogenesis*. Trends Mol Med, 2004. **10**(10): p. 493-9.
132. Steinke, J.W. and L. Borish, *Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists*. Respir Res, 2001. **2**(2): p. 66-70.
133. Gold, M.J., et al., *Group 2 innate lymphoid cells facilitate sensitization to local, but not systemic, TH2-inducing allergen exposures*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(4): p. 1142-8.
134. Van der Kolk, J.H., et al., *Equine acquired multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD) in 14 horses associated with ingestion of Maple leaves (Acer pseudoplatanus) covered with European tar spot (Rhytisma acerinum)*. Mol Genet Metab, 2010. **101**(2-3): p. 289-91.
135. Jankovic, D., et al., *Single cell analysis reveals that IL-4 receptor/Stat6 signaling is not required for the in vivo or in vitro development of CD4+ lymphocytes with a Th2 cytokine profile*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 3047-55.
136. Min, B., et al., *Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite*. J Exp Med, 2004. **200**(4): p. 507-17.
137. Morris, S.C., R.L. Coffman, and F.D. Finkelman, *In vivo IL-4 responses to anti-IgD antibody are MHC class II dependent and beta 2-microglobulin independent and develop normally in the absence of IL-4 priming of T cells*. J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3299-304.
138. Forbes, E., et al., *Differential requirements for IL-4/STAT6 signalling in CD4 T-cell fate determination and Th2-immune effector responses*. Immunol Cell Biol, 2010. **88**(3): p. 240-3.

139. van Panhuys, N., et al., *In vivo studies fail to reveal a role for IL-4 or STAT6 signaling in Th2 lymphocyte differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(34): p. 12423-8.
140. Kaplan, M.H., et al., *Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 313-9.
141. Mohrs, M., et al., *Analysis of type 2 immunity in vivo with a bicistronic IL-4 reporter*. Immunity, 2001. **15**(2): p. 303-11.
142. Voehringer, D., K. Shinkai, and R.M. Locksley, *Type 2 immunity reflects orchestrated recruitment of cells committed to IL-4 production*. Immunity, 2004. **20**(3): p. 267-77.
143. Mathew, A., et al., *Signal transducer and activator of transcription 6 controls chemokine production and T helper cell type 2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation*. J Exp Med, 2001. **193**(9): p. 1087-96.
144. Moser, R., J. Fehr, and P.L. Bruijnzeel, *IL-4 controls the selective endothelium-driven transmigration of eosinophils from allergic individuals*. J Immunol, 1992. **149**(4): p. 1432-8.
145. Schleimer, R.P., et al., *IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1*. J Immunol, 1992. **148**(4): p. 1086-92.
146. Schnyder, B., et al., *Interleukin-4 (IL-4) and IL-13 bind to a shared heterodimeric complex on endothelial cells mediating vascular cell adhesion molecule-1 induction in the absence of the common gamma chain*. Blood, 1996. **87**(10): p. 4286-95.
147. Barnes, P.J., *The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. J Clin Invest, 2008. **118**(11): p. 3546-56.
148. Romagnani, S., *T-cell subsets (Th1 versus Th2)*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2000. **85**(1): p. 9-18; quiz 18, 21.
149. Wills-Karp, M., *Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 255-81.
150. Hoeck, J. and M. Woisetschlager, *STAT6 mediates eotaxin-1 expression in IL-4 or TNF-alpha-induced fibroblasts*. J Immunol, 2001. **166**(7): p. 4507-15.
151. Hoeck, J. and M. Woisetschlager, *Activation of eotaxin-3/CCL126 gene expression in human dermal fibroblasts is mediated by STAT6*. J Immunol, 2001. **167**(6): p. 3216-22.
152. Doucet, C., et al., *Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma*. J Clin Invest, 1998. **101**(10): p. 2129-39.
153. Marie, C., et al., *Regulation by anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13, TGFbeta) of interleukin-8 production by LPS- and/ or TNFalpha-activated human polymorphonuclear cells*. Mediators Inflamm, 1996. **5**(5): p. 334-40.
154. Marie, C., et al., *IL-10 and IL-4 synergize with TNF-alpha to induce IL-1ra production by human neutrophils*. Cytokine, 1996. **8**(2): p. 147-51.
155. Niino, H., et al., *Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils*. Blood, 1997. **89**(5): p. 1621-8.
156. Girard, D., R. Paquin, and A.D. Beaulieu, *Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis*. Biochem J, 1997. **325 (Pt 1)**: p. 147-53.
157. Boey, H., et al., *Interleukin-4 is a neutrophil activator*. J Allergy Clin Immunol, 1989. **83**(5): p. 978-84.
158. Zaitsu, M., et al., *New induction of leukotriene A(4) hydrolase by interleukin-4 and interleukin-13 in human polymorphonuclear leukocytes*. Blood, 2000. **96**(2): p. 601-9.

159. Abdel-Salam, B.K., *T-cell proliferation by surface molecules expression on polymorphonuclear neutrophils stimulated with IL-4 in superantigen presence*. Allergol Immunopathol (Madr), 2012. **40**(2): p. 81-7.
160. Farivar, A.S., et al., *Endogenous interleukin-4 and interleukin-10 regulate experimental lung ischemia reperfusion injury*. Ann Thorac Surg, 2003. **76**(1): p. 253-9.
161. Dabbagh, K., et al., *IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo*. J Immunol, 1999. **162**(10): p. 6233-7.
162. Ratthe, C., et al., *Interleukin (IL)-4 induces leukocyte infiltration in vivo by an indirect mechanism*. Mediators Inflamm, 2009. **2009**: p. 193970.
163. Guo, Y.L., et al., *Interleukin (IL)-4 induces production of cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINCs) and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in lungs of asthmatic rats*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2013. **33**(4): p. 470-8.
164. Gilleece, M.H., et al., *Recombinant human interleukin 4 (IL-4) given as daily subcutaneous injections--a phase I dose toxicity trial*. Br J Cancer, 1992. **66**(1): p. 204-10.
165. Huang, H., et al., *IL-4 stimulates the expression of CXCL-8, E-selectin, VEGF, and inducible nitric oxide synthase mRNA by equine pulmonary artery endothelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **292**(5): p. L1147-54.
166. Kleinman, H.K., et al., *Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma*. Biochemistry, 1982. **21**(24): p. 6188-93.
167. Kleinman, H.K., et al., *Basement membrane complexes with biological activity*. Biochemistry, 1986. **25**(2): p. 312-8.
168. Vukicevic, S., et al., *Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components*. Exp Cell Res, 1992. **202**(1): p. 1-8.
169. Biederer, T. and P. Scheiffele, *Mixed-culture assays for analyzing neuronal synapse formation*. Nat Protoc, 2007. **2**(3): p. 670-6.
170. Bi, Y.A., D. Kazolias, and D.B. Duignan, *Use of cryopreserved human hepatocytes in sandwich culture to measure hepatobiliary transport*. Drug Metab Dispos, 2006. **34**(9): p. 1658-65.
171. Kubota, Y., et al., *Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures*. J Cell Biol, 1988. **107**(4): p. 1589-98.
172. Terranova, V.P., et al., *Use of a reconstituted basement membrane to measure cell invasiveness and select for highly invasive tumor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(2): p. 465-9.
173. Albini, A., et al., *A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells*. Cancer Res, 1987. **47**(12): p. 3239-45.
174. Coltrini, D., et al., *Matrigel plug assay: evaluation of the angiogenic response by reverse transcription-quantitative PCR*. Angiogenesis, 2013. **16**(2): p. 469-77.
175. Passaniti, A., et al., *A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor*. Lab Invest, 1992. **67**(4): p. 519-28.
176. Bissell, D.M., et al., *Support of Cultured-Hepatocytes by a Laminin-Rich Gel - Evidence for a Functionally Significant Subendothelial Matrix in Normal Rat-Liver*. Journal of Clinical Investigation, 1987. **79**(3): p. 801-812.

177. Vanacker, J., et al., *Transplantation of an alginate-matrigel matrix containing isolated ovarian cells: first step in developing a biodegradable scaffold to transplant isolated preantral follicles and ovarian cells*. *Biomaterials*, 2012. **33**(26): p. 6079-85.
178. Glynn, D.J., M.R. Hutchinson, and W.V. Ingman, *Toll-like receptor 4 regulates lipopolysaccharide-induced inflammation and lactation insufficiency in a mouse model of mastitis*. *Biol Reprod*, 2014. **90**(5): p. 91.
179. Akhtar, N., E.B. Dickerson, and R. Auerbach, *The sponge/Matrigel angiogenesis assay*. *Angiogenesis*, 2002. **5**(1-2): p. 75-80.
180. Grimaldi, A., et al., *Cytokine loaded biopolymers as a novel strategy to study stem cells during wound-healing processes*. *Macromol Biosci*, 2011. **11**(8): p. 1008-19.
181. Temme, S., et al., *Technical advance: monitoring the trafficking of neutrophil granulocytes and monocytes during the course of tissue inflammation by noninvasive 19F MRI*. *J Leukoc Biol*, 2014. **95**(4): p. 689-97.
182. Grimaldi, A., et al., *The leech: a novel invertebrate model for studying muscle regeneration and diseases*. *Curr Pharm Des*, 2010. **16**(8): p. 968-77.
183. Hirche, T.O., et al., *Deficiency in neutrophil elastase does not impair neutrophil recruitment to inflamed sites*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004. **30**(4): p. 576-84.
184. Ludwig, A., et al., *The CXC-chemokine neutrophil-activating peptide-2 induces two distinct optima of neutrophil chemotaxis by differential interaction with interleukin-8 receptors CXCR-1 and CXCR-2*. *Blood*, 1997. **90**(11): p. 4588-97.
185. Iversen, O.H., *The cell kinetics of the inflammatory reaction. Introduction and overview*. *Curr Top Pathol*, 1989. **79**: p. 1-5.
186. Gundel, R., et al., *IL-4 induced leucocyte trafficking in cynomolgus monkeys: correlation with expression of adhesion molecules and chemokine generation*. *Clin Exp Allergy*, 1996. **26**(6): p. 719-29.
187. Hickey, M.J., D.N. Granger, and P. Kubes, *Molecular mechanisms underlying IL-4-induced leukocyte recruitment in vivo: a critical role for the alpha 4 integrin*. *J Immunol*, 1999. **163**(6): p. 3441-8.
188. Wang, J.M., et al., *IL-8-Induced T-Lymphocyte Migration: Direct as Well as Indirect Mechanisms*. *Methods*, 1996. **10**(1): p. 135-44.
189. Taub, D.D., et al., *T lymphocyte recruitment by interleukin-8 (IL-8). IL-8-induced degranulation of neutrophils releases potent chemoattractants for human T lymphocytes both in vitro and in vivo*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(8): p. 1931-41.
190. Tulpule, A., et al., *Interleukin-4 in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma*. *Ann Oncol*, 1997. **8**(1): p. 79-83.
191. Shi, H.Z., et al., *Effect of inhaled interleukin-4 on airway hyperreactivity in asthmatics*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. **157**(6 Pt 1): p. 1818-21.
192. Dittrich, A.M., et al., *A new mechanism for inhalational priming: IL-4 bypasses innate immune signals*. *J Immunol*, 2008. **181**(10): p. 7307-15.
193. Mulligan, M.S., et al., *Protective effects of IL-4 and IL-10 against immune complex-induced lung injury*. *J Immunol*, 1993. **151**(10): p. 5666-74.
194. Kroegel, C., et al., *Endobronchial secretion of interleukin-13 following local allergen challenge in atopic asthma: relationship to interleukin-4 and eosinophil counts*. *Eur Respir J*, 1996. **9**(5): p. 899-904.
195. Batra, V., et al., *Bronchoalveolar lavage fluid concentrations of transforming growth factor (TGF)-beta1, TGF-beta2, interleukin (IL)-4 and IL-13 after segmental allergen challenge and their effects on alpha-smooth muscle actin and collagen III synthesis by primary human lung fibroblasts*. *Clin Exp Allergy*, 2004. **34**(3): p. 437-44.

196. Dentelli, P., et al., *Human IL-3 stimulates endothelial cell motility and promotes in vivo new vessel formation*. J Immunol, 1999. **163**(4): p. 2151-9.
197. Fonseca, K.B., et al., *Injectable MMP-sensitive alginate hydrogels as hMSC delivery systems*. Biomacromolecules, 2014. **15**(1): p. 380-90.
198. Scapini, P., et al., *CXCL1/macrophage inflammatory protein-2-induced angiogenesis in vivo is mediated by neutrophil-derived vascular endothelial growth factor-A*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 5034-40.
199. Angiolillo, A.L., et al., *Interleukin-15 promotes angiogenesis in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **233**(1): p. 231-7.
200. Pickens, S.R., et al., *IL-17 contributes to angiogenesis in rheumatoid arthritis*. J Immunol, 2010. **184**(6): p. 3233-41.
201. Nishimura, A., et al., *Controlled release of insulin from self-assembling nanofiber hydrogel, PuraMatrix: application for the subcutaneous injection in rats*. Eur J Pharm Sci, 2012. **45**(1-2): p. 1-7.
202. Gelain, F., L.D. Unsworth, and S. Zhang, *Slow and sustained release of active cytokines from self-assembling peptide scaffolds*. J Control Release, 2010. **145**(3): p. 231-9.
203. Allen, P., J. Melero-Martin, and J. Bischoff, *Type I collagen, fibrin and PuraMatrix matrices provide permissive environments for human endothelial and mesenchymal progenitor cells to form neovascular networks*. J Tissue Eng Regen Med, 2011. **5**(4): p. e74-86.
204. Zhang S, E.-B.R., Zhao X, Spirio L., *Self-assembling peptide nanofiber scaffolds.*, in *Scaffolding in Tissue Engineering.*, M.J. Elisseeff PX, Editor. 2005, CRC: Boca Raton (FL). p. 217-238.

