

Université de Montréal

Interactions entre l'inflammation neutrophilique et le remodelage bronchique dans l'asthme :

Investigations chez le modèle naturel de l'asthme équin sévère

Par

Sophie Mainguy-Seers

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae doctor* (Ph. D.)
en sciences vétérinaires

Août 2022

© Sophie Mainguy-Seers, 2022

Université de Montréal

Département de sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire

Cette thèse intitulée

Interactions entre l'inflammation neutrophilique et le remodelage bronchique dans l'asthme :

Investigations chez le modèle naturel de l'asthme équin sévère

Présentée par

Sophie Mainguy-Seers

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Mathilde Leclère

Présidente-rapporteuse

Jean-Pierre Lavoie

Directeur de recherche

James G. Martin

Codirecteur

Marcio Carvalho Costa

Membre du jury

Andréanne Côté

Examinatrice externe

Résumé

L'asthme est une des maladies chroniques les plus prévalentes, affectant environ 300 millions d'individus dans le monde et causant plus de 400 000 décès annuellement. La condition se caractérise par une hyperréactivité bronchique, de l'inflammation pulmonaire et des changements structuraux (remodelage) des voies respiratoires. Bien que l'inflammation soit le plus souvent de type éosinophilique dans l'asthme, une proportion importante des patients affectés par la forme sévère de la maladie présente plutôt une infiltration des voies respiratoires par les neutrophiles. Cette inflammation neutrophilique a été associée à plusieurs issues cliniques négatives, notamment à une mauvaise réponse aux traitements, à une obstruction respiratoire permanente et à la mortalité. Malgré l'importance de ces conséquences cliniques pour les patients affectés, le rôle de l'inflammation neutrophilique dans la pathophysiologie de l'asthme, dont ses effets sur le remodelage bronchique, demeure peu exploré. Dans toutes les formes d'asthme, les traitements usuels de la maladie (glucocorticoïdes et bronchodilatateurs) ne permettent pas de renverser entièrement les lésions de remodelage bronchique, dont l'augmentation de la masse du muscle lisse, et ne contrôlent pas adéquatement la neutrophilie pulmonaire. L'augmentation de la masse musculaire lisse bronchique représente pourtant une cible thérapeutique importante vu son implication dans le rétrécissement de la lumière bronchique et le bronchospasme.

Les objectifs de cette thèse ont donc été d'étudier les mécanismes potentiellement impliqués dans l'association entre l'inflammation neutrophilique et la sévérité de la maladie, et d'investiguer les effets de thérapies anti-neutrophiliques sur le remodelage bronchique dans le modèle de l'asthme équin sévère. Similairement à la condition humaine, l'asthme équin sévère est caractérisé par une obstruction respiratoire fluctuante, de l'inflammation pulmonaire et un remodelage bronchique, notamment une augmentation de la masse du muscle lisse. Cette maladie se prête particulièrement bien à l'étude du phénotype neutrophilique puisque c'est cette cellule granulocytaire qui infiltre le milieu pulmonaire lors des exacerbations cliniques.

Les études réalisées dans ce projet doctoral ont permis de déterminer que l'azithromycine, un macrolide possédant des propriétés immunomodulatrices, réduit l'inflammation neutrophilique dans le modèle de l'asthme équin. Toutefois, ce traitement n'a pas diminué l'obstruction bronchique ni les lésions de remodelage lorsqu'utilisé en monothérapie, et n'a pas potentialisé les effets des corticostéroïdes inhalés. Ces résultats suggèrent que l'atténuation de l'inflammation pulmonaire ne suffit pas à rétablir l'homéostasie tissulaire dans la phase chronique de la maladie. Toutefois, l'hétérogénéité phénotypique des neutrophiles pourrait rendre leur simple quantification dans les sécrétions respiratoires insuffisante pour élucider leurs répercussions dans l'asthme. Par exemple, les neutrophiles pourraient contribuer au remodelage bronchique par la relâche de vésicules extracellulaires, des nanoparticules qui peuvent modifier la biologie des cellules locales et distantes. Ainsi, les caractéristiques des vésicules neutrophiliques et leur effet prolifératif sur le muscle lisse bronchique ont été examinés. Les résultats obtenus indiquent que les vésicules produites par les neutrophiles augmentent la prolifération du muscle lisse bronchique lorsqu'elles proviennent de cellules exposées au lipopolysaccharide, un fragment bactérien omniprésent dans l'environnement et incriminé dans l'infiltration neutrophilique et le développement de l'obstruction bronchique dans l'asthme humain et équin.

Mots-clés : asthme, cheval, équin, macrolides, muscle lisse bronchique, neutrophiles, remodelage, tamoxifène, thérapie, vésicules extracellulaires.

Abstract

Asthma is one of the most prevalent chronic diseases, affecting approximately 300 million people worldwide and causing over 400,000 deaths annually. The condition is characterized by the combination of bronchial hyperreactivity, lung inflammation, and structural changes in the airways (remodeling). Although an eosinophilic inflammation is common in asthma, a significant proportion of patients affected by the severe form of the disease have a neutrophilic airway infiltration. The neutrophilic phenotype has been associated with several negative outcomes in human asthma, including poor response to therapy, permanent airway obstruction and mortality. Despite these associations, the role of neutrophils in asthma, including its effects on airway remodeling, remains insufficiently explored. Unfortunately, standard asthma therapies (glucocorticoids and bronchodilators) do not adequately control neutrophilic inflammation and reverse only partially, if at all, bronchial remodeling lesions, including the increased airway smooth muscle mass. This structural modification is however an important therapeutic target because of its involvement in bronchial lumen narrowing and bronchospasm.

The main objectives of this thesis were therefore to study mechanisms potentially involved in the association between neutrophilic inflammation and asthma severity, and to investigate the effects of anti-neutrophilic therapies on bronchial remodeling reversibility in the severe equine asthma model. Similar to the human disease, severe equine asthma is characterized by fluctuating airflow obstruction, pulmonary inflammation, and remodeling lesions, including a large increase in airway smooth muscle mass. Clinical exacerbations are characterized by a marked pulmonary neutrophilic influx, making this disease particularly suitable to study the neutrophilic phenotype.

Studies conducted during this doctoral program revealed that azithromycin, a macrolide with immunomodulatory properties, reduces neutrophilic inflammation in the equine asthma model, but fails to alleviate bronchial obstruction and remodeling lesions, suggesting that the control of neutrophilic inflammation is not sufficient to restore tissue homeostasis when the disease reaches its chronic phase. However, the simple quantification of neutrophils within respiratory secretions might not elucidate comprehensively the possible functional consequences of this cell

in the pathophysiology of asthma. For instance, neutrophils could lead and sustain bronchial structural lesions through the release of extracellular vesicles. Those nanoparticles can modify the biology of local and distant cells and are involved in the pathophysiology of several inflammatory diseases. Thus, the characteristics and the effect of neutrophil extracellular vesicles on airway smooth muscle proliferation were studied in horses with severe asthma. The results obtained indicate that extracellular vesicles increase bronchial smooth muscle cell proliferation when they are produced by neutrophils exposed to lipopolysaccharide, a ubiquitous environmental contaminant incriminated in the development of neutrophilic infiltration and bronchial obstruction in human and equine asthma.

Keywords: airway smooth muscle, asthma, equine, extracellular vesicles, horse, macrolides, neutrophils, remodeling, tamoxifen, therapy.

Table des matières

| | |
|---|----|
| Résumé..... | 3 |
| Abstract..... | 5 |
| Table des matières..... | 7 |
| Liste des tableaux..... | 13 |
| Liste des figures..... | 14 |
| Liste des sigles et des abréviations..... | 17 |
| Remerciements..... | 19 |
| Introduction..... | 21 |
| Contributions à l'avancement des connaissances..... | 23 |
| Revue de littérature..... | 26 |
| L'asthme chez l'humain..... | 27 |
| Prévalence..... | 27 |
| Importance clinique et socioéconomique..... | 28 |
| Facteurs de risque..... | 29 |
| Diagnostic et classification..... | 33 |
| Ouverture..... | 37 |
| Inflammation neutrophilique dans l'asthme..... | 38 |
| Biologie du neutrophile en bref..... | 38 |
| Origines de la neutrophilie dans l'asthme..... | 40 |
| Neutrophiles et conséquences cliniques dans l'asthme..... | 45 |
| Neutrophiles et dommage tissulaire dans l'asthme..... | 48 |
| Ouverture..... | 55 |

| | |
|--|-----|
| Remodelage bronchique dans l'asthme..... | 56 |
| Description et rôles du muscle lisse bronchique | 57 |
| Remodelage du muscle lisse bronchique dans l'asthme | 58 |
| Origines du remodelage du muscle lisse bronchique | 61 |
| Conséquences du remodelage du muscle lisse bronchique | 64 |
| Autres lésions architecturales en rafale..... | 65 |
| Ouverture | 67 |
| L'asthme équin comme modèle naturel de la maladie | 69 |
| Justifications de l'utilisation des modèles animaux..... | 69 |
| Asthme équin | 70 |
| Diagnostic de l'asthme équin | 72 |
| Caractéristiques du modèle équin | 74 |
| Facteurs de risque | 76 |
| Immunopathologie de l'asthme équin..... | 79 |
| Remodelage bronchique dans l'asthme équin | 82 |
| Ouverture | 87 |
| Traitements anti-neutrophiliques dans l'asthme | 88 |
| Glucocorticoïdes..... | 88 |
| Justification de la recherche de thérapies alternatives aux glucocorticoïdes | 91 |
| Tamoxifène..... | 93 |
| Macrolides..... | 95 |
| Ouverture | 102 |
| Objectifs et hypothèses..... | 104 |
| Méthodes | 106 |

| | |
|--|-----|
| Survol du plan expérimental | 107 |
| Résultats | 109 |
| Article 1 - Glucocorticoid therapy in horses with asthma: A narrative review..... | 110 |
| Abstract | 112 |
| Introduction..... | 113 |
| Materials and methods | 114 |
| Results | 115 |
| Conclusions and future directions | 134 |
| References..... | 136 |
| Article 2 - Efficacy of tamoxifen for the treatment of severe equine asthma | 151 |
| Abstract | 153 |
| Introduction..... | 154 |
| Materials and methods | 155 |
| Results | 157 |
| Discussion..... | 159 |
| References..... | 163 |
| Figures | 167 |
| Article 3 - Randomised study of the immunomodulatory effects of azithromycin in severely asthmatic horses | 173 |
| Abstract | 175 |
| Introduction..... | 176 |
| Materials and methods | 177 |
| Results | 181 |
| Discussion..... | 183 |

| | |
|---|-----|
| References..... | 188 |
| Table and figures..... | 195 |
| Supplementary table..... | 202 |
| Article 4 - Effects of azithromycin on bronchial remodeling in the natural model of severe neutrophilic asthma in horses..... | 204 |
| Abstract..... | 206 |
| Introduction..... | 207 |
| Materials and methods..... | 208 |
| Results..... | 211 |
| Discussion..... | 214 |
| References..... | 220 |
| Tables and figures..... | 226 |
| Supplementary File..... | 233 |
| References in Supplement..... | 240 |
| Tables and figures in Supplement..... | 242 |
| Article 5 - Neutrophil extracellular vesicles and airway smooth muscle proliferation in the natural model of severe asthma in horses..... | 247 |
| Abstract..... | 249 |
| Introduction..... | 250 |
| Materials and Methods..... | 251 |
| Results..... | 256 |
| Discussion..... | 259 |
| References..... | 265 |
| Figures..... | 273 |

| | |
|---|-----|
| Supplementary File..... | 280 |
| References in Supplement | 285 |
| Tables and Figures in Supplement | 287 |
| Discussion générale..... | 307 |
| Retour sur les objectifs de la thèse..... | 308 |
| Réflexions sur les résultats obtenus..... | 309 |
| Conclusions et perspectives | 321 |
| Références bibliographiques..... | 324 |
| Annexes | 377 |
| Annexe 1 - Lung Function Variation during the Estrus Cycle of Mares Affected by Severe Asthma | 378 |
| Abstract | 380 |
| Introduction..... | 381 |
| Materials and Methods..... | 381 |
| Results | 384 |
| Discussion..... | 386 |
| References..... | 392 |
| Figures | 398 |
| Annexe 2 - Nebulisation of dexamethasone sodium phosphate for the treatment of severe asthmatic horses | 402 |
| Abstract | 404 |
| Introduction..... | 405 |
| Materials and methods | 406 |
| Results | 409 |

| | |
|------------------|-----|
| Discussion | 410 |
| References | 414 |
| Figures | 417 |

Liste des tableaux

Revue de littérature

Tableau 1. Méta-analyses sur l'utilisation des macrolides dans l'asthme chez les adultes.....98

Article 3 - Randomised study of the immunomodulatory effects of azithromycin in severely asthmatic horses

Table 1. Sequences of primer pairs used for quantitative PCR analysis.....195

Supplementary table 1. Bacterial count in tracheal wash samples.....202

Article 4 - Effects of azithromycin on bronchial remodeling in the natural model of severe neutrophilic asthma in horses

Table 1. Sequences of primer pairs used for quantitative PCR analysis.....226

Supplementary table 1. Percentage of bronchoalveolar lavage fluid recovered and total cell counts.....242

Article 5 - Neutrophil extracellular vesicles and airway smooth muscle proliferation in the natural model of severe asthma in horses

Supplementary table S1. Proteins significantly downregulated in EVs produced by LPS-stimulated neutrophils.....291

Supplementary table S2. Proteins significantly upregulated in EVs produced by LPS-stimulated neutrophils.....293

Supplementary table S3. Proteins significantly upregulated in EVs produced by LPS-stimulated neutrophils, only during asthmatic exacerbation.....300

Supplementary table S4. Biological processes enriched in proteins from neutrophil-derived EVs stimulated with LPS.....302

Liste des figures

Revue de littérature

| | |
|---|----|
| Figure 1. Résumé schématique des médiateurs neutrophiliques impliqués dans l’asthme et leurs conséquences potentielles..... | 48 |
| Figure 2. Les types de vésicules extracellulaires | 53 |
| Figure 3. Principales lésions du remodelage bronchique dans l’asthme. | 56 |
| Figure 4. Caractéristiques cliniques de l’asthme équin sévère.. | 72 |
| Figure 5. Évaluation de la fonction pulmonaire par la technique du ballonnet œsophagien (mécanique standard) | 73 |
| Figure 6. Évaluation de la fonction pulmonaire par oscillométrie pulsée | 73 |
| Figure 7. Lavage bronchoalvéolaire par vidéoendoscopie | 74 |
| Figure 8. Biopsies endobronchiques chez l’espèce équine | 84 |
| Figure 9. Biopsie thoracoscopique chez l’espèce équine | 85 |
| Figure 10. Bronchiole provenant d’un cheval asthmatique sévère | 86 |

Méthodes

| | |
|--|-----|
| Figure 11. Chronologie des études incluses dans la thèse | 107 |
|--|-----|

Article 2 - Efficacy of tamoxifen for the treatment of severe equine asthma

| | |
|---|-----|
| Figure 1. Transpulmonary pressure | 167 |
| Figure 2. Pulmonary resistance | 168 |
| Figure 3. Pulmonary elastance | 169 |
| Figure 4. Clinical respiratory scores | 170 |
| Figure 5. Tracheal mucus scores | 171 |
| Figure 6. Bronchoalveolar lavage fluid cytology | 172 |

Article 3 - Randomised study of the immunomodulatory effects of azithromycin in severely asthmatic horses

| | |
|--|-----|
| Figure 1. Lung function..... | 196 |
| Figure 2. Tracheal mucus score..... | 197 |
| Figure 3. Bronchoalveolar lavage fluid cytology..... | 198 |
| Figure 4. Apoptotic neutrophils..... | 199 |
| Figure 5. Transcriptomic analysis..... | 200 |
| Figure 6. Endobronchial biopsy score..... | 201 |

Article 4 - Effects of azithromycin on bronchial remodeling in the natural model of severe neutrophilic asthma in horses

| | |
|--|-----|
| Figure 1. Lung function..... | 227 |
| Figure 2. Bronchodilation test..... | 228 |
| Figure 3. Bronchoalveolar lavage fluid cytology..... | 229 |
| Figure 4. Endobronchial biopsies..... | 230 |
| Figure 5. Peripheral bronchial remodeling..... | 231 |
| Figure 6. Endobronchial ultrasound..... | 232 |
| Supplementary figure 1. Lung function measured by impulse oscillometry..... | 243 |
| Supplementary figure 2. Gene expression in bronchoalveolar lavage fluid cells..... | 244 |
| Supplementary figure 3. Gene expression in peripheral polymorphonuclear cells..... | 245 |
| Supplementary figure 4. Gene expression in endobronchial biopsies..... | 246 |

Article 5 - Neutrophil extracellular vesicles and airway smooth muscle proliferation in the natural model of severe asthma in horses

| | |
|---|-----|
| Figure 1. Lung function measured by oscillometry..... | 273 |
| Figure 2. Bronchoalveolar lavage fluid cytology..... | 274 |
| Figure 3. Neutrophil extracellular vesicle characterization by laser scattering microscopy..... | 275 |

| | |
|---|-----|
| Figure 4. Gene ontology enrichment analysis of proteins downregulated by LPS in neutrophil-derived EVs..... | 276 |
| Figure 5. Gene ontology enrichment analysis of proteins upregulated by LPS in neutrophil-derived EVs. | 277 |
| Figure 6. Gene ontology enrichment analysis of proteins upregulated by LPS in neutrophil-derived EVs only during asthmatic exacerbation..... | 278 |
| Figure 7. Airway smooth muscle proliferation..... | 279 |
| Supplementary Figure S1. Reactome enrichment analysis of proteins downregulated by LPS in neutrophil-derived EVs..... | 287 |
| Supplementary Figure S2. Reactome enrichment analysis of proteins upregulated by LPS in neutrophil-derived EVs..... | 288 |
| Supplementary figure S3. Reactome enrichment analysis of proteins upregulated by LPS in neutrophil-derived EVs only during asthmatic exacerbation | 289 |
| Supplementary Figure S4. Flow cytometry analysis | 290 |

Annexe 1 - Lung Function Variation during the Estrus Cycle of Mares Affected by Severe Asthma

| | |
|-------------------------------------|-----|
| Figure 1. Pulmonary resistance..... | 398 |
| Figure 2. Pulmonary reactance | 399 |
| Figure 3. Coherence | 400 |
| Figure 4. Correlations | 401 |

Annexe 2 - Nebulisation of dexamethasone sodium phosphate for the treatment of severe asthmatic horses

| | |
|---|-----|
| Figure 1. Respiratory clinical score..... | 417 |
| Figure 2. Lung function..... | 418 |
| Figure 3. Bronchodilation test..... | 419 |
| Figure 4. Serum cortisol | 420 |
| Figure 5. Correlations | 421 |

Liste des sigles et des abréviations

ADN : acides désoxyribonucléiques

AELM : asthme équin léger à modéré

AES : asthme équin sévère

ARN : acides ribonucléiques

BALA : agonistes β 2-adrénergiques longue action

CXCL8 : interleukine 8

GCR : récepteurs aux glucocorticoïdes

GM-FSC : facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages

GC : glucocorticoïdes

Ig : immunoglobulines

CSI : corticostéroïdes inhalés

IL : interleukine

LBA : lavage bronchoalvéolaire

LPS : lipopolysaccharide

MLB : muscle lisse bronchique

MMP : métalloprotéinase

MPO : myéloperoxydase

MPOC : maladie pulmonaire obstructive chronique

NETs : pièges extracellulaires des neutrophiles

TGF- β : facteur de croissance transformant β

TLR : récepteurs de type Toll

TNF : facteur de nécrose tumorale

VEMS : volume expiratoire maximal par seconde

VEs : vésicules extracellulaires

Remerciements

Je suis très reconnaissante du soutien constant du D^r Jean-Pierre Lavoie tout au long de mon parcours académique, tant comme directeur de résidence que comme directeur de recherche. Je le remercie particulièrement pour sa générosité dans le temps accordé à ma formation, les multiples opportunités d'apprentissage offertes et sa grande capacité à cultiver la curiosité scientifique chez ses étudiants. Je remercie aussi le D^r James G. Martin pour sa disponibilité, ses observations toujours éclairantes et son regard critique qui a permis d'améliorer la pertinence des projets expérimentaux. Je me considère choyée d'avoir été guidée par deux mentors aussi altruistes que rigoureux.

Je remercie aussi tous les membres et collègues du laboratoire pour leur implication dans mes différents projets, et pour avoir rendu les dernières années amusantes en plus d'édifiantes. Merci donc à Khristine Picotte, Amandine Bessonnat, Amandine Vargas, Esther Millares Ramirez, Sheila Dogaheh Pourali, Roxane Boivin, Selma Ben Hamouda, Hélène Richard, Florence Dupuis-Dowd, Nicolas Herteman, Julie-Anne Carrier, Camille Rolland, Alexandra J. Lemoyne, Marine Rullier, Valérie Dubuc, Elizabeth Pépin, Mohamed Issouf et Roger Fontaine. Je remercie aussi mes co-auteurs Pierre Hélie, Francis Beaudry, Christian Bédard, Olivia Labrecque, Alvaro G. Bonilla, Christopher Fernandez Prada et Mouhamadou Diaw pour leur contribution à ma formation dans des domaines variés.

Je tiens aussi à remercier les professeurs et les cliniciens de l'équipe de médecine interne équine, Mathilde Leclère, Daniel Jean, Marion Allano et Susana Macieira, qui en plus de contribuer à ma formation d'interniste, ont su me supporter dans mon programme combiné de résidence-PhD. Je remercie aussi tous les internes que j'ai eu la chance de côtoyer et mes co-résidents, Clémentine Gy, Ludovic Tanquerel, Estelle Manguin et Séléna de Wasseige, qui m'ont accompagnée dans cette aventure, parfois un peu à leurs dépens!

Je suis indéfiniment reconnaissante pour le support indéfectible de ma famille, particulièrement celui de mes parents Julie Mainguy et Michel Seers qui ont toujours cru en moi (un peu aveuglément) et qui m'ont offert tous les outils pour réussir. Je tiens aussi spécialement à

remercier Olivier Verdon pour sa patience et son soutien, et notre fils Xavier pour ajouter une étincelle si brillante dans nos vies. L'entourage précieux de ma famille, de ma belle-famille et de mes amis a été essentiel à la poursuite de mes études.

Je reconnais l'importance du soutien financier que j'ai reçu durant ma formation doctorale, particulièrement des Fonds de Recherche du Québec en Santé et des bourses reçues de la Faculté des Études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal, ainsi que les subventions des Instituts de Recherche en Santé du Canada pour le financement des études réalisées.

Merci aux membres du jury, D^{re} Mathilde Leclère, D^r Marcio Costa, D^{re} Andréanne Côté, D^r James G. Martin et D^r Jean-Pierre Lavoie pour le temps accordé à l'évaluation de cette thèse et à l'amélioration que vous avez permis d'y apporter.

Introduction

L'asthme est une maladie chronique affectant un peu plus de 8% des Canadiens (1). La condition se caractérise par une obstruction respiratoire fluctuante, de l'inflammation bronchique et des lésions structurelles des voies respiratoires (le remodelage bronchique) (2). La forme sévère affecte une minorité de patients (\approx 5-10%), mais elle contribue disproportionnellement au fardeau de la maladie par son association à des exacerbations fréquentes et à la mortalité (3). Jusqu'à 50% des patients asthmatiques sévères présentent une inflammation pulmonaire de type neutrophilique (4) et ce phénotype a été plus souvent associé à une obstruction bronchique fixe et permanente (5, 6), à la mortalité (7) et à une dysfonction des voies respiratoires périphériques (8). Les objectifs globaux de ce projet doctoral sont donc d'investiguer la contribution des neutrophiles aux lésions structurelles affectant les voies respiratoires centrales et périphériques grâce à l'étude de la réversibilité du remodelage par des traitements anti-neutrophiliques. Puisque des considérations éthiques limitent la collection de biopsies pulmonaires chez les patients asthmatiques, l'étude du remodelage chez des modèles animaux demeure essentielle à la compréhension du phénomène et au développement de thérapies. Ainsi, le modèle de l'asthme équin sévère, une maladie chronique qui se développe naturellement chez les animaux prédisposés génétiquement, a été étudié dans cette thèse. La condition se manifeste par des épisodes d'obstruction respiratoire dont la sévérité fluctue avec l'exposition antigénique environnementale, de l'inflammation pulmonaire neutrophilique et du remodelage bronchique (9). Parmi les altérations structurelles, l'augmentation de la masse du muscle lisse bronchique observée tant chez l'humain que chez le cheval asthmatique est particulièrement délétère puisqu'elle contribue au bronchospasme exagéré et au rétrécissement de la lumière des voies respiratoires. Toutefois, les thérapies usuelles de la maladie (glucocorticoïdes (GC) et bronchodilatateurs) ne procurent qu'une réversibilité partielle des lésions structurelles dans l'asthme et ne contrôlent pas l'inflammation neutrophilique chez ces deux espèces. L'évaluation de la fonction et de l'inflammation pulmonaire, ainsi que la collection séquentielle de biopsies des bronches centrales et périphériques sont possibles grâce à la taille et au tempérament du

cheval, permettant la réalisation d'essais thérapeutiques dont les résultats pourraient bénéficier à la santé humaine et animale.

Afin de contextualiser les études expérimentales réalisées dans ce projet doctoral, la revue de littérature caractérisera l'asthme chez l'humain, les répercussions de l'inflammation neutrophilique et du remodelage bronchique dans la maladie, les particularités de l'asthme équin comme modèle naturel de la maladie, puis les traitements anti-neutrophiliques étudiés dans cette thèse.

Contributions à l'avancement des connaissances

Malgré l'association de l'inflammation neutrophilique à plusieurs issues cliniques négatives dans l'asthme, les mécanismes pathophysiologiques sous-jacents demeurent globalement incompris. Bien que la réponse au traitement à base de GC des patients souffrant de ce phénotype soit fréquemment insatisfaisante (10), peu d'études ont évalué les effets de thérapies visant spécifiquement l'inflammation neutrophilique. De plus, leurs résultats mitigés ne permettent pas de conclure sur le rôle du neutrophile dans la sévérité de la maladie. Similairement à ce qui est observé chez l'humain, l'article 1 de cette thèse (*Glucocorticoid therapy in horses with asthma : A narrative review*, p.110), a illustré comment les GC sont insuffisants pour normaliser l'inflammation neutrophilique et le remodelage bronchique dans l'asthme équin sévère. Ainsi, deux molécules ayant un potentiel pour atténuer l'inflammation neutrophilique ont été investiguées dans ce projet doctoral; le tamoxifène et l'azithromycine. Le premier est un modulateur sélectif des récepteurs à l'œstrogène qui inhibe le chimiotactisme et la survie des neutrophiles *in vitro* (11, 12). Malgré ces caractéristiques prometteuses, les résultats décrits dans l'article 2 (*Efficacy of tamoxifen for the treatment of severe equine asthma*, p.151) indiquent que le tamoxifène n'atténue pas la neutrophilie pulmonaire dans l'asthme équin sévère. Le traitement a tout de même amélioré légèrement la fonction pulmonaire, un résultat qui souligne la dichotomie entre l'inflammation et l'obstruction respiratoire, mais aussi l'importance de mieux comprendre le rôle de l'œstrogène (et des autres hormones sexuelles) dans la pathophysiologie de l'asthme.

L'addition de macrolides au traitement usuel de l'asthme sévère confère certains bénéfices cliniques, dont une amélioration de la qualité de vie et une diminution de la fréquence d'exacerbations (13), possiblement grâce aux propriétés anti-inflammatoires que possède cette classe d'antibiotique (14). Bien que l'administration d'azithromycine, un macrolide synthétique, ait diminué la neutrophilie pulmonaire dans l'asthme équin sévère, aucune amélioration concomitante de l'obstruction respiratoire ni des lésions de remodelage bronchique n'a été obtenue dans les études réalisées dans ce projet doctoral, que ce soit en monothérapie ou lorsque le macrolide a été combiné à un glucocorticoïde inhalé (article 3 – *Randomised study of the immunomodulatory effects of azithromycin in severely asthmatic horse*, p.173 et article 4 –

Effects of azithromycin on bronchial remodeling in the natural model of severe neutrophilic asthma in horses, p.204). Ceci suggère que l'atténuation de l'inflammation neutrophilique n'est pas suffisante pour renverser les lésions de remodelage, dont l'augmentation de la masse du muscle lisse, lorsqu'elles sont chroniquement établies. Un rôle de la neutrophilie pulmonaire dans le développement initial des changements architecturaux n'est toutefois pas exclu et nécessitera des investigations ultérieures. Alternativement, la dichotomie entre la cinétique de l'inflammation et des lésions de remodelage pourrait indiquer que la neutrophilie n'est pas une cause, mais plutôt une lésion coïncidente, ou même une conséquence des changements architecturaux puisque les cellules structurales peuvent produire des molécules inflammatoires. Le neutrophile est une cellule plastique aux vastes fonctions biologiques; une évaluation de ses multiples facettes est donc nécessaire à la compréhension des répercussions potentielles de ce type d'inflammation. Les effets des vésicules extracellulaires (VEs) neutrophiliques sur la prolifération du muscle lisse bronchique dans l'asthme équin sévère ont donc été investigués dans l'article 5 (*Neutrophil extracellular vesicles and airway smooth muscle proliferation in the natural model of severe asthma in horses*, p.247). Les résultats obtenus indiquent que les neutrophiles activés au lipopolysaccharide (LPS; communément appelé endotoxine), un fragment bactérien répandu dans l'environnement et dont l'inhalation contribue au développement de l'obstruction bronchique dans l'asthme humain et équin (15, 16), pourraient participer à l'augmentation de la masse du muscle lisse par la libération de vésicules qui stimulent la prolifération des cellules musculaires lisses bronchiques. Bien que le statut d'exacerbation de la maladie n'ait pas potentialisé les effets des VEs neutrophiliques dans cette étude, l'augmentation marquée de la quantité de neutrophiles résidants dans les poumons pourrait décupler les effets biologiques des vésicules.

Cette thèse a aussi des retombées sur la pratique de la médecine équine. Bien que l'utilisation d'antibiotiques ne soit pas recommandée dans le traitement de l'asthme équin, des essais thérapeutiques sont fréquemment effectués par les vétérinaires praticiens. La démonstration que l'administration d'antibiotiques à large spectre ne modifie pas la quantification bactérienne trachéale en culture ni le degré de l'obstruction respiratoire dans l'article 2 ne supporte pas leur usage dans l'asthme équin sévère. Les projets réalisés ont aussi mené à une investigation

préliminaire de l'effet du cycle œstral dans l'asthme équin (annexe 1 - *Lung Function Variation during the Estrus Cycle of Mares Affected by Severe Asthma*, p.378), démontrant pour la première fois une influence des hormones sexuelles dans la sévérité de cette condition.

Revue de littérature

L'asthme chez l'humain

L'asthme est une maladie chronique caractérisée par une pathophysiologie complexe et hétérogène et dont les éléments cliniques distinctifs sont l'altération du débit expiratoire ainsi que l'inflammation et l'hyperréactivité bronchiques. Les signes cliniques principaux incluent la dyspnée, une sensation d'oppression thoracique, des sibilances (sifflements expiratoires), une production augmentée de mucus et la toux (2). L'intensité des symptômes fluctue généralement dans le temps et peut culminer en une obstruction permanente des voies respiratoires chez certains patients. L'hétérogénéité de la condition se reflète par une sévérité, un taux d'exacerbation et une réponse thérapeutique variables chez les patients asthmatiques.

Prévalence

L'asthme affecte environ 3.6% de la population mondiale (17), soit près de 260 millions d'individus (18). Bien que la prévalence internationale ait globalement diminué d'environ 25% depuis la décennie 1990 (18), elle varie géographiquement (de \approx 1000-10 000 cas par 100 000 habitants) (18) et elle est en augmentation en Amérique du Nord (18). Au Canada, l'asthme atteint 8.4% de la population de plus de 12 ans (1) et les projections indiquent une augmentation de 16% des cas d'asthme entre les années 2014 et 2033 au pays (19). La prévalence qui fut historiquement plus faible dans certains pays en voie de développement est maintenant en hausse, parallèlement à l'industrialisation, l'urbanisation et possiblement à un meilleur accès à des soins de santé, et incidemment au diagnostic (20). La proportion d'asthmatiques atteints de la forme sévère varie de 1% à 20% selon les études (21-24), avec une estimation de 5-10% la plus communément rapportée (25, 26). Cette variabilité est vraisemblablement une conséquence d'un manque de consensus historique sur la définition de l'asthme sévère, et des variations démographiques et géographiques.

Chez les enfants, l'asthme est la maladie chronique la plus fréquente, touchant environ 10% de la population pédiatrique mondiale, avec une montée de la prévalence dans les pays riches (27). La moitié des enfants asthmatiques serait affectée par une symptomatologie marquée (27).

Importance clinique et socioéconomique

En plus de la morbidité consécutive à la présence de symptômes respiratoires, vivre avec de l'asthme réduit la qualité de vie des sujets atteints (28). Même dans un pays avec un système de santé robuste comme le Canada, la condition demeure incontrôlée dans le tiers des cas (1). L'asthme réduit l'espérance de vie corrigée pour l'incapacité, et ce de façon disproportionnée dans les pays au développement socioéconomique plus faible (18). Les asthmatiques sévères ont davantage de comorbidités, dont des troubles mentaux et comportementaux (21, 29). Incidemment, un Canadien sur quatre consulte pour des soins en santé mentale l'année suivant un diagnostic d'asthme, avec un taux de visite à l'urgence pour un trouble mental plus élevé comparativement à la période précédant le diagnostic (30). L'asthme peut aussi occasionner de la détresse émotionnelle en limitant les activités de la vie quotidienne, en diminuant les perspectives d'emploi (31) et en altérant les relations interpersonnelles (32). Chez les enfants, l'asthme est une cause majeure d'absentéisme à l'école et est lié à de mauvaises performances académiques, affectant disproportionnellement certaines communautés ethniques (33).

Heureusement, la mortalité associée à cette maladie a drastiquement chuté dans les dernières décennies avec l'avènement de thérapies plus appropriées, notamment l'usage répandu des corticostéroïdes inhalés (CSI, comme la fluticasone, le budésonide et la béclo-métasone), et plus sélectif des agonistes β 2-adrénergiques (incluant des molécules courte action comme le salbutamol, et des produits longue action comme le salmétérol et le formotérol). Ainsi, la mortalité a diminué de plus de 50% depuis les années 1990 (18, 34), mais peu de gain a été effectué sur ce front durant la dernière décennie (34). Avec plus de 400 000 décès annuellement (18), l'asthme demeure la deuxième cause de mortalité parmi les maladies chroniques respiratoires, après la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) (17). La forme sévère est associée à un risque accru de décès (3) et les mécanismes inculpés dans la mortalité sont un bronchospasme exagéré, des bouchons muqueux obstruant les voies respiratoires (*mucus suffocation*) et l'épaississement de la paroi bronchique (7, 35-38). Toutefois, même des patients asthmatiques légers peuvent développer des exacerbations fatales (39), soulignant l'importance de traiter adéquatement toutes les formes d'asthme (40).

En plus des conséquences sur la santé des patients affectés, l'asthme sévère est un fardeau socioéconomique majeur, avec une augmentation disproportionnée des coûts de soins de santé pour ceux souffrant d'exacerbation (41). Au Canada, les patients asthmatiques sévères ont un coût direct de soins de santé trois fois plus élevé que les non-asthmatiques, et deux fois plus élevé que les asthmatiques légers à modérés (21). Par conséquent, les projections financières indiquent que le coût associé au contrôle sous-optimal des symptômes de l'asthme d'ici 2033 sera de plus de 200 milliards de dollars au pays (19).

Facteurs de risque

L'asthme est une maladie complexe qui résulte d'interactions entre des facteurs génétiques, physiologiques et environnementaux. Puisque les événements incitateurs surviennent longtemps avant l'apparition de symptômes, même durant la période foetale, et que la sensibilité aux facteurs prédisposants varie d'un individu à l'autre, l'étude de la pathophysiologie de l'asthme est laborieuse (42). Les nombreux facteurs de risque identifiés influencent le développement initial de la condition, mais aussi l'avènement d'exacerbation et la sévérité de la maladie (43).

Génétique

La génétique serait responsable d'environ 10% du risque de devenir asthmatique durant l'enfance, tandis que cette proportion est moindre lorsque l'asthme apparaît à l'âge adulte, où l'environnement jouerait un plus grand rôle (44-46). La propension au développement de l'asthme durant la petite enfance est plus élevée lorsqu'un parent est asthmatique, et ce de façon plus prononcée s'il s'agit de la mère (47). Ce risque persiste même à l'âge adulte, où la prédisposition à l'asthme tardif est plus élevée si un proche parent est affecté. Grâce à des études d'association pangénomique, plusieurs polymorphismes nucléotidiques ont été reliés à l'asthme chez l'enfant (particulièrement au locus 17q12-21 (44, 45)) et dans une moindre mesure, à l'incidence de la maladie à l'âge adulte (44). Des prédispositions ethniques existent, bien qu'il soit difficile de distinguer l'effet de la génétique et du contexte socioéconomique qui est souvent inéquitable. Par exemple, certaines populations autochtones ont une prévalence plus élevée d'asthme au Canada (48).

L'épigénétique est aussi impliquée dans la pathophysiologie de la maladie (49). Celle-ci est définie par les mécanismes modulant l'expression génique, mais qui n'altèrent pas la séquence d'acides désoxyribonucléiques (ADN). Ceci comprend la modification de l'histone (acétylation, phosphorylation ou méthylation) et la présence d'acides ribonucléiques (ARN) non codants, comme les microARN. Ces processus peuvent entre autres modifier les sites de liaison des facteurs de transcription, et donc mener à une régulation différentielle de l'expression génique (49). Une hypométhylation de gènes impliqués dans la biologie des lymphocytes T (50), une hyperméthylation du gène codant pour les récepteurs β 2-adrénérgiques (51), et un profil de microARN distinct dans les expectorations (52) ne sont que quelques exemples de la répercussion de l'épigénétique dans l'asthme. Ces changements épigénétiques sont différents selon le phénotype inflammatoire (53) et ils sont modifiés par des facteurs environnementaux, tels que la pollution (51) et l'exposition *in utero* à une mère asthmatique (54).

Allergie et exposition environnementale

Puisque l'asthme est associé à la présence d'allergies dans 50-75% des cas (55, 56), le phénotype allergique fut historiquement le plus étudié. Typiquement, l'asthme allergique est lié à un historique familial ou personnel de maladies allergiques (par exemple, l'eczéma ou la rhinite), à une augmentation des immunoglobulines (Ig) E sériques (57), à une incidence durant l'enfance et à une réponse satisfaisante aux CSI (2). Toutefois, l'atopie joue aussi un rôle dans le développement tardif de l'asthme, puisque l'eczéma, la rhinite allergique saisonnière et un test d'allergie cutané positif sont tous des facteurs associés à une incidence augmentée à l'âge adulte (58).

Les allergènes inhalés intérieurs les plus souvent incriminés dans l'asthme sont les antigènes de champignons, de coquerelles, d'acariens de maison, les endotoxines et les souris (59-61). Dans une moindre mesure et de façon plus controversée, l'exposition aux animaux de compagnie à fourrure influencerait aussi le développement de la condition (62). Environ 15% des cas d'asthme sont liés à une exposition reliée au travail (asthme occupationnel) (31), dans lesquels les allergènes ou irritants incriminés sont divers et nombreux (animaux de laboratoire, farine, fruits de mer, isocyanates, chlore, etc.) (63).

Parmi les allergènes extérieurs, les pollens ne semblent pas être un facteur prédisposant au développement initial de l'asthme (64), mais ils contribuent aux exacerbations de la maladie. Conséquemment, l'augmentation de leur concentration aérienne saisonnière est associée à une hausse des hospitalisations dues à l'asthme au Canada (65). La concentration de polluants extérieurs, incluant des particules comme l'ozone et le monoxyde de carbone, est aussi reliée aux admissions en urgence pour des crises asthmatiques au Canada, particulièrement chez les jeunes enfants (66). Effectivement, l'exposition aux particules liées au trafic routier détériore la fonction respiratoire des asthmatiques (67). Plusieurs études suggèrent une prévalence plus élevée de l'asthme en milieu urbain, ce qui pourrait être expliqué par le degré de pollution (68), un effet protecteur d'une exposition plus variée à des microorganismes environnementaux dans les fermes (69), mais aussi par un éventuel sous-diagnostic de l'asthme en milieu rural (70).

Fumer la cigarette est lié à la prévalence (61) et à l'incidence (58) de l'asthme à l'âge adulte, et cette habitude nuit substantiellement au fardeau de la maladie (18). Les conséquences à long terme sont considérables, avec un déclin plus rapide de la fonction pulmonaire chez les asthmatiques dont la mère fumait durant la grossesse (71). En plus de la cigarette, plusieurs autres facteurs de risque *in utero* ont été identifiés, dont l'obésité, la prise de poids (72), le microbiome intestinal maternel (73) et le contrôle de l'asthme durant la grossesse chez la mère asthmatique (47).

Micro-organismes

Les virus respiratoires, particulièrement le virus syncytial respiratoire, les rhinovirus et le virus influenza, ont été associés au développement de la maladie. Toutefois, la majorité des enfants qui souffrent d'une atteinte virale aiguë ne développeront pas d'asthme, et les infections virales sont souvent asymptomatiques (74). Ainsi, il demeure incertain si les virus jouent réellement un rôle causal, ou plutôt si l'association est inversement causée par une prédisposition des sujets asthmatiques à être plus sévèrement atteints lors d'infection virale (75). Des facteurs confondants, tels que la prise d'antibiotiques, une dysbiose secondaire à celle-ci, et les interactions entre les virus et des facteurs environnementaux complexifient la compréhension de l'implication des virus (75). Parmi les mécanismes pathophysiologiques proposés, notons que le

virus syncytial respiratoire et les rhinovirus induisent un biais de l'immunité cellulaire vers une réponse de type T2, et que le virus influenza atténue la production d'interféron γ (typifiant la réponse de type T1) (43). Alors que le rôle des virus respiratoires dans le développement de l'asthme est peu élucidé, leur implication dans l'incidence des exacerbations est clairement établie. Ils sont isolés dans $\approx 60\%$ des épisodes d'exacerbation chez les enfants, ce qui contribue à l'augmentation notable des hospitalisations lors du retour en classe à l'automne au Canada (76). Chez les adultes, 80% des exacerbations sont associées à des symptômes du rhume (77), avec une détection virale variant de 50% à 70% des cas selon les études (77, 78). L'asthme sévère, particulièrement neutrophilique (79), pourrait être associé à des atteintes plus graves lors d'infection au SARS-CoV-2 (COVID-19) (80).

Tout comme pour les virus, le rôle des infections bactériennes dans le développement de l'asthme est controversé, alors que leur influence sur l'incidence d'exacerbations est plus consensuelle (74). Par exemple, la colonisation pharyngienne avec *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ou *Mycoplasma catarrhalis* à un mois de vie est associée au développement de l'asthme à l'âge de cinq ans (81). Les bactéries atypiques *Mycoplasma pneumoniae* et *Chlamydia pneumoniae* sont incriminées lors d'exacerbations cliniques, et bien qu'elles aient été isolées plus souvent chez les asthmatiques que chez les individus sains, leur implication dans la pathogenèse demeure peu explorée (82). Le rôle des agents bactériens n'est pas simple, puisqu'une exposition à un plus grand nombre de pathogènes a un effet protecteur sur le développement de l'asthme (69) et les microbiomes pulmonaires et gastro-intestinaux pourraient moduler la pathogenèse de la maladie par leur impact sur le développement normal de l'immunité. Par exemple, l'accouchement par césarienne et ses conditions aseptiques inhérentes sont un facteur de risque pour le développement de la maladie, vraisemblablement en raison de ses conséquences immédiates sur l'établissement du microbiome chez le nouveau-né (83).

Statut physiologique

Les hormones sexuelles et le sexe modulent le risque de développer de l'asthme. Alors que la maladie est plus fréquente chez les garçons durant l'enfance, cette tendance s'inverse à la puberté (17, 84). Le taux d'hospitalisation pour une exacerbation asthmatique est plus élevé chez

les femmes, une différence qui est accentuée durant les années reproductrices (85), et elles sont surreprésentées dans les phénotypes sévères et résistants aux corticostéroïdes (55, 86). Le cycle œstral influence aussi la symptomatologie de la maladie, avec des détériorations plus fréquentes durant les phases pérимenstruelle et menstruelle (87-90), bien que ceci ne soit pas consensuel (91). La grossesse peut influencer la sévérité des signes cliniques par ses variations hormonales, par un effet mécanique modifiant les volumes respiratoires et par l'occurrence de comorbidités (par exemple, la congestion nasale et le reflux gastro-œsophagien). Conséquemment, certaines femmes expérimentent une amélioration des symptômes (possiblement via la capacité de la progestérone et de l'œstrogène à relaxer le muscle lisse bronchique (92)), tandis que d'autres voient leur condition se détériorer durant la grossesse (93). Finalement, le plus petit calibre des voies respiratoires des femmes pourrait les prédisposer à l'hyperréactivité bronchique et à l'asthme à l'âge adulte (84, 94).

L'indice de masse corporelle influence aussi la pathophysiologie de la condition. Effectivement, l'obésité peut moduler le développement et la sévérité de l'asthme par la présence d'inflammation systémique, l'altération fonctionnelle des cellules de l'immunité et l'effet mécanique de l'obésité sur la capacité résiduelle fonctionnelle du poumon (95). Les risques relatifs de l'incidence (58) et de la prévalence (96) de l'asthme à l'âge adulte sont doublés chez les obèses.

Finalement, le stress influence la morbidité de l'asthme en altérant l'activité de l'axe hypothalamo-pituitaire-surrénalien et du système nerveux autonome (97). Un score élevé de stress à l'adolescence est associé à l'incidence de l'asthme dans la décennie suivante (98). Au Canada, les enfants asthmatiques modérés à sévères qui démontrent le plus de symptômes sont ceux exposés à du stress aigu et chronique (99).

Diagnostic et classification

Le diagnostic définitif de l'asthme nécessite la documentation d'un historique et de symptômes respiratoires compatibles, ainsi qu'une démonstration d'un syndrome obstructif réversible. Les éléments anamnestiques suggestifs incluent les facteurs de risque décrits ci-haut,

particulièrement une histoire d'atopie et d'asthme familial. Les signes respiratoires typiques sont une sensation de souffle court ou d'oppression thoracique, une quantité augmentée d'expectoration, de la toux et une respiration sifflante. Ces symptômes sont variables dans le temps et sont parfois liés à des événements provocateurs (par exemple, l'exercice, une infection des voies respiratoires, une exposition occupationnelle). La variabilité du débit expiratoire peut être mise en évidence par des tests de réversibilité (réponse à des bronchodilatateurs courte action, ou une amélioration avec un traitement anti-inflammatoire plus prolongé), par des tests de bronchoconstriction (méthacholine ou histamine) ou par une démonstration d'une variation journalière significative du débit expiratoire de pointe ou du volume expiratoire maximal par seconde (VEMS) par spirométrie (2). D'autres tests de fonction pulmonaire, comme l'oscillométrie, peuvent compléter l'évaluation respiratoire. Enfin, divers examens complémentaires peuvent supporter un diagnostic d'asthme, tels que la démonstration d'allergie (test d'allergie intradermique ou dosage sérique d'IgE), la caractérisation du profil inflammatoire des expectorations, l'éosinophilie sanguine et la concentration fractionnelle du monoxyde d'azote dans l'air expiré.

Étant donné l'hétérogénéité de la condition, la présence fréquente de comorbidités et la sous-utilisation de la spirométrie en pratique, les erreurs de diagnostic sont toutefois communes (100, 101). Le diagnostic différentiel non exhaustif inclut le syndrome de toux chronique des voies respiratoires supérieures, une dysfonction laryngée, la MPOC, la fibrose kystique, la tuberculose, la bronchiectasie, etc. Les comorbidités fréquentes comprennent la rhinosinusite, l'eczéma, l'obésité, le reflux gastro-œsophagien et les troubles mentaux (2).

Phénotypes asthmatiques

La catégorisation de la sévérité de l'asthme est établie rétrospectivement par le type et les doses de médicaments requis pour contrôler les signes cliniques, selon les critères établis par la « Global Initiative for Asthma » (2). L'asthme léger répond à un traitement de base (typiquement un CSI faible dose, ou une combinaison d'une faible dose de CSI et d'agonistes β 2-adrénergiques longue action (BALA) administrée au besoin ou en combinaison avec un autre traitement de maintenance de faible intensité). L'asthme modéré inclut les patients qui requièrent

l'administration continue d'une dose moyenne de CSI-BALA. Les asthmatiques sévères nécessitent de fortes doses de CSI-BALA, ou des GC oraux, ce qui peut ou non contrôler leurs signes cliniques (2). L'asthme sévère est différent de l'asthme non contrôlé qui concerne plutôt les patients dont les signes persistent à cause d'une adhérence inadéquate au traitement, une mauvaise technique d'inhalation, la présence de comorbidités ou une composante occupationnelle. La définition d'asthme sévère implique donc que les comorbidités ont été adressées, et que la compliance et la technique d'administration des médicaments sont adéquates (2).

Vu l'hétérogénéité de l'asthme, des phénotypes cliniques distinctifs ont été proposés dans l'objectif d'offrir une médecine personnalisée aux patients (25). Les principaux éléments utilisés pour établir les phénotypes sont l'âge d'apparition (enfance ou tardif), la sévérité, le degré d'obstruction bronchique, la présence d'atopie et le type d'inflammation bronchique basé sur le différentiel cellulaire des expectorations induites (éosinophilique ($\geq 2\%$ (2)), neutrophilique ($>40-76\%$ (102)), mixte, ou paucigranulocytaire (c'est-à-dire l'absence d'inflammation bronchique)) (25, 26). Le sexe, l'obésité, la cigarette et la présence d'un agent provocateur (par exemple, l'asthme induit par l'exercice et l'asthme occupationnel) servent aussi à catégoriser les individus. Bien que légèrement variables d'une étude à l'autre, quatre principaux phénotypes se distinguent : l'asthme léger allergique d'apparition précoce, l'asthme allergique modéré à sévère précoce avec remodelage, l'asthme non allergique éosinophilique tardif, et l'asthme non allergique non éosinophilique tardif (103). Parmi les asthmatiques sévères, trois principaux phénotypes sont décrits : l'asthme allergique précoce, l'asthme non allergique éosinophilique tardif, et l'asthme neutrophilique (103, 104). La neutrophilie dans les expectorations est un facteur important pour le phénotypage de patients asthmatiques sévères (105). Ce phénotype neutrophilique, moins étudié et disposant de peu d'options thérapeutiques, sera décrit en plus amples détails dans le prochain chapitre de cette revue de littérature. Malgré les avancées récentes sur la caractérisation des patients, les phénotypes ne permettent pas encore d'identifier les processus pathophysiologiques sous-jacents (endotypes) ni de prédire adéquatement la réponse au traitement (2).

Endotypes asthmatiques

Bien qu'il s'agisse possiblement d'une dichotomie trop simpliste, les mécanismes moléculaires sous-jacents de l'asthme sont généralement divisés en réponse immunologique de type T2 ou non-T2 (106). Globalement, l'asthme T2, qui médierait la majorité des cas d'asthme (2, 107), comporte des individus de toutes les sévérités (108), répond généralement bien aux GC (109) et est souvent associé à des allergies. Brièvement, l'asthme de type T2 est dirigé par l'immunité adaptative (cellules T CD4+ se différenciant en Th-2) et l'immunité innée (cellules lymphoïdes innées de type 2 et cellules tueuses naturelles) (110). Cette réponse inflammatoire est stimulée par l'interleukine (IL)-33, l'IL-25 et la lymphopoïétine stromale thymique libérées entre autres par les cellules épithéliales exposées à des allergènes, ce qui engendre ensuite la relâche d'IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13 qui stimulent l'inflammation éosinophilique et la sécrétion de mucus. Les biomarqueurs d'une réponse de type T2 sont l'éosinophilie sanguine ($> 150-300$ cellules/ μl) et pulmonaire ($\geq 2\%$ des cellules dans les expectorations), la concentration fractionnelle du monoxyde d'azote dans l'air expiré (> 25 parties par milliard), les niveaux d'IgE, les tests d'allergie (103), et d'autres biomarqueurs moins couramment utilisés (par exemple, la périostine (108, 111)). L'inclusion d'anticorps monoclonaux ciblant les IgE et les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 dans l'arsenal thérapeutique a révolutionné le traitement des individus affectés par de l'asthme de type T2 dans les dernières décennies.

L'asthme non-T2 est moins bien caractérisé, mais impliquerait les réponses de type T17, T1, et l'immunité innée (112). Il englobe l'asthme neutrophilique et paucigranulocytaire, bien que ces deux phénotypes soient cliniquement distincts. Alors que l'asthme paucigranulocytaire est associé à une meilleure fonction pulmonaire (108, 113-115) et à moins de symptômes (29, 108), le phénotype neutrophilique est beaucoup plus hétérogène. La réponse de type T17, qui est plus marquée chez les asthmatiques sévères (116), est caractérisée par la relâche d'IL-17A qui favorise la production par les cellules épithéliales de facteurs stimulant les colonies de granulocytes, d'IL-6, de CXCL1 et de l'interleukine 8 (CXCL8), ce qui stimule indirectement la migration et l'inflammation neutrophilique (110). La réponse de type T1 est aussi davantage impliquée dans l'asthme sévère (111), avec une augmentation des lymphocytes Th-1 (116) et une production accentuée d'interféron γ par les cellules du lavage bronchoalvéolaire (LBA) (116). L'immunité

innée serait aussi impliquée dans le phénotype neutrophilique, avec une expression accrue des molécules associées à différents inflammasomes (dont le NLRP3) (108), ainsi qu'à des récepteurs (récepteurs de type Toll (TLR)2, TLR4, CD14) et des cytokines (CXCL8) liés à l'immunité innée (117). Effectivement, l'inflammasome NLRP3, exprimé par les neutrophiles et les macrophages, certaines caspases inflammatoires et l'IL-1 β , sont augmentés dans les expectorations de patients neutrophiliques (118).

L'absence de consensus sur la définition de la neutrophilie pulmonaire dans les expectorations complique l'étude de ce phénotype, avec des valeurs seuils très variables selon les auteurs ($\geq 40\%$ (105, 119), $\geq 50\%$ (120), $\geq 61\%$ (109, 117, 118, 121, 122), $>65\%$ (10, 123), $\geq 73.6\%$ (108), $>76\%$ (115, 124)). Cette variabilité s'explique entre autres par une définition variable du degré de neutrophilie considéré normal (par exemple, par l'utilisation de la valeur moyenne ou du $>90^{\text{ième}}$ percentile dans une population contrôle (125)), et des variations démographiques. Bien que plusieurs biomarqueurs de l'asthme non-T2 aient été proposés, aucun n'est encore systématiquement utilisé en clinique, ni recommandés dans les directives consensuelles de la « Global Initiative for Asthma » (2, 112). Parmi ces biomarqueurs potentiels d'une réponse de type T1 et T17, notons le YKL-40 (29), l'IL-6, l'IL-17 (103), et l'azurocidine (108, 111, 126).

Ouverture

Ce premier chapitre illustre que la prévention et le traitement de l'asthme ne peuvent pas être simples et uniformes étant donné l'hétérogénéité et la complexité des facteurs de risque et des phénotypes de la maladie. L'inflammation neutrophilique est incriminée dans l'asthme sévère persistant (127), mais la pathophysiologie et le traitement de ce phénotype sont encore insuffisamment explorés. Ainsi, les caractéristiques de l'asthme neutrophilique et ses conséquences potentielles seront approfondies dans le prochain chapitre.

Inflammation neutrophilique dans l'asthme

Biologie du neutrophile en bref

Le neutrophile est la cellule nucléée la plus abondante dans la circulation sanguine, constituant 50-70% des leucocytes circulants. Leur nombre peut décupler lors d'infection grâce à la démargination et à l'augmentation de la granulopoïèse dans la moelle osseuse (128). Il est un pilier de l'immunité innée, particulièrement dans la défense contre les bactéries et les champignons. Ses armes principales sont la dégranulation de protéases et de molécules oxydantes, la phagocytose, la relâche de pièges extracellulaires (NETs pour *neutrophils extracellular traps*) et la libération de VEs (129). Longtemps considéré comme une cellule différenciée de façon terminale, il est maintenant établi que le neutrophile est plastique et qu'il peut adopter son phénotype aux stimuli environnants (130).

La granulopoïèse est principalement activée par le facteur stimulant les colonies de granulocytes, et dans une moindre mesure par le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-FSC), l'IL-6, l'IL-4 et indirectement par l'IL-17 (128, 129). Les neutrophiles sont produits dans les sinus veineux de la moelle osseuse, évoluant de cellules précurseurs myéloïdes (myéloblastes), en promyélocytes, myélocytes, métamyélocytes, neutrophiles immatures non segmentés, puis en neutrophiles matures (polymorphonucléaires segmentés). Le paradigme suggérant que ce sont des cellules effectrices à courte longévité (demi-vie ≈ 10 heures en circulation chez la souris, l'humain et le cheval (131-133)) tend à changer avec la démonstration plus récente d'une survie de plusieurs jours des neutrophiles humains (134). De plus, leur longévité est considérablement prolongée lors d'exposition à des cytokines inflammatoires ou à des molécules microbiennes comme le LPS (135), et lorsqu'ils migrent dans les tissus (136).

Les neutrophiles sont recrutés dans les tissus lorsque les cellules endothéliales de veinules postcapillaires surexpriment des molécules d'adhésion lors d'inflammation (P et E-sélectines). Les neutrophiles peuvent adhérer à la surface endothéliale par le biais de différents récepteurs, dont le ligand-1 de la glycoprotéine P-sélectine, ce qui enclenche la migration tissulaire. Les neutrophiles se lient, puis initient le roulement pour s'ancrer à l'endothélium. Une fois adhésés,

les neutrophiles débutent le rampement, qui dépend de l'interaction entre l'antigène macrophage-1 (MAC-1) sur les neutrophiles et la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) sur les cellules endothéliales. Lorsque le neutrophile est fermement adhérent, la migration trans, ou préférentiellement paracellulaire (à la jonction endothéliale), peut débuter (129). Le phénomène est légèrement distinct dans le poumon, avec une migration préférentielle au niveau des capillaires plutôt que des veinules et elle est partiellement indépendante des β 2-intégrines et sélectines (129), avec plutôt une implication de la molécule d'adhésion dipeptidase-1 (137).

Parmi l'arsenal de défense des neutrophiles, la relâche de granules est primordiale. Quatre types de granules sont sécrétés : primaires (ou azurophiles; incluant la myéloperoxydase (MPO), la protéase sérine élastase et les α -défensines), secondaires (ou spécifiques; incluant la lactoferrine et le lysosome), tertiaires (arginase, gélatinase, métalloprotéinase (MMP)-9) et les vésicules sécrétoires (dont les VEs) (129, 138). Les neutrophiles quiescents n'exposent pas les tissus hôtes à ces granules, mais lors de stimulation, elles sont relâchées de façon progressive, en débutant par les vésicules sécrétoires et en terminant par les granules primaires (139). Cette libération coordonnée et hiérarchisée des granules permet de limiter les dommages tissulaires en répondant de façon proportionnelle à l'insulte subie (128). Grâce à l'activité de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, les neutrophiles produisent des dérivés réactifs de l'oxygène, dont l'anion superoxyde qui possède une puissante activité bactéricide (128). Finalement, la relâche de NETs permet aux neutrophiles de libérer des filets d'ADN enduits de protéases et d'histone qui facilitent la destruction des agents pathogènes extracellulaires. Toutefois, comme l'ensemble de l'artillerie des neutrophiles, il s'agit d'une arme à double tranchant puisque la libération de NETs a aussi le potentiel de causer des dommages tissulaires à l'organisme (140).

Les neutrophiles influencent aussi l'immunité adaptative en modulant les réponses de type T1 ou T2 (141) par le transport d'antigènes dans les nœuds lymphatiques (142) et par leur capacité à présenter ces derniers (143). Ils participent à la résolution de l'inflammation, entre autres en produisant le récepteur pour l'IL-10 sur leur surface (144), en sécrétant des médiateurs lipidiques anti-inflammatoires (résolvines, protectines) (145) et en induisant le phénotype immunorégulateur M2b chez les macrophages (146). Ils contribuent aussi à la réparation tissulaire, en éliminant les débris et en permettant la restructuration du collagène après une

insulte (136). La clairance tissulaire des neutrophiles apoptotiques s'effectue grâce à la phagocytose par les macrophages (128, 147) ou par la migration inverse vers la circulation sanguine (136). Il est présumé que les neutrophiles se dirigent vers la microvascularisation pulmonaire pour y subir une reprogrammation (ou désactivation), suite à laquelle ils retourneraient dans la moelle osseuse pour mourir par apoptose (136).

Bien qu'ils soient essentiels au maintien de l'homéostasie et à la guérison tissulaire, les neutrophiles contribuent à la pathophysiologie de certaines maladies non infectieuses, comme l'arthrite rhumatoïde, le cancer, la MPOC, et certains phénotypes asthmatiques, particulièrement dans la forme sévère. La prochaine section décrira les causes et les conséquences potentielles de l'inflammation neutrophilique dans l'asthme.

Origines de la neutrophilie dans l'asthme

L'implication du neutrophile dans l'asthme demeure controversée (125). Le tissu pulmonaire contient de nombreux neutrophiles matures en condition normale (148), et ils sont donc abondants dans les expectorations d'individus sains (149), constituant de 30-50% des cellules (4, 10, 150, 151). Leur présence est essentielle à la protection contre les agents pathogènes et les molécules exogènes inhalées. En plus de leur rôle dans l'immunité locale bronchique, l'importante réserve de neutrophiles intravasculaires pulmonaires constituerait une niche pour la défense contre les agents pathogènes en circulation (152). Toutefois, les neutrophiles peuvent être retrouvés en quantité plus importante dans l'asthme, de la forme légère, modérée (10) à sévère (4, 153). Parmi les patients asthmatiques, la prévalence du phénotype neutrophilique varie de $\approx 15\%$ (115, 154), 25-30% (10, 111, 155) et jusqu'à $>50\%$ dans l'asthme sévère ou persistant (4).

Les causes de la neutrophilie sont relativement peu élucidées et sont le plus probablement multifactorielles et sujettes à une variation interindividuelle (156). Les différentes variables physiologiques, infectieuses et immunologiques qui peuvent contribuer à l'infiltration neutrophilique dans l'asthme seront décrites ci-dessous.

Caractéristiques physiologiques

L'obésité, par sa stimulation de l'inflammation systémique, de l'immunité innée et d'une réponse de type T1, pourrait favoriser le développement de l'inflammation neutrophilique dans l'asthme (157). La leptine, une molécule qui possède des récepteurs à la surface des neutrophiles et qui stimule l'immunité (158), et la résistance à l'insuline (96) pourraient être impliquées dans l'association entre la neutrophilie et l'obésité. Dans certaines études, les patients obèses asthmatiques ont davantage de neutrophiles dans leur expectoration, avec une corrélation entre l'indice de masse corporelle et le degré de neutrophilie pulmonaire (157). Le lien entre l'obésité et la neutrophilie est plus prononcé chez les femmes dans plusieurs études (157, 159, 160). D'ailleurs, le phénotype neutrophilique est plus fréquent chez la femme en général (10, 55, 115, 122).

Une dysrégulation de l'inflammation lors du vieillissement pourrait être impliquée dans le développement de la neutrophilie dans l'asthme. Effectivement, ce phénotype est plus fréquemment retrouvé chez les asthmatiques âgés (10, 114, 115, 122) et le degré de l'inflammation neutrophilique est corrélé avec l'âge (109, 114, 124, 149). La neutrophilie pulmonaire est aussi associée à la durée de la maladie (120, 124, 161, 162).

L'ethnicité pourrait aussi moduler le type d'inflammation, avec davantage de neutrophiles dans les expectorations de patients Afro-Américains (149). Finalement, certaines comorbidités, dont le reflux gastro-œsophagien, sont associées à la neutrophilie pulmonaire (163).

Agents infectieux

Puisque l'inflammation neutrophilique dans l'asthme est liée à une activation de l'immunité innée, et que cette dernière est puissamment stimulée par les pathogènes bactériens, il n'est pas étonnant qu'une association puisse être suggérée entre neutrophilie et colonisation bactérienne. La présence d'une neutrophilie pulmonaire marquée a été associée à une colonisation des voies respiratoires par certaines bactéries dans l'asthme sévère (*Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus* spp. et *Streptococcus* spp.) (121). Une colonisation bactérienne jugée cliniquement significative est aussi plus fréquemment observée chez les patients asthmatiques neutrophiliques (117, 164). De plus, la quantité de LPS dans les expectorations, un produit des bactéries Gram négatif, est

corrélée avec la neutrophilie pulmonaire chez les asthmatiques (117). Une altération de la composition du microbiome pourrait aussi contribuer à ce phénotype. Effectivement, la neutrophilie a été associée à un microbiome moins varié, à une surabondance des taxons *Moraxella* et *Haemophilus* et à une diminution des taxons *Gemella*, *Porphyromonas* et *Streptococcus* (113, 123). Particulièrement, le marqueur neutrophilique CXCL8 est corrélé à la charge d'*Haemophilus influenzae* dans les expectorations d'asthmatiques non contrôlés (165). La charge bactérienne totale est aussi plus élevée dans ce phénotype, et est corrélée avec la neutrophilie dans les expectorations (123). Finalement, l'utilisation d'antibiotiques, particulièrement les macrolides, peut améliorer la qualité de vie et le taux d'exacerbation dans l'asthme neutrophilique (166), suggérant une implication possible de certains agents pathogènes dans ce phénotype. Ce sujet sera abordé dans le dernier chapitre de cette revue de littérature (Traitements anti-neutrophiliques dans l'asthme, p.88). Toutefois, l'inflammation neutrophilique n'est pas associée à la colonisation bactérienne dans toutes les études. Par exemple, chez des enfants asthmatiques, la neutrophilie intraépithéliale ne diffère pas selon le statut de la culture bactérienne (167) et une culture positive dans le LBA ne corrèle pas avec la neutrophilie (168). Bien qu'il puisse être tentant de croire que les bactéries sont la cause de la neutrophilie, l'inverse est aussi envisageable; le micro-environnement inflammatoire et les dommages tissulaires pourraient favoriser la colonisation par certaines bactéries.

Les virus ont aussi été incriminés dans le développement de l'inflammation neutrophilique. Les exacerbations asthmatiques induites par une infection virale sont accompagnées de davantage de neutrophiles dans les expectorations que les exacerbations non infectieuses (78). Les neutrophiles sanguins de patients asthmatiques relâchent davantage de CXCL8 en réponse à une stimulation avec un agoniste des récepteurs viraux TLR7/8 (169). Ceci pourrait donc contribuer à l'influx de neutrophiles lors d'exacerbations asthmatiques induites par les virus. Encore une fois, ce sujet n'est pas consensuel. Par exemple, la neutrophilie intraépithéliale ne diffère pas selon la présence de différents agents viraux chez les enfants asthmatiques sévères (167).

Allergie et réponse immunitaire altérée

Bien que les patients souffrant du phénotype neutrophilique présentent généralement moins d'atopie (4, 10), leurs symptômes peuvent être exacerbés par l'exposition à des poussières et à des particules fongiques (111). De plus, l'inhalation d'allergènes exacerbe l'influx de neutrophiles chez les patients présentant déjà ce type d'inflammation au niveau tissulaire (170), et même la neutrophilie sanguine peut augmenter lors d'exposition antigénique chez les asthmatiques (171). Chez les individus sensibilisés aux pollens, il y a davantage de desquamation épithéliale et d'infiltration neutrophilique dans la sous-muqueuse lors de la saison d'exposition à ces allergènes (172). Une altération de la réponse innée pourrait aussi être impliquée dans l'asthme neutrophilique. Effectivement, la phagocytose des macrophages alvéolaires est moins efficace dans l'asthme non éosinophilique, ce qui pourrait contribuer à la persistance des neutrophiles dans les voies respiratoires (173). De plus, la neutrophilie sanguine est plus élevée chez les asthmatiques, particulièrement chez ceux ayant de l'inflammation pulmonaire neutrophilique concomitante (115), suggérant la présence d'inflammation systémique.

Exposition à des irritants

De nombreuses études incriminent la cigarette dans le développement de la neutrophilie pulmonaire dans l'asthme (115, 174-176), une association qui pourrait être médiée par la réponse de type T17 (174). Toutefois, la neutrophilie dans les expectorations de patients asthmatiques fumeurs, ex-fumeurs ou non-fumeurs ne diffère pas selon d'autres auteurs (114, 115, 154). Une quantité moindre de neutrophiles dans le parenchyme alvéolaire est même observée dans l'asthme fatal chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs (177), démontrant l'ambiguïté de cette association. Parmi les autres irritants causant de l'inflammation neutrophilique, les particules engendrées par le trafic routier semblent aussi importantes (67), et impliquent particulièrement l'ozone (178) et les gaz d'échappement du diesel (179).

Dans l'asthme occupationnel, l'exposition expérimentale à l'agent incitateur peut être accompagnée d'une augmentation de l'inflammation neutrophilique (180, 181). Réciproquement, la cessation de l'exposition antigénique améliore l'hyperréactivité bronchique et l'inflammation pulmonaire (182). Ce n'est cependant pas toujours le cas puisque

l'inflammation neutrophilique peut persister plusieurs années malgré le retrait antigénique (181, 182), suggérant que l'exposition occupationnelle n'est pas l'unique facteur exacerbant chez ces patients. Dans l'asthme occupationnel, la neutrophilie est entre autres associée à l'exposition aux isocyanates (183) et au chlore (184).

Traitement avec les glucocorticoïdes

Alors qu'il est bien établi que l'administration de CSI réduit l'éosinophilie dans les expectorations, elle ne diminue généralement pas la neutrophilie (161, 185). Puisque les GC prolongent la survie des neutrophiles en inhibant leur apoptose (186), la neutrophilie pourrait représenter une conséquence du traitement de l'asthme. Ainsi, certains auteurs proposent qu'une réduction de la dose, ou un arrêt complet de l'administration des GC, devrait être effectué afin de déterminer si la neutrophilie persiste pour phénotyper correctement un patient donné (125). L'induction de la neutrophilie par les CSI est accompagnée d'une hausse de l'élastase, suggérant que leur présence n'est pas anodine considérant la capacité de cette protéase à dégrader les tissus (109). Au contraire, d'autres n'ont pas observé de différence entre les asthmatiques neutrophiliques et les autres phénotypes dans l'utilisation de GC (10, 120, 123, 149). Similairement, il n'y a pas de corrélation entre la neutrophilie et la dose de CSI ou de GC oral reçue dans plusieurs études (105, 157, 187). Même chez des patients souffrant de crise aiguë grave nécessitant une intubation, il n'y a pas de différence dans le comptage de neutrophiles dans les sécrétions trachéales chez les patients recevant ou non des GC (188). Finalement, le retrait des CSI chez certains patients cause une augmentation de la neutrophilie pulmonaire, en plus d'une perte de contrôle de l'asthme (185). Ces résultats contradictoires illustrent l'hétérogénéité de la maladie, et pourraient être causés entre autres par l'inclusion de populations différentes et de la variabilité des doses et des types de GC utilisés.

La dernière section démontre que le développement de la neutrophilie pulmonaire dans l'asthme est probablement multifactoriel et que des investigations spécifiques sont nécessaires pour mieux comprendre l'origine de ce phénotype. La présence des neutrophiles a été associée à de nombreuses issues cliniques négatives qui seront décrites ci-dessous.

Neutrophiles et conséquences cliniques dans l'asthme

Sévérité de la maladie et neutrophilie

Bien que l'inflammation neutrophilique soit observée dans tout le spectre de sévérité de la maladie, les neutrophiles sont fréquemment associés à un phénotype plus sévère et à une obstruction pulmonaire accentuée (29, 55, 127, 189-191). Effectivement, la neutrophilie pulmonaire est deux fois plus élevée dans l'asthme sévère que chez les asthmatiques modérés et les individus sains (192). Cette augmentation des neutrophiles n'est pas limitée à la lumière bronchique, mais est aussi observée au niveau tissulaire chez les adultes (192) et chez les enfants (167). De plus, plusieurs marqueurs protéiques d'activation neutrophilique (azurocidine, MPO, MMP-9, YKL-40) sont surexprimés dans l'asthme non contrôlé (126) et la neutrophilie sanguine est plus élevée dans la forme sévère (193). La neutrophilie pulmonaire a aussi été corrélée à des symptômes de dépression et d'anxiété chez les patients asthmatiques; bien que les données actuelles ne permettent pas d'établir si cette association est causale, ces deux phénomènes pourraient être liés par la présence d'inflammation systémique qui peut moduler les circuits neuronaux (194).

Cependant, l'association entre la neutrophilie et la sévérité de la condition n'est pas supportée par tous (195), une incongruité possiblement liée au fait que le seuil de neutrophilie pulmonaire considéré anormal n'est pas clairement établi. Par exemple, dans une étude où la définition de neutrophilie pulmonaire était basée sur la valeur du 95% percentile du groupe contrôle (soit $\geq 73.6\%$ dans les expectorations), il n'y avait pas de différence dans le nombre de patients neutrophiliques entre les forme sévère et légère-moderée (108). Similairement, d'autres rapportent qu'il y a davantage d'éosinophiles et de neutrophiles dans la paroi bronchique de patients asthmatiques légers-moderés par rapport aux contrôles (196), mais pas de différence entre les phénotypes léger-moderé et sévère (195, 196). D'autres n'ont pas observé de différence dans la quantification de neutrophiles dans la sous-muqueuse de patients asthmatiques légers ou sévères par rapport aux contrôles (57).

Fonction pulmonaire et neutrophilie

Le VEMS est diminué chez les patients asthmatiques neutrophiliques par rapport au phénotype éosinophilique (154). Une corrélation négative entre le VEMS et le degré d'inflammation neutrophilique chez les asthmatiques est fréquemment rapportée (53, 124, 149, 191, 197), une relation qui n'existe pas chez les individus sains (150). Le ratio VEMS/capacité vitale forcée (ou coefficient de Tiffeneau) est aussi davantage altéré dans le phénotype neutrophilique (118, 197, 198). Dans l'asthme occupationnel, la réduction du VEMS à la suite d'un test de bronchoprovocation inhalé spécifique est corrélée au degré d'augmentation de l'inflammation neutrophilique (180). Néanmoins, cette accentuation de l'obstruction respiratoire dans le phénotype neutrophilique n'est pas unanime (199). Par exemple, dans une étude enrichie en patients asthmatiques sévères, le VEMS est plutôt positivement corrélé à la quantification de neutrophiles dans la sous-muqueuse bronchique (153), et de façon similaire, la proportion de neutrophiles intraépithéliaux est associée positivement avec le VEMS chez les enfants (167). Ces résultats apparemment contradictoires suggèrent que les neutrophiles tissulaires et intraluminaux jouent possiblement un rôle distinct dans la maladie.

La neutrophilie dans les expectorations est aussi positivement corrélée au degré d'hyperinflation (124) et est associée à une élévation de la capacité résiduelle fonctionnelle, indiquant une réserve inspiratoire diminuée (114). La neutrophilie est aussi associée à une dysfonction des petites voies respiratoires (8) et elle est plus marquée chez les patients avec une réversibilité incomplète de l'obstruction bronchique (29, 187). Au contraire, chez les enfants asthmatiques sévères, il n'y a pas de différence dans la quantification de neutrophiles intraépithéliaux des bronches centrales entre les patients ayant une obstruction permanente, ou réversible (200).

L'inflammation mixte éosinophilique et neutrophilique semble synergique puisqu'elle est liée à une détérioration plus marquée de la fonction pulmonaire (114, 120), à une obstruction fixe permanente (201), et à plus de visites en urgence chez les asthmatiques sévères (120).

Réponse au traitement et neutrophilie

Contrairement à l'asthme éosinophilique, l'asthme non éosinophilique et/ou neutrophilique répond moins bien aux CSI (10, 199) et aux GC oraux (111). Chez les enfants asthmatiques sévères

résistants aux GC oraux, ceux ayant des symptômes persistants ont davantage de neutrophiles et d'éosinophiles intraépithéliaux que les enfants moins symptomatiques (202). Le contraire a toutefois été observé dans une autre étude; bien que les neutrophiles intraépithéliaux étaient plus élevés chez les enfants asthmatiques que chez les contrôles, ceux affectés par le phénotype neutrophilique avaient un meilleur score clinique et nécessitaient de plus faibles doses de CSI (167), soulignant une fois de plus la controverse sur les impacts de la neutrophilie dans l'asthme.

Exacerbations et neutrophilie

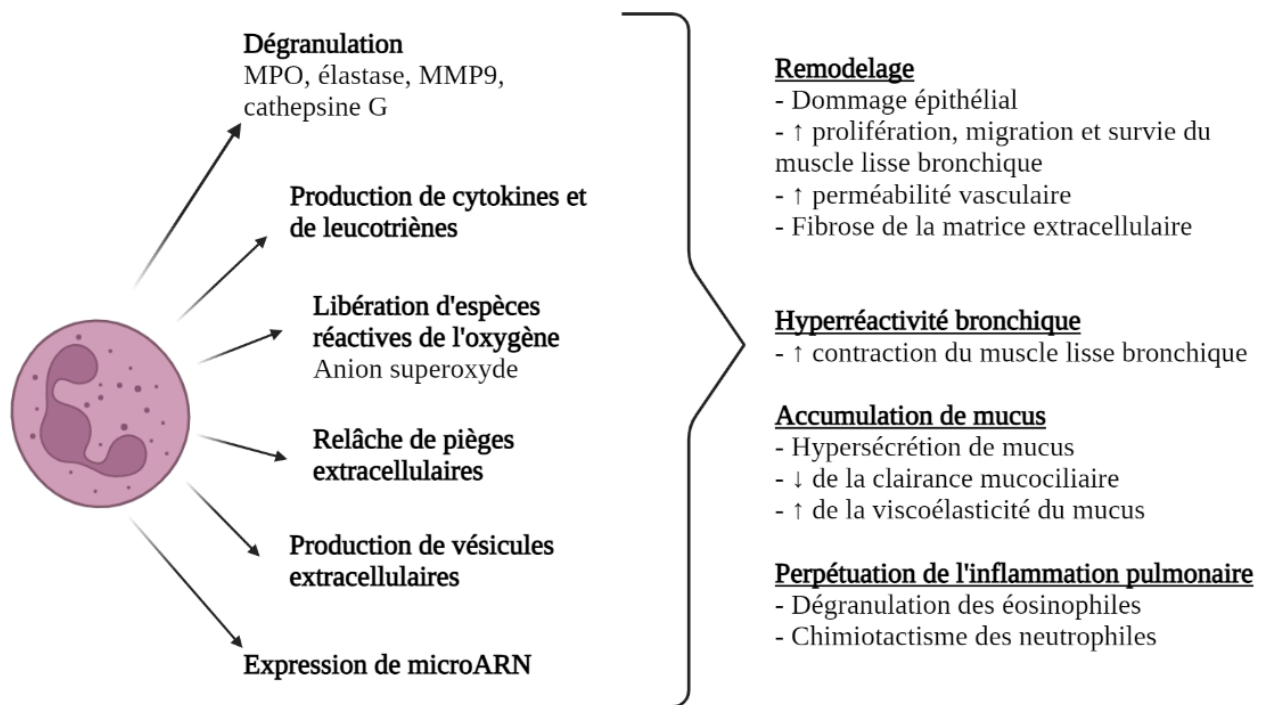
Le lien entre neutrophilie et exacerbations a été établi il y a plus de deux décennies (203). La survenue d'une exacerbation suite au retrait des CSI est précédée par une augmentation des neutrophiles et du CXCL8 dans les expectorations (185). Similairement, une augmentation du CXCL8 dans les expectorations précède une rechute clinique chez les patients traités pour une exacerbation asthmatique (204). Le nombre d'hospitalisations aux soins intensifs est plus important chez les patients neutrophiliques (111) et il y a beaucoup plus de neutrophiles et d'élastase dans les sécrétions respiratoires de patients asthmatiques intubés pour une crise d'asthme aiguë que chez des individus intubés pour une autre raison, ou chez les asthmatiques légers (188, 205).

Mortalité

Une infiltration bronchique neutrophilique est décrite lors d'asthme fatal, particulièrement lors d'attaque aiguë fulgurante (7, 36, 206), bien que ceci ne soit pas toujours observé (35, 37). La neutrophilie est plus marquée au sein de la paroi bronchique dans l'asthme fatal par rapport à l'asthme non fatal (207). D'autres ont plutôt rapporté qu'il y aurait davantage de neutrophiles uniquement dans le parenchyme péribronchiolaire dans l'asthme fatal (177).

Neutrophiles et dommage tissulaire dans l'asthme

Les études relatées précédemment décrivent des associations parfois controversées entre la neutrophilie et les issues négatives et il demeure incertain si la présence de neutrophiles est causale ou non. La prochaine section a pour objectif de décrire comment les neutrophiles pourraient contribuer au dommage tissulaire, et donc aux conséquences cliniques dans l'asthme (Figure 1, p.48). Bien qu'il ait été anecdotiquement rapporté que la réponse immunologique innée des neutrophiles sanguins et respiratoires était plus faible chez les patients asthmatiques (208), la majorité des études indiquent plutôt un degré d'activation plus élevé (193, 209), et une réponse chimiotactique augmentée (210).



Created in **BioRender.com** **bio**

Figure 1. – Résumé schématisé des médiateurs neutrophiliques impliqués dans l'asthme et leurs conséquences potentielles. ARN : acides ribonucléiques; MMP9 : métalloprotéinase 9;

MPO : myéloperoxidase.

Cytokines inflammatoires

L'asthme neutrophilique est associé à une augmentation de l'expression de plusieurs cytokines, ce qui pourrait participer à la sévérité de la maladie et au remodelage bronchique. Effectivement, les expectorations de patients neutrophiliques de toute sévérité contiennent davantage de cytokines inflammatoires (dont l'IL-1 β , l'IL-6, le CXCL8, l'IL-12, l'IL-17A et le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) (123).

Particulièrement, la concentration de CXCL8 est plus élevée dans les expectorations de patients asthmatiques neutrophiliques (4, 117, 118, 211), particulièrement dans le phénotype sévère (29). Le CXCL8 est une chimiokine puissante pour le neutrophile et elle est produite entre autres par les cellules épithéliales, le muscle lisse bronchique (MLB), les monocytes et les neutrophiles eux-mêmes. Ceci pourrait engendrer un cercle vicieux de chimiotactisme puisque la production de CXCL8 par les neutrophiles sanguins est accentuée chez les asthmatiques neutrophiliques (212). Néanmoins, d'autres ont observé le contraire, soit que les neutrophiles pulmonaires de patients asthmatiques produiraient moins de CXCL8, une trouvaille toutefois possiblement biaisée par la prise de CSI dans cette étude (208). Nonobstant cette incongruence, il existe bien une corrélation entre la neutrophilie et le CXCL8 dans les expectorations (4, 52, 127, 182, 185, 211) et les sécrétions trachéales de patients asthmatiques intubés (188, 205). Au niveau tissulaire, l'immunoréactivité pour le CXCL8 dans l'épithélium et la sous-muqueuse des bronches centrales est plus importante chez les asthmatiques sévères que chez les modérés (191). Le CXCL8 dans l'asthme neutrophilique représente une cible thérapeutique potentielle puisque cette cytokine pourrait participer à la sévérité de la maladie par ses effets sur le remodelage, incluant une diminution de l'apoptose et une augmentation de la prolifération du MLB (213).

Plusieurs autres cytokines sont associées conjointement à la sévérité de la maladie et à la présence d'inflammation neutrophilique. Par exemple, les cytokines types de l'immunité innée, l'IL-1 β (154, 211), l'IL-6 (154, 211) et le TNF- α (123), sont tous augmentées dans le phénotype neutrophilique. L'IL-1 β , particulièrement associée à l'asthme sévère (108, 214, 215), est activée par la caspase-1 au sein des inflammasomes, dont le NLRP3. Ainsi, la neutrophilie dans les expectorations d'asthmatiques est corrélée à l'expression de l'IL-1 β (52, 211, 215) et du NLRP3

(108, 215), qui sont à leur tour corrélés à une fonction pulmonaire altérée (215). Le facteur de croissance transformant β (TGF- β) pourrait aussi être impliqué dans le lien entre la neutrophilie et la sévérité de la maladie. Effectivement, la quantité de neutrophiles contenue dans la sous-muqueuse est corrélée à l'immunomarquage pour le TGF- β chez les asthmatiques (153), une cytokine profibrotique associée à la prolifération du MLB (216).

La réponse T17 possède aussi un rôle indirect important dans l'activation des neutrophiles, entre autres en stimulant la sécrétion de la chimiokine CXCL8 (217). Incidemment, la neutrophilie dans le LBA des patients asthmatiques est corrélée à l'IL-17 (218). Dans la circulation sanguine, les asthmatiques ont davantage de lymphocytes Th-17 (219, 220), et ce de façon plus marquée dans la forme sévère (220), et chez les femmes (219). Similairement, davantage de cellules immunoréactives pour l'IL-17 se retrouvent dans les tissus d'asthmatiques sévères (221, 222). La relation entre la sévérité et la réponse T17 pourrait être liée au remodelage bronchique puisque les cytokines T17 augmentent la prolifération et la migration, et réduisent l'apoptose des cellules musculaires lisses bronchiques (223, 224).

Finalement, les neutrophiles peuvent relâcher des leucotriènes, dont la leucotriène B₄ qui est elle-même chimiotactique pour les neutrophiles, et qui peut potentialiser la contraction du MLB (225). Enfin, le surnageant de culture de neutrophiles activés augmente la contractilité d'anneaux bronchiques stimulés (226, 227), un effet médié en partie par les leucotriènes D₄ (227).

Granules neutrophiliques

Les granules neutrophiliques sont essentielles à la défense contre les micro-organismes, mais possèdent un potentiel élevé de causer des dommages à l'hôte. La quantité de MPO au niveau pulmonaire est plus élevée chez les asthmatiques que chez les individus sains et est corrélée à la neutrophilie dans les expectorations (4, 127), bien que ce ne soit pas toujours le cas (201). La concentration de MPO est plus élevée chez les patients affectés par la forme sévère de la maladie (127), bien que ceci ne soit encore une fois pas corroboré par tous (190). Une corrélation entre la quantité de MPO dans les expectorations et la variabilité du débit expiratoire de pointe chez les asthmatiques est rapportée (127). Les résultats discordants concernant la MPO pourraient être

causés par une définition variable du phénotype sévère, et des diverses techniques de mesure de cette enzyme dans les études rapportées.

Une autre protéine contenue dans les granules primaires, l'élastase, est augmentée dans les expectorations de patients asthmatiques (162), particulièrement dans le phénotype neutrophilique (117, 118). Le niveau d'élastase dans les expectorations corrèle positivement avec la neutrophilie, et négativement avec le VEMS (162), mais pas dans toutes les études (195). Elle est aussi élevée dans les sécrétions respiratoires de patients intubés pour une crise d'asthme (188, 205). L'élastase pourrait avoir des implications sur la perpétuation du milieu inflammatoire puisqu'elle possède la capacité de causer la dégranulation des éosinophiles (228). De plus, l'élastase neutrophilique est parfois directement localisée au site de dommages épithéliaux dans l'asthme fatal (36). Cette protéine n'est pas seulement augmentée dans les sécrétions respiratoires, mais aussi dans le plasma de patients asthmatiques neutrophiliques (229). Ce faisant, l'élastase pourrait atteindre le MLB et contribuer au remodelage pulmonaire étant donné sa capacité à accentuer la prolifération des cellules musculaires lisses (230). De plus, l'élastase augmente la sécrétion de mucus par les cellules épithéliales bronchiques (231).

La MMP-9, une protéine retrouvée dans les granules tertiaires, est présente en quantité importante dans les expectorations d'individus souffrant d'asthme instable (126). Chez les enfants asthmatiques sévères, la MMP-9 corrèle avec la neutrophilie pulmonaire (168), mais ceci n'a pas été confirmé chez les adultes asthmatiques sévères (201). Notamment, la MMP-9 est impliquée dans la prolifération du MLB (232) et dans la fibrose de la membrane basale (233).

Parmi les autres protéines contenues dans les granules de neutrophiles, l'expression génique des α -défensines et de la cathepsine G est augmentée dans les leucocytes sanguins provenant de patients asthmatiques neutrophiliques (229). Toute comme l'élastase, la cathepsine G peut initier la dégranulation des éosinophiles (228).

Espèces réactives de l'oxygène

Les neutrophiles périphériques stimulés provenant de patients asthmatiques relâchent davantage d'espèces réactives de l'oxygène que ceux des individus sains (234, 235), et ce de façon plus marquée lorsque la maladie est instable (234, 236, 237). La production d'anion superoxyde

par les neutrophiles périphériques stimulés est aussi associée à une plus grande altération de la fonction respiratoire et à une hyperréactivité bronchique chez les asthmatiques (234, 235). Les espèces réactives de l'oxygène seraient impliquées dans l'hypersécrétion de mucus, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'hyperréactivité bronchique (238).

Pièges extracellulaires des neutrophiles

Les neutrophiles ont la capacité de relâcher des NETs contenant des enzymes protéolytiques (protéases, élastase, MPO), de l'histone et de l'ADN. Ces NETS sont essentiels à l'immunité innée puisqu'ils trappent et détruisent les bactéries extracellulaires, mais ils peuvent aussi engendrer du dommage tissulaire. Effectivement, les NETs augmentent la mort cellulaire des cellules endothéliales et épithéliales respiratoires *in vitro* (140).

Il y a davantage de NETs dans les expectorations d'asthmatiques que chez les individus sains (198). De plus, la quantité d'ADN extracellulaire (marqueur de NETs) dans les expectorations est corrélée à la neutrophilie (198, 214, 218) et les patients avec une concentration élevée d'ADN extracellulaire ont davantage d'issues cliniques négatives (asthme non contrôlé, cortico-dépendance, exacerbations fréquentes, hypersécrétion de mucus) (198, 214). Les NETs sont aussi retrouvés dans la paroi bronchique de patients asthmatiques, mais pas chez les individus sains (170). Ceci pourrait participer à la création du micromilieu inflammatoire et profibrotique puisque la co-incubation de NETs et de cellules épithéliales engendre la production de cytokines inflammatoires (CXCL8, IL-6) (214). Finalement, lorsque les neutrophiles relâchent des NETs, ils peuvent devenir des cytoplastes, des corps énucléés qui conservent certaines fonctions cellulaires, incluant la phagocytose (218). La neutrophilie pulmonaire est corrélée à la quantité de cytoplastes chez les asthmatiques, et ces derniers pourraient contribuer au chimiotactisme des neutrophiles en favorisant une réponse de type T17 (218). Enfin, les NETs pourraient participer à l'obstruction bronchique en augmentant la viscoélasticité du mucus (239).

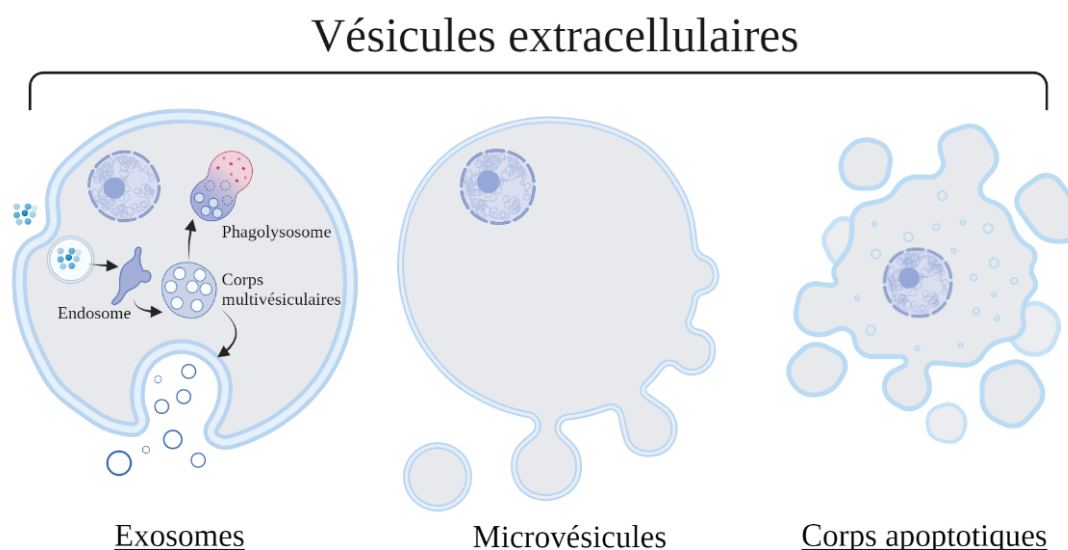
MicroARN

Les microARN sont de simples brins d'ARN non codants impliqués dans la sous-régulation post-transcriptionnelle des gènes, mais leur rôle dans l'asthme neutrophilique a été peu étudié jusqu'à présent. Par exemple, le microARN-199a-5p, spécifiquement relâché par les neutrophiles, est

surexprimé dans le plasma et les expectorations de patients atteints d'asthme neutrophilique et son expression est négativement corrélée avec le VEMS (240). Cette accentuation de l'obstruction bronchique pourrait être liée à des changements architecturaux du MLB puisque la transfection de cellules musculaires lisses humaines avec le microARN-199a-5p augmente l'expression de protéines contractiles (240). Dans l'asthme sévère, les microARN-223-3p et microARN-142-3p, exprimés par les neutrophiles, sont associés à l'obstruction respiratoire (52).

Vésicules extracellulaires

Les VEs sont des nanoparticules produites par tous les types cellulaires et qui peuvent circuler via les liquides biologiques et les tissus pour atteindre leur cible. Les VEs sont séparées en trois catégories selon leur taille et leur origine cellulaire (Figure 2, p.53). Les exosomes sont les plus petites vésicules ($\approx 30-150$ nm) et ils proviennent de la fusion de corps multivésiculaires (endosomes) avec la membrane cellulaire. Les microvésicules (ou ectosomes) mesurent de $\approx 100-1000$ nm et proviennent d'une extravasation (bourgeonnement) de la membrane cellulaire. Finalement, les corps apoptotiques (généralement > 1000 nm) sont relâchés lors de l'apoptose cellulaire (241, 242).



Created in [BioRender.com](https://www.biorender.com) 

Figure 2. – Les types de vésicules extracellulaires.

Bien qu'il ait été initialement postulé que la relâche de vésicules était un moyen de se débarrasser de déchets intracellulaires, il est maintenant établi qu'elles participent à plusieurs activités biologiques importantes, dont la coagulation et la communication intercellulaire (242). Les interactions intercellulaires se produisent grâce au transport d'un cargo vésiculaire enrichi en protéines, ARN, ADN, lipides et mitochondries, et qui peut être internalisé par les cellules cibles locales ou distantes. La présentation d'antigènes par le portage de complexe d'histocompatibilité majeur, le transfert d'ARN ou de récepteurs de surface font partie des activités biologiques connues des VEs. Cette voie de communication intercellulaire peut mener à diverses réponses physiologiques ou pathologiques, dont la production de cytokines pro ou anti-inflammatoires et la différenciation et la prolifération cellulaire (242). L'utilisation des VEs comme cargo thérapeutique est aussi prometteuse. Par exemple, des données dérivées de modèles animaux suggèrent que les VEs provenant de cellules souches pourraient diminuer l'inflammation pulmonaire et favoriser la guérison cellulaire (243).

Vésicules extracellulaires et asthme

Les études concernant les VEs dans l'asthme sont encore peu nombreuses et assez hétérogènes. Les VEs pourraient éventuellement servir de biomarqueurs chez les asthmatiques, puisqu'elles sont détectées dans le plasma (244) et dans différents fluides respiratoires, incluant le condensat d'air expiré (245), les expectorations (245), les lavages nasaux (246) et les LBA (247-250). Les microvésicules dérivées de plaquettes sont présentes en quantité augmentée en circulation dans l'asthme (251) et il y a aussi davantage d'exosomes dans les LBA de patients asthmatiques (250). Les microARN provenant d'exosomes de LBA d'asthmatiques légers (252) et sévères (248) diffèrent de ceux d'individus sains. D'autres microARN retrouvés dans les VEs (hsa-miR-224-5p, hsa-miR-581, hsa-miR-151a-5p et hsa-miR-9-5p) sont négativement corrélés avec la neutrophilie pulmonaire dans l'asthme sévère (248). De plus, des études fonctionnelles ont démontré que les VEs isolées du LBA de patients asthmatiques ont un effet inflammatoire en favorisant la sécrétion de CXCL8 et de leucotriènes par des cellules épithéliales en culture (249). Finalement, les VEs de neutrophiles stimulés au LPS augmentent la prolifération, la migration et la viabilité du MLB (253). Les rôles relativement inexplorés des VEs dans l'asthme ont justifié l'élaboration dans ce projet doctoral d'une étude où le contenu protéique et l'effet prolifératif des VEs neutrophiliques ont

été investigués (article 5 - *Neutrophil extracellular vesicles and airway smooth muscle proliferation in the natural model of severe asthma in horses*, p.247).

Ouverture

Clarifier le rôle des neutrophiles dans l'asthme pourrait permettre d'ajuster les stratégies thérapeutiques et de favoriser le développement de la médecine personnalisée. Ainsi, déterminer comment les neutrophiles contribuent au remodelage bronchique, notamment à la modification de la biologie du muscle lisse, est particulièrement important. Puisque cette cellule est indispensable à la survie, le contrôle de l'inflammation et de l'activation neutrophiliques constitue néanmoins un défi thérapeutique qui sera abordé au dernier chapitre de cette recension des écrits.

Remodelage bronchique dans l'asthme

L'obstruction respiratoire dans l'asthme est variable dans le temps et est généralement réversible. Toutefois, elle peut devenir permanente et fixe dans certains cas, une conséquence présumée des multiples changements structuraux des parois bronchiques, nommés collectivement le remodelage (Figure 3, p.56). Bien que le remodelage soit souvent jugé irréversible, ou seulement partiellement réversible, il s'agit d'un processus actif même dans l'asthme chronique (254), signifiant qu'il pourrait constituer une cible thérapeutique dans la maladie. Puisque le MLB est le principal effecteur de l'obstruction et de l'hyperréactivité bronchique (255), ses altérations structurelles constitueront l'emphase de ce chapitre.

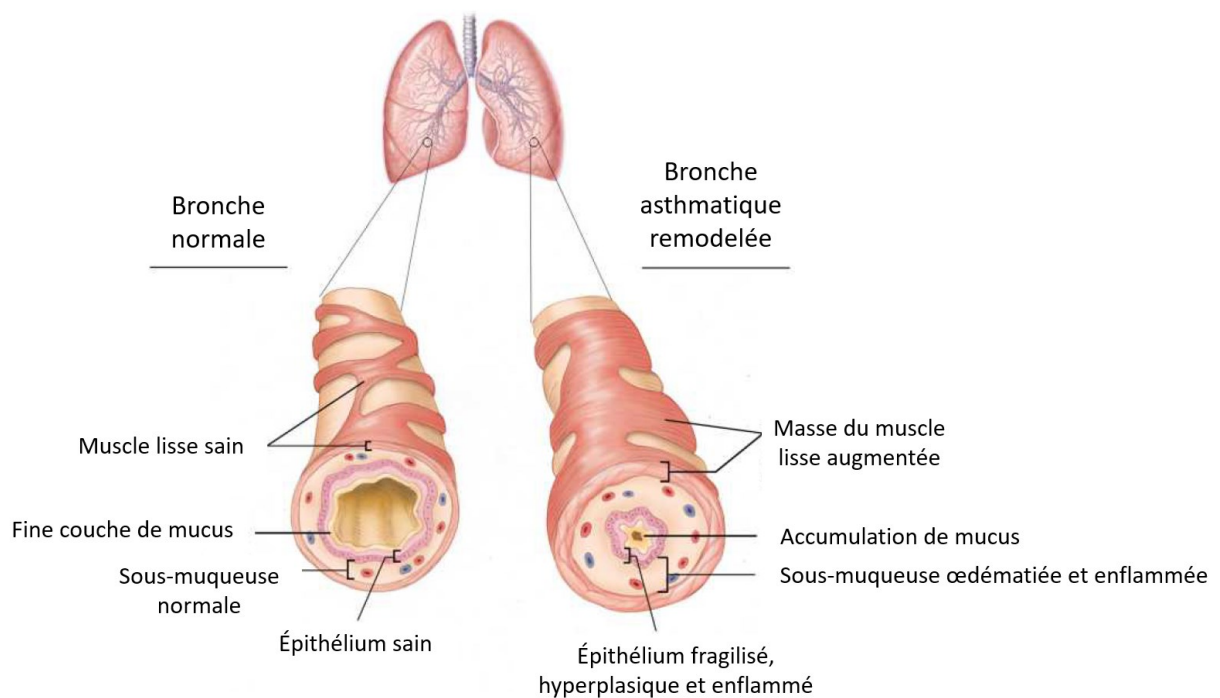


Figure 3. – Schéma résumant les principaux changements du remodelage bronchique dans l'asthme.

Adapté de *Journal of Asthma and Allergy*, 2021; 14 : 539-556. Publié originalement et utilisé avec la permission de *Dove Medical Press Ltd*.

Description et rôles du muscle lisse bronchique

La cellule musculaire lisse est fusiforme, possède un seul noyau allongé (256, 257) et mesure environ 70 μm en état de relaxation (258). Le muscle est présent transversalement et entoure hélicoïdalement les voies respiratoires, de la trachée jusqu'aux bronchioles terminales (259, 260). Distalement, le volume absolu du muscle lisse est plus faible que dans les bronches centrales (261, 262), mais il est proportionnellement plus élevé par rapport à l'aire des voies respiratoires (256). La masse du MLB entourant des bronches de même taille peut varier remarquablement chez les individus sains (260). Bien qu'il soit composé majoritairement de fibres musculaires, le MLB sain comporte aussi des vaisseaux sanguins, des terminaisons nerveuses, de la matrice extracellulaire et parfois des cellules inflammatoires, particulièrement des mastocytes (263, 264).

Les rôles physiologiques du MLB sont sujets à controverse. L'origine embryologique commune du poumon et du système digestif expliquerait sa présence au niveau des voies respiratoires. Le MLB est parfois désigné péjorativement « d'appendice du poumon » puisqu'il est largement considéré comme un organe vestigial qui a plus d'effets délétères que bénéfiques sur la santé (265). Certains lui attribuent tout de même quelques fonctions physiologiques utiles telles que la croissance du poumon lors de l'embryogenèse (266), la régulation du débit expiratoire favorisant les échanges gazeux (267), la protection des voies respiratoires distales contre l'inhalation de gaz ou de particules nocives (268) et l'accentuation de l'efficacité de la toux et de l'expulsion du mucus.

Dans l'asthme, ce sont plutôt les conséquences néfastes du MLB qui sont évidentes. Effectivement, le bronchospasme est un acteur majeur des crises asthmatiques, notamment lors d'épisode fatal, et il explique la place importante des relaxants musculaires (antagonistes muscariniques ou agonistes β 2-adrénergiques) dans la gestion thérapeutique de la maladie. La plasticité du MLB affecte sa structure, mais aussi ses fonctions, incluant une altération de ses propriétés synthétiques et contractiles. Ces modifications peuvent avoir des conséquences cliniques dans l'asthme; l'élévation de sa contractilité accentuant le bronchospasme, l'augmentation de sa masse détériorant l'obstruction respiratoire et le développement d'un phénotype sécréteur perpétuant l'inflammation bronchique (269).

Remodelage du muscle lisse bronchique dans l'asthme

De nombreuses études ont démontré une augmentation de la masse de MLB chez les asthmatiques (3, 37, 38, 207, 254, 257, 262, 270-276), dans une proportion de trois à cinq fois plus élevée par rapport aux individus sains (38, 261, 262). Cette augmentation se produit dans les bronches de toute taille, mais elle affecte particulièrement celles de taille moyenne, et elle est plus marquée chez les patients asthmatiques sévères (196, 260, 274) et dans l'asthme fatal (275). L'expansion du MLB se ferait uniquement en direction radiale dans l'asthme (277).

L'hyperplasie et l'hypertrophie musculaires sont principalement incriminées dans l'augmentation de la masse du MLB (278), mais les données sont contradictoires concernant l'importance relative de ces deux processus. L'identification des causes prépondérantes de l'augmentation de la masse du MLB est pourtant essentielle à l'établissement de thérapies ciblées.

Hyperplasie

L'hyperplasie du MLB (augmentation de la prolifération ou du nombre de cellules) est fréquemment rapportée chez les asthmatiques (261, 262, 279, 280), bien que pas toujours (196, 207, 277). Cette prolifération est plus marquée dans la forme sévère chez les adultes (254) et chez les enfants (281), ainsi que dans l'asthme fatal (273). De plus, le muscle lisse provenant de sujets asthmatiques prolifère davantage en culture que celui prélevé chez des individus sains (282, 283), et ce de façon plus importante dans l'asthme sévère (284). Ceci pourrait être lié, entre autres, à une expression plus importante de la protéine *Abelson interactor 1* dans le MLB asthmatique, une molécule impliquée dans la prolifération (285), la migration (286) et la contraction des myocytes (287). Les voies de signalisation impliquées dans l'hyperplasie des cellules musculaires lisses incluent les protéines kinase activées par les mitogènes (MAPK) (incluant les protéines kinase régulées par un signal extracellulaire (ERK) (232), Jun amino terminal (JNKs) et p38s), les protéines kinase phosphatidylinositol 3 (283) et les protéines kinase C (232, 288).

Hypertrophie

Une augmentation de la taille des cellules musculaires lisses (hypertrophie) dans l'asthme est aussi fréquemment rapportée (196, 257, 273, 280, 281), bien que ce ne soit pas consensuel (279).

Celle-ci affecte particulièrement les grosses voies respiratoires (> 10 mm (273), > 6 mm (289)). Tout comme pour l'hyperplasie, l'hypertrophie est plus importante chez les patients atteints de la forme sévère (196). Dans l'asthme fatal, la taille des cellules musculaires lisses peut même être deux fois plus grande que chez les contrôles (256), bien que d'autres n'aient pas observé une telle différence (273). L'hypertrophie musculaire est aussi rapportée dans l'asthme pédiatrique (281). Les voies de signalisation associées à ce processus incluent les protéines kinase phosphatidylinositol 3, les kinase-3 β glycogène synthase, les Rho kinases et possiblement les protéines kinase C (288). Lorsque l'hypertrophie et l'hyperplasie sont présentes de façon conjointe, c'est généralement l'hyperplasie qui est le facteur principal de l'augmentation de la masse du MLB (273, 280, 281).

Dépôt de matrice dans le muscle

La contribution du dépôt de matrice extracellulaire dans l'augmentation de la masse du MLB est controversée. Tandis que l'aire de la matrice extracellulaire au sein du muscle lisse était augmentée dans l'asthme fatal dans une étude (38), ceci est contredit par d'autres auteurs (196, 273, 289). Le volume absolu de matrice extracellulaire s'accroît proportionnellement à l'augmentation de la masse du MLB, mais sa proportion relative au muscle lisse serait même réduite dans les grosses voies respiratoires dans l'asthme fatal (273).

Autres changements pouvant mener à l'augmentation de la masse du MLB

Bien qu'il n'y ait pas d'évidence définitive *in vivo* que la migration des cellules musculaires lisses participe à l'augmentation de la masse du MLB, la contribution de la migration de cellules environnantes ou de cellules progénitrices provenant de la circulation est plausible (290). Effectivement, les cellules musculaires lisses peuvent migrer en réponse à des stimuli inflammatoires (291), dont l'IL-17 (224) et le CXCL8 (292). Ces cytokines peuvent être sécrétées par l'épithélium exposé aux allergènes et ceci pourrait expliquer la distance diminuée entre l'épithélium et le MLB parfois observée dans l'asthme sévère (196, 293).

Les fibroblastes résidants dans la paroi bronchique peuvent transitionner vers le myofibroblaste (un type cellulaire comportant plusieurs similitudes fonctionnelles avec les cellules musculaires lisses) en réponse à différents stimuli, dont le TGF- β (294). Finalement, une diminution de

l'apoptose des cellules musculaires lisses pourrait aussi contribuer à l'augmentation de la masse du MLB dans l'asthme, mais ceci n'a pas été confirmé jusqu'à présent (277).

Variation de la contractilité du muscle lisse bronchique

Une augmentation de la force contractile du MLB dans l'asthme est communément rapportée (258, 295). Le muscle lisse provenant de trachée asthmatique aurait une contractilité maximale plus élevée et une capacité de relaxation plus faible en réponse aux agonistes β 2-adrénergiques par rapport aux contrôles (296). D'autres ont plutôt observé que l'hyperréactivité serait limitée aux voies périphériques, là où on retrouve le micromilieu inflammatoire, puisque le muscle lisse n'est pas hypercontractile, et serait même hypocontractile au niveau de la trachée et des bronches principales (297, 298). De façon similaire, les bronches provenant de patients asthmatiques légers à modérés seraient hyporéactives au carbachol et à l'histamine (299). Les contradictions dans les études de contractilité sont vraisemblablement dues à l'inclusion de patients asthmatiques de sévérités variées (et recevant ou non des traitements) et des différences méthodologiques (le retrait ou non de l'épithélium, l'utilisation de muscle lisse trachéal ou bronchique et le type d'agoniste utilisé).

L'expression de la chaîne légère de la myosine, une molécule clé de la contraction musculaire, est plus élevée dans le MLB asthmatique, et ceci est plus marqué dans l'asthme sévère (196). Le protéome du muscle lisse intrapulmonaire asthmatique est distinct de celui des sujets contrôles, avec une surrégulation de protéines structurelles impliquées dans la contraction musculaire (298). Au contraire, d'autres n'ont pas observé de différence dans l'expression génique de différentes protéines contractiles et structurelles du MLB microdisséqué au laser dans l'asthme (279). De plus, l'expression génique du MLB provenant d'individus sains et asthmatiques n'est pas différente, et la réponse au GC très similaire dans une autre étude (300).

La bronchoconstriction pourrait aussi être affectée par la disposition du MLB autour des voies respiratoires (plus de force de contraction s'il est disposé circulairement et moins hélicoïdalement autour des bronches), mais cette hypothèse n'est pas avérée puisque l'angle des faisceaux musculaires n'est pas différent chez les asthmatiques (277).

Phénotype inflammatoire/sécrétoire du muscle lisse

Par la sécrétion de cytokines, le MLB pourrait contribuer à perpétuer l'inflammation pulmonaire, incluant la stimulation et le chimiotactisme des neutrophiles. Par exemple, les cellules musculaires lisses produisent la chimiokine CXCL8 lorsqu'elles sont stimulées par des molécules inflammatoires (dont l'IL-1 β et le TNF- α) (301), une sécrétion qui est inhibée par les cytokines de type T2 (IL-4, IL-13). Dans l'asthme sévère, l'expression du CXCL8 par les cellules musculaires lisses est accentuée (293) et les myofibroblastes stimulés à l'IL-1 α produisent aussi davantage de CXCL8 et de GM-FSC chez les asthmatiques par rapport aux contrôles (274). En plus des cytokines, le MLB peut sécréter diverses protéines pouvant contribuer au remodelage. Par exemple, la collagénase MMP-1 est retrouvée en quantité augmentée dans le surnageant de culture de muscle lisse asthmatique, ainsi que dans les lavages bronchiques de patients asthmatiques (302). La MMP-1 est aussi exprimée davantage au sein du MLB asthmatique *in vivo* et elle induit sa contraction *in vitro* (303). Le microenvironnement inflammatoire inhérent à la maladie pourrait contribuer à la sécrétion de protéines de la matrice extracellulaire; par exemple, les éosinophiles augmentent la production par les cellules musculaires lisses de collagène et de fibronectine (304). Les cellules musculaires lisses asthmatiques stimulées produisent aussi plus de facteurs de croissance comparativement aux contrôles (305). Finalement, les myocytes provenant de patients asthmatiques expriment davantage de TGF- β 1, une cytokine qui a un effet mitogène sur le MLB, et qui pourrait donc agir de façon autocrine (216).

Origines du remodelage du muscle lisse bronchique

En l'absence d'une compréhension exacte des causes du remodelage du MLB, une des hypothèses énoncées est que l'inflammation chronique serait responsable, du moins en partie, de plusieurs lésions structurelles. Toutefois, les évidences qui lient ces deux phénomènes sont indirectes et ne permettent pas d'établir un lien de causalité clair (306). Le fait que les biopsies soient souvent effectuées sur des patients avec une symptomatologie sévère et qui reçoivent des traitements anti-inflammatoires complexifie la compréhension de l'interaction entre l'inflammation et le remodelage.

L'inflammation comme effecteur du remodelage

Parmi les évidences indirectes qui lient l'inflammation et le remodelage, l'association entre l'augmentation de la masse du MLB et la durée de la maladie (273) ou l'âge (38) suggère une progression des lésions qui pourrait être consécutive à de l'inflammation persistante. En effet, le MLB est apte à répondre à différents stimuli inflammatoires puisqu'il possède des récepteurs fonctionnels pour de nombreuses cytokines, dont le CCR1 (307) et le CCR3, et ils sont plus nombreux dans l'asthme (291). Le MLB exprime aussi les récepteurs pour le CXCL8 (CXCR1 et CXCR2) (308). Cette chimiokine pourrait contribuer au remodelage dans le phénotype neutrophilique puisqu'elle induit la prolifération et réduit l'apoptose des cellules musculaires lisses bronchiques (213). Les myocytes expriment aussi des récepteurs pour les cytokines de type T17 (IL-17-A, IL-17F, IL-22) (224). Ces dernières accroissent la prolifération, réduisent l'apoptose (223) et augmentent la migration des cellules musculaires lisses saines et asthmatiques (224). D'ailleurs, une immunoréactivité pour l'IL-17A (221) et le CXCL8 (191) est bien observée dans le MLB asthmatique. Tel que discuté dans le chapitre précédent, de nombreux médiateurs neutrophiliques pourraient contribuer au remodelage du MLB, incluant les protéines granulaires (particulièrement l'élastase neutrophilique (230)) et les vésicules extracellulaires (253). Toutefois, il existe peu d'évidence directe liant l'inflammation neutrophilique à l'augmentation de la masse du MLB. Effectivement, contrairement à d'autres cellules inflammatoires colocalisées au sein du MLB, comme les mastocytes (199, 257, 309, 310) et les lymphocytes (257, 310), les granulocytes, particulièrement les neutrophiles, y sont rarement observés (257). De plus, la neutrophilie dans la paroi bronchique des petites voies respiratoires est associée à une augmentation de la masse du MLB uniquement dans les grosses voies respiratoires (280), ce qui est difficilement explicable biologiquement. Finalement, la densité des neutrophiles dans la sous-muqueuse est corrélée à la prolifération du muscle lisse chez les individus contrôles, mais pas chez les asthmatiques (207).

L'inflammation granulocytaire mixte induit potentiellement des lésions structurelles plus sévères. Effectivement, une obstruction permanente chronique des voies respiratoires chez les asthmatiques sévères a été associée à une augmentation de la masse du MLB et à une inflammation mixte éosinophilique et neutrophilique (201). De façon similaire, l'hyperplasie et l'hypertrophie du MLB dans les grosses bronches (> 6 mm) sont seulement détectées chez les

patients asthmatiques avec de l'inflammation tissulaire granulocytaire mixte (289). Bien que l'emphase de cette thèse porte sur le phénotype neutrophilique, le rôle de certaines autres cellules inflammatoires est possiblement substantiel. Entre autres, la quantification de mastocytes au sein du MLB est associée à sa prolifération tant chez les individus sains que chez les asthmatiques (302) et l'éosinophilie dans les expectorations est corrélée au pourcentage de l'aire de la paroi bronchique évaluée par tomodensitométrie (311). Dans l'éventualité où l'inflammation ne serait pas la cause primaire du remodelage, il n'en demeure pas moins que les interactions entre le muscle lisse et les médiateurs inflammatoires sont inévitables une fois la maladie développée, et que plusieurs molécules inflammatoires induisent un bronchospasme.

L'inflammation et le remodelage comme deux phénomènes parallèles

Bien que l'inflammation et le remodelage co-existent dans l'asthme, il pourrait s'agir de deux processus parallèles dont l'évolution peut être distincte. Effectivement, le paradigme supposant que le remodelage soit une conséquence de l'inflammation est remis en doute par le fait que l'augmentation de la masse du MLB est présente dans l'asthme infantile, dans une proportion similaire à ce qui est observé chez l'adulte (281). De plus, l'association entre la durée de la maladie et la masse du MLB précédemment mentionnée est controversée puisqu'elle est faible ou absente selon d'autres études (3, 200, 273), suggérant que les changements architecturaux sont déterminés très tôt dans le cours de la maladie. En effet, la masse du MLB chez des enfants en bas âge qui présentent des sifflements récurrents permet de prédire quels individus développeront éventuellement de l'asthme (312). De plus, certains enfants ont des symptômes avant même l'apparition de remodelage ou d'inflammation (313) et des changements épithéliaux peuvent précéder la présence d'inflammation (314). La fonction pulmonaire à un mois de vie permet même de prédire quels individus souffriront d'asthme à l'âge adulte (315), suggérant que des anomalies structurelles puissent survenir très tôt dans la vie ou *in utero*. Effectivement, le fait que des processus affectant le développement des structures respiratoires *in utero* soient rapportés comme des facteurs de risque de l'asthme, comme fumer la cigarette lors de la grossesse (316), supporte que les changements structuraux puissent précéder le développement de l'inflammation. Contrairement au paradigme usuel, il est donc possible que l'inflammation soit une conséquence et non une cause du remodelage. Effectivement, la dysrégulation du processus

de réparation tissulaire pourrait contribuer à la création d'un micromilieu inflammatoire néfaste pour l'organisme (306). De plus, le succès limité des thérapies anti-inflammatoires pour améliorer le remodelage suggère que d'autres facteurs sont en jeu; la bronchoconstriction pourrait elle-même mener à des changements architecturaux. Par exemple, la membrane basale s'épaissit en réponse à des inhalations répétées de méthacholine chez les asthmatiques, en l'absence de changement du niveau d'inflammation (317).

Conséquences du remodelage du muscle lisse bronchique

L'importance du remodelage du MLB est illustrée par son association avec la sévérité de la condition. Effectivement, la masse du MLB est plus élevée dans l'asthme sévère (293), et ce de façon encore plus saillante dans l'asthme fatal (3, 35, 273). À l'inverse, la masse du MLB est normale chez $\approx 40\%$ des asthmatiques, particulièrement dans la forme légère à modérée (280).

L'obstruction bronchique permanente est aussi une conséquence de l'augmentation de la masse du MLB (201, 318). Effectivement, le MLB est plus proéminent chez les patients aux prises avec des symptômes persistants comparativement à ceux démontrant des signes intermittents (196), et chez les enfants asthmatiques sévères ayant une obstruction fixe (200). De plus, l'augmentation de la masse du MLB est associée à un contrôle sous-optimal des signes cliniques chez les enfants asthmatiques sévères (319).

Plusieurs études rapportent une corrélation négative entre le VEMS et la masse du MLB chez les adultes (196, 201, 293, 320) et chez les enfants asthmatiques sévères (200), indiquant une résistance expiratoire accrue. Enfin, les changements phénotypiques du MLB dans l'asthme pourraient intrinsèquement nuire à la réponse clinique puisque la prolifération des cellules musculaires lisses asthmatiques n'est pas atténuée par la dexaméthasone contrairement à celle provenant d'individus sains (284). Tout de même, les GC permettent de diminuer la masse du MLB dans l'asthme et plus la réduction est substantielle, plus la fonction pulmonaire s'améliore (321).

Bien que le remodelage soit généralement considéré comme un phénomène délétère associé à l'obstruction bronchique, certains aspects pourraient être protecteurs. Par exemple, l'épaisseur de la paroi bronchique en tomographie assistée par ordinateur est négativement corrélée à l'hyperréactivité bronchique (les structures impliquées ne sont toutefois pas déterminées par cette technique) (322). Ainsi, certaines facettes du remodelage pourraient prévenir une bronchoconstriction maximale et le collapse des bronches (323), et l'épaississement de la paroi pourrait hypothétiquement diminuer l'absorption d'antigènes par la muqueuse respiratoire (306).

Autres lésions architecturales en rafale

Épithélium

L'épithélium forme une couche continue le long de l'arbre respiratoire, et contient principalement des cellules épithéliales ciliées, des cellules à mucus, des cellules en dôme (anciennement cellules de Clara), des cellules basales et des cellules de l'immunité. Au niveau de la trachée, la muqueuse est constituée d'un épithélium cylindrique cilié comprenant de nombreuses cellules à mucus. La hauteur de l'épithélium devient de plus en plus étroite dans les bronches pour devenir cuboïde dans les bronchioles, puis plate au niveau alvéolaire. Les échanges gazeux se produisent au niveau de l'interface composée de l'épithélium alvéolaire et de l'endothélium, mesurant moins de 0.4 μm . Les pneumocytes de type I permettent les échanges gazeux. Ce sont des cellules terminales dérivées des pneumocytes de type II qui eux assurent le renouvellement de l'épithélium respiratoire et la production de surfactant nécessaire au maintien de la tension de surface qui prévient le collapse alvéolaire (324). L'épithélium est le premier lieu de rencontre entre l'hôte et les allergènes impliqués dans l'asthme, et joue donc vraisemblablement un rôle clé dans la pathophysiologie de la maladie.

La desquamation et la fragilité épithéliales sont fréquemment observées dans l'asthme (37, 196, 257, 272, 325), bien que ces lésions puissent être en partie artéfactuelles (326). L'hyperplasie épithéliale (37, 327), une augmentation de la quantité de cellules à mucus et une infiltration de cellules inflammatoires dans l'épithélium (328) sont caractéristiques de la maladie. L'épithélium est aussi incriminé dans les changements architecturaux affectant les structures sous-jacentes,

incluant le MLB (329). Par exemple, les cellules épithéliales asthmatiques produisent davantage de TGF- β (330), un médiateur important dans la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (331). De plus, les cocultures de cellules épithéliales bronchiques et de cellules musculaires lisses induisent la prolifération de ces dernières, surtout lorsque l'épithélium est endommagé (232).

Membrane basale

La membrane basale sert d'ancrage aux cellules épithéliales et de barrière structurelle avec le tissu conjonctif sous-jacent, bien que les cellules inflammatoires puissent y migrer librement à travers des pores (324). Elle est composée de trois couches distinctes; la *lamina lucida*, la *lamina densa* (ces deux couches formant la vraie membrane basale) et la *lamina reticularis* qui est la portion de la membrane qui est épaissie dans l'asthme (332, 333).

L'épaississement de la membrane basale est fréquent chez les asthmatiques (37, 172, 196, 257, 272, 325, 334, 335) et cette lésion n'est pas influencée par la durée de la condition (38, 334). Chez les enfants, la membrane basale est épaissie avant même que le diagnostic d'asthme soit confirmé cliniquement (336), bien que d'autres n'aient pas observé ce changement chez de jeunes enfants avec une obstruction respiratoire réversible (313). Elle serait davantage épaissie chez les asthmatiques sévères (272), mais cette trouvaille n'est pas consensuelle (196, 335), possiblement en raison des différentes techniques utilisées (microscopie optique ou électronique, colorations standards ou immunohistochimiques). De plus, une corrélation négative entre l'épaisseur de la membrane basale et le VEMS est rapportée (334), tandis que d'autres suggèrent le contraire (196). L'épaississement de la membrane basale est aussi associé à l'hyperréactivité bronchique à l'adénosine monophosphate (328).

Tissu conjonctif sous-épithélial

Le tissu conjonctif sous-épithélial est composé de la *lamina propria* qui est située tout juste sous la membrane basale et dont la délimitation avec la sous-muqueuse sous-jacente n'est pas clairement délimitée dans l'arbre trachéobronchique. Ce tissu conjonctif est composé majoritairement de matrice extracellulaire, de vaisseaux et de glandes à mucus. La matrice extracellulaire est produite principalement par les fibroblastes et les myofibroblastes et est

composée essentiellement de collagène, de fibres élastiques, de protéoglycanes, de MMP et d'inhibiteurs des MMP (278).

L'aire du tissu conjonctif sous-épithélial augmente chez les asthmatiques (270, 277), ce qui peut être causé par de l'œdème tissulaire (325) ou un dépôt augmenté de matrice extracellulaire. Effectivement, il y a davantage de collagène dans la sous-muqueuse de patients asthmatiques modérés et sévères que chez les asthmatiques légers ou les contrôles (196, 222). Toutefois, la distance entre l'épithélium et le muscle lisse est plus faible chez les patients asthmatiques sévères (196), une anomalie possiblement causée par la migration des cellules musculaires lisses vers l'épithélium. L'augmentation de la proportion de collagène dans la matrice extracellulaire pourrait être protectrice par sa prévention d'un rétrécissement excessif de la lumière bronchique lors de la contraction du MLB. Ceci concorde avec la corrélation entre l'épaisseur de la sous-muqueuse et le VEMS chez les adultes (196) et les enfants asthmatiques sévères (200). À l'opposé, il est aussi possible qu'une matrice extracellulaire plus épaisse et remodelée nuise à la transduction des forces vers le MLB, amenuisant l'effet bronchodilatateur des respirations profondes par exemple.

La sous-muqueuse des patients asthmatiques est infiltrée de cellules inflammatoires (276, 328, 337), particulièrement de lymphocytes T et d'éosinophiles, et surtout dans les voies respiratoires périphériques (338, 339). Il y a aussi plus de glandes à mucus chez les asthmatiques (272, 276), particulièrement dans la forme sévère (196) et dans l'asthme fatal (340). L'hyperplasie des glandes à mucus est corrélée avec la neutrophilie pulmonaire (341) et les neutrophiles sont plus nombreux dans les glandes à mucus chez les asthmatiques (340). Finalement, l'aire occupée par les vaisseaux sanguins dans la sous-muqueuse est plus élevée dans l'asthme (275).

Ouverture

Les traitements usuels de l'asthme diminuent l'inflammation pulmonaire et soulagent le bronchospasme, mais ne visent pas directement à amenuiser le remodelage bronchique et ne corrigent pas l'infiltration neutrophilique. Les informations colligées dans ce chapitre suggèrent que l'inflammation et le remodelage sont deux processus aux interactions bidirectionnelles et

que cibler l'un sans l'autre risque de mener à un échec thérapeutique. Le prochain chapitre décrira l'asthme équin, et comment il peut servir de modèle pour évaluer l'évolution du remodelage bronchique en réponse à des thérapies anti-neutrophiliques.

L'asthme équin comme modèle naturel de la maladie

Justifications de l'utilisation des modèles animaux

Bien que les études effectuées directement chez l'espèce concernée par une maladie permettent d'obtenir des résultats plus aisément applicables en pratique, la médecine translationnelle et l'utilisation des modèles animaux demeurent nécessaires pour investiguer la pathophysiologie et le développement de nouvelles thérapies (342). Un seul modèle ne suffit probablement pas à reproduire parfaitement l'hétérogénéité et la complexité de l'asthme humain, incluant ses facteurs génétiques, environnementaux et infectieux. Les organismes qui ont servi de modèles pour l'étude de l'asthme sont variés et couvrent un vaste éventail de taille; de la drosophile, au rongeur, jusqu'au cheval. L'espèce qui est le plus largement utilisée est la souris, particulièrement la souche BALB/c qui développe aisément une réponse immunologique de type T2. La gestion facilitée de cette espèce en recherche a aussi popularisé son utilisation (courte gestation, facilité de manipulation, disponibilité commerciale, faible coût, manipulations génétiques aisées (343)). Toutefois, un inconvénient majeur est que la souris ne développe pas naturellement de l'asthme. Effectivement, l'induction d'une maladie respiratoire inflammatoire et allergique qui s'apparente à l'asthme requiert une exposition et une sensibilisation antigénique expérimentales. De ce fait, et combiné avec sa courte longévité, il n'est pas possible de répliquer l'inflammation bronchique chronique et récurrente observée chez les individus asthmatiques. L'anatomie et la physiologie respiratoires diffèrent aussi considérablement entre l'humain et la souris. Parmi ces différences, la souris possède moins de bifurcations bronchiques, une proportion plus élevée d'alvéoles, des anneaux cartilagineux complets (343) et dont la présence cesse beaucoup plus tôt dans l'arbre bronchique (344), une faible quantité de MLB (345), très peu de cellules à mucus et une fréquence respiratoire considérablement plus élevée que chez l'humain (300 rpm versus 12-20 rpm) (343). Toutes ces caractéristiques pourraient modifier l'hyperréactivité bronchique et l'évaluation de la réponse au traitement. De plus, la résistance pulmonaire demeure normale même chez les souris sensibilisées à différents allergènes; des tests de bronchoconstriction sont donc nécessaires pour détecter une altération respiratoire (343). Enfin, le modèle murin est désavantagé pour l'étude du phénotype neutrophilique de l'asthme par l'absence de gène codant pour le CXCL8. Les rats

sont aussi fréquemment utilisés comme modèle expérimental de l'asthme et les différentes souches possèdent des avantages distincts pour l'étude de sa pathophysiologie. Par exemple, le rat brun de Norvège permet une induction facilitée d'une inflammation de type T2 et est utile pour l'étude du remodelage du MLB (346) et la souche Fisher 344 présente une hyperréactivité bronchique innée, favorisant l'étude de la physiologie du muscle lisse et de la bronchoconstriction (347). Le cobaye est aussi un modèle animal particulièrement utile pour l'étude de l'hypersensibilité bronchique considérant sa masse du MLB naturellement élevée (259), sa réponse marquée aux agonistes contractiles et son développement d'une réponse allergique immédiate et retardée (345). Toutefois, il existe moins de variétés génétiques que chez la souris et le rat (345) et tout comme pour les autres rongeurs, l'espèce ne développe pas naturellement la maladie. Bien que ces modèles animaux ont été extensivement étudiés pour investiguer la pathogénie et le traitement de l'asthme, peu de médications issues des rongeurs se sont révélées intéressantes pour traiter la maladie humaine (348).

Seules les espèces équine et féline développent naturellement des conditions homologues à l'asthme humain. L'asthme félin touche environ 1-5% des chats, est déclenché par l'inhalation d'allergènes et est caractérisé cliniquement par de la toux, des sifflements, une détresse expiratoire et de l'inflammation éosinophilique (349, 350). Malheureusement, la pathophysiologie de la condition et son utilité comme modèle animal de l'asthme humain demeurent peu explorées, entre autres puisque les antigènes responsables de l'inflammation pulmonaire ne sont pas connus.

Asthme équin

L'asthme équin est une maladie respiratoire chronique dont la sévérité clinique est principalement influencée par l'exposition antigénique environnementale. La condition est séparée en deux entités (351). La forme légère à modérée (AELM), encore communément appelée *inflammatory airway disease*, est très prévalente, avec jusqu'à 80% des chevaux de course démontrant un certain degré d'inflammation pulmonaire (352). La maladie est caractérisée par une baisse de performance, de la toux, du jetage nasal et de l'hyperréactivité

bronchique. Elle peut être observée chez des chevaux de tous âges, mais particulièrement chez les jeunes et ceux d'âge moyen (351). Dans l'AELM, l'inflammation peut être de type éosinophilique, mastocytaire, neutrophilique ou mixte. La condition est le plus souvent transitoire, mais une proportion indéterminée de chevaux développera éventuellement la forme sévère. L'asthme équin sévère (AES) a porté différents noms au fil du temps, incluant la pousse, le souffle, l'emphysème, ou en anglais, *recurrent airway obstruction*, *heaves*, *broken wind* ou *chronic obstructive pulmonary disease*. Cette maladie incurable affecte environ 10-14% de la population équine dans les régions au climat tempéré (353, 354), et survient chez les chevaux adultes (généralement > 7 ans). En plus des signes observés dans la forme légère à modérée, les chevaux atteints d'AES démontrent des épisodes de détresse respiratoire au repos (tirage nasal et effort expiratoire; Figure 4, p.72); une conséquence du bronchospasme, de l'accumulation de mucus et du remodelage bronchique. Ces épisodes sont cycliques et varient en fonction de l'exposition antigénique environnementale, principalement aux antigènes présents dans le foin. Il existe aussi une forme d'asthme sévère qui est exacerbée par l'exposition au pâturage (*pasture asthma*), particulièrement observée dans le Sud-Est des États-Unis. De l'inflammation neutrophilique marquée (> 20-25% de neutrophiles dans le LBA) caractérise les périodes d'exacerbation de la maladie. Des périodes de rémission peuvent être obtenues lorsque l'exposition antigénique est réduite de façon prolongée; les chevaux ne démontrent alors aucun signe respiratoire et sont cliniquement indiscernables des animaux contrôles. Toutefois, même en rémission, de l'inflammation systémique (355), une obstruction bronchique périphérique sous-clinique (356) et des lésions de remodelage (357, 358) demeurent, et des exacerbations subséquentes récidiveront invariablement si le retrait antigénique n'est pas soutenu. Étant donné son incurabilité et la détérioration graduelle de la condition, l'AES est une cause importante d'euthanasie dans l'industrie équine (359, 360).



Figure 4. – Caractéristiques cliniques de l’asthme équin sévère. A. Dilatation nasale. B. Expiration abdominale. C. Tirage costal lors de l’inspiration. Photo gracieuseté de Mathilde Leclère, FMV.

Diagnostic de l’asthme équin

Une histoire de signes cliniques respiratoires qui fluctuent en fonction de l’exposition antigénique est souvent l’information anamnestique qui suggère un diagnostic d’asthme. Celui-ci est confirmé par la chronicité des signes respiratoires (> 4 semaines), la caractérisation de l’inflammation bronchique et l’évaluation de la fonction pulmonaire (ou de l’hyperréactivité bronchique) (Figures 5 et 6, p.73). Toutefois, l’évaluation de l’obstruction respiratoire est généralement limitée aux centres de référence et aux laboratoires de recherche puisque les appareils présentement disponibles sont complexes et non portatifs. L’approche diagnostique nécessite aussi l’exclusion d’autres causes de maladies respiratoires incluant, mais non limitées à, une pneumonie bactérienne, fongique ou parasitaire, une bronchite post-virale, la fibrose pulmonaire multinodulaire et des maladies des voies respiratoires supérieures. Chez les chevaux présentés avec comme seul signe clinique une intolérance à l’effort, une investigation des systèmes myoarthrosquelettique, cardiaque et endocrinien, ainsi qu’une évaluation de la fonction des voies respiratoires supérieures au repos et à l’effort peuvent être requises pour exclure d’autres causes (351).



Figure 5. – Évaluation de la fonction pulmonaire par la technique du ballonnet œsophagien (mécanique standard). A. Intubation naso-œsophagienne permettant la mesure de la pression œsophagienne comme substitut de la pression pleurale. B. Installation d'un masque et du pneumotachographe mesurant le débit d'air respiré.



Figure 6. – Évaluation de la fonction pulmonaire par oscillométrie pulsée. Des ondes sonores sont superposées au système respiratoire et les signaux résultants permettent de mesurer des paramètres de la fonction pulmonaire.



Figure 7. – Lavage bronchoalvéolaire par vidéoendoscopie. Avec l'autorisation de l'éditeur, d'après Mainguy-Seers S. Revue des nouveautés thérapeutiques ciblant l'asthme équin. Prat. Vét. Équine. 2021; 212:48-53.

Caractéristiques du modèle équin

Comparativement aux modèles de rongeur, la longévité (25-30 ans) du cheval est un net avantage considérant la nature chronique de l'asthme et l'association du remodelage avec la durée de la maladie chez l'humain (273). Grâce à leur caractère docile, la fonction pulmonaire peut aisément être mesurée par différentes techniques sur les chevaux non sédatisés et qui respirent spontanément. Sous sédation debout, il est également possible de réaliser de multiples prélèvements (lavage bronchoalvéolaire (Figure 7, p.74), biopsies endobronchiques, échographie endobronchique) permettant la réalisation d'études morphométriques (9). La prise de biopsies pulmonaires thoracoscopiques séquentielles est possible grâce à leur grande taille, et leur tempérament permet la réalisation de la procédure sous sédation, sans avoir recours à une anesthésie générale. L'évaluation du remodelage des petites voies respiratoires, un défi chez les

autres espèces (344), est donc relativement aisée chez le cheval, et peut être répétée pour évaluer la réponse thérapeutique. Leur taille permet aussi le prélèvement d'une quantité substantielle de sang, négligeable pour la santé de l'individu, mais qui facilite la récolte de cellules spécifiques, comme les neutrophiles périphériques. Le fait que des exacerbations puissent être déclenchées ou cessées par le degré d'exposition antigénique permet aussi aux chercheurs d'étudier éthiquement les mêmes chevaux sur de longues périodes, puisqu'ils peuvent être phénotypiquement normaux entre les différents projets de recherche. Étant donné leur utilisation comme athlète, un autre avantage du modèle équin est la possibilité d'étudier l'effet de l'asthme sur la physiologie de l'exercice et sur la fonction du pharynx et du larynx, des structures où des comorbidités peuvent être détectées, tant chez l'espèce équine (361) que chez l'humain (362), et qui peuvent complexifier le diagnostic et la gestion de l'asthme.

Parmi les inconvénients liés à l'utilisation du cheval comme modèle naturel de l'asthme, notons l'expertise et les installations requises, les coûts associés à leurs soins et hébergements, la disponibilité plus limitée d'anticorps commerciaux, et l'absence de manipulations aisées du bagage génétique (9). Les individus étudiés sont hétérogènes (tant dans leur génétique que leur historique médical), ce qui peut se refléter en une réponse thérapeutique variable, mais qui est aussi probablement plus représentative de la maladie humaine. Leur taille limite la réalisation de certaines manipulations; par exemple, il n'est actuellement pas possible d'évaluer les lésions architecturales pulmonaires par tomодensitométrie, l'imagerie médicale du poumon du cheval adulte se limitant à l'échographie et aux radiographies. Il existe aussi certaines différences anatomiques et physiologiques au niveau du système respiratoire. Alors que l'humain peut respirer tant par la bouche que par la cavité nasale, le cheval est un respirateur nasal obligatoire. Chez l'humain, l'arbre bronchique se divise habituellement à chaque génération en deux branches (dichotomique) (344), tandis que chez le cheval, les générations bronchiques se succèdent plus aléatoirement (embranchement monopodial) (363). Enfin, la lobulation pulmonaire est simplifiée chez le cheval. Seulement le lobe accessoire droit est distinct et la fissure cardiaque sépare subtilement les portions crâiales et caudales du poumon bilatéralement (364).

Facteurs de risque

Héritabilité et génétique

L'aspect héréditaire de l'asthme équin sévère (AES) a été reconnu il y a plus de 80 ans (365). La progéniture a une probabilité de ≈50% de développer la maladie si un des deux parents est affecté et de ≈70% si les deux le sont (366). Toutefois, le caractère génétique est complexe et est le plus probablement polygénique, tout comme la maladie humaine. Des polymorphismes nucléotidiques dans le gène de l'IL-4R du chromosome 13 ont été associés à l'AES dans certaines lignées équines (367, 368). Bien qu'une étude ait observé une prédisposition raciale pour le Pursang Anglais (369)), toutes les races peuvent être affectées.

Allergie et exposition environnementale

L'environnement joue un rôle majeur dans le développement et la survenue des exacerbations dans l'AES. Un environnement antigénique (ventilation minimale et litière de paille) est associé à un risque plus élevé d'avoir un diagnostic d'asthme (368), alors qu'à l'inverse, une ventilation adéquate et une augmentation du temps passé à l'extérieur réduisent l'intensité des signes cliniques et le besoin de thérapies pharmacologiques dans l'AES (370). Bien que la ventilation et le milieu de vie influencent les signes cliniques, l'alimentation à base de foin sec est l'élément le plus important dans le développement des exacerbations cliniques dans l'AES par l'inhalation de poussières que cette diète engendre (353). Parmi les contaminants retrouvés dans le foin, les particules fongiques (dont *Micropolyspora faeni* et *Aspergillus fumigatus* (371, 372)) et les endotoxines (16, 373) sont particulièrement incriminées dans le développement de la réaction inflammatoire. Plus précisément, l'inhalation de particules fongiques est impliquée dans le déclenchement d'exacerbations chez les chevaux atteints d'AES (371), et un diagnostic d'AELM est aussi plus probable lors de détection de particules fongiques dans le lavage trachéal (374). De plus, les récepteurs dectin-1 (récepteurs pour les β -glucanes fongiques) sont surrégulés lors d'exposition au foin, bien qu'il n'y ait pas de différence liée au statut de la maladie (375). Curieusement, les chevaux en exacerbation d'AES ont moins de particules fongiques dans leur LBA; une conséquence potentielle d'une pénétration moins profonde des particules en présence de bronchospasme et d'accumulation de mucus (375). Le taux d'endotoxines (LPS) est nettement

augmenté dans les écuries poussiéreuses (376), et celles-ci sont associées au développement de l'inflammation neutrophilique et de l'obstruction bronchique dans l'AES (16, 373). Bien d'autres composants du foin pourraient contribuer à la pathophysiologie de la maladie, comme les mites de foin, les pollens et autres débris végétaux, les peptidoglycanes et des poussières inorganiques, mais davantage d'études sont requises pour connaître l'implication individuelle ou synergique de chacun (377). L'importance de l'exposition environnementale et de l'alimentation est exemplifiée par les nombreuses études provenant de différents groupes de recherche ayant induit des exacerbations par des changements de régime (pour ne nommer que quelques exemples : (357, 378-381)). À l'inverse, le remplacement du foin par des substituts a été maintes fois associé à une amélioration de la fonction pulmonaire ou des signes cliniques, et à une réduction de l'inflammation neutrophilique. Ces substituts incluent l'alimentation à base de pellets de foin (382), d'ensilage (353, 383), de foin traité à l'huile (382) et la mise au pâturage (357). L'effet de la pasteurisation du foin est plus controversé; cette technique réduit la quantité de champignons dans le foin et la concentration de particules inhalables dans l'environnement des chevaux, mais aucune amélioration clinique ou inflammatoire n'est détectée après une exposition de cinq jours chez des chevaux atteints d'AES (384). Toutefois, l'alimentation à base de foin pasteurisé réduirait la susceptibilité à l'AELM (374). Finalement, bien que souvent considéré insuffisant, alimenter les chevaux asthmatiques sévères avec du foin trempé réduit les signes cliniques et le besoin de traitements pharmacologiques (370).

La saisonnalité des signes cliniques observée chez certains chevaux atteints d'AES (353) suggère une réponse individuelle et variable à différents allergènes. L'été, la sévérité des signes cliniques est corrélée à la concentration de pollens extérieurs (dont ceux de la famille des pinacées, des bouleaux, des moracées et de spores de *Oospora*), à la température ambiante - la fonction pulmonaire étant pire les journées très chaudes - et à l'enthalpie (385).

L'asthme humain est souvent lié à d'autres conditions allergiques (eczéma, rhinite allergique) (2). De façon similaire, l'asthme équin a été associé à l'hypersensibilité aux *Culicoïdes*, une condition cutanée allergique (368). Les chevaux souffrants de cette maladie présentent une hypersensibilité bronchique similaire à celle des chevaux asthmatiques légers à sévères (386). Malgré l'aspect allergique de la condition, l'utilité des tests immunologiques dans le diagnostic de l'asthme équin

est sujette à controverse. Globalement, la concentration sérique en IgE total ou spécifique n'est pas un outil fiable dans le diagnostic de la maladie (387, 388), bien que certaines techniques puissent identifier des allergènes d'intérêt (389).

Statut physiologique

L'incidence et la prévalence de l'AES augmentent avec l'âge (353, 366); les chevaux âgés de > 7 ans étant plus à risque (369). La forme légère à modérée peut survenir à tous les âges (351).

Contrairement à l'humain chez qui le sexe influence la prévalence de l'asthme, il n'y a pas de forte prédisposition de sexe dans l'asthme équin. Tout de même, une étude rapporte que les juments ont 1.4 fois plus de chance d'avoir un diagnostic d'AES que les étalons (369), et une autre décrit une augmentation du risque de maladies respiratoires chez les jeunes juments de course (390). Toutefois, cette prédisposition de sexe n'a pas été observée par d'autres (354, 391). Dans une étude préliminaire et connexe au projet doctoral, l'auteure de cette thèse a évalué l'effet du cycle œstral sur la sévérité de l'obstruction respiratoire chez des juments atteintes d'AES (annexe 1 - *Lung Function Variation during the Estrus Cycle of Mares Affected by Severe Asthma*, p.378). Une amélioration de la résistance inspiratoire lors de la phase lutéale du cycle œstral a été observée, suggérant un rôle potentiel des hormones sexuelles dans la pathophysiologie de la maladie (392). De plus, bien qu'aucune étude ne l'ait démontré objectivement, il est anecdotiquement rapporté que la gestation atténue les signes respiratoires dans l'AES.

Tout comme dans l'asthme humain, l'obésité a récemment été décrite comme un facteur de risque dans l'incidence de l'asthme équin, bien que cette étude soit limitée par des critères diagnostiques peu stricts (391).

Interactions avec des agents infectieux et le microbiome

L'implication des agents bactériens ou viraux dans la condition équine n'est pas clairement établie et est controversée (393). Il n'y a pas de corrélation évidente entre l'inflammation pulmonaire, les performances athlétiques et la présence de virus respiratoires chez des pursangs de course (393). De façon similaire, il n'y a pas d'association entre la présence d'une infection virale (Herpèsvirus 1 et 4, virus de la rhinite A et B, influenza et adénovirus) et d'une maladie

respiratoire compatible avec de l'asthme chez de jeunes chevaux de courses (390). Au contraire, une autre étude a rapporté que la séroprévalence contre le virus de la rhinite de type A est plus élevée chez les chevaux asthmatiques légers-modérés (394). Il existe aussi une association entre un diagnostic d'AELM et l'excrétion virale d'Herpèsvirus de type 2 (394), un gammaherpèsvirus généralement considéré non pathogène, mais dont le rôle potentiel dans les maladies respiratoires équines n'est pas clairement résolu (395, 396).

La présence de bactéries intracellulaires dans le lavage trachéal est associée à de la toux chez les jeunes chevaux de course (397). Toutefois, ceci n'indique pas une association causale, puisque ces chevaux ont aussi davantage d'accumulation de mucus, ce qui pourrait favoriser la rétention de bactéries dans les sécrétions respiratoires. Au contraire, une autre étude rapporte une charge bactérienne trachéale (via la quantification génique 16S) plus faible dans l'AELM, suggérant une potentielle dysbiose pulmonaire (398). De plus, le microbiome pulmonaire de chevaux asthmatiques sévères est différent de celui de chevaux sains lors d'une exposition antigénique (399). Finalement, la détection de bactéries atypiques (*Chlamydia psittaci*) dans l'épithélium respiratoire est plus fréquente dans l'AES (359). Ces résultats mériteraient toutefois d'être confirmés puisque le diagnostic d'asthme n'était pas basé sur des tests objectifs dans cette dernière étude.

Immunopathologie de l'asthme équin

Bien que la phase d'exacerbation de la maladie soit globalement caractérisée par un profil inflammatoire (surexpression des cytokines IL-1 β , TNF- α , CXCL8 dans les cellules du LBA (400)), les mécanismes immunologiques sous-jacents sont controversés. La maladie est médiée par une réponse de type T2, qui apparaît dans les 24 heures après une exposition antigénique et qui coïncide avec l'infiltration neutrophilique (401). Effectivement, davantage de lymphocytes expriment l'ARN messager pour l'IL-4 et l'IL-5, et moins pour l'INF- γ dans le LBA provenant de chevaux atteints d'AES (402). Une réponse de type T2 a aussi été incriminée dans l'AELM (403). Même si cette réponse immunologique est plus intuitivement associée à l'inflammation éosinophilique, les neutrophiles possèdent aussi des récepteurs pour des cytokines de type T2

(IL-5, IL-9), récepteurs qui sont d'ailleurs plus nombreux chez les chevaux atteints d'AES, et qui sont surexprimés lors d'exacerbation (404). D'autres ont plutôt observé un profil inflammatoire mixte de type 1 et 2 dans l'AES (400, 405) et dans l'AELM (406). Une réponse de type T17, exprimée par une surrégulation de la cytokine IL-17 dans les cellules du LBA, est aussi impliquée dans l'AES (407) et dans l'AELM (408). Notamment, les différents phénotypes inflammatoires dans l'AELM (neutrophilique, mastocytaire et éosinophilique) peuvent avoir une pathophysiologie différente, mise en évidence par des réponses immunologiques distinctes (403, 406).

Caractérisation de l'inflammation neutrophilique

Dès 4-6 heures après une exposition antigénique, les neutrophiles commencent à infiltrer le tissu pulmonaire dans l'AES (409). Conséquemment, l'élastase neutrophilique augmente rapidement dans le LBA de chevaux asthmatiques sévères après une brève exposition antigénique (147). Tout comme dans l'asthme humain, le degré d'inflammation neutrophilique est corrélé avec l'expression de CXCL8 et d'IL-1 β dans le LBA (400). De plus, la concentration de CXCL8 demeure plus élevée dans l'AES même en rémission comparativement aux contrôles (400). La MMP-9, un produit des granules tertiaires des neutrophiles, est aussi augmentée dans les sécrétions respiratoires dans l'AES (410). Les neutrophiles pulmonaires de chevaux asthmatiques sévères produisent davantage de NETs et ont un degré d'activation plus important (407). Il convient de rappeler que même les chevaux sains développent un léger degré d'inflammation neutrophilique pulmonaire lors d'une augmentation de l'exposition antigénique, mais dans une moindre mesure et de façon transitoire (399, 401). En plus de l'infiltration neutrophilique locale, les chevaux asthmatiques sévères développent une neutrophilie périphérique quelques heures après une exposition antigénique (16, 409). La taille des neutrophiles périphériques est plus élevée et leur contenu en MPO plus important lors de l'exacerbation de la maladie (411), démontrant un degré d'activation cellulaire accru.

Une augmentation marginale des éosinophiles pulmonaires peut aussi se produire lors d'exposition antigénique dans l'AES (399), bien que ceci ne soit pas usuel (409). Un comptage éosinophilique sanguin plus élevé chez les chevaux atteints d'AES est rapporté, mais celui-ci

diminue avec l'exposition antigénique (409). L'implication de l'éosinophile semble donc marginale dans l'AES, contrairement à l'AELM où le profil inflammatoire peut être éosinophilique.

Conséquences de l'inflammation neutrophilique

Globalement, les conséquences cliniques de la neutrophilie pulmonaire dans l'asthme équin sont relativement peu documentées et les études disponibles comportent plusieurs limites méthodologiques. D'abord, la neutrophilie pulmonaire est corrélée avec la sévérité des signes cliniques dans l'AES (360, 412). Chez les chevaux de course, l'inflammation neutrophilique est liée à une moins bonne performance (352) et il existe une forte association entre l'hyperréactivité bronchique et l'inflammation neutrophilique dans l'AELM (394). La neutrophilie est aussi associée à des lésions histologiques. Effectivement, le degré d'inflammation bronchiolaire, notamment neutrophilique, est corrélé avec l'hyperplasie épithéliale et des cellules à mucus dans une population combinant des chevaux sains et atteints d'AES (413). Dans une large étude de nécropsie chez de jeunes chevaux de course, le degré d'inflammation tissulaire était corrélé à l'hyperplasie du MLB dans les petites voies respiratoires, mais la proportion de chevaux atteints d'AELM était inconnue dans cette population (414). Curieusement, les chevaux atteints d'AES qui ont davantage de lésions histologiques ont moins d'inflammation neutrophilique détectée par cytologie du LBA. Les auteurs ont suggéré que cette trouvaille pourrait être une conséquence de la corrélation inverse entre la neutrophilie et le degré de mucostase, suggérant que la cytologie du LBA est possiblement moins fiable lorsque du mucus obstrue les bronches (415). Au contraire, chez les chevaux contrôles, les lésions pulmonaires histologiques sont plus marquées chez ceux présentant de l'inflammation neutrophilique (415). Finalement, les exosomes isolés de neutrophiles périphériques stimulés au LPS provenant de chevaux sains augmentent la prolifération du MLB (416), une découverte ultérieurement confirmée chez l'humain (253). Toutefois, il demeure indéterminé s'il s'agit d'un phénomène d'importance dans l'asthme, ce qui a justifié l'élaboration de l'article 5 (*Neutrophil extracellular vesicles and airway smooth muscle proliferation in the natural model of severe asthma in horses*, p.247).

Remodelage bronchique dans l'asthme équin

L'origine et l'évolution du remodelage bronchique dans l'asthme équin sont encore très peu comprises. Les lésions architecturales ont surtout été décrites dans l'AES, mais ont aussi été récemment rapportées dans la forme légère à modérée de la maladie. Bien que la condition ait déjà été nommée *chronic obstructive pulmonary disease* ou emphysème, la destruction alvéolaire ne fait généralement pas partie des lésions structurelles dans l'asthme équin (360).

Muscle lisse bronchique

Chez le cheval asthmatique sévère, la masse du MLB est augmentée de deux à trois fois par rapport aux individus sains (417, 418), une trouvaille aussi rapportée dans l'asthme induit par le pâturage (419). Ceci est lié à de l'hyperplasie, de l'hypertrophie, mais aussi à une augmentation de l'apoptose compatible avec un renouvellement cellulaire élevé (417, 418). L'augmentation de la masse de MLB est présente dans les bronches de toute taille, mais est plus marquée dans les petites voies respiratoires (418). Une courte exposition antigénique (un mois) ne modifie pas la masse du MLB, malgré une augmentation de la prolifération et de l'apoptose des cellules musculaires lisses (417). À l'inverse, un retrait antigénique prolongée (près d'un an) réduit la masse du MLB d'environ 30%, mais elle demeure toutefois plus élevée que chez les chevaux sains (357). Le MLB des voies respiratoires périphériques dans l'AES a une vitesse maximale de raccourcissement plus élevée que celle des chevaux contrôles et que celle du MLB trachéal, une conséquence potentielle du micro-environnement inflammatoire de la périphérie pulmonaire (420). D'ailleurs, le MLB dans l'AES exprime davantage l'insert (+) de la chaîne légère de la myosine lors de l'exacerbation clinique, comme chez l'humain asthmatique (421), ce qui pourrait lui conférer cette vitesse de contraction accentuée (422). Il n'y a pas de démonstration d'une augmentation de la masse du MLB dans l'AELM à ce jour, entre autres parce que les biopsies endobronchiques (Figure 8, p.84) ne permettent pas de quantifier la masse du MLB chez les chevaux (423). La collection de biopsies pulmonaires (Figures 9 et 10, p.85) permettrait de vérifier la présence de cette lésion architecturale, mais il n'est pas indiqué d'effectuer cette procédure plus invasive chez ce type de patient. Toutefois, une fibrose du muscle lisse y est présente, un changement qui n'est pas associé à la durée de la maladie (424). Dans l'AELM, le MLB a aussi une

expression génique plus importante de l'isoforme insert (+) de la myosine (425), mais sans différence au niveau de l'hyperplasie ni de l'hypertrophie.

Épithélium

Une hyperplasie épithéliale (424, 426, 427), une perte de cellules ciliées (426) et une déplétion de cellules en dôme (428, 429) sont observées dans l'asthme équin. Une infiltration de cellules inflammatoires est aussi caractéristique de l'AES (360, 426, 427), et ce davantage en exacerbation (430) et avec une prédominance de neutrophiles (428), tandis que l'éosinophilie tissulaire n'est pas une caractéristique de l'AES (426, 431). Au contraire, d'autres n'ont pas relevé de différence d'inflammation épithéliale chez des chevaux atteints d'AES, mais les prélèvements ont été effectués après seulement 48-72 heures d'exposition antigénique dans cette étude (432). Davantage de cellules à mucus sont observées dans l'AES et l'asthme induit par le pâturage, ce qui est accompagné d'une accumulation de mucus dans les bronches (360, 415, 419, 426, 427, 433).

Membrane basale

L'épaississement de la membrane basale est une trouvaille parfois observée dans l'asthme équin (430), mais de façon beaucoup moins constante que chez l'humain asthmatique. Une étude de microscopie électronique n'y a pas révélé de modifications structurelles dans l'AES (426).

Sous-muqueuse

Il y a davantage de fibrose dans les tissus conjonctifs dans l'AES (415). Effectivement, les chevaux asthmatiques ont davantage de collagène (434) et de fibres élastiques (419, 434) dans la paroi des voies périphériques. Une infiltration de cellules inflammatoires dans les bronches périphériques est observée dans l'AES (433), particulièrement lors d'exacerbation (415). Cette infiltration est aussi détectée dans les voies centrales (426, 430), et est proportionnelle au degré d'inflammation de l'épithélium (426). Dans l'asthme induit par le pâturage, l'inflammation des tissus conjonctifs est surtout caractérisée par une infiltration lymphocytaire et neutrophilique (419). Des changements sont aussi présents dans l'asthme léger-moderé, avec un épaississement de la sous-muqueuse (424) qui est similaire à celui observé dans la forme sévère (435).

Vascularisation

Le nombre de vaisseaux est augmenté dans la *lamina propria* de chevaux asthmatiques sévères, qu'ils soient en exacerbation ou en rémission (436), ainsi que la densité des vaisseaux superficiels trachéaux (437). L'aire des artères pulmonaires est aussi plus importante dans l'AES, une conséquence de l'augmentation de la masse du muscle lisse vasculaire (438). De l'inflammation peut aussi entourer les vaisseaux sanguins (428).

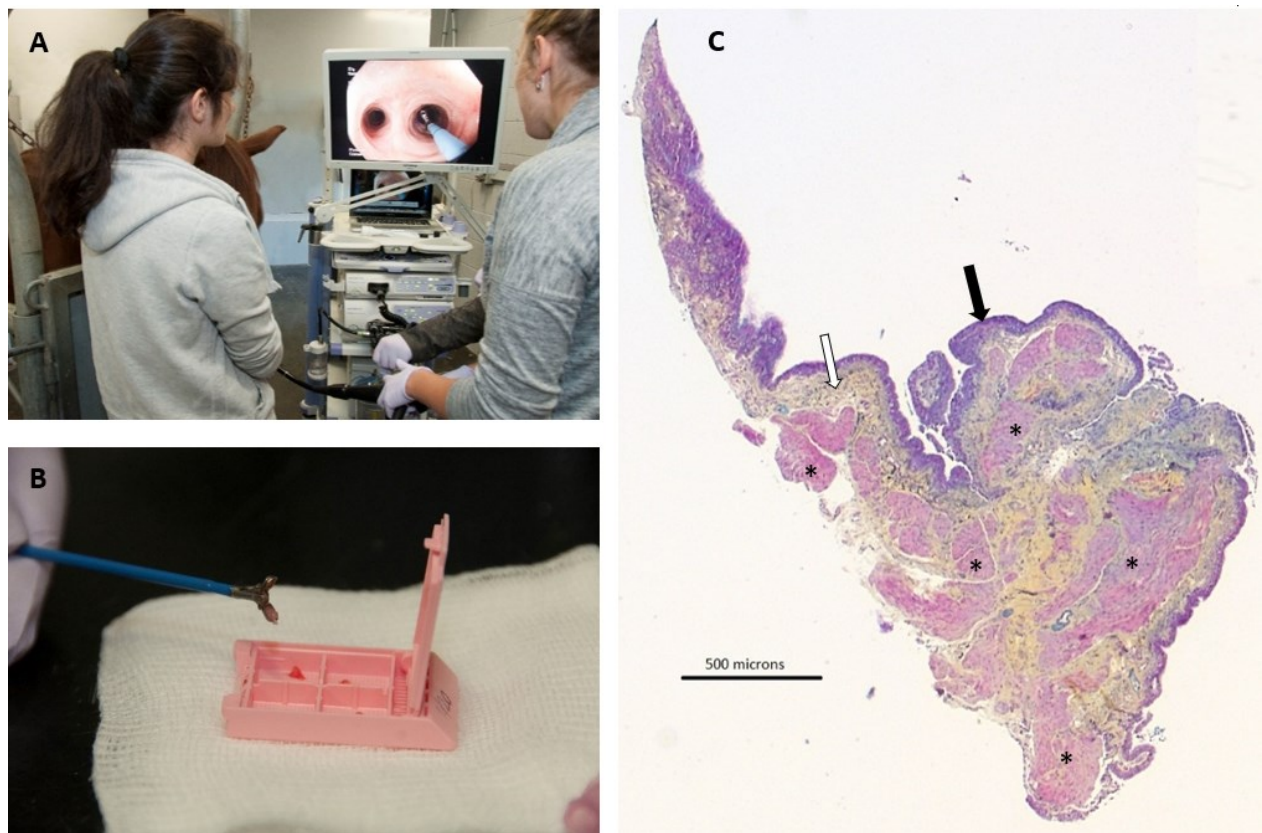


Figure 8. — Biopsies endobronchiques chez l'espèce équine. A. Prise d'une biopsie endobronchique chez le cheval sédaté, debout. B. Pince lisse permettant la collection de biopsies d'environ 2-3 mm². C. Biopsie endobronchique colorée au Russell-Movat pentachrome modifié, permettant une délimitation claire du muscle lisse bronchique (*), de l'épithélium (flèche noire) et de la sous-muqueuse (flèche blanche).



Figure 9. – Biopsie thoracoscopique chez l'espèce équine. A. Chirurgie pour la collection de biopsies pulmonaires thoracoscopiques sur cheval sédaté, debout. B. Exemple de biopsie pulmonaire obtenue chez le cheval. C. Plaies chirurgicales associées aux trois ports d'entrée thoracoscopiques.

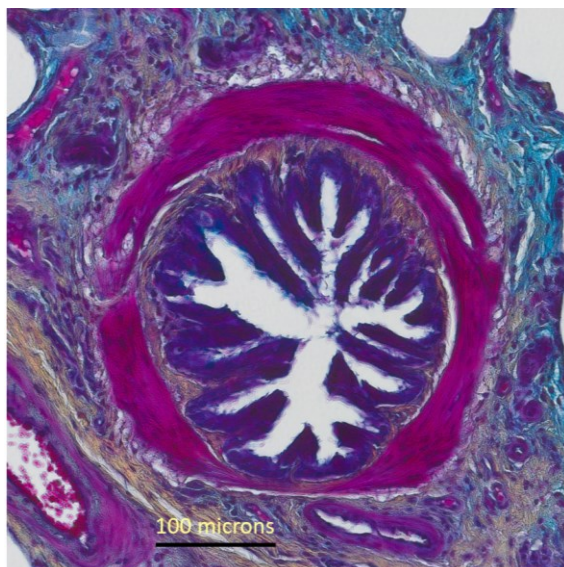


Figure 10. – Bronchiole provenant d'un cheval asthmatique sévère, illustrant l'augmentation de la masse du muscle lisse. Coloration au Russell-Movat pentachrome modifié.

Conséquences du remodelage dans l'asthme équin

Les conséquences fonctionnelles du remodelage dans l'asthme équin ont été très peu investiguées. Un score semi-quantitatif des lésions histologiques dans les biopsies endobronchiques corrèle avec le degré d'obstruction respiratoire dans l'AES (430). Étonnamment, l'aire du MLB dans les voies respiratoires centrales est négativement associée à la résistance pulmonaire chez les asthmatiques sévères, mais ceci est expliqué par l'épaississement du tissu conjonctif sous-épithélial qui réduit la quantité de MLB prélevée (423). La quantité de collagène dans les voies périphériques est corrélée à la résistance pulmonaire lorsque les chevaux atteints d'AES sont en rémission, ce qui pourrait contribuer à la persistance de l'obstruction bronchique sous-clinique observée chez ceux-ci (434). Finalement, l'hyperplasie épithéliale est associée à un ratio ventilation/perfusion altéré et au degré d'espace mort dans l'AES (427).

Ouverture

Tout comme chez l'humain, la thérapie médicamenteuse de base de l'asthme équin repose sur l'utilisation de GC et de bronchodilatateurs. Bien que les changements alimentaires et de régime demeurent prioritaires pour la gestion de l'AES, la compliance des propriétaires de chevaux pour l'implémentation des recommandations alimentaires est faible (370) et ceux-ci prennent plusieurs semaines à être efficaces (357). Ces limites expliquent en partie la nécessité d'utiliser les GC et la recherche de nouvelles thérapies chez l'espèce équine.

Déterminer si l'atténuation de l'inflammation neutrophilique se répercute en une amélioration des lésions de remodelage pourrait aider à comprendre comment le neutrophile participe à la sévérité de la maladie. Les similitudes dans la pathophysiologie et dans le type de lésions architecturales entre l'asthme équin et humain, ainsi que la capacité de prélever séquentiellement des échantillons permettant l'évaluation des lésions architecturales centrales et périphériques font de l'espèce équine un modèle avantageux pour l'étude de thérapies ciblant le remodelage. La translation de la réponse thérapeutique dans l'asthme est possiblement plus fiable chez le cheval que chez la souris (343), justifiant l'utilisation du modèle équin dans ce projet doctoral.

Traitements anti-neutrophiliques dans l'asthme

Les objectifs thérapeutiques dans l'asthme sont d'abord de prévenir les exacerbations, puis de contrôler les symptômes et de normaliser la fonction pulmonaire (104). Les CSI permettent d'atteindre ces objectifs chez la majorité des patients, mais ils sont parfois insuffisants, particulièrement chez les individus atteints d'asthme neutrophilique. Le traitement de ce phénotype est compliqué par le fait que les neutrophiles sont impliqués dans de multiples processus biologiques essentiels à la survie, dont la défense contre les micro-organismes (439). Cibler le neutrophile dans l'asthme est donc une tâche audacieuse, puisqu'il n'est évidemment pas envisageable d'atténuer complètement leur fonction, et le degré de réduction de neutrophilie pulmonaire cliniquement significatif et minimalement important dans l'asthme n'est pas établi (440). L'emphase de ce chapitre portera sur les traitements qui ont le potentiel de restreindre spécifiquement l'inflammation neutrophilique et qui seront étudiés dans ce projet doctoral.

Glucocorticoïdes

Selon les directives de la « Global Initiative for Asthma », tous les patients asthmatiques, adultes et adolescents, devraient être traités avec des CSI, que ce soit de façon constante ou ponctuelle, selon les besoins (2). Les GC oraux demeurent la thérapie recommandée pour le traitement des exacerbations sévères (25). Dans l'AES, les GC constituent aussi la première option pharmacologique. Dans le cadre de ce projet doctoral, une revue de littérature répertoriant les effets des GC sur la fonction pulmonaire, l'inflammation bronchique et le remodelage dans l'asthme équin fut effectuée (article 1 - *Glucocorticoid therapy in horses with asthma: A narrative review*, p.110 (441)) et ne seront donc que brièvement abordés ici.

Mécanismes d'action des GC en bref

La famille des corticostéroïdes endogènes comprend les minéralocorticoïdes, les stéroïdes androgènes et les GC. À la suite d'une stimulation par l'hormone adrénocorticotrophine, la *zona fasciculata* des glandes surrénaliennes produit du cortisol à partir du cholestérol (442). Les récepteurs aux GC (GCR) se retrouvent dans tous les tissus et l'isoforme prédominant GCR- α

médie la plupart des actions génomiques et non génomiques des GC. L'isoforme GCR- β ne lie pas directement les GC, mais peut interagir avec l'ADN des gènes régulés par les GC et former des hétérodimères avec les GCR- α , deux mécanismes qui pourraient inhiber l'action des corticostéroïdes et ultimement moduler la réponse thérapeutique (443, 444).

Les propriétés anti-inflammatoires des GC sont surtout attribuées à leurs effets génomiques. Ces derniers sont caractérisés par la transactivation de gènes anti-inflammatoires (dont l'IL-10) et la transrépression de gènes inflammatoires (particulièrement via le facteur de transcription facteur nucléaire *kappa B*) (442). Les effets génomiques ne sont pas immédiats puisque l'altération de l'expression génique et de la translation protéique subséquente prennent des heures. Au contraire, les effets non génomiques peuvent se produire en quelques minutes. Ceux-ci pourraient être impliqués dans les effets cliniques des GC dans l'asthme, avec entre autres une réduction de la contraction du muscle lisse et la modulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (445, 446).

Effets cliniques des glucocorticoïdes dans l'asthme

Les GC sont les molécules les plus efficaces pour atténuer les symptômes et améliorer la fonction pulmonaire dans l'asthme, bien que leur combinaison avec d'autres thérapies (dont les agonistes β -adrénergiques) ait une valeur ajoutée (447). Les CSI produisent une amélioration cliniquement notable de la qualité de vie chez les asthmatiques (448) et leur administration à long terme améliore la fonction pulmonaire et atténue l'hyperréactivité bronchique (449). De plus, les CSI utilisés en monothérapie sont plus efficaces que tout autre médicament utilisé seul pour prévenir les exacerbations sévères (450). Toutefois, ils ne sont pas suffisants pour contrôler l'asthme et ses exacerbations chez tous les patients. Effectivement, alors que l'éosinophilie pulmonaire est un biomarqueur pour une meilleure réponse aux GC dans l'asthme (451), l'obstruction respiratoire et les symptômes s'améliorent chez les patients souffrant d'asthme neutrophilique, mais dans une moindre mesure (10).

Tout comme chez l'humain asthmatique, l'administration de GC est le traitement médical le plus efficace pour améliorer la fonction pulmonaire dans l'asthme équin (357, 435, 441), même dans la forme sévère où l'inflammation pulmonaire est de type neutrophilique. Pour des raisons

économiques, les GC sont fréquemment administrés par voie orale, tandis que l'utilisation de CSI est moins commune et est rarement prolongée chez l'espèce équine. Conséquemment, la sévérité de la maladie n'est pas classifiée selon le type ou la dose de GC utilisés dans l'asthme équin contrairement à l'humain. Malgré une intensification de la recherche de nouvelles thérapies dans l'asthme équin, aucune molécule n'atteint l'efficacité des GC (452).

Effets des GC sur l'inflammation neutrophilique

Les CSI atténuent l'inflammation éosinophilique, mais pas neutrophilique dans l'asthme (161, 185). Une augmentation de la neutrophilie peut même apparaître suite à l'administration de CSI (109), possiblement à cause de l'inhibition de leur apoptose (186). Au niveau tissulaire, la quantification des neutrophiles dans l'épithélium et la sous-muqueuse n'est pas modifiée par les GC (453, 454), bien que d'autres rapportent une diminution des neutrophiles intraépithéliaux (455). La simple évaluation quantitative de l'inflammation neutrophilique pourrait toutefois être insuffisante pour caractériser l'effet des GC sur ces granulocytes. En effet, une diminution de leur niveau d'activation pourrait amoindrir leur relâche de protéases incriminées dans le développement du dommage tissulaire. Par exemple, bien que les GC augmentent la survie des neutrophiles, ils diminuent leur production de CXCL8 (186). D'autres ont cependant observé qu'un traitement avec les CSI engendre une hausse de l'élastase neutrophilique (109) et potentialise certaines fonctions neutrophiliques (augmentation de la cascade oxydative et amélioration de la phagocytose) (456). De plus, un traitement à la fluticasone augmente l'expression génique de l'IL-1 β et de l'isoenzyme non spécifique de l'alkaline phosphatase dans les expectorations, deux marqueurs de l'inflammation neutrophilique (457). Similairement, les GC oraux ne diminuent pas l'IL-1 β ni le CXCR2 dans les expectorations d'asthmatiques (458).

De façon similaire, les CSI et les GC oraux sont inefficaces pour normaliser l'inflammation neutrophilique dans l'AES (357, 459), mais ils peuvent atténuer certains aspects potentiellement délétères pour les tissus, comme la production de NETs (407).

Effets des GC sur le remodelage bronchique

Malgré l'utilisation massive des GC dans l'asthme, relativement peu d'études cliniques se sont penchées sur leurs effets sur le remodelage bronchique, incluant sur le MLB (329, 333). Plusieurs

évidences *in vitro* suggèrent toutefois des effets directs des GC sur les cellules musculaires lisses. Entre autres, la dexaméthasone réduit la prolifération des cellules musculaires lisses induite par le TGF- β (216), par la thrombine (274) et par la co-incubation avec des cellules épithéliales bronchiques (232). Néanmoins, la dexaméthasone ne semble pas atténuer la prolifération des cellules musculaires lisses asthmatiques (284), un phénomène qui pourrait contribuer à la corticorésistance. La dexaméthasone réduit aussi la sécrétion de CXCL8 par les cellules musculaires lisses stimulées par des cytokines inflammatoires (301). Malgré ces évidences *in vitro*, peu d'études ont investigué les variations de la masse du MLB par les GC. Il a tout de même été démontré que l'administration de flunisolide durant six semaines réduit la masse du muscle lisse de plus de 50% chez des asthmatiques légers-modérés dans les voies périphériques, mais pas centrales (321). L'administration de budésonide durant 11 jours réduit la masse du MLB centrale, mais le fait qu'une réduction similaire a été observée dans le groupe placebo complique l'interprétation des résultats de cette étude (310). Finalement, l'épaississement des bronches en tomodensitométrie est atténué par un traitement prolongé aux CSI (> sept mois), mais cette technique d'imagerie ne permet pas de déterminer quelles structures anatomiques sont impliquées (460). Dans l'AES, la fluticasone inhalée diminue la masse du MLB d'environ 30% après trois mois de traitement (435), une réduction qui n'est pas potentialisée lorsque le traitement est prolongé durant un an et qui demeure plus du double comparativement aux chevaux sains (357). Un traitement prolongé aux CSI réduit l'épaississement de la membrane basale, et incidemment l'hyperréactivité bronchique dans l'asthme (461). Les altérations épithéliales peuvent aussi être améliorées par les CSI, avec entre autres une restauration des cellules épithéliales ciliées (453, 462) et une diminution du nombre de cellules à mucus (455). Un traitement de deux semaines à la prednisone ne réduit pas l'immunomarquage du TGF- β ni la quantité de collagène dans la sous-muqueuse des voies centrales dans l'asthme (222).

Justification de la recherche de thérapies alternatives aux glucocorticoïdes

Malgré leur efficacité clinique chez la majorité des patients asthmatiques, même de fortes doses de CSI et les GC oraux peuvent être insuffisants pour contrôler les symptômes et prévenir les

exacerbations dans l'asthme sévère. Les mécanismes pathologiques responsables de la corticorésistance sont peu élucidés, mais ils pourraient inclure une surrégulation des GCR- β (463) et des facteurs de transcription inflammatoires (443, 464). Une amélioration de moins de 15% du VEMS après un court traitement de GC oral (méthylprednisolone 40 mg, deux semaines) est suggérée comme critère clinique de corticorésistance dans l'asthme humain, alors qu'aucun paramètre n'existe pour définir ce phénomène dans l'AES. Parmi les caractéristiques cliniques associées à la corticorésistance chez l'humain, notons l'obésité (157), certaines déficiences (par exemple, la vitamine D (465)), le microbiome pulmonaire (466) et finalement, l'inflammation de type neutrophilique (10, 215).

En plus du phénomène de corticorésistance, les effets adverses des GC justifient la recherche de thérapies alternatives. Effectivement, ce sont les médicaments les plus souvent associés à des complications médicales (467), particulièrement lorsque des doses élevées sont requises (468). Incidemment, plus de 90% des asthmatiques sévères présentent des effets adverses liés à la prise de GC (469). La fragilité cutanée (470), l'ostéoporose (471), les désordres mentaux et les changements de comportement (32, 472), le diabète de type II (469), les cataractes (469) et les ulcères gastriques (469) représentent une liste non exhaustive des effets secondaires potentiels des GC. Les investigations de thérapies alternatives ou complémentaires aux GC sont donc nécessaires afin de permettre une diminution des doses administrées. Puisque des molécules biologiques efficaces existent pour les patients souffrant du phénotype éosinophilique (anticorps monoclonaux ciblant les IgE et les cytokines de type T2 (IL-4, IL-5, IL-13)), la recherche d'option thérapeutique est encore plus pertinente pour le phénotype neutrophilique. Malheureusement, les traitements ciblant le neutrophile, comme les antagonistes des récepteurs CXCR2 (119, 473), les anticorps monoclonaux contre le récepteur à l'IL-17 (brodalumab) (474) et un inhibiteur des phosphoinositide 3-kinase δ (nemoralisib) (475) ont donné des résultats mitigés jusqu'à présent. Dans ce projet doctoral, deux thérapies anti-neutrophiliques, le tamoxifène et les macrolides, ont été étudiées et seront décrites ci-bas.

Tamoxifène

Le tamoxifène a été synthétisé en 1962 dans le but initial de l'utiliser comme contraceptif. Cependant, malgré l'efficacité contraceptive chez le rat, le tamoxifène induit plutôt l'ovulation chez la femme, contrecarrant l'objectif initial (476). Malgré l'échec du tamoxifène dans son rôle initialement espéré, la molécule a été suggérée comme thérapie potentielle pour le cancer du sein peu de temps après la découverte de l'implication des récepteurs à l'œstrogène dans cette condition (476). Ainsi, depuis son introduction clinique dans les années 1970, le tamoxifène est largement utilisé pour le traitement et la prévention de récurrence ou d'incidence du cancer du sein chez les femmes à haut risque (477). Le profil sécuritaire de cette thérapie a propulsé son utilisation massive (477) et son importance dans le traitement des néoplasies mammaires lui vaut une place dans la liste des médicaments essentiels de l'Organisation Mondiale de la Santé depuis 1984.

Le tamoxifène fait partie des modulateurs sélectifs des récepteurs à l'œstrogène, agissant comme agoniste ou antagoniste selon la localisation tissulaire des récepteurs et l'espèce animale. Il est l'isomère *trans* du triphenyléthylène, lui conférant une activité généralement anti-oestrogénique. Son inhibition de la prolifération des cellules épithéliales mammaires par le blocage de la phase G₁ du cycle cellulaire et son antagonisme de la croissance cellulaire médiée par l'œstrogène expliquent son utilité dans le traitement du cancer du sein. Par contre, son efficacité dans le traitement de néoplasmes mammaires négatifs aux récepteurs à l'œstrogène, et dans d'autres types de tumeurs (par exemple, les carcinomes pancréatiques, les tumeurs dermoïdes, les gliomes malins) a élargi son utilisation (478) et a soulevé des interrogations concernant l'étendue de ses propriétés thérapeutiques. Les effets immunomodulateurs du tamoxifène ont d'abord été notés de façon anecdotique lorsque des patients traités pour le cancer du sein ont constaté une évolution favorable de maladies à médiation immune, comme la dermatomyosite (479) et la thyroïdite de Riedel (480-482). Des évidences expérimentales suggèrent que le tamoxifène pourrait être bénéfique dans le contrôle de l'inflammation et dans la guérison de traumatismes spinaux (483, 484).

Propriétés anti-neutrophiliques

Les propriétés anti-neutrophiliques du tamoxifène ont surtout été étudiées chez l'espèce équine. Chez le neutrophile équin, le tamoxifène diminue le chimiotactisme induit par le CXCL8 (485), atténue la cascade oxydative et augmente l'apoptose (11, 486) via une activation de la caspase 3 (487). Ces effets du tamoxifène ne seraient pas médiés par une interaction avec les récepteurs à l'œstrogènes nucléaires (α et β) ni membranaires (12). L'incubation des neutrophiles avec le tamoxifène augmente aussi leur phagocytose par les macrophages alvéolaires (488). Cependant, ces résultats sont contredits par les données d'une autre étude indiquant que le tamoxifène cause une augmentation de la phagocytose, du chimiotactisme et de la production de NETs par les neutrophiles humains, suggérant plutôt un effet inflammatoire de cette molécule (489). Il est possible que le tamoxifène agisse différemment selon les espèces, en fonction d'une modulation différentielle des récepteurs à l'œstrogène et de la localisation de ces derniers.

In vivo, l'efficacité clinique du tamoxifène a été étudiée chez un modèle d'inflammation pulmonaire aiguë induite expérimentalement chez des chevaux sains. Après une exposition antigénique (foin contaminé par des spores d'*Aspergillus fumigatus*), les chevaux sains ont développé de l'inflammation pulmonaire neutrophilique marquée qui a été considérablement réduite par un court traitement au tamoxifène (490). Le score clinique respiratoire et l'accumulation de mucus ont aussi été améliorés par cette thérapie. Cependant, les trouvailles de cette étude doivent être interprétées précautionneusement puisque l'exposition antigénique a été cessée en même temps que le début du traitement, ce qui aurait pu atténuer l'inflammation neutrophilique. De plus, les mécanismes impliqués dans le développement et l'entretien de l'inflammation pulmonaire sont vraisemblablement différents entre les animaux sains et les asthmatiques. Effectivement, l'inflammation n'est que transitoire lorsque du foin est introduit chez des chevaux sains (417). Ces résultats devraient donc être confirmés chez des animaux naturellement atteints d'asthme et a donc supporté la réalisation de l'étude 2 dans ce projet doctoral (*Efficacy of tamoxifen for the treatment of severe equine asthma*, p.151).

Effets respiratoires de l'œstrogène

Comme modulateur des récepteurs à l'œstrogène, le tamoxifène pourrait avoir certains effets respiratoires par l'activation ou l'inactivation de ces récepteurs au niveau pulmonaire. Diverses actions de l'œstrogène sur les cellules structurelles respiratoires sont effectivement décrites, incluant une relaxation du MLB (92, 491), une potentialisation de l'effet des agonistes β 2-adrénergiques (492), une réduction de la prolifération des myofibroblastes pulmonaires (493), une augmentation (494) ou au contraire, une diminution (495) de la production de mucus par les cellules épithéliales bronchiques. L'impact clinique de l'œstrogène chez la femme asthmatique est toutefois controversé. Le taux d'œstrogène endogène est négativement associé à la fonction pulmonaire chez les adolescentes (496), tandis que d'autres n'ont pas observé de telle corrélation (497). Son administration comme thérapie de remplacement hormonal postménopause est associée à l'incidence de l'asthme (498), à une détérioration de la fonction respiratoire et à une augmentation du besoin quotidien en bronchodilatateur (499). Finalement, certains rapportent une amélioration des symptômes asthmatiques avec l'utilisation d'œstrogène exogène (90), tandis que d'autres ont observé le contraire (500) ou une absence de changement (501). Le taux d'œstrogène est négativement associé à la concentration fractionnelle du monoxyde d'azote dans l'air expiré, indiquant que cette hormone pourrait atténuer l'inflammation pulmonaire dans l'asthme (497). Tous ces résultats contradictoires ne permettent donc pas de prédire clairement l'effet clinique potentiel du tamoxifène, qui peut agir soit en agoniste ou antagoniste des récepteurs à l'œstrogène, mais il est plausible que des variations de la fonction pulmonaire puissent survenir.

Macrolides

Les macrolides sont composés de macrocycle de lactone et sont particulièrement connus et utilisés pour leurs propriétés antibiotiques. Les molécules possédant 14 ou 15 atomes dans leur cycle lactone ont aussi des effets immunomodulateurs (14), incluant l'azithromycine, un macrolide synthétique de deuxième génération. Selon les plus récentes lignes directrices dans l'asthme, les macrolides peuvent être recommandés comme traitement additionnel pour les

patients dont la maladie n'est pas contrôlée par une dose élevée de CSI-BALA et après consultation avec un spécialiste (2). Chez les patients avec une inflammation de type T2, ce traitement devrait être considéré que si les thérapies biologiques ne sont pas disponibles ou se sont avérées inefficaces. Selon certains auteurs, les macrolides constituent le seul traitement qui a démontré une certaine efficacité clinique dans le traitement de l'asthme neutrophilique (102).

L'intérêt pour l'utilisation des macrolides dans les maladies respiratoires non infectieuses date des années 1960, où l'effet cortico-réducteur de la troléandomycine chez des patients asthmatiques sévères a été constaté (502). Dans les années 1980, l'augmentation fulgurante de la durée de vie des patients atteints de panbronchiolite traités avec un macrolide a propulsé l'intérêt envers cette classe de médicaments (503). La panbronchiolite est une maladie à prédisposition génétique caractérisée par le développement de nodules péribronchiques et par de l'inflammation neutrophilique. Les macrolides sont aussi bénéfiques dans la réduction d'exacerbations d'autres maladies respiratoires médiées par de l'inflammation neutrophilique (504), telles que la MPOC (505, 506), la fibrose kystique (507) et la bronchiectasie (508). Cependant, l'utilisation des macrolides dans l'asthme sévère demeure controversée étant donné les données contradictoires sur leur efficacité et le risque de développement d'antibiorésistance (509). Ainsi, leur usage devrait être réservé aux patients souffrant d'asthme sévère (510-512).

Effets cliniques des macrolides dans l'asthme

Plusieurs méta-analyses sur l'utilisation de macrolides dans l'asthme chez les adultes révèlent des résultats discordants sur leurs effets sur la fonction pulmonaire, le contrôle de l'asthme, la qualité de vie, le taux d'exacerbation et l'inflammation pulmonaire (Tableau 1, p.98). L'étude Cochrane la plus récente indique une diminution du taux d'exacerbations (513), ce qui représente un effet substantiel considérant le risque clinique et les coûts associés à ces dernières (41). Cette méta-analyse a aussi rapporté une amélioration significative du VEMS, de la qualité de vie et du contrôle de l'asthme, mais sans atteindre la différence minimalement importante cliniquement (513). Un court traitement à l'azithromycine (trois jours) lors d'exacerbation n'améliore pas les symptômes ni la fonction pulmonaire (514). Effectivement, les effets cliniques bénéfiques semblent nécessiter plusieurs semaines de thérapie. Les plus larges études randomisées effectuées sur les

macrolides (AMAZES et AZISAST) supportent qu'un traitement prolongé avec l'azithromycine (combiné au traitement usuel de l'asthme) diminue le taux d'exacerbation et améliore la qualité de vie sans modifier la fonction pulmonaire (13, 166). Ces résultats ne sont toutefois pas consensuels : l'addition d'azithromycine durant huit mois chez des patients asthmatiques sévères a amélioré le score de dyspnée et la fonction pulmonaire (VEMS), mais pas le taux d'exacerbation selon d'autres (515). De plus, certaines études rapportent des bénéfices des macrolides particulièrement chez les patients souffrant d'asthme neutrophilique (155, 166), alors que d'autres ont observé une amélioration peu importe le type d'inflammation présent (13). Les méta-analyses effectuées chez les enfants asthmatiques indiquent aussi une réduction du taux d'exacerbation (516) et une amélioration de la fonction pulmonaire (VEMS et débit expiratoire de pointe) par les macrolides (516), particulièrement chez les enfants dépendants aux GC oraux (517).

| Méta-analyses sur les macrolides dans l'asthme | ↑ VEMS | ↑ débit expiratoire de pointe | ↓ hyper-réactivité bronchique | ↑ contrôle de l'asthme | ↑ qualité de vie | ↓ exacerbation | ↓ inflammation pulmonaire |
|--|--------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------|----------------|--|
| Undela K et al. <i>Cochrane Database Syst Rev.</i> 2021 (513) | Oui | NE | NE | Oui | Oui | Oui | NE |
| Tian BP et al. <i>J Cell Mol Med.</i> 2019 (518) | Non | Non | NE | Non | Non | NE | Non |
| Hiles SA et al. <i>Eur Respir J.</i> 2019 (519) | Non | NE | NE | Non | Non | Oui | Non |
| Wang X et al. <i>Medicine (Baltimore).</i> 2019 (520) | Oui | Non | NE | Non | Non | Non | ↓ de la FENO chez les asiatiques |
| Tong X et al. <i>Pulm Pharmacol Ther.</i> 2015 (521) | Oui | Oui | Oui, chez les Caucasiens | Non | Non | NE | ↓ de la neutrophilie chez les Asiatiques |
| Reiter J et al. <i>Allergy.</i> 2013 (522) | Non | Oui | Oui | Oui | Oui | NE | NE |

Tableau 1. – Méta-analyses effectuées dans les 10 dernières années sur l'utilisation des macrolides dans l'asthme chez les adultes. FENO : concentration fractionnelle du monoxyde d'azote dans l'air expiré; NE : non évalué; VEMS : volume expiratoire maximal par seconde.

Effets des macrolides sur l'inflammation neutrophilique

Tout comme pour leurs effets cliniques, les changements anti-inflammatoires induits par les macrolides sont controversés. En plus de réduire la neutrophilie dans les expectorations, l'administration de clarithromycine durant huit semaines diminue la concentration de CXCL8, de MMP-9 et d'élastase chez des asthmatiques sévères, particulièrement dans le sous-groupe souffrant d'asthme non-éosinophilique (155). Toutefois, dans une méta-analyse regroupant des patients caucasiens et asiatiques, l'azithromycine atténue l'inflammation neutrophilique uniquement chez les asthmatiques asiatiques (521). Chez des patients affectés par de la toux chronique (incluant des asthmatiques), l'azithromycine réduit l'inflammation bronchique neutrophilique, mais pas éosinophilique (523). Tout comme chez les adultes, l'administration d'azithromycine réduit la neutrophilie dans les expectorations chez les enfants asthmatiques (524). Au contraire, l'addition prolongée d'azithromycine au traitement usuel de l'asthme dans l'étude AMAZES n'a pas diminué la neutrophilie dans les expectorations (13). Toutefois, une sous étude d'AMAZES rapporte une réduction des cytokines inflammatoires IL-6 et IL-1 β , ainsi que de l'ADN extracellulaire (marqueur de NETs) par l'azithromycine dans les expectorations d'asthmatiques sévères (165), suggérant que le simple dénombrement des neutrophiles n'est pas un indicateur fiable pour caractériser adéquatement les effets anti-inflammatoires des macrolides.

In vitro, les macrolides atténuent différentes propriétés des neutrophiles; ils induisent leur apoptose (525, 526), préviennent leur dégranulation (527) et leur relâche d'espèces réactives de l'oxygène (527, 528) et de NETs (527). L'azithromycine réduit l'expression génique des neutrophiles pour les cytokines IL-1 β , CXCL8, IL-6, TNF- α et du GM-FSC après une stimulation au LPS (529). Trois jours d'administration d'azithromycine chez des individus en santé engendrent un effet biphasique sur la dégranulation. Une augmentation de celle-ci est d'abord notée (2-24h après la dernière dose), puis elle est atténuée jusqu'à un mois après l'administration, un effet qui est accompagné d'une augmentation de l'apoptose neutrophilique (530). Les résultats de cette dernière étude doivent cependant être interprétés précautionneusement considérant l'absence de groupe contrôle. Finalement, les macrolides réduisent le chimiotactisme (531) et l'expression de molécules d'adhésion (532) chez les neutrophiles, deux mécanismes qui pourraient contribuer

à la diminution de la neutrophilie pulmonaire dans diverses maladies respiratoires inflammatoires. La forte concentration intracellulaire des macrolides au sein des neutrophiles (> 100 fois plus élevée que dans le plasma) (530) pourrait contribuer à leurs effets accentués sur cette cellule.

Effets des macrolides sur le remodelage bronchique

Plusieurs études rapportent une diminution de la masse du MLB par les macrolides dans des modèles expérimentaux d'asthme chez le rongeur (533-536), mais leurs effets sur le remodelage dans l'asthme humain sont quasi inexplorés. L'addition d'azithromycine à la thérapie usuelle (CSI-BALA) durant huit mois chez des patients asthmatiques sévères augmente l'aire de la lumière bronchique, mais sans modifier l'épaisseur de la paroi des voies respiratoires évaluée par tomodynamométrie (515). L'administration de clarithromycine durant six semaines réduit l'œdème de la sous-muqueuse dans l'asthme léger à modéré (537). Toutefois, un traitement de six semaines d'azithromycine ne modifie pas l'épaisseur épithéliale ni le nombre de cellules à mucus dans les bronches centrales dans l'asthme modéré à sévère (538).

Autres modes d'action possibles des macrolides dans l'asthme

En plus de leurs propriétés anti-inflammatoires, plusieurs hypothèses sont émises concernant les mécanismes impliqués dans les effets bénéfiques des macrolides dans l'asthme.

Effets antimicrobiens

Les propriétés antimicrobiennes des macrolides pourraient contribuer à leur efficacité dans l'asthme, mais les données sont contradictoires. Par exemple, une réduction de l'hyperréactivité bronchique par la clarithromycine est observée chez les patients asthmatiques possédant une plus grande diversité de leur microbiome respiratoire (539). Dans le même sens, l'administration à long terme d'azithromycine chez des asthmatiques sévères réduit la diversité microbienne dans les expectorations et l'abondance d'*Haemophilus influenzae* (540), une bactérie possiblement impliquée dans la pathophysiologie de l'asthme (81). D'ailleurs, les diminutions de la cytokine inflammatoire IL-1 β et de la charge d'*Haemophilus influenzae* dans les expectorations sont corrélées après un traitement à l'azithromycine (165). Les macrolides sont efficaces contre

certaines bactéries atypiques. Conséquemment, une administration de clarithromycine durant six semaines augmente le VEMS seulement chez les patients asthmatiques ayant un résultat PCR positif pour *Chlamydia pneumoniae* ou *Mycoplasma pneumoniae* (541). Au contraire, l'azithromycine n'était pas plus efficace chez des patients séropositifs pour *Chlamydia pneumoniae* dans une autre étude (511). Des effets positifs des macrolides peuvent toutefois être observés en l'absence d'infection ou de surcroissance bactérienne. Chez de jeunes enfants, le raccourcissement des épisodes d'exacerbation obtenu par un court traitement à l'azithromycine n'est pas affecté par la présence d'infection bactérienne ou virale (542). Les études expérimentales chez les rongeurs exempts de pathogènes ont aussi permis de démontrer que les effets bénéfiques des macrolides ne sont pas uniquement dus à leurs propriétés antibiotiques (543). L'effet antimicrobien des macrolides pourraient aussi contribuer à leur effet cortico-réducteur puisque certaines bactéries ont la capacité de dégrader les GC (539).

Les macrolides possèdent aussi des propriétés antivirales qui pourraient contribuer à leurs effets bénéfiques dans l'asthme vu l'implication de certains virus dans le développement d'exacerbation, tels que les rhinovirus. Les cellules épithéliales nasales prétraitées à la clarithromycine sont moins susceptibles à une infection expérimentale avec le rhinovirus de type 14 (544). Similairement, les cellules épithéliales bronchiques traitées à l'azithromycine sont davantage résistantes à une infection expérimentale au rhinovirus grâce à une production augmentée d'interféron (545). Les effets antiviraux des macrolides n'ont toutefois pas été suffisamment investigués pour en déterminer l'importance clinique.

Modulation des cellules structurelles bronchiques

La modulation de la biologie des cellules musculaires lisses *in vitro* par les macrolides pourrait expliquer la réduction de la masse du MLB observée chez les modèles expérimentaux d'asthme chez le rongeur (533-536). L'azithromycine induit l'autophagie (546, 547), augmente l'apoptose (546) et atténue la prolifération des cellules musculaires lisses (547), ce qui pourrait avoir des répercussions cliniques importantes dans une maladie où l'augmentation de la masse du MLB est surtout imputée à l'hyperplasie cellulaire (280). De plus, l'azithromycine relaxe le MLB (548) en inhibant l'accumulation intracellulaire de calcium (549). L'addition d'azithromycine à

l'isoprénaline, un agoniste β 2-adrénergique, potentialise son effet myorelaxant sur les cellules musculaires lisses, suggérant que la combinaison de ces médicaments pourrait avoir un effet bronchodilatateur synergique (549).

Les macrolides réduisent la sécrétion de mucus par les cellules épithéliales bronchiques, augmentent la clairance mucociliaire (538, 550-552) et diminuent l'apoptose des cellules épithéliales (535). L'azithromycine atténue la perméabilité de la barrière épithéliale et la sécrétion de MMP-9 par les cellules épithéliales *in vitro* (538). Toutefois, ces derniers résultats n'ont pas été reproduits *in vivo*, puisqu'une administration d'azithromycine durant six semaines n'a pas modifié la quantité de cellules à mucus, l'épaisseur de l'épithélium, ni la concentration de MMP-9 dans les lavages bronchiques chez des asthmatiques (538). Néanmoins, cette étude était limitée par le faible nombre de patients inclus et l'absence de groupe contrôle.

Autres mécanismes potentiels

Chez certains patients, l'effet bénéfique des macrolides pourrait être dû à ses propriétés prokinétiques (agoniste des récepteurs motiline) qui pourraient atténuer le reflux gastro-œsophagien qui aggrave parfois les signes respiratoires dans l'asthme (553). Finalement, l'effet cortico-réducteur des macrolides a parfois été attribué à leur inhibition du cytochrome P450 qui altère le métabolisme des GC (554). Toutefois, ceci ne s'applique pas à l'azithromycine qui n'interagit pas avec ce système enzymatique hépatique (555).

Ouverture

Le phénotype neutrophilique de l'asthme requiert l'investigation de thérapies spécifiques pour améliorer l'instauration de la médecine personnalisée. Combinés, les effets anti-inflammatoires du tamoxifène, son apparente efficacité clinique dans un modèle expérimental d'inflammation neutrophilique équin et les effets respiratoires de l'œstrogène, quoique contradictoires, ont justifié l'étude clinique de cette molécule dans le cadre de ce projet doctoral (article 2 - *Efficacy of tamoxifen for the treatment of severe equine asthma*, p.151 (556)). Ensuite, les propriétés immunomodulatrices, leurs effets sur la biologie des cellules musculaires lisses, et l'efficacité

possiblement plus marquée dans le phénotype neutrophilique ont tous justifié l'étude de l'azithromycine, seul ou combiné aux GC, dans ce doctorat (article 3 – *Randomised study of the immunomodulatory effects of azithromycin in severely asthmatic horses*, p.173 (557) et article 4 – *Effects of azithromycin on bronchial remodeling in the natural model of severe neutrophilic asthma in horses*, p.204 (558)).

Objectifs et hypothèses

Prémisse

Bien que l'asthme puisse généralement être contrôlé par l'administration de GC, la maladie demeure incurable chez l'humain, et chez le cheval dans sa forme sévère. Puisque l'inflammation neutrophilique est associée à la sévérité de la condition, il est primordial de déterminer si son atténuation peut améliorer l'issue clinique.

Objectifs généraux

- Déterminer si une thérapie visant l'inflammation neutrophilique peut améliorer la fonction pulmonaire et atténuer les lésions de remodelage bronchique dans l'asthme.
- Étudier des mécanismes potentiellement impliqués dans l'association entre l'inflammation neutrophilique et la sévérité de l'asthme.

Objectifs spécifiques

- Décrire les effets des GC dans l'asthme équin, incluant leurs impacts sur la fonction pulmonaire, l'inflammation neutrophilique et le remodelage bronchique, et leurs limites dans le traitement de la condition (article 1).
- Identifier une thérapie pouvant atténuer l'inflammation neutrophilique dans l'asthme (articles 2 et 3).
- Déterminer si un traitement qui diminue l'inflammation neutrophilique potentialise les effets des CSI sur le remodelage bronchique dans l'asthme, avec un intérêt particulier pour l'augmentation de la masse du MLB (article 4).
- Étudier l'effet des vésicules extracellulaires neutrophiliques sur la prolifération du muscle lisse bronchique dans l'asthme (article 5).

Hypothèse générale

- L'inflammation neutrophilique contribue au remodelage bronchique dans l'asthme, d'où le corollaire suivant : le contrôle de la neutrophilie pulmonaire permet d'atténuer les lésions de remodelage bronchique chroniquement établies et incidemment d'améliorer la fonction pulmonaire.

Méthodes

Survol du plan expérimental

Articles 2 et 3 : recherche de thérapies anti-neutrophiliques

Objectif

- Déterminer si un court traitement au tamoxifène ou à l'azithromycine permet de diminuer l'inflammation neutrophilique dans l'AES

Article 4 : étude de l'administration prolongée d'azithromycine et de CSI

Objectif

- Déterminer si le contrôle de la neutrophilie par les macrolides potentialise les effets des CSI sur la fonction pulmonaire et sur le remodelage bronchique

Article 1 : revue de littérature sur les GC dans l'AES

Objectif

- Décrire les impacts des GC dans l'AES, incluant leurs effets sur l'inflammation neutrophilique et sur le remodelage bronchique

Article 5 : effet des VEs neutrophiliques sur la prolifération du MLB

Objectifs

- Évaluer l'effet des VEs neutrophiliques sur la prolifération du MLB dans l'AES
- Caractériser le contenu protéique des VEs neutrophiliques
- Identifier des protéines potentiellement impliquées dans l'hyperplasie du MLB

Chronologie




Figure 11. – Chronologie des études incluses dans la thèse. AES : asthme équin sévère; CSI : corticostéroïdes inhalés; MLB : muscle lisse bronchique; VEs : vésicules extracellulaires.

Les GC ne permettent pas d'atténuer l'inflammation neutrophilique dans l'asthme humain, en plus d'être souvent insuffisants pour normaliser la fonction pulmonaire dans le phénotype neutrophilique. Les données sont éparses et variables sur l'effet des GC sur l'inflammation pulmonaire dans l'asthme équin. La première étape de ce projet a donc été de répertorier et de décrire leurs impacts sur la fonction pulmonaire, l'inflammation et le remodelage bronchique dans une revue de littérature narrative (article 1 - *Glucocorticoid therapy in horses with asthma: A narrative review*, p.110). Cette revue de littérature démontrant l'absence de normalisation de l'inflammation neutrophilique par les GC dans l'AES, tout comme observé dans l'asthme humain, l'étape expérimentale subséquente a été de trouver un traitement qui permettrait de réduire la neutrophilie pulmonaire. De courtes études cliniques randomisées avec des molécules possédant un potentiel d'atténuer l'inflammation neutrophilique ont donc été effectuées. Les effets du tamoxifène sur la fonction pulmonaire et l'inflammation neutrophilique ont été comparés à ceux de la dexaméthasone dans l'AES (article 2 - *Efficacy of tamoxifen for the treatment of severe equine asthma*, p.151). Le traitement au tamoxifène a réduit marginalement la résistance pulmonaire, mais sans modifier la neutrophilie; ce qui a mis un terme à l'investigation de cette thérapie. L'administration d'azithromycine a été comparée à celle d'un autre antibiotique à large spectre (ceftiofur), et seulement le macrolide a permis de réduire des marqueurs de l'inflammation neutrophilique (article 3 - *Randomised study of the immunomodulatory effects of azithromycin in severely asthmatic horses*, p.173). Ces résultats encourageants, combinés à la littérature prometteuse sur les macrolides dans l'asthme neutrophilique, ont justifié la poursuite des investigations de ce projet doctoral avec cette thérapie. Dans l'article 4 (*Effects of azithromycin on bronchial remodeling in the natural model of severe neutrophilic asthma in horses*, p.204), l'administration prolongée d'azithromycine, combinée au traitement usuel de l'asthme (CSI) a été évaluée, avec une emphase sur son impact sur le remodelage bronchique. Finalement, l'effet des vésicules extracellulaires neutrophiliques sur la prolifération du MLB dans l'asthme a été examiné dans l'article 5 (*Neutrophil extracellular vesicles and airway smooth muscle proliferation in the natural model of severe asthma in horses*, p.247).

Résultats

Article 1 - Glucocorticoid therapy in horses with asthma: A narrative review

Sommaire

Bien que l'amélioration de l'obstruction respiratoire par les GC dans l'asthme équin sévère soit bien établie, les données concernant leurs effets sur l'inflammation neutrophilique et sur le remodelage bronchique sont moins nombreuses et plus mitigées. Cet article avait pour objectifs de rapporter les impacts des GC sur la fonction respiratoire, l'inflammation pulmonaire et le remodelage bronchique dans l'asthme équin sévère, en plus de proposer des pistes d'investigation basées sur les données recueillies. Cette revue de littérature a illustré l'absence de normalisation de l'inflammation neutrophilique par les GC, mais a tout de même dénoté leur capacité à atténuer le degré d'activation des neutrophiles et leur production de certains médiateurs inflammatoires.

Contribution

J'ai contribué à l'élaboration de la méthodologie de recherche de la littérature (70%), à la sélection et à l'inclusion des articles (100%) et à l'écriture du manuscrit (90%).

Article publié

J Vet Intern Med. 2021 Jul;35(4):2045-2057. Reprinted with permission of John Wiley and Sons publishing without content modification (open access, Creative Commons Attribution Non-Commercial 4.0 International). Copyright © 2021 John Wiley and Sons publishing.

<https://doi.org/10.1111/jvim.16189>

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Glucocorticoid therapy in horses with asthma: A narrative review

Sophie Mainguy-Seers, Jean-Pierre Lavoie

Université de Montréal, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Clinical Sciences, 3200 Sicotte street, St-Hyacinthe, J2S 2M2, QC, Canada.

Corresponding author: Jean-Pierre Lavoie, Université de Montréal, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Clinical Sciences, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, J2S 2M2, Quebec, Canada.

Keywords: corticosteroid, dexamethasone, heaves, horse, inhalation.

Abbreviations: ASM, airway smooth muscle; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; CXCL-8 (interleukin-8); GC, glucocorticoid; GCR, glucocorticoid receptor; HPA, hypothalamic-pituitary-adrenal; IAD, inflammatory airway disease; IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharides; mRNA, messenger ribonucleic acid; NETs, neutrophil extracellular traps; NF- κ B, nuclear factor-kappa B; SEA, severe equine asthma.

Acknowledgment: Funding provided by the Fonds de Recherche du Québec en Santé, 272483 (doctoral scholarship; Sophie Mainguy-Seers). We thank Marie-Claude Poirier for her assistance with the literature search.

Conflict of Interest Declaration: Authors declare no conflict of interest.

Off-label Antimicrobial Declaration: Authors declare no off-label use of antimicrobials.

Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) or Other Approval Declaration: Authors declare no IACUC or other approval was needed.

Human Ethics Approval Declaration: Authors declare human ethics approval was not needed for this study.

Abstract

Despite substantial research efforts to improve the treatment and outcome of horses with asthma, glucocorticoids (GC) remain the cornerstone of drug therapy of this prevalent disease. The high efficacy of GC to relieve airway obstruction explains their extensive use despite potential deleterious effects. However, much is yet to be uncovered concerning GC use in horses with asthma, including the comparative efficacy of the different drugs, the determination of minimal effective doses and the mechanisms underlying their variable modulation of airway inflammation. The objectives of this structured review were to report and compare the plethora of effects of the various GC used in asthmatic horses with a focus on impact on lung function, airway inflammation and bronchial remodelling. Adverse effects are also briefly described, with an emphasis on those that have been specifically reported in horses with asthma. Ultimately, we aimed to highlight gaps in the literature and to identify future research areas.

Introduction

Asthma is a frequent and debilitating pulmonary disease affecting horses worldwide. This chronic non-infectious inflammatory condition varies from mild and moderate, formerly known as "inflammatory airway disease", to the more severe disease previously known as "recurrent airway obstruction" or "heaves". Clinical exacerbations of severe asthma (SEA) occur when affected horses, mostly adults living in temperate climates, are exposed to antigenic triggers, such as moulds and dust present in hay and bedding. In warmer regions, exacerbations of pasture asthma are more common during periods of high heat, humidity, and airborne fungal spores and grass pollen concentrations (1). Clinical signs include cough, nasal discharge, exercise intolerance and increased respiratory effort at rest. Diagnosis involves exclusion of other respiratory diseases, characterization of airway inflammation (generally >25% neutrophils in bronchoalveolar lavage fluid [BALF] during exacerbations) and, ideally, an assessment of lung function (2). The latter is mostly limited to research settings due to the complexity and portability of currently available equipment. Therefore, the evaluation of lung function has been mostly used in research facilities to assess drug efficacy.

The milder forms of asthma affect horses of all ages and include heterogeneous phenotypes with variable BALF inflammatory subsets (elevated proportion of mast cells or neutrophils or eosinophils or a combination of these inflammatory cells). The presence of cough and nasal discharge suggest a respiratory condition in some cases, but the diagnosis is less straightforward in instances where poor performance is the only complaint. Even though the terminology "asthma" incorporates the spectrum of inflammatory respiratory conditions in horses, it does not reflect a continuum in the disease, nor a common pathogenesis (2).

Antigen avoidance is the strategy of choice to manage SEA and it is achieved by modifying the diet, mainly by replacing dry hay by less dusty hay alternatives, and by reducing the environmental antigenic exposure. Yet, this approach is not always feasible or adequately implemented, and weeks to months can be required to normalize the lung function. Conversely, glucocorticoids (GC) have the advantage of relieving airway obstruction much faster than antigen avoidance (3, 4), making these drugs the cornerstone of therapy of asthma. The impacts of GC on lung function, pulmonary inflammation, bronchial remodelling, as well as their adverse effects in

horses with asthma will be addressed here. The objectives of this review were to explore current knowledge on GC use in asthmatic horses and to identify gaps in the literature to guide future research. While GC have been mainly studied in horses with SEA, their use is largely extrapolated to the treatment of milder forms of asthma (2) and they are generally considered effective to control pasture asthma (5, 6). Even though asthma in horses and humans share many similarities (7), these are different and heterogeneous conditions for which treatment response, including to GC therapy, needs specific investigation.

Materials and methods

Searches of PubMed, CAB Abstracts and Web of Sciences databases were performed until October 19 2020 using the key words (horse* OR equine OR Equidae OR Equus) AND (glucocorticoid* OR corticosteroid* OR dexamethasone OR prednisolone OR prednisone OR triamcinolone OR isoflupredone OR methylprednisolone OR fluticasone OR beclomethasone OR betamethasone OR ciclesonide OR budesonide) AND (asthma* OR "recurrent airway obstruction" OR heaves OR COPD OR "chronic obstructive pulmonary disease*" OR "inflammatory airway disease*" OR "IAD" OR "broken wind" OR "small airway disease*"). A snowball selection was also applied to incorporate additional publications. Case reports, case series, retrospective studies, prospective clinical trials, systematic reviews, meta-analyses, and letters, but not narrative reviews, book chapters or meeting abstracts, were included in this manuscript. The literature search was restricted to studies available in English or French. After removal of duplicates using the reference manager ENDNOTE (version X9.3.3), the search yielded 210 resources from which titles and abstracts were screened for relevance to this manuscript (the papers had to concern GC, asthma and the equine species), leaving 85 articles eligible for full-text review. Then, 61 additional references were obtained from snowballing or to support the information presented.

Results

Mechanisms of action of glucocorticoids

Endogenous corticosteroids include mineralocorticoids, androgenic steroids (androgens, estrogens, progestogens), and GC. The latter are synthesized enzymatically from cholesterol in the *zona fasciculata* of the adrenal glands (8) in response to stimulation by the adrenocorticotropic hormone (ACTH). The pituitary gland produces ACTH after stimulation by the corticotropin-releasing hormone originating from the hypothalamus in response to stress.

The numerous GC targets result in a multifaceted reduction of inflammation (9). Glucocorticoid receptors (GCR) are found in all tissues, with the isoform GCR- α being the most widely expressed and the main effector of GC functions. Glucocorticoid receptor β does not bind GC, but it can modulate steroid response by its interactions with DNA of GC responsive genes, a mechanism possibly contributing to resistance to therapy (10, 11). The potent anti-inflammatory actions of GC are mediated primarily by effects on gene transcription (genomic effects). The lipophilic GC can penetrate the cell membrane freely to bind the cytoplasmic GCR- α . This binding causes the release of chaperone molecules and subsequent translocation of the GC-GCR complex to the nucleus. There, the interactions with GC responsive elements lead to transactivation (increase in gene expression) (8) of anti-inflammatory genes, such as interleukin (IL)-10, or transrepression (decrease in gene expression) of pro-inflammatory genes. Transrepression mostly occurs through the modulation of DNA-bound transcription factors, notably nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and activator protein-1 (8). Of note, the NF- κ B pathway is responsible for the production of several pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules in response to various stimuli (9) and it is overexpressed in many inflammatory diseases, including SEA in which its expression in bronchial cells correlates with lung dysfunction (12).

Because modification of gene expression and subsequent protein translation take hours, these genomic effects have a delayed onset of action. On the contrary, non-genomic mechanisms can occur within minutes and are caused by interactions with the cellular membrane or with the cytosolic or membrane-bound GCR. The consequences of non-genomic actions of GC are being increasingly recognized in the treatment of asthma in humans (13) and their effects, including

alteration of calcium intracellular levels, reduced smooth muscle contraction and modulation of reactive oxygen species production, are summarized elsewhere (14). Although seldom studied in horses, the non-genomic actions of GC on neutrophils are mediated in part by the GCR (15).

The pharmacokinetics and pharmacodynamics of different GC used in horses have been reviewed recently (16).

Effects of glucocorticoids on lung function

The effects of GC on lung function have been mainly studied in horses with SEA in research settings. In these conditions, the improvement is evident within a few days of therapy, but inhaled and systemic corticosteroids have limited residual effect after cessation of the treatment (17-20). For this reason, when GC use is required, it should be combined with modifications of dietary and environmental conditions.

Meta-analysis evaluating the effects of GC on clinical score (21) and lung function (22) in asthma did not detect a difference in the magnitude of improvement between systemic and inhaled use. However, when inhaled GC are directly compared to appropriate systemic administration, the latter is never inferior, but often superior (17, 18, 23-25). Instances where inhaled administration is more effective involve comparison with either prednisone (26), which is not bioavailable in horses (27) or the long-acting formulation of dexamethasone 21-isonicotinate, which was possibly used at too low a dose according to the authors (28). Furthermore, it is expected that systemic administration should result in a faster and greater improvement in horses suffering from severe airway obstruction in which mucus accumulation, bronchospasm and cough might impair lower airways deposition of inhaled medication. A brief review supported that systemic administration has a faster onset of action than by inhalation (29).

The effects of GC on arterial blood gas are conflicting (30-34). The lack of a control group (33, 34) or the combination of GC administration with environmental modifications and bronchodilators (30, 31), complicated the interpretation of the results.

Systemic use of glucocorticoids

Dexamethasone is a highly potent GC and the most studied in the treatment of asthma. Consequently, it was used as a positive control in several studies assessing the effects of novel drugs on airway inflammation and lung function in SEA. When compared to a phosphodiesterase-4 inhibitor (theophylline) (35), a new generation phosphodiesterase-4 inhibitor (L-826,141) (36), a MAPK p38 inhibitor (37), a leukotriene D4 receptor antagonist (20), and a selective estrogen receptor modulator (tamoxifen) (38), the effects of dexamethasone (0.04-0.06 mg/kg q24h, IV or PO, 7-14 days) on lung function were never equalled.

Intravenous (0.04-0.1 mg/kg q24h) (23, 35, 39, 40) and oral (0.05 mg/kg q24h) (41) therapy with dexamethasone improves lung function of horses with SEA within three days. Faster relief of airway obstruction occurs with transient changes noted six hours after oral administration (at dosage of 0.164 mg/kg and 0.082 mg/kg) and as early as two hours after IV administration (0.1 mg/kg) in horses with SEA (19). Dexamethasone (0.1 mg/kg, IV, q24 h, seven days) improves the clinical score, the lung function, the mucus score and the cough frequency during exacerbation of SEA (42).

The oral administration of a low dose (5 mg) of injectable dexamethasone for a week improves the lung function and the clinical score of horses with SEA, although to a magnitude insufficient for clinical use (25). Given the poor improvement observed with the oral administration of the injectable dexamethasone (25, 35), it is advisable to administer products intended for oral use. Interestingly, the bioavailability of dexamethasone powder is better than that of the injectable forms in fasting horses, whereas it is similar when they are fed (43).

Because treatment adherence is sometimes not achieved in clinical settings (44), and objective lung function measurements are lacking, GC efficacy is more challenging to discern in such conditions. Dexamethasone administered in the home environment by the usual caregiver (0.08 mg/kg q24h four days, 0.04 mg/kg q24h four days, then 0.04 mg/kg q48h eight days, PO) to SEA horses, does not improve the clinical scores despite concurrent environmental modifications and bronchodilator administration (45). As suggested by the authors, these results could have been biased by the low number of animals included, the various housing conditions and the presence

of an outlier. In contrast, owners and trainers were able to identify an improvement in performance, coughing, nasal discharge and breathing difficulty in horses with varying degree of asthma treated with dexamethasone (0.1 mg/kg, PO, q24, three weeks) in their usual environment (32). In that study, a single assessment by a veterinarian did not differentiate between the horses receiving the placebo or the GC, although the respiratory frequency and the hypoxemia significantly improved (32).

The efficacy of the dexamethasone-21-isonicotinate formulation and its ideal dose for the treatment of asthma are unclear. While a single intramuscular administration (0.06 mg/kg) with a 10-day follow-up does not improve lung function (28), others observed a reduction of airway obstruction with another posology (0.04 mg/kg IM every three days for 10 days) (39).

The effects of GC in the milder forms of asthma have been little investigated. The clinical usefulness of dexamethasone (0.05 mg/kg IM q24h, 15 days) is supported by the decrease of airway hyperresponsiveness in mild-moderate asthmatic horses (46). However, in smoke-induced mild asthma, administration of dexamethasone (20 mg IM q24h, 16 days) does not potentiate the enhanced performance and VO_2 peak obtained with the improvement of air quality (47).

Another potential benefit of GC in the clinical management of airway obstruction is the prevention of tachyphylaxis to β_2 -adrenergic agonists. Dexamethasone (0.1 mg/kg IV q24h, five days) prevents the clenbuterol-induced β_2 -adrenergic receptor density downregulation on equine lymphocytes (48). Thus, it is commonly recommended to use β_2 -adrenergic agonists and GC concomitantly to prevent reduced efficacy of the bronchodilator. However, this effect might be cell-dependant as dexamethasone (100 μ M) does not prevent the agonist-induced downregulation in equine bronchial fibroblasts (49).

Prednisolone administration (2 mg/kg PO q24h, seven days) ameliorates the airway obstruction in SEA, but less so than dexamethasone (0.05 mg/kg PO q24h) despite a similar suppression of cortisol production (41). In contrast, treatment with prednisolone (1 mg/kg four days, 0.75 mg/kg four days and then 0.5 mg/kg four days, PO) improved the clinical score in SEA similarly to dexamethasone (0.1 mg/kg four days, 0.075 mg/kg four days and 0.05 mg/kg four days, IM) in

another study. However, the environmental modifications performed concurrently made assessment of the GC response equivocal in this latter study (50).

The poor efficacy of prednisone in SEA is expected because of its low gastrointestinal absorption (27). Furthermore, prednisone is an inactive pro-drug and the hepatic metabolism required to obtain active metabolites is suspected to be inadequate in horses. Accordingly, prednisone (2.2 mg/kg q24 PO, 10 days (51) and a one-month decreasing regimen starting at 500 mg q12h PO (26)) does not improve lung function when used concurrently with environmental changes in SEA. When the antigenic exposure of the asthmatic subjects is unchanged, a 10-day prednisone administration (1 mg/kg q24h PO) does not modify lung function (39). In two SEA horses used to assess the sensitivity of forced expiration technique to detect response to therapy, lung function improved with prednisone administration (1 mg/kg q12 h PO, 14 days), however environmental changes were implemented simultaneously (52).

Triamcinolone acetonide, a potent long-acting GC, is typically administered intramuscularly or intraarticularly. A single dose (0.08-0.09 mg/kg IM) improves the lung function for approximately four weeks in SEA (53, 54). Notably, this dose administered once intraarticularly has a similar potency to relieve airway obstruction, which suggests that enhanced performance perceived after such use might be related to a pulmonary condition rather than a locomotor disease in some cases (54).

Similarly, the intra-articular administration of methylprednisolone acetate (200 mg once) ameliorates lung function in SEA, but the effect is mild, transient and likely without clinical relevance. Indeed, the pulmonary resistance decreased within 24 hours, but returned to baseline three days after administration (55). The same dose administered intramuscularly does not relieve airway obstruction (55).

Isoflupredone acetate (0.03 mg/kg IM q24h, two weeks) improves lung function similarly to dexamethasone (0.04 mg/kg IV q24h, two weeks) in SEA (40). However, the hypokalaemia resulting from the high mineralocorticoid activity of isoflupredone is a concern in horses (40).

Inhaled administration of glucocorticoids

Beclomethasone dipropionate is a prodrug requiring cleavage by esterase enzymes within the lung to become pharmacologically active, limiting its systemic bioavailability (56). Several regimens of beclomethasone have been investigated for the treatment of SEA. Doses as low as 500 µg improve lung function within 24 hours (57), although the same dose (500 µg q12h) administered for 10 days in horses kept in an antigenic environment ameliorated but did not normalize lung function (28). Inhalation of beclomethasone (1320 µg q12h, seven days) relieves airway obstruction, but possibly less so than dexamethasone (0.1 mg/kg IV) (23). When given at a higher dose for a longer duration (3750 µg q12h, 15 days) in horses kept in stable environmental conditions, beclomethasone improves lung function starting a week after initiation of treatment with some animals having normal lung function at the end of therapy (33). However, these results need to be interpreted with caution as there was no control group (33). The PaO₂ and PaCO₂ were not significantly altered by the treatment in that study. Conversely, the administration of beclomethasone (1600 µg q24h, 10 days) to horses with SEA kept in their natural environment improved the PaO₂ after treatment and also eight weeks later. However, this study lacked a placebo control group and the unusual persistence of beneficial effects suggests that the antigenic exposure was not stable, despite effort to do so (34). The reduction of airway obstruction by beclomethasone is supported by in vitro experiments in which precision-cut lung slices from horses without respiratory disease were studied. The bronchoconstriction induced by leukotriene C₄ is attenuated by beclomethasone and the rapid onset of action (< 30 minutes) suggests a non-genomic mechanism of action (58).

Fluticasone is an inhaled GC for which systemic adverse effects are less likely considering its low oral bioavailability (<1%) (56) and its efficacy attributable to local lung absorption (59). Despite these favourable properties, it is detectable in plasma after inhalation in horses (60).

Fluticasone (2000 µg q12h) administered to horses with SEA kept in an antigenic environment markedly improves lung function after a month (3). The degree of airway obstruction then remains stable for the next five months of therapy, but further improves when the horses are moved to a low antigenic environment. However, even after 11 months of fluticasone treatment

(including antigen avoidance for the last five months), some residual bronchospasm can persist (3). In contrast, the combination of fluticasone (2500 µg q12h) and salmeterol (250 µg q12h; a long-acting β₂-agonist) normalizes respiratory mechanics within a week and no residual bronchospasm is present after 12 weeks of therapy (4), indicating that GC and β₂-adrenergic agonists might act synergistically. Of note, fluticasone improved lung function faster than environmental management in these two trials (3, 4). Interestingly, fluticasone (1980 µg q12h) hastens the improvement in lung function only in SEA horses with the most severe airway obstruction when used in combination with antigen avoidance strategies (26). Fluticasone (2000 µg q12h, five days) used with bronchodilators and antigen avoidance did not improve respiratory signs in two horses with an unusual presentation of SEA (> 80% eosinophils in BALF) (61).

In the prevention of exacerbations, a high dose of inhaled fluticasone (6 mg BID, seven days) is as effective as dexamethasone (0.1 mg/kg IV q24h, seven days). However, the latter is more potent in the treatment of exacerbation (24).

In mild asthmatic horses, inhaled fluticasone (3000 µg q12h, 15 days) decreases airway hyperresponsiveness similarly to dexamethasone (0.05 mg/kg IM q24h) (46).

Ciclesonide is a prodrug activated by esterase within the lungs to confer pharmacological activity (56). Its high protein-binding in circulation likely limits its systemic effects as GC linked to proteins do not activate their receptors (56). Ciclesonide aerosolized using the Soft Mist™ technology, and a novel administration system, improves lung function during exacerbation of SEA, with the regimen of 2700 µg q12h being maximally effective (18) with results comparable to those obtained with dexamethasone (0.066 mg/kg PO q24h, two weeks).

Inhaled budesonide has dose-dependent effect on lung function of horses with SEA and the dosage of 1800 µg q12h for two weeks is as potent as dexamethasone (0.04 mg/kg IV q24h) (17). Nebulized budesonide (1500 µg q12h, 10 days) improves the respiratory clinical score during exacerbation of SEA, but not during remission (62). The interpretation of these latter results needs caution as a low-dust environment was also implemented and the study lacked a control group (62).

The nebulization of the injectable form of dexamethasone (5 mg q24h, seven days) does not improve lung function in SEA, while it significantly suppresses the endogenous cortisol production (25). These results contrast from findings in healthy horses, where nebulized dexamethasone at the same dose does not suppress the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and has a low systemic bioavailability (63). The suppression of the HPA axis in asthmatic horses and not in controls is consistent with another study where the plasma concentration of inhaled budesonide was significantly greater in SEA than in healthy horses (64). The authors suggested that this might be caused by an increased pulmonary absorption of drugs by the diseased epithelium. Alternatively, it could be explained by a higher delivery to the gastrointestinal tract in asthmatic animals because of greater airway obstruction, cough, or mucus accumulation impairing penetration in lower airways. The plasma and urinary clearance of nebulized dexamethasone has been described (65).

Effects of glucocorticoids on inflammation

Effects of glucocorticoids on bronchoalveolar lavage fluid cell populations

Despite the potent anti-inflammatory effects of GC, these drugs generally fail to normalize airway neutrophilia unless antigen avoidance is implemented concurrently.

In horses in chronic exacerbation kept in a constant antigenic environment, parenteral dexamethasone (0.04 mg/kg IV q24h, 14 days) does not modify airway neutrophilia despite normalization of the lung function (20, 36, 37). Similarly, oral administration (0.1 mg/kg q24h, three weeks (32) or 0.06 mg/kg q24h, 14 days (66)) does not reduce airway neutrophilia when the environment is unchanged. A shorter treatment with a higher dose (0.1 mg/kg IV, three days) also fails to improve pulmonary inflammation in SEA (24). In another study, the administration of dexamethasone (0.04 mg/kg IV q24h, two weeks) significantly decreased airway neutrophilia even when antigen avoidance was not implemented, but the percentage of neutrophils failed to normalize in most horses (17). The limited information available in milder forms of asthma is similar: treatment with intramuscular dexamethasone (0.05 mg/kg q24h, 15 days (46) and 20 mg q24h, 10 days (67)) does not decrease BALF neutrophils, eosinophils or mast cells.

The studies in which GC are combined to environmental modifications are harder to interpret and conflicting (42, 50, 68-70). For instance, airway neutrophilia decreases with dexamethasone (0.1 mg/kg four days, 0.075 mg/kg four days and 0.05 mg/kg four days, IM), but not with prednisolone (1 mg/kg four days, 0.75 mg/kg four days and 0.5 mg/kg four days, PO) when it is combined with environmental management (50). When dexamethasone (0.165 mg/kg q24h seven days, 0.083 mg/kg q24h seven days and 0.04 mg/kg q24h seven days, PO) is started when the antigenic exposure used to induce exacerbation is stopped, a decrease in airway neutrophilia is unsurprisingly obtained (70). Dexamethasone (decreasing regimen starting at 0.165 mg/kg q24h, three weeks PO) combined with feeding modification improves airway neutrophilia to a greater extent than dietary alterations alone in SEA (68).

The duration of antigenic exposure prior to therapy might modulate the treatment response. When the exacerbation time is short prior to treatment, dexamethasone (0.1 mg/kg IV q24 h, one week) decreases but does not normalize airway neutrophilia (42). However, these results need to be interpreted with caution as no control group was included. Similarly, when the treatment is started as soon as significant airway obstruction occurs, dexamethasone (0.1 mg/kg IV q24h, 10 days) decreases airway neutrophilia in SEA compared to horses receiving no treatment (39).

The administration of prednisone (2.2 mg/kg q24h PO, 14 days), concurrently with environmental changes, decreases airway neutrophilia to a greater extent than environmental changes alone in SEA (51). These results are surprising considering the poor bioavailability of this drug (27) and the fact that oral prednisone (400 mg/horse q24h, 10 days (71) or 1 mg/kg q24h, 10 days (39)) did not improve airway neutrophilia in two other trials (39, 71).

As reported for systemic administration, inhaled GC generally does not alter airway inflammation. Yet, differences in drugs, doses, lengths of therapy, duration of exacerbation, and concomitant environmental changes all contribute to conflicting results. Fluticasone (either 3000 µg or 6000 µg q12h, three days) does not modify airway neutrophilia in severe (24) and in mild-moderate asthma (3000 µg q12h, 15 days) (46). Even prolonged administration (six months, 2000 µg q12h for the first month, then adjusted to control clinical signs), does not improve airway neutrophilia in contrast to the horses managed with antigen avoidance (3). Expectedly, the administration of

fluticasone (2000 µg q12h, 21 days) in horses with SEA decreases airway neutrophilia when it is accompanied by improvement of hay quality (72). Conversely, in another cohort of SEA, the administration of fluticasone (1980 µg q12h two weeks; then 1100 µg q24h one week and 1100 µg q48h one week), along with environmental management, did not improve airway neutrophilia (26). Interestingly, half of these horses were treated by their owners, suggesting that efficacy of environmental and therapy recommendations might be poorer in field conditions. In SEA, the combination of fluticasone (2500 µg q12h) and salmeterol (250 µg, q12h) improves airway neutrophilia after eight weeks of therapy while environmental modifications result in a significant improvement after one week of treatment (4).

Similar to fluticasone, inhaled budesonide (1800 µg q12h, 14 days) (17) and beclomethasone (500 µg q12h, 10 days) (28) do not modify BALF cytology in horses kept in an antigenic environment. In contrast, a 7-day treatment with aerosolized beclomethasone (1320 µg q12h) reduces BALF neutrophilia during antigenic exposure, but without normalizing it. In that study, corticosteroid treatment also decreased pro-inflammatory lymphocyte populations (CD4+ and B lymphocytes) (73). Likewise, beclomethasone (1600 µg q24h, 10 days) reduced airway neutrophilia in horses kept in their natural environment, however a control group was not included (34). Inhalation of budesonide (1500 µg q12h, 10 days) decreased airway neutrophilia in horses with SEA, but the treatment was accompanied by a low-dust environment and there was no control group (62). The nebulization of dexamethasone (15 mg q24h, 13 days) does not modify BALF cytology in mild asthma (74).

Combined, these results suggest that the environment, rather than GC, is mainly responsible for the improvement of airway neutrophilic inflammation in many studies.

Effects of glucocorticoids on pulmonary gene expression and markers of inflammation

Several studies have explored the effects of GC on pulmonary gene expression in asthmatic horses. The results are disparate as different treatment regimens, environmental management and horses with different disease severity were investigated. Furthermore, variation in PCR methodology possibly influenced the results and it should be specifically designed to limit bias in

each experimental trial. A normalization technique was proposed for the study of BALF gene expression in horses with milder forms of asthma treated with GC (75).

Consistent with the anti-inflammatory properties of GC, downregulation of several pro-inflammatory genes in BALF of asthmatic horses have been reported. Fluticasone administered for six months decreases the mRNA expression of interleukin-8 (CXCL-8) in BALF cells of SEA horses kept in an antigenic environment. However, this reduction is smaller than that obtained with antigenic avoidance (3). The alveolar macrophages gene expression of CXCL-8 and IL-1 β is reduced by a single administration of fluticasone (2000 μ g) after an experimental challenge (aerosolization of *Aspergillus fumigatus*) (76). In milder forms of asthma, dexamethasone (20 mg IM q24h, 10 days) downregulates the gene expression of IL-5 and TNF- α in BALF cells, while the expression of several other genes is unchanged (IL-1 β , IL-4, IL-6, CXCL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-23, IFN- γ and eotaxin-2) (77). Neither dexamethasone-21-isonicotinate (0.06 mg/kg IM once) nor beclomethasone (500 μ g q12h, 10 days) modify the gene expression of NF- κ B and activator-protein 1 from epithelial cells of SEA horses kept in an antigenic environment (28).

Variable results are obtained when environmental modifications is performed. Adding dexamethasone (decreasing regimen starting at 0.165 mg/kg q24h PO) to dietary modification results in a greater decrease in the BALF cells gene expression of CXCL-8, CXCL-2 and IL-1 β than feeding modifications solely in SEA (68). The administration of dexamethasone (0.05 mg/kg IM q24h, two days) does not modify the gene expression of CXCL-8, TNF- α , IL-1 β , INF- γ and IL-6 of SEA horses in remission at pasture (78). In that study, the treatment decreased the gene expression of IL-6 and TNF- α during exacerbation, but it was combined with environmental improvement (78). In contrast, a 3-week treatment with fluticasone (2000 μ g q12h), along with enhanced hay quality, fails to modify the gene expression of pro-inflammatory cytokines despite an improvement of airway neutrophilia, lung function and clinical signs in horses with SEA (72).

Several other variables of lung inflammation have been assessed. In SEA, dexamethasone (0.06 mg/kg q24h PO, two weeks) reduces the neutrophil extracellular traps (NETs) formation and neutrophilic apoptosis without modifying neutrophilic activation (evaluated through the marker of activation CD11b) nor the gene expression of IL-17 from BALF cells (66). Inhaled budesonide

decreases BALF metalloproteinases in horses with SEA, but interpretation of these results is complicated by concomitant environmental modification and the lack of a control group (79). Finally, dexamethasone (0.06 mg/kg q24h PO, two weeks) increases the BALF regulatory T cells in SEA, but not in controls (80).

Effects of glucocorticoids on peripheral leukocytes, systemic markers of inflammation and in vitro studies

The inflammation in SEA (81), and in milder forms of asthma (82), is not merely localized to the lung as several pro-inflammatory markers are increased in circulation. Nonetheless, most studies evaluating the effects of GC on systemic inflammation have been performed in healthy horses.

Dexamethasone reduces the lipopolysaccharides (LPS) induced expression of CXCL-8 (15, 83), IL-1 β (83), TNF- α (15, 83) and TLR-4 (15) from peripheral neutrophils of healthy horses. Furthermore, dexamethasone inhibits phorbol myristate acetate induced NETS formation (66) and respiratory burst of peripheral neutrophils (15). However, the IL-17-induced CXCL-8 production by equine neutrophils is not downregulated by dexamethasone (84). This finding could contribute to the persistence of airway neutrophilia during GC treatment as CXCL-8 is a potent neutrophilic chemoattractant. However, these results need confirmation in asthmatic horses as it was performed in healthy animals. Enhanced neutrophilic viability induced by GC (83) could also participate to the persistence of neutrophils in the airways.

In equine whole blood cultures, dexamethasone, and to a lesser extent hydrocortisone, inhibits the stimulated release of TNF- α , IL-1Ra and IFN- γ (85). Triamcinolone (0.04 mg/kg IV once) administered to healthy horses decreases the production of several eicosanoids (thromboxane B₂, prostaglandin E₂ and prostaglandin F₂ α) in whole blood stimulated by LPS (86). Finally, dexamethasone (10⁻⁵ M) decreases the gene expression of CXCL-8 induced by IL-4, LPS and TNF- α from pulmonary artery endothelial cells of normal adult horses (87).

Effects on airway remodelling

Characteristics of airway remodelling in asthma have been reviewed (88) and include increased airway smooth muscle (ASM) mass, abnormal extracellular matrix deposition, mucus gland hypertrophy and epithelial fragility. Few studies have investigated the modulation of bronchial structural changes by GC.

A six-month fluticasone administration (2000 µg q12h one month, then at doses required to control lung function) decreases the ASM mass in peripheral airways by approximately 30% in horses with SEA kept in an offending environment (3). A shorter fluticasone treatment (2500 µg q12h, three months) results in a similar improvement (about 30% decrease in ASM mass) after three, but not one month of therapy (4). The same improvement is obtained after two months of fluticasone therapy (2500 µg q12h) in SEA horses (unpublished results from the authors). The combination of fluticasone and salmeterol might be synergistic as it normalizes the thickness of the extracellular matrix of central airways, while fluticasone and salmeterol used in monotherapies have no such effect (4).

Interestingly, the peripheral ASM maximal velocity of shortening correlates with the time elapsed since the last GC treatment in horses with SEA (89). The authors proposed that the apparent decrease in hypercontractility might be related to direct interaction between ASM and GC or through modification of the inflammatory microenvironment.

The smooth muscle myosin heavy chain (+) insert provides a faster rate of muscle contraction and possibly contributes to airway hyperresponsiveness in asthma (90). Its gene expression, which is increased in ASM from central airways of horses with asthma (91), is reduced 2-fold after three months of fluticasone treatment in SEA (2000 µg q12h one month, then at doses required to control lung function) (91). Similar results are obtained after two months of fluticasone administration (2500 µg q12h; unpublished results from the authors).

In vitro, dexamethasone decreases serum-induced collagen production of equine bronchial fibroblasts and has a biphasic effect on cellular proliferation (anti-proliferative at high concentration [10^{-6} and 10^{-4} M] and pro-proliferative in lower ranges [< 1 µM]) (49). Dexamethasone, alone or synergistically with β_2 -adrenoreceptor agonists, also limits the TGF- β_1 -

induced transition of fibroblasts to myofibroblast. All these effects could contribute to the anti-remodelling properties of GC in asthma.

During clinical remission of SEA, the degree of bronchiolar inflammation is higher in horses stabled and pharmacologically treated (corticosteroid +/- bronchodilators) compared to the subjects kept at pasture (92). These results are consistent with data obtained from BALF cytologies (3).

Adverse effects

Most studies evaluating short-term use of systemic or inhaled GC do not report any clinical adverse effects (40, 46). However, their long-term administration is usually limited by fear of adverse events including laminitis, immunosuppression, and interactions with endocrine metabolism.

Laminitis

Reports of glucocorticoid-induced laminitis are anecdotal (93, 94). Several mechanisms such as interaction with digital vascularization, abnormal keratinocytes growth and induction of peripheral insulin resistance have been proposed to explain a possible laminitis risk with GC and are reviewed elsewhere (95-97). However, clinical signs related to laminitis have rarely been reported when it was specifically monitored in asthma (17, 24, 40). Furthermore, a retrospective case-control study did not support an increased risk of laminitis in a large number of horses treated with prednisolone (98).

Triamcinolone is thought to be associated with greater risk of laminitis based on cases where doses which markedly exceed the recommended dosing rate were administered (99-101) and on a pharmacokinetic study that described the apparition of hoof rings in 4/5 horses 2-14 months after the use of triamcinolone (0.2 mg/kg IV) (102). However, the incidence of laminitis appears rare when large numbers of horses are examined (development of laminitis in 3/2000 horses treated with GC intraarticularly, mainly triamcinolone (103), and in 1/205 horses receiving 10-80

mg of triamcinolone via various route of administration, with the affected horse having a history of laminitis (104)).

Although the association of corticosteroids with laminitis is controversial, cautious use is recommended especially in horses with an endocrine or systemic inflammatory disease, or a local foot condition. Indeed, GC do not affect the basal tone of digital veins and arteries in vitro, but they potentiate the vasoconstrictor effects of biogenic amines (105). Furthermore, the administration of dexamethasone (0.1 mg/kg IV q24h, six days) reduces skin temperature and amplifies the temperature drop induced by phenylephrine, indicating a possible potentiation of the vasoconstrictor effects of catecholamines (106). These studies suggest that GC might prompt laminitis development when given during a stressful or an inflammatory condition. However, it is unclear if asthma represents a predisposing factor. Indeed, SEA has been positively associated with the onset of laminitis, but negatively associated with its recurrence in a retrospective study (107). Prednisolone administration is associated with the development of subsequent episodes of laminitis in horses, but not of the first onset (107). In summary, GC-induced laminitis is uncommonly reported when asthmatic horses are treated systemically at recommended doses although it remains a potential complication to consider in predisposed animals. To our knowledge, episodes of laminitis have never been reported with inhaled GC.

Effects on blood leukocytes and immunosuppression

As expected with systemic GC administration in adult horses (108-113) and foals (108), increased neutrophils and decreased lymphocytes and eosinophils blood counts have been described in horses with SEA administered dexamethasone and isoflupredone (40). As in other species, a higher vascular neutrophil count is attributed to the release from the marginalized pool (114). This effect is not observed when fluticasone is administered to horses with SEA (115).

Short-term GC treatments are usually not associated with clinical immunosuppression, but cases of pneumonia after long-term systemic use have been described in horses (116). Immunosuppression induced by GC could be multifactorial. For example, the administration of dexamethasone to horses (0.88 mg/kg IM q24h, three days) and ponies (5 mg IV once) increases serum iron concentration which could facilitate bacterial proliferation (117). Furthermore,

dexamethasone (0.2 mg/kg IM twice weekly during eight weeks) significantly suppresses the production of immunoglobins G_a and G_b after vaccination in healthy horses (118). The administration of injectable hydrocortisone (1 mg/kg) to healthy horses increases the migration capacity of stimulated neutrophils while the bacterial phagocytosis and killing capacity against *Staphylococcus aureus* are unchanged (119). Generally, the use of inhaled corticosteroids is considered safer because of the local delivery. In agreement with this, the administration of fluticasone for almost a year to horses with SEA does not alter their innate and acquired immune function, including lymphocyte function and the amnestic and novel responses to vaccination after six months of therapy (115).

Impact on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis

The HPA axis is controlled by negative feedback signals resulting in the reduction of corticotropin-releasing hormone secretion when endogenous or exogenous GC stimulate the hypothalamic GCR. This in turn decreases ACTH production by the pituitary gland, and ultimately the production of cortisol by the adrenal glands (56). Horses with SEA have similar cortisol levels at rest and at exercise compared to healthy animals (120). Multiple equine studies have described adrenal suppression with systemic and inhaled GC, but typically without clinical signs. Furthermore, the responsiveness to ACTH administration usually remains unchanged (53, 121, 122). Dexamethasone administered at different dosages ([0.1 mg/kg IV q24h, seven days] (122); [0.088 mg/kg or less, IM, every five days for 30 days] (121); [0.044 mg/kg IM once] (123); [0.04 mg/kg q24h, IV, two weeks] (17), [20 mg, IM, once] (112)) causes adrenal suppression as early as two hours after the administration. A single dose of triamcinolone (0.09 mg/kg IM) suppresses endogenous cortisol production for approximately four weeks in horses with SEA (53). The administration of a smaller dose of triamcinolone (0.044 mg/kg IM) results in maximal adrenal suppression by 12 hours and lasts 14 days (123). Isoflupredone acetate (0.03 mg/kg IM q24h, 14 days) also seems to cause a longer suppression than dexamethasone (40). Methylprednisolone administered intraarticularly (200 mg once) briefly suppresses cortisol production, from 6 to 24 hours after the injection (55).

Although a month-long administration of inhaled fluticasone at a decreasing dosage does not modify the adrenocortical function (26), longer administration (11 months) suppresses the endogenous cortisol production in SEA horses (124). Inhaled beclomethasone (1320 µg q12h, seven days) suppresses cortisol, which normalizes two days after discontinuation of treatment (122). Even lower doses of beclomethasone ([from 500 to 1500 µg q12h, one week] (57) and [528 µg q12h, five days] (125)) causes adrenal suppression. The administration of inhaled budesonide (1800 µg q12h, two weeks) induces HPA axis suppression in horses with SEA to a similar extent to dexamethasone (0.04 mg/kg IV q24h, two weeks) (17). Conversely, ciclesonide administered at different dosages (up to 2700 µg q12h, 14 days) does not alter serum cortisol measurements, which is consistent with the low oral bioavailability of this drug (18).

Theoretically, HPA axis suppression could lead to hypoadrenocorticism after drug withdrawal, but this has not been reported in horses with asthma. Nevertheless, and to minimize the disturbance of the endogenous GC circadian rhythm of horses (126), it is commonly recommended to administer GC in the morning.

Metabolic effects

Glucocorticoids interfere with glucose and lipid metabolism. These effects have not been assessed specifically in asthmatic horses, therefore it is unknown if their disease status could affect the metabolic alterations. Increased blood glucose (102, 123, 127) and triglycerides (102) and insulin resistance (128) are expected with GC administration. Use of dexamethasone (0.05 mg/kg IM q24h, seven days) also results in a clinically irrelevant elevation of blood lactate (127).

Glucocorticoids alter calcium metabolism by increasing urinary excretion and decreasing gastrointestinal absorption (129) along with an inhibition of calcium release from bones (130). Because administration of GC to human patients is associated with osteoporosis, this effect was investigated in pony foals where prolonged treatment (> three months) with dexamethasone (0.005-0.05 mg/kg q24h IM) led to osteonecrosis (130). In healthy and severe asthmatic horses administered triamcinolone (0.09 mg/kg IM once), serum osteocalcin, an indicator of bone turnover, is significantly reduced and it takes up to 150 days for some horses to reach their baseline levels (131). In a horse with SEA and histologic alteration of the parathyroid gland, the

use of dexamethasone (0.06 mg/kg PO q24h, eight days) was believed to have precipitated clinical signs related to refractory hypocalcaemia and hypomagnesemia (38).

Glucocorticoids have variable mineralocorticoid properties and can therefore influence electrolyte balance, even with selective GC such as dexamethasone and triamcinolone (123). The higher mineralocorticoid potency of isoflupredone might explain the hypokalemia induced by this drug in horses with SEA (0.03 mg/kg IM 24h, 14 days) (40).

Rarely, and not specifically in asthmatic horses, large overdoses of GC have been associated with hyperadrenocorticism with signs such as muscle wasting, polydipsia/polyuria and hepatopathy (99, 101).

Impacts of glucocorticoids on airways microorganism populations

The interactions between the inflammatory pulmonary microenvironment and microorganisms in asthma are poorly understood, but a role for virus, bacteria, altered microbiome and fungus in the pathogenesis of the disease is suspected (67, 74, 132-135) and was recently reviewed (136). The study of airway microbiome in equine asthma is at its onset and follows the growing interest in understanding the crosstalk between the lung and gut microbiota and immune functions in humans (137). Of note, the airway microbiome is associated with alteration of the GC response in humans (138, 139).

In horses, few data are available concerning the impacts of GC on the airway microbiome and the effect of the latter on treatment response is unknown. The use of dexamethasone (20 mg q24h IM, ten days) alters the abundance of some operational taxonomic units (roughly bacterial species) from the lower respiratory tract of healthy and mild asthmatic horses (67). The nebulization of dexamethasone (15 mg q24h, 13 days) decreases the microbiota diversity in mild asthma in upper, but not in lower airways, and it does not modify the upper airway mycobiota nor the nasal equine herpesvirus-2 DNA expression from nasal swabs (74). Oral and pharyngeal fungal infections are a possible complication of inhaled GC in humans. This has not been observed to our knowledge in the equine species and no fungal growth occurred from pharyngeal swabs of horses with SEA treated with beclomethasone (33).

Miscellaneous effects

Coughing during inhalation of GC is frequently reported in human asthmatics (56) and it has been noted in SEA after inhalation of beclomethasone (6, 57, 122), budesonide (17) and nebulized dexamethasone (25). However, it is uncertain if the induction of cough is related to the GC, the vehicle, the inhalation device or simply to the disease itself.

The administration of GC has deleterious effects on the tegument with skin thinning, fragility and delayed healing observed even with inhaled use in humans (56). The chronic use of inhaled fluticasone (2500 µg q12h, five months) resulted in local alopecia around the nostrils in one study and the histopathology results were consistent with locally GC-induced epidermal and follicular atrophy (unpublished results from the authors).

Alterations of coagulation can occur with GC in other species; however it has not been reported in the horse so far. Indeed, the administration of dexamethasone (0.05 mg/kg IM q24h, seven days) does not affect thromboelastographic variables (140).

Behavioural changes, occasionally described in humans (141) after GC administration, have not been described in the equine species to our knowledge.

Corticosteroid resistance

Corticosteroid insensitivity is a well-recognized phenomenon in asthma in humans although there is no consensual definition. The cellular mechanisms leading to GC resistance in asthma are only partially understood but include the overexpression of pro-inflammatory transcription factors and of the GCR-β (10, 142). The GC sensitivity is also modulated by several clinical factors (142), such as genetics, neutrophilic inflammation (143) and co-morbidities, including obesity (144). Corticosteroid resistance is not objectively defined in horses and the severity of the disease, the presence of co-morbidities, the antigenic exposure, the compliance, and the administration techniques by the caregivers could all influence treatment response.

Conclusions and future directions

This review highlights the potency of GC for relieving airway obstruction in asthma, but also underlines the varying clinical response. These heterogeneous results undoubtedly reflect disparity in research protocols including differences in the severity of asthma, the GC used, and the dose administered. Of note, several studies investigated the effects of GC therapy concurrently to modification of diet or stabling conditions. Although this is likely more representative of clinical management in the field, it further complicates the evaluation of the specific impacts of GC administration. However, even in controlled research settings, the environmental conditions can not be completely standardised (including variation in humidity, temperature and pollen concentration) and can influence the respiratory condition (145), emphasizing the necessity to include a control group. Most available GC successfully relieve airway obstruction, but no normalization of neutrophilic inflammation is expected when antigen avoidance is not implemented, even though indicators of neutrophilic activation (such as NETs) can be attenuated. From this review, several questions are raised for future investigations.

- Few studies have assessed GC treatment in horses with mild and moderate asthma, including their impact on performance in sport or racehorses. The usefulness of adding GC to environmental management in this condition remains to be determined.
- Airway luminal neutrophilia, and possibly mastocytic and eosinophilic inflammation, are not controlled by potent anti-inflammatory drugs such as GC. Therefore, a better understanding of the role of neutrophils in the disease would be helpful to specifically determine if GC attenuate the deleterious activities of these leukocytes. The impacts of GC on markers of inflammation in BALF, in bronchial tissue and in circulation are also poorly understood.
- Understanding the specific contributions of genomic and non genomic actions of GC, as well as the signalling pathways implicated in the beneficial effects on bronchoconstriction and remodelling would be useful for the development of alternative therapies. Particularly, the characterization of the mechanisms involved in the reduction of ASM mass by GC is an area of research applicable to translational medicine. Indeed, treatments targeting ASM are relevant as

it is the main contributor to airway hyperresponsiveness, and it is associated with long-term persistent fixed airway obstruction in humans (146).

- Only partial reversibility of bronchial remodelling was achieved with long-term inhaled GC in SEA. Consequently, determining if further improvement can be obtained with systemic administration or with combination therapy (β 2-adrenoreceptor agonists, anticholinergics, etc.) would be valuable for the long-term management of this incurable disease. The possible synergy between β 2-adrenoreceptor agonists and GC to control airway inflammation and remodelling merits further investigation.
- Comparative studies of the available inhaled and systemic GC would be useful to establish the value of each drug and the minimal effective dose of systemic GC. Furthermore, many pharmacodynamic and pharmacokinetic information is extrapolated from human data. Obtaining equine specific knowledge in this area (such as oral bioavailability, protein-binding, or affinity with the GCR) would be useful to guide clinical recommendations and to reduce the risks of adverse effects.
- Investigations specifically monitoring adverse events could allow the practitioners to weigh the pros and cons more clearly when using GC but would require the study of large cohorts of horses. The possible association between laminitis and a diagnosis of SEA requires further investigation.
- The impacts of co-morbidities, environmental factors, microbiome and physiological states, such as aging, sex and estrus variation, on disease severity and treatment response to GC require further investigation. A definition of GC resistance is needed to characterize uncontrolled asthma and to guide clinicians and researchers towards precision medicine.

References

1. Costa LR, Johnson JR, Baur ME, Beadle RE. 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):1635-42.
2. Couetil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Leguillette R, Richard EA. Inflammatory Airway Disease of Horses--Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med.* 2016;30(2):503-15.
3. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Joubert P, Relave F, Setlakwe EL, Beauchamp G, et al. Corticosteroids and antigen avoidance decrease airway smooth muscle mass in an equine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;47(5):589-96.
4. Bullone M, Vargas A, Elce Y, Martin JG, Lavoie JP. Fluticasone/salmeterol reduces remodelling and neutrophilic inflammation in severe equine asthma. *Sci Rep.* 2017;7(1):8843.
5. Mair TS. Obstructive pulmonary disease in 18 horses at summer pasture. *Vet Rec.* 1996;138(4):89-91.
6. Hudson NPH. Management of a case of summer pasture associated obstructive pulmonary disease by inhaled corticosteroids and environmental control. *Equine Vet Educ.* 1999;11(3):116-20.
7. Bond S, Leguillette R, Richard EA, Couetil L, Lavoie JP, Martin JG, et al. Equine asthma: Integrative biologic relevance of a recently proposed nomenclature. *J Vet Intern Med.* 2018;32(6):2088-98.
8. Vandewalle J, Luybaert A, De Bosscher K, Libert C. Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids. *Trends Endocrinol Metab.* 2018;29(1):42-54.
9. Beck IM, Vanden Berghe W, Vermeulen L, Yamamoto KR, Haegeman G, De Bosscher K. Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. *Endocr Rev.* 2009;30(7):830-82.
10. Barnes PJ. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(3):636-45.

11. Payne AS, Freishtat RJ. Conserved steroid hormone homology converges on nuclear factor kappaB to modulate inflammation in asthma. *J Investig Med*. 2012;60(1):13-7.
12. Bureau F, Bonizzi G, Kirschvink N, Delhalle S, Desmecht D, Merville MP, et al. Correlation between nuclear factor-kappaB activity in bronchial brushing samples and lung dysfunction in an animal model of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(4 Pt 1):1314-21.
13. Alangari AA. Genomic and non-genomic actions of glucocorticoids in asthma. *Ann Thorac Med*. 2010;5(3):133-9.
14. Panettieri RA, Schaafsma D, Amrani Y, Koziol-White C, Ostrom R, Tliba O. Non-genomic Effects of Glucocorticoids: An Updated View. *Trends Pharmacol Sci*. 2019;40(1):38-49.
15. Lecoq L, Vincent P, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP. Genomic and non-genomic effects of dexamethasone on equine peripheral blood neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009;128(1-3):126-31.
16. Cuming RS, Groover ES, Wooldridge AA, Caldwell FJ. Review of glucocorticoid therapy in horses. Part 1: Pharmacology. *Equine Vet Educ*. 2018;30(3):141-50.
17. Lavoie JP, Leclere M, Rodrigues N, Lemos KR, Bourzac C, Lefebvre-Lavoie J, et al. Efficacy of inhaled budesonide for the treatment of severe equine asthma. *Equine Vet J*. 2019;51(3):401-7.
18. Lavoie JP, Bullone M, Rodrigues N, Germim P, Albrecht B, Salis-Soglio Mv. Effect of different doses of inhaled ciclesonide on lung function, clinical signs related to airflow limitation and serum cortisol levels in horses with experimentally induced mild to severe airway obstruction. *Equine Vet J*. 2019;51(6):779-86.
19. Cornelisse CJ, Robinson NE, Berney CE, Kobe CA, Boruta DT, Derksen FJ. Efficacy of oral and intravenous dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction. *Equine Vet J*. 2004;36(5):426-30.
20. Lavoie JP, Léguillette R, Pasloske K, Charette L, Sawyer N, Guay D, et al. Comparison of effects of dexamethasone and the leukotriene D4 receptor antagonist L-708,738 on lung function

and airway cytologic findings in horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res.* 2002;63(4):579-85.

21. Calzetta L, Rogliani P, Page C, Roncada P, Pistocchini E, Soggiu A, et al. Clinical effect of corticosteroids in asthma-affected horses: A quantitative synthesis. *Equine Vet J.* 2018;50(5):594-601.

22. Calzetta L, Roncada P, di Cave D, Bonizzi L, Urbani A, Pistocchini E, et al. Pharmacological treatments in asthma-affected horses: A pair-wise and network meta-analysis. *Equine Vet J.* 2017;49(6):710-7.

23. Rush BR, Raub ES, Rhoads WS, Flaminio M, Matson CJ, Hakala JE, et al. Pulmonary function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *Am J Vet Res.* 1998;59(8):1039-43.

24. Robinson NE, Berney C, Behan A, Derksen FJ. Fluticasone propionate aerosol is more effective for prevention than treatment of recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med.* 2009;23(6):1247-53.

25. Mainguy-Seers S, Bessonnat A, Picotte K, Lavoie JP. Nebulisation of dexamethasone sodium phosphate for the treatment of severe asthmatic horses. *Equine Vet J.* 2019;51(5):641-5.

26. Couëtill LL, Chilcoat CD, DeNicola DB, Clark SP, Glickman NW, Glickman LT. Randomized, controlled study of inhaled fluticasone propionate, oral administration of prednisone, and environmental management of horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res.* 2005;66(10):1665-74.

27. Peroni DL, Stanley S, Kollias-Baker C, Robinson NE. Prednisone per os is likely to have limited efficacy in horses. *Equine Vet J.* 2002;34(3):283-7.

28. Couetil LL, Art T, de Moffarts B, Becker M, Melotte D, Jaspard F, et al. Effect of beclomethasone dipropionate and dexamethasone isonicotinate on lung function, bronchoalveolar lavage fluid cytology, and transcription factor expression in airways of horses with recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med.* 2006;20(2):399-406.

29. Jocelyn NA. In an adult horse with severe asthma (previously recurrent airway obstruction) does using inhaled corticosteroids result in an equal improvement in clinical signs when compared to systemic corticosteroids? *Veterinary Evidence*. 2018;3(2):139.
30. Stopyra A, Sobiech P, Waclawska-Matyjasik A. Acid-base indicators in the venous and arterial blood of horses affected by recurrent airway obstruction (RAO). *Pol J Vet Sci*. 2012;15(3):463-7.
31. Votion D, Ghafir Y, Vandenput S, Duvivier DH, Art T, Lekeux P. Analysis of scintigraphical lung images before and after treatment of horses suffering from chronic pulmonary disease. *Vet Rec*. 1999;144(9):232-6.
32. Gerber V, Schott HC, Robinson NE. Owner assessment in judging the efficacy of airway disease treatment. *Equine Vet J*. 2011;43(2):153-8.
33. Ammann VJ, Vrins AA, Lavoie JP. Effects of inhaled beclomethasone dipropionate on respiratory function in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Equine Vet J*. 1998;30(2):152-7.
34. Klier J, Bartl C, Geuder S, Geh KJ, Reese S, Goehring LS, et al. Immunomodulatory asthma therapy in the equine animal model: A dose-response study and evaluation of a long-term effect. *Immun Inflamm Dis*. 2019;7(3):130-49.
35. Cesarini C, Hamilton E, Picandet V, Lavoie JP. Theophylline does not potentiate the effects of a low dose of dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction. *Equine Vet J*. 2006;38(6):570-3.
36. Lavoie JP, Pasloske K, Joubert P, Cordeau ME, Mancini J, Girard Y, et al. Lack of clinical efficacy of a phosphodiesterase-4 inhibitor for treatment of heaves in horses. *J Vet Intern Med*. 2006;20(1):175-81.
37. Lavoie JP, Thompson D, Hamilton E, Debrue M, David F, Hickey G. Effects of a MAPK p38 inhibitor on lung function and airway inflammation in equine recurrent airway obstruction. *Equine Vet J*. 2008;40(6):577-83.

38. Mainguy-Seers S, Picotte K, Lavoie JP. Efficacy of tamoxifen for the treatment of severe equine asthma. *J Vet Intern Med.* 2018;32(5):1748-53.
39. Robinson NE, Jackson C, Jefcoat A, Berney C, Peroni D, Derksen FJ. Efficacy of three corticosteroids for the treatment of heaves. *Equine Vet J.* 2002;34(1):17-22.
40. Picandet V, Léguillette R, Lavoie JP. Comparison of efficacy and tolerability of isoflupredone and dexamethasone in the treatment of horses affected with recurrent airway obstruction ('heaves'). *Equine Vet J.* 2003;35(4):419-24.
41. Leclere M, Lefebvre-Lavoie J, Beauchamp G, Lavoie JP. Efficacy of oral prednisolone and dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction in the presence of continuous antigen exposure. *Equine Vet J.* 2010;42(4):316-21.
42. Robinson NE, Berney C, Eberhart S, deFeijter-Rupp HL, Jefcoat AM, Cornelisse CJ, et al. Coughing, mucus accumulation, airway obstruction, and airway inflammation in control horses and horses affected with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res.* 2003;64(5):550-7.
43. Grady JA, Davis EG, Kukanich B, Sherck AB. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dexamethasone after oral administration in apparently healthy horses. *Am J Vet Res.* 2010;71(7):831-9.
44. Boivin R, Pilon F, Lavoie JP, Leclere M. Adherence to treatment recommendations and short-term outcome of pleasure and sport horses with equine asthma. *Can Vet J.* 2018;59(12):1293-8.
45. Husulak ML, Manning ST, Meachem MD, Burgess HJ, Epp TY, Montgomery JB. Does antimicrobial therapy improve outcomes in horses with severe equine asthma and a positive tracheal wash bacterial culture? *Can J Vet Res.* 2018;82(3):184-91.
46. Léguillette R, Tohver T, Bond SL, Nicol JA, McDonald KJ. Effect of Dexamethasone and Fluticasone on Airway Hyperresponsiveness in Horses With Inflammatory Airway Disease. *J Vet Intern Med.* 2017;31(4):1193-201.

47. Bond SL, Greco-Otto P, MacLeod J, Galezowski A, Bayly W, Léguillette R. Efficacy of dexamethasone, salbutamol, and reduced respirable particulate concentration on aerobic capacity in horses with smoke-induced mild asthma. *J Vet Intern Med.* 2020;34(2):979-85.
48. Abraham G, Brodde OE, Ungemach FR. Regulation of equine lymphocyte beta-adrenoceptors under the influence of clenbuterol and dexamethasone. *Equine Vet J.* 2002;34(6):587-93.
49. Franke J, Abraham G. Concomitant inhibition of primary equine bronchial fibroblast proliferation and differentiation by selective β 2-adrenoceptor agonists and dexamethasone. *Eur J Pharmacol.* 2014;741:205-13.
50. Couroucé-Malblanc A, Fortier G, Pronost S, Siliart B, Brachet G. Comparison of prednisolone and dexamethasone effects in the presence of environmental control in heaves-affected horses. *Vet J.* 2008;175(2):227-33.
51. Jackson CA, Berney C, Jefcoat AM, Robinson NE. Environment and prednisone interactions in the treatment of recurrent airway obstruction (heaves). *Equine Vet J.* 2000;32(5):432-8.
52. Couëtil LL, Rosenthal FS, Simpson CM. Forced expiration: a test for airflow obstruction in horses. *J Appl Physiol (1985).* 2000;88(5):1870-9.
53. Lapointe JM, Lavoie JP, Vrins AA. Effects of triamcinolone acetonide on pulmonary function and bronchoalveolar lavage cytologic features in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res.* 1993;54(8):1310-6.
54. Bessonnat A, Picotte K, Lavoie JP. Intra-articular triamcinolone acetonide improves lung function in horses with severe asthma. *Equine Vet J.* 2020;52(1):131-5.
55. Millares-Ramirez EM, Picotte K, Lavoie JP. Pulmonary response of severely asthmatic horses after intra-articular administration of methylprednisolone. *Equine Vet J.* 2020.
56. Baptist AP, Reddy RC. Inhaled corticosteroids for asthma: are they all the same? *J Clin Pharm Ther.* 2009;34(1):1-12.

57. Rush BR, Raub ES, Thomsen MM, Davis EG, Matson CJ, Hakala JE. Pulmonary function and adrenal gland suppression with incremental doses of aerosolized beclomethasone dipropionate in horses with recurrent airway obstruction. *J Am Vet Med Assoc.* 2000;217(3):359-64.
58. Fugazzola M, Barton AK, Niedorf F, Kietzmann M, Ohnesorge B. Non-genomic action of beclomethasone dipropionate on bronchoconstriction caused by leukotriene C4 in precision cut lung slices in the horse. *BMC Vet Res.* 2012;8:160.
59. Laan TT, Westermann CM, Dijkstra AV, van Nieuwstadt RA, Fink-Gremmels J. Biological availability of inhaled fluticasone propionate in horses. *Vet Rec.* 2004;155(12):361-4.
60. Gray BP, Biddle S, Pearce CM, Hillyer L. Detection of fluticasone propionate in horse plasma and urine following inhaled administration. *Drug Test Anal.* 2013;5(5):306-14.
61. Ortloff A, Folch H, Moran G. Eosinophils in lung tissue in 2 Chilean Criollo horses with exacerbated recurrent airway obstructions "heaves". *Turk J Vet Anim Sci.* 2011;35(2):93-7.
62. Barton AK, Pelli A, Rieger M, Gehlen H. Procalcitonin Under the Course of Budesonide Inhalation Therapy in Recurrent Airway Obstruction. *J Equine Vet Sci.* 2016;45:58-63.
63. Haspel AD, Giguère S, Hart KA, Berghaus LJ, Davis JL. Bioavailability and tolerability of nebulised dexamethasone sodium phosphate in adult horses. *Equine Vet J.* 2018;50(1):85-90.
64. Barton AK, Heinemann H, Schenk I, Machnik M, Gehlen H. Influence of respiratory tract disease and mode of inhalation on detectability of budesonide in equine urine and plasma. *Am J Vet Res.* 2017;78(2):244-50.
65. Symonds NE, Dart AJ, Keledjian J, Lau ML, Ennis LC, McIver VC, et al. Pilot study to quantify the time to clear dexamethasone from plasma and urine of adult horses following a single nebulisation. *Aust Vet J.* 2019;97(5):144-8.
66. Vargas A, Boivin R, Cano P, Murcia Y, Bazin I, Lavoie JP. Neutrophil extracellular traps are downregulated by glucocorticosteroids in lungs in an equine model of asthma. *Respir Res.* 2017;18(1):207.

67. Bond SL, Timsit E, Workentine M, Alexander T, Léguillette R. Upper and lower respiratory tract microbiota in horses: bacterial communities associated with health and mild asthma (inflammatory airway disease) and effects of dexamethasone. *BMC Microbiol.* 2017;17(1):184.
68. DeLuca L, Erb HN, Young JC, Perkins GA, Ainsworth DM. The effect of adding oral dexamethasone to feed alterations on the airway cell inflammatory gene expression in stabled horses affected with recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med.* 2008;22(2):427-35.
69. Molnar CS, Pop A. Cytology results of bronchoalveolar lavage fluid in horses with recurrent airway obstruction. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Veterinary Medicine.* 2011;68(1):239-44.
70. Barussi FC, Bastos FZ, Leite LM, Fragoso FY, Senegaglia AC, Brofman PR, et al. Intratracheal therapy with autologous bone marrow-derived mononuclear cells reduces airway inflammation in horses with recurrent airway obstruction. *Respir Physiol Neurobiol.* 2016;232:35-42.
71. Traub-Dargatz JL, McKinnon AO, Thrall MA, Jones RL, Bruyninckx W, Blancquaert AM, et al. Evaluation of clinical signs of disease, bronchoalveolar and tracheal wash analysis, and arterial blood gas tensions in 13 horses with chronic obstructive pulmonary disease treated with prednisone, methyl sulfonmethane, and clenbuterol hydrochloride. *Am J Vet Res.* 1992;53(10):1908-16.
72. Giguere S, Viel L, Lee E, MacKay RJ, Hernandez J, Franchini M. Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002;85(3-4):147-58.
73. Rush BR, Flaminio MJ, Matson CJ, Hakala JE, Shuman W. Cytologic evaluation of bronchoalveolar lavage fluid from horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *Am J Vet Res.* 1998;59(8):1033-8.
74. Bond SL, Workentine M, Hundt J, of UC, Gilkerson JR, Leguillette R. Effects of nebulized dexamethasone on the respiratory microbiota and mycobiota and relative equine herpesvirus-1, 2, 4, 5 in an equine model of asthma. *J Vet Intern Med.* 2020;34(1):307-21.

75. Beekman L, Tohver T, Dardari R, Léguillette R. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bronchoalveolar lavage cells from horses with inflammatory airway disease. *BMC Mol Biol.* 2011;12:5.
76. Laan T, Bull S, van Nieuwstadt RA, Fink-Gremmels J. The effect of aerosolized and intravenously administered clenbuterol and aerosolized fluticasone propionate on horses challenged with *Aspergillus fumigatus* antigen. *Vet Res Commun.* 2006;30(6):623-35.
77. Bond SL, Hundt J, Léguillette R. Effect of injected dexamethasone on relative cytokine mRNA expression in bronchoalveolar lavage fluid in horses with mild asthma. *BMC Vet Res.* 2019;15(1):397.
78. Pietra M, Peli A, Bonato A, Ducci A, Cinotti S. Equine bronchoalveolar lavage cytokines in the development of recurrent airway obstruction. *Vet Res Commun.* 2007;31 Suppl 1:313-6.
79. Barton AK, Shety T, Bondzio A, Einspanier R, Gehlen H. Metalloproteinases and their inhibitors are influenced by inhalative glucocorticoid therapy in combination with environmental dust reduction in equine recurrent airway obstruction. *BMC Vet Res.* 2016;12(1):282.
80. Boivin R, Vargas A, Cano P, Lavoie JP. Glucocorticosteroids administration is associated with increased regulatory T cells in equine asthmatic lungs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2018;201:67-71.
81. Lavoie-Lamoureux A, Leclere M, Lemos K, Wagner B, Lavoie JP. Markers of systemic inflammation in horses with heaves. *J Vet Intern Med.* 2012;26(6):1419-26.
82. Gy C, Leclere M, Vargas A, Grimes C, Lavoie JP. Investigation of blood biomarkers for the diagnosis of mild to moderate asthma in horses. *J Vet Intern Med.* 2019;33(4):1789-95.
83. Hirsch G, Lavoie-Lamoureux A, Beauchamp G, Lavoie JP. Neutrophils are not less sensitive than other blood leukocytes to the genomic effects of glucocorticoids. *PLoS One.* 2012;7(9):e44606.
84. Murcia RY, Vargas A, Lavoie JP. The Interleukin-17 Induced Activation and Increased Survival of Equine Neutrophils Is Insensitive to Glucocorticoids. *PLoS One.* 2016;11(5):e0154755.

85. Rutten S, Schrodler W, Abraham G. Modulation of TNF-alpha, IL-1Ra and IFN-gamma in equine whole blood culture by glucocorticoids. *Vet Immunol Immunopathol.* 2019;210:1-5.
86. Mangal D, Uboh CE, Soma LR, Liu Y. Inhibitory effect of triamcinolone acetonide on synthesis of inflammatory mediators in the equine. *Eur J Pharmacol.* 2014;736:1-9.
87. Huang H, Lavoie-Lamoureux A, Moran K, Lavoie JP. 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):L1147-L1154.
88. Bullone M, Lavoie JP. The equine asthma model of airway remodeling: from a veterinary to a human perspective. *Cell Tissue Res.* 2019.
89. Matusovsky OS, Kachmar L, Ijpmma G, Bates G, Zitouni N, Benedetti A, et al. Peripheral Airway Smooth Muscle, but Not the Trachealis, Is Hypercontractile in an Equine Model of Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;54(5):718-27.
90. Leguillette R, Laviolette M, Bergeron C, Zitouni N, Kogut P, Solway J, et al. Myosin, transgelin, and myosin light chain kinase: expression and function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179(3):194-204.
91. Boivin R, Vargas A, Lefebvre-Lavoie J, Lauzon AM, Lavoie JP. Inhaled corticosteroids modulate the (+)insert smooth muscle myosin heavy chain in the equine asthmatic airways. *Thorax.* 2014;69(12):1113-9.
92. Bullone M, Joubert P, Gagne A, Lavoie JP, Helie P. Bronchoalveolar lavage fluid neutrophilia is associated with the severity of pulmonary lesions during equine asthma exacerbations. *Equine Vet J.* 2018;50(5):609-15.
93. Eustace RA, Redden RR. Iatrogenic laminitis. *Vet Rec.* 1990;126(23):586.
94. Muylle E, Oyaert W. Lung function tests in obstructive pulmonary disease in horses. *Equine Vet J.* 1973;5(1):37-44.
95. Bailey SR, Elliott J. The corticosteroid laminitis story: 2. Science of if, when and how. *Equine Vet J.* 2007;39(1):7-11.

96. Bailey SR. Corticosteroid-associated laminitis. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2010;26(2):277-85.
97. Cornelisse CJ, Robinson NE. Glucocorticoid therapy and the risk of equine laminitis. *Equine Vet Educ.* 2013;25(1):39-46.
98. Jordan VJ, Ireland JL, Rendle DI. Does oral prednisolone treatment increase the incidence of acute laminitis? *Equine Vet J.* 2017;49(1):19-25.
99. Ryu SH, Kim BS, Lee CW, Yoon J, Lee YL. Glucocorticoid-induced laminitis with hepatopathy in a Thoroughbred filly. *J Vet Sci.* 2004;5(3):271-4.
100. Dutton H. The corticosteroid laminitis story: 1. Duty of care. *Equine Vet J.* 2007;39(1):5-6.
101. Cohen ND, Carter GK. Steroid hepatopathy in a horse with glucocorticoid-induced hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc.* 1992;200(11):1682-4.
102. French K, Pollitt CC, Pass MA. Pharmacokinetics and metabolic effects of triamcinolone acetonide and their possible relationships to glucocorticoid-induced laminitis in horses. *J Vet Pharmacol Ther.* 2000;23(5):287-92.
103. Bathe AP. The corticosteroid laminitis story: 3. The clinician's viewpoint. *Equine Vet J.* 2007;39(1):12-3.
104. McCluskey MJ, Kavenagh PB. Clinical use of triamcinolone acetonide in the horse (205 cases) and the incidence of glucocorticoid-induced laminitis associated with its use. *Equine Veterinary Education.* 2004;16(2):86-9.
105. Eyre P, Elmes PJ, Strickland S. Corticosteroid-potentiated vascular responses of the equine digit: a possible pharmacologic basis for laminitis. *Am J Vet Res.* 1979;40(1):135-8.
106. Cornelisse CJ, Robinson NE, Berney CA, Eberhart S, Hauptman JE, Derksen FJ. Thermographic study of in vivo modulation of vascular responses to phenylephrine and endothelin-1 by dexamethasone in the horse. *Equine Vet J.* 2006;38(2):119-26.

107. Welsh CE, Duz M, Parkin TDH, Marshall JF. Disease and pharmacologic risk factors for first and subsequent episodes of equine laminitis: A cohort study of free-text electronic medical records. *Prev Vet Med.* 2017;136:11-8.
108. Burguez PN, Ousey J, Cash RS, Rossdale PD. Changes in blood neutrophil and lymphocyte counts following administration of cortisol to horses and foals. *Equine Vet J.* 1983;15(1):58-60.
109. Magnuson NS, McGuire TC, Banks KL, Perryman LE. In vitro and in vivo effects of corticosteroids on peripheral blood lymphocytes from ponies. *Am J Vet Res.* 1978;39(3):393-8.
110. Vernimb GD, Van Hoose LM, Hennessey PW. Onset and duration of corticosteroid effect after injection of Betasone for treating equine arthropathies. Results of laboratory and clinical studies. *Vet Med Small Anim Clin.* 1977;72(2):241-4.
111. Targowski SP. Effect of prednisolone on the leukocyte counts of ponies and on the reactivity of lymphocytes in vitro and in vivo. *Infect Immun.* 1975;11(2):252-6.
112. Eiler H, Oliver J, Goble D. Adrenal gland function in the horse: effect of dexamethasone on hydrocortisone secretion and blood cellularity and plasma electrolyte concentrations. *Am J Vet Res.* 1979;40(5):727-9.
113. Osbaldiston GW, Johnson JH. Effect of ACTH and selected glucocorticoids on circulating blood cells in horses. *J Am Vet Med Assoc.* 1972;161(1):53-6.
114. Carakostas MC, Moore WE, Smith JE, Johnson D. Effects of etiocholanolone and prednisolone on intravascular granulocyte kinetics in horses. *Am J Vet Res.* 1981;42(4):626-8.
115. Dauvillier J, Felipe MJ, Lunn DP, Lavoie-Lamoureux A, Leclère M, Beauchamp G, et al. Effect of long-term fluticasone treatment on immune function in horses with heaves. *J Vet Intern Med.* 2011;25(3):549-57.
116. Mair TS. Bacterial pneumonia associated with corticosteroid therapy in three horses. *Vet Rec.* 1996;138(9):205-7.
117. Smith JE, DeBowes RM, Cipriano JE. Exogenous corticosteroids increase serum iron concentrations in mature horses and ponies. *J Am Vet Med Assoc.* 1986;188(11):1296-8.

118. Slack J, Risdahl JM, Valberg SJ, Murphy MJ, Schram BR, Lunn DP. Effects of dexamethasone on development of immunoglobulin G subclass responses following vaccination of horses. *Am J Vet Res.* 2000;61(12):1530-3.
119. Morris DD, Strzemienski PJ, Gaulin G, Spencer P. The effects of corticosteroid administration on the migration, phagocytosis and bactericidal capacity of equine neutrophils. *Cornell Vet.* 1988;78(3):243-52.
120. Cuff TL, Williams RJ, Deaton CM, Smith NC, Davies BD, Davies-Morel MCG, et al. Changes in plasma cortisol and ascorbic acid in horses with and without recurrent airway obstruction upon exercise and ascorbic acid supplementation. *Equine and Comparative Exercise Physiology.* 2005(2):105–12.
121. MacHarg MA, Bottoms GD, Carter GK, Johnson MA. Effects of multiple intramuscular injections and doses of dexamethasone on plasma cortisol concentrations and adrenal responses to ACTH in horses. *Am J Vet Res.* 1985;46(11):2285-7.
122. Rush BR, Worster AA, Flaminio MJ, Matson CJ, Hakala JE. Alteration in adrenocortical function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *Am J Vet Res.* 1998;59(8):1044-7.
123. Slone DE, Purohit RC, Ganjam VK, Lowe JL. Sodium retention and cortisol (hydrocortisone) suppression caused by dexamethasone and triamcinolone in equids. *Am J Vet Res.* 1983;44(2):280-3.
124. Munoz T, Leclere M, Jean D, Lavoie JP. Serum cortisol concentration in horses with heaves treated with fluticasone propionate over a 1 year period. *Res Vet Sci.* 2015;98:112-4.
125. Rush BR, Trevino IC, Matson CJ, Hakala JE. Serum cortisol concentrations in response to incremental doses of inhaled beclomethasone dipropionate. *Equine Vet J.* 1999;31(3):258-61.
126. Toutain PL, Oukessou M, Autefage A, Alvinerie M. Diurnal and episodic variations of plasma hydrocortisone concentrations in horses. *Domest Anim Endocrinol.* 1988;5(1):55-9.

127. Mizen K, Woodman J, Boysen SR, Wagg C, Greco-Otto P, Leguillette R, et al. Effect of Dexamethasone on Resting Blood Lactate Concentrations in Horses. *J Vet Intern Med.* 2017;31(1):164-9.
128. Brennan KM, Urschel KL. Recovery of insulin sensitivity in mature horses after a 3 week course of dexamethasone therapy. *Equine Vet J.* 2014;46(6):718-21.
129. Glade MJ, Krook L, Schryver HF, Hintz HF. Calcium metabolism in glucocorticoid-treated pony foals. *J Nutr.* 1982;112(1):77-86.
130. Glade MJ, Krook L. Glucocorticoid-induced inhibition of osteolysis and the development of osteopetrosis, osteonecrosis and osteoporosis. *Cornell Vet.* 1982;72(1):76-91.
131. Lepage OM, Laverty S, Marcoux M, Dumas G. Serum osteocalcin concentration in horses treated with triamcinolone acetonide. *Am J Vet Res.* 1993;54(8):1209-12.
132. Burrell MH, Wood JL, Whitwell KE, Chanter N, Mackintosh ME, Mumford JA. Respiratory disease in thoroughbred horses in training: the relationships between disease and viruses, bacteria and environment. *Vet Rec.* 1996;139(13):308-13.
133. Wood JLN, Newton JR, Chanter N, Mumford JA. Association between respiratory disease and bacterial and viral infections in British racehorses. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):120-6.
134. Fillion-Bertrand G, Dickson RP, Boivin R, Lavoie JP, Huffnagle GB, Leclere M. Lung Microbiome Is Influenced by the Environment and Asthmatic Status in an Equine Model of Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2019;60(2):189-97.
135. Dauvillier J, Ter Woort F, van Erck-Westergren E. Fungi in respiratory samples of horses with inflammatory airway disease. *J Vet Intern Med.* 2019;33(2):968-75.
136. Couetil L, Cardwell JM, Leguillette R, Mazan M, Richard E, Bienzle D, et al. Equine Asthma: Current Understanding and Future Directions. *Front Vet Sci.* 2020;7:450.
137. Frati F, Salvatori C, Incorvaia C, Bellucci A, Di Cara G, Marcucci F, et al. The Role of the Microbiome in Asthma: The Gut(-)Lung Axis. *Int J Mol Sci.* 2018;20(1).

138. Durack J, Lynch SV, Nariya S, Bhakta NR, Beigelman A, Castro M, et al. Features of the bronchial bacterial microbiome associated with atopy, asthma, and responsiveness to inhaled corticosteroid treatment. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(1):63-75.
139. Goleva E, Jackson LP, Harris JK, Robertson CE, Sutherland ER, Hall CF, et al. The effects of airway microbiome on corticosteroid responsiveness in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(10):1193-201.
140. Woodman J, Wagg CR, Boysen SR, Leguillette R, Mizen K, Roy MF. Evaluation of coagulation via thromboelastography in healthy horses administered dexamethasone. *Can Vet J*. 2015;56(12):1271-4.
141. Hoes JN, Jacobs JW, Verstappen SM, Bijlsma JW, Van der Heijden GJ. Adverse events of low- to medium-dose oral glucocorticoids in inflammatory diseases: a meta-analysis. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(12):1833-8.
142. Hew M, Chung KF. Corticosteroid insensitivity in severe asthma: significance, mechanisms and aetiology. *Intern Med J*. 2010;40(5):323-34.
143. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax*. 2002;57(10):875-9.
144. Telenga ED, Tideman SW, Kerstjens HA, Hacken NH, Timens W, Postma DS, et al. Obesity in asthma: more neutrophilic inflammation as a possible explanation for a reduced treatment response. *Allergy*. 2012;67(8):1060-8.
145. Bullone M, Murcia RY, Lavoie JP. Environmental heat and airborne pollen concentration are associated with increased asthma severity in horses. *Equine Vet J*. 2016;48(4):479-84.
146. Smith BM, Zhao N, Olivenstein R, Lemiere C, Hamid Q, Martin JG. Asthma and fixed airflow obstruction: Long-term trajectories suggest distinct endotypes. *Clin Exp Allergy*. 2020.

Article 2 - Efficacy of tamoxifen for the treatment of severe equine asthma

Sommaire

Cette étude a évalué les effets d'un court traitement au tamoxifène, un modulateur sélectif des récepteurs à l'œstrogène, chez des chevaux atteints d'asthme sévère. Malgré ses propriétés anti-neutrophiliques *in vitro*, le tamoxifène n'a pas atténué l'inflammation neutrophilique lors de la phase d'exacerbation de la maladie. La molécule a tout de même diminué la résistance pulmonaire, mais de façon beaucoup moins efficace que le contrôle positif, la dexaméthasone. Cette amélioration marginale de l'obstruction respiratoire n'est pas suffisante pour justifier l'utilisation clinique du tamoxifène, mais supporte l'investigation des effets de l'œstrogène dans l'asthme.

Contribution

J'ai participé à l'élaboration des protocoles de déontologie et des demandes de subvention (60%), à la réalisation des procédures expérimentales (mesures de fonction pulmonaire, score clinique respiratoire, endoscopies respiratoires, lavage bronchoalvéolaire; 80%), aux analyses statistiques (80%), à l'analyse des données et à la rédaction du manuscrit (90%). J'étais à l'aveugle dans cette étude, je n'ai donc pas participé à l'administration des médicaments aux animaux.

Article publié

J Vet Intern Med. 2018;32(5):1748-1753. Reprinted with permission of John Wiley and Sons publishing without content modification (open access, Creative Commons Attribution Non-Commercial 4.0 International). Copyright © 2018 John Wiley and Sons publishing.

<https://doi.org/10.1111/jvim.15289>

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Efficacy of tamoxifen for the treatment of severe equine asthma

Sophie Mainguy-Seers^a, Khristine Picotte^a, Jean-Pierre Lavoie^a.

^aUniversité de Montréal, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Clinical Sciences, 3200 Sicotte street, St-Hyacinthe, J2S 2M2, QC, Canada.

Keywords: Airway neutrophilia, dexamethasone, estrogen, heaves.

Abbreviations: BALF, Bronchoalveolar lavage fluid; CI, 95% confidence interval; E_L, pulmonary elastance; NETs, neutrophil extracellular traps; P_L, transpulmonary pressure; R_L, pulmonary resistance.

Corresponding author: Jean-Pierre Lavoie, Faculty of veterinary medicine, Department of Clinical Sciences, 3200 Sicotte Street, St-Hyacinthe, J2S 2M2, QC, Canada, jean-pierre.lavoie@umontreal.ca

This study was performed at the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal.

It was supported by the Equine Research Fund of the Université de Montréal and an unrestricted research grant from Zoetis and the Canadian Institutes of Health Research.

The results of this study were presented at the 35th VCRS annual symposium, Champaign, IL, USA, October 1-4th, 2017.

Conflicts of interest: Authors declare no conflicts of interest.

Off-label antimicrobial use: No antibiotic was used off-labeled.

All experimental procedures were performed in accordance with the Canadian Council for Animal Care guidelines and were approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal (Protocol # Rech-1324).

Abstract

Background: Tamoxifen, a selective estrogen receptor modulator, decreased airway neutrophilia and improved clinical signs in an experimental model of equine asthma, and induced neutrophilic apoptosis in vitro.

Hypothesis/Objectives: That tamoxifen reduces airway neutrophilia and improves lung function in severe asthmatic horses.

Animals: Twelve severe asthmatic horses from a research herd.

Methods: Randomized controlled blinded study design. The effects of a 12-day oral treatment with tamoxifen (0.22 mg/kg, q24h) or dexamethasone (0.06 mg/kg, q24h) on lung function, endoscopic tracheal mucus score and bronchoalveolar lavage fluid cytology were compared.

Results: Tamoxifen significantly improved the pulmonary resistance (R_L) (mean reduction of 1.15 cm H₂O/L/s (CI: 0.29-2.01, $P = .007$) on day 13), but had no effect on the other variables evaluated. Dexamethasone normalized lung function (mean reduction of R_L of 2.48 cm H₂O/L/s (CI: 1.54-3.43, $P < .0001$) on day 13), without affecting airway neutrophilia.

Conclusions and clinical importance: Results of this study do not support the use of tamoxifen at the dose studied as an anti-neutrophilic medication in the treatment of asthmatic horses in chronic exacerbation.

Introduction

Severe equine asthma, also known as heaves or recurrent airway obstruction, is a common and incurable respiratory disease of adult horses. Exacerbations are triggered by inhalation of environmental antigens, most commonly those found in hay. The disease is characterized by airway hyper-responsiveness, mucus hypersecretion, intraluminal neutrophilia and structural changes affecting the airways (remodeling) (1). Through the release of pro-inflammatory mediators, proteases and extracellular traps, neutrophils are potentially major perpetrators of lung damage (2, 3) and their presence has been associated with the dysfunction of peripheral airways in asthmatic patients (4). Usual therapies (corticosteroids and bronchodilators), while improving the lung function, do not normalize airway luminal neutrophilia and tissue remodeling of asthmatic horses (5, 6). Furthermore, clinical signs relapse quickly after cessation of medication (7). Although antigen avoidance controls airway inflammation, pulmonary remodeling is incompletely reversed even after a year at pasture (5). Therefore, therapies targeting airway neutrophilia are required to determine if control of pulmonary inflammation can improve lung function and remodeling in severe equine asthma (8).

Tamoxifen is a synthetic selective estrogen receptor modulator. Because of its antagonism of estrogen-dependent growth and its inhibitory effect on breast epithelial cells proliferation, its major use has been in the treatment of breast cancer (9, 10). Nonetheless, tamoxifen appears to have a broader spectrum of activity as it showed beneficial effects in estrogen-receptor negative cancers, in selected immune disorders, and potentially in spinal cord injury (11-14). As estrogen administration has been associated with both improvement and, contrariwise, to the development of asthma in women, studying the impact of an estrogen receptor modulator could help delineate the role of sex hormones in asthma (15, 16). Recently, it showed promising results for the treatment of severe equine asthma by reducing the neutrophilic chemotactic response and respiratory burst production and by inducing apoptosis of peripheral and pulmonary neutrophils in vitro (17, 18). Tamoxifen was also studied in healthy adult horses in which an asthma-like inflammation was experimentally reproduced by exposure to *Aspergillus fumigatus* contaminated hay. In this experiment, tamoxifen increased the apoptosis of peripheral and pulmonary neutrophils and improved clinical condition, airway neutrophilia and mucus

accumulation (19). We therefore hypothesized that tamoxifen, by decreasing airway neutrophilia, would improve the lung function of severely asthmatic horses. Our objectives were to study the effects of tamoxifen on airway luminal inflammation, on tracheal mucus accumulation and on pulmonary function testing of asthmatic horses during continuous antigen exposure.

Materials and methods

Ethics statement

All experimental procedures were performed in accordance with the Canadian Council for Animal Care guidelines and were approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal (Protocol # Rech-1324).

Animals

Twelve severe asthmatic horses (7 mares and 5 geldings) from our research herd were studied. Horses were mixed breeds, aged 14 ± 4 years and weighed 514 ± 51 kg. The horses were diagnosed with severe asthma based on history and previous results of pulmonary function and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology. These horses had historically $> 25\%$ neutrophils on BALF cytology and a transpulmonary pressure (P_L) change above 15 cm of H_2O when stabled and fed hay and airway obstruction was reversible by antigen avoidance. The presence of a concomitant medical condition was excluded with a physical examination and complete blood count.

To induce chronic exacerbation of the disease as seen in clinical practice, the animals were stabled 3 weeks prior to the study and were fed dry timothy hay and sweet feed twice daily. The management remained the same throughout the study period. No treatment was administered at least 7 weeks prior to the trial. Horses were conditioned to wear a mask and to stand in a stock.

Pulmonary function tests

Lung function was measured in standing unsedated animals, except for one horse that required sedation prior to each pulmonary function test (xylazine (Rompum, Bayer, Mississauga, ON,

Canada), 0.4 mg/kg, IV) (6). Briefly, esophageal pressure was measured as an index of the transpulmonary pressure (P_L) using a balloon sealed over the end of a polyethylene catheter placed in the distal third of the esophagus. Flow rates were obtained by use of a heated pneumotachograph and a differential pressure transducer fitted to a mask placed over the horse's nose. The system (Flexiware 7.6, SCIREQ, Montréal, QC, Canada) allowed electronic integration of the flow signal to provide tidal volume. Prior to each experiment, the system was calibrated by forcing known flow of air through the pneumotachograph with a blower-rotameter and by applying known pressure with a water manometer on the differential pressure transducer used to measure esophageal pressure. Values of pulmonary resistance (R_L) and elastance (E_L) were obtained by applying the data to the multiple regression equation for the single compartment model of the lung ($P_L = E_L V + R_L \dot{V} + K$) where V is the volume, \dot{V} the airflow and K the transpulmonary end-expiratory pressure. All the valid breaths were used for analysis.

Endoscopic tracheal mucus scoring and bronchoalveolar lavage

Horses were sedated with xylazine (Rompum, Bayer, Mississauga, ON, Canada; 0.5 mg/kg, IV) and butorphanol (Torbugesic, Zoetis, Florham Park, NJ, USA; 20 to 30 μ g/kg, IV) and tracheoscopy was performed with a 1.6 m videoendoscope (Evis Exera II CV-180, Olympus Canada Inc. Richmond Hill, ON, Canada). Tracheal mucus score was evaluated during reviewing of video recordings by an investigator blinded to the treatment group (20). Bronchoalveolar lavage was performed as previously described (6). Briefly, after topical anesthesia with 0.5% lidocaine (Lurocaine; lidocaine hydrochloride 20 mg/ml, Vétoquinol N.-A. Inc., 2000, ch. Georges, Lavaltrie, QC, Canada), two 250 ml-boluses of warm sterile isotonic saline (0.9% Sodium Chloride Injection, USP, Baxter, Mississauga, ON, Canada) were sequentially instilled into a main bronchus through the videoendoscope and then aspirated with a suction pump. The samples were kept on ice until reaching the laboratory within 90 minutes. Cytocentrifuged preparations of BALF (400 μ L, unfiltered) were made and cells were stained with a modified Wright–Giemsa solution (DiffQuick, Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Differential leucocyte counts from 400 cells were performed by an investigator blinded to the treatment group.

Study protocol

After randomization based on pulmonary resistance ranking value, six horses received tamoxifen citrate (Apo-tamox, Apotex Inc., 150 Signet Drive, Toronto, ON, Canada; 20 mg/tablet, 0.22 mg/kg, PO) (19) once daily and six horses received dexamethasone (Dexamethasone powder, Dominion Veterinary Laboratories Ltd. 1199 Sanford Street, Winnipeg, MB, Canada; 10 mg/packet, 0.06 mg/kg, PO) once daily for 12 days. Pulmonary function tests were performed prior to treatment on day 1, and on days 6 and 13. Endoscopic tracheal mucus scores and bronchoalveolar lavages were performed on days 1 and 13. The attitude, appetite and a clinical respiratory score (21) were evaluated daily by a blinded investigator.

Statistical analysis

Bronchoalveolar lavage, lung function and the clinical respiratory score data were analysed with repeated-measures two-way ANOVA with “group” as the between-subject factor and “time” (days of treatment) as the within-subject factor with Bonferroni corrections for multiple comparisons. Mucus scores were evaluated within each treatment group with Wilcoxon matched-pairs signed rank tests and between treatment groups with Mann-Whitney tests. Data are described as mean difference with 95% confidence interval (CI). P values < .05 were considered statistically significant. GraphPad Prism 7 (GraphPad Prism 7, GraphPad Software, Inc, La Jolla, California, USA) was used for statistical calculations.

Results

No adverse effect was observed in the tamoxifen group. On the ninth day of treatment, a horse treated with dexamethasone developed hypocalcemic and hypomagnesemic tetany unresponsive to therapy. Euthanasia was humanely elected for this animal and at necropsy, loss of the principal cells of the parathyroid gland was observed. The exact cause of this finding was undetermined. All data from that horse were excluded from analysis.

Pulmonary function tests and clinical respiratory scores

Horses were in clinical exacerbation of the disease at baseline ($P_L > 15$ cm H₂O, $R_L > 1$ cm H₂O/L/s and $E_L > 1$ cm H₂O/L). A group-time interaction was noted for the R_L , E_L and P_L values as dexamethasone significantly improved lung function which normalized in all treated horses when evaluated on day 6 (mean reduction of R_L of 2.29 cm H₂O/L/s (CI: 1.35-3.24, $P < .0001$), mean reduction of E_L of 4.44 cm H₂O/L (CI: 2.51-6.37, $P < .0001$) and mean reduction of P_L of 32.44 cm H₂O (CI: 20.69-44.20, $P < .0001$) and 13 (mean reduction of R_L of 2.48 cm H₂O/L/s (CI: 1.54-3.43, $P < .0001$), mean reduction of E_L of 4.45 cm H₂O/L (CI: 2.52-6.38, $P < .0001$) and mean reduction of P_L of 34.65 cm H₂O (CI: 22.89-46.41, $P < .0001$)) (Figure 1, 2, 3). Treatment with tamoxifen had no significant effect on P_L (mean increase of 2.19 cm H₂O on day 13 (CI: -12.93-8.54, $P > .99$)) and E_L (mean increase of 1.74 cm H₂O/L on day 13 (CI: -3.51-0.02, $P = .054$)). However, a significant reduction of R_L was noted at the end of the treatment period with tamoxifen (mean reduction of 1.15 cm H₂O/L/s (CI: 0.29-2.01, $P = .007$)). The clinical respiratory scores were improved in the dexamethasone group only, on day 6 (mean reduction of 1.6/8 (CI: 0.2-3, $P = .01$)), 8 (mean reduction of 1.8/8 (CI: 0.4-3.2, $P = .004$)), 10 (mean reduction of 1.8/8 (CI: 0.4-3.2, $P = .004$)) and 11 (mean reduction of 2.2/8 (CI: 0.8-3.6, $P = .0002$)) (figure 4).

Tracheal mucus scores

No difference was observed in the tracheal mucus scores between treatment groups at baseline or after therapy (mean reduction of 0.8/5 (CI: -2.8-1.1, $P = .56$) in the tamoxifen group and mean reduction of 0.5/5 (CI: -2.0-1.0, $P = .75$) in the dexamethasone group on day 13) (Figure 5).

BALF cytology

At the beginning of the study, the percentage of neutrophils in the BALF was above normal ($> 5\%$) in 10 of the 11 remaining horses. The horse lacking airway neutrophilia was excluded from analysis concerning BALF cytology. The two-way ANOVA showed a group effect ($P = .02$) which was possibly related to a higher neutrophilia at baseline in the tamoxifen group. Neither tamoxifen (mean reduction of 17.3% (CI: -15.1-49.8, $P = .35$)) nor dexamethasone (mean reduction of 3.3% (CI: -29.2-35.7, $P > .99$)) improved the BALF neutrophilia (Figure 6).

Discussion

The results of this randomized controlled study failed to detect an effect of a short-term treatment with tamoxifen on airway neutrophilia in severe asthmatic horses, refuting our hypothesis. A statistically significant diminution, but not a normalization, of airway resistance was observed, without improvement of the pulmonary elastance. As expected, dexamethasone normalized lung function without reducing airway inflammation (6) nor macroscopic mucus accumulation (22).

Tamoxifen's effectiveness in the treatment of breast cancer is partly attributed to the apoptosis of tumor cells mediated by oxidative stress and increased ceramide intracellular level among other mechanisms (23). Tamoxifen also causes ceramide intracellular accumulation in neutrophils (24), therefore, we suspected that it could lead to neutrophilic apoptosis and concurrent improvement of airway inflammation. However, we did not observe a decrease of airway neutrophilia with tamoxifen which contrasts with previous reports. Indeed, in one study, tamoxifen administered every other day for three doses reduced experimentally induced intraluminal inflammation in healthy horses (19). However, the pathways responsible for neutrophil accumulation in healthy horses after hay exposure likely differ from that of asthmatic horses which might explain these different results. Also, because the airway neutrophilia is transient when hay is introduced to healthy horses and considering that antigenic exposure was ceased when the treatment was initiated, the improvement reported might have been the normal kinetic of airway inflammation regulation, rather than an effect of tamoxifen (25). Moreover, the duration of the antigenic challenge was of a short duration (one week) compared to ours (three weeks), which could have contributed the discordance of the results. The chronicity of the exacerbation in our study could have impeded the anti-inflammatory efficacy of this medication. However, to be useful clinically, a treatment would have to be effective under these conditions.

The effects of tamoxifen on neutrophils are controversial with *in vitro* studies suggesting an anti-inflammatory effect by the induction of apoptosis, a reduction of the chemotactic response and respiratory burst production, a decreased production of 5-lipoxygenase and a diminution of the neutrophilic infiltration to the site of injury (17-19, 26, 27). To the contrary, other experiments have shown activation of neutrophils by an enhancement of their chemotaxis, phagocytic and

bactericidal activity and neutrophil extracellular traps (NETs) formation (24). Because aberrant NETs production is a feature of human and equine asthma, medications increasing their formation might be detrimental for the treatment of this condition (3, 28). Furthermore, it has been suggested that the immunomodulation associated with tamoxifen is mediated by a shift from a Th1 to a Th2 response, possibly related to an inhibition of the maturation of dendritic cells (11, 29). Because a predominant Th2-type response has been associated with exacerbation in severe equine asthma, at least in some horses (30, 31), a shift in cellular signaling might explain the lack of efficacy in our study. Of note, a case report describes human asthma exacerbations induced by tamoxifen, but the mechanisms of those deteriorations were not determined (32). Taken together, the usefulness of this medication raises interrogations in a disease where immunological pathways involved are complex and incompletely understood.

The main limitation of our trial is the small number of horses which might have precluded the detection of small differences in the airway neutrophilia, the primary outcome of this study. Additionally, the mild neutrophilia (< 25%) observed in 5 horses in the present trial could have reduced our capacity to identify improvement of luminal inflammation. Even though the BALF cytology is a mainstay in asthma diagnosis, the degree and onset of neutrophilic influx might not be constant (33). From these 5 horses, only one had airway neutrophilia defined as normal (< 5%) despite its disease being well characterized by being part of the research herd for several years, and the presence of severe airway obstruction (R_L of 4.3 cm H₂O/L/s and E_L of 2.2 cm H₂O/L) at the onset of the study. Nevertheless, the changes in airway neutrophilia with tamoxifen were inconsistent, and did not lead to normalization in any horses. Our sample size was based on power analysis calculated from the Perez's study (19) results where 6 animals in each group was sufficient to observe significant improvement in airway inflammation, clinical score and mucus accumulation with tamoxifen. However, considering the mild reduction of neutrophilia and the variability of the data in the current study, about 30 severe asthmatic animals would have been required to obtain significant result with a power of 80% and alpha set at 0.05. Such a small effect would question the usefulness of this drug for the treatment of severe equine asthma. Lastly, we can not exclude that the lack of improvement could have been due to inappropriate dosage. The dose was chosen because it was reportedly effective at decreasing the airway neutrophilia in

experimental airway inflammation in horses and was similar to the dosage used for breast-cancer treatment (10, 19). The pharmacokinetics of the molecule is currently studied (G. Morán, personal communication). The results of this study should be interpreted in light of the limitations raised above.

The clinical significance of the improvement in R_L with tamoxifen in the present study is difficult to conceptualize because the other parameters of lung function and the clinical respiratory scores were unchanged. Resistance is associated with airflow limitations in central airways. Therefore, it is possible that tamoxifen mediated specific bronchodilator effect on central bronchi independently from an effect on airway luminal neutrophils and without improving airflow in the periphery of the lung. Selective estrogen receptor modulators can act as a receptor antagonist or agonist depending on the target cells. Interestingly, estrogen possesses bronchodilator property which might be related to its receptor colocalization with beta-2 adrenergic receptors in airway smooth muscle cells (34). Some studies associate estrogen with improvement of asthma symptoms or lung function (15), while others suggest a detrimental effect of this sex hormone (16). Therefore, an estrogen-mediated bronchodilation would be a possible explanation for the reduced R_L observed in our study, however more research on the role of sex hormones in asthma is required. Alternatively, the bronchodilation could have been mediated by an interaction with calcium-channels. A reduction of vascular smooth muscle cell contractility has been reported with tamoxifen and the authors suggested that the effect might be related to an inhibition of voltage dependant calcium channels (35).

Consistent with the favorable safety profile of tamoxifen in humans, we did not observe adverse events with a short-term administration. Reported adverse effects after prolonged use include endometrial cancers and thromboembolic accidents (9). The refractory hypocalcemic and hypomagnesemic tetany observed in a dexamethasone treated horse was associated with the loss of principal cells in the parathyroid gland which possibly decreased the production of parathyroid hormone. Because glucocorticoids alter calcium metabolism by increasing urinary excretion and decreasing intestinal absorption, the primary underlying condition might have been worsened by the dexamethasone treatment (36, 37).

In conclusion, a short-term tamoxifen treatment failed to improve airway inflammation of severely asthmatic horses in chronic exacerbation, precluding the use of this medication at the current posology to assess the role of pulmonary neutrophils in the disease. The therapy resulted in a reduction of R_L , but in contrast to dexamethasone, the lung function did not normalize. Nevertheless, deciphering the mechanisms responsible for the improvement in lung function of severe asthmatic horses with tamoxifen is of interest and justifies determining its pharmacokinetics for future studies.

References

1. Pirie RS. Recurrent airway obstruction: a review. *Equine Vet J.* 2014;46(3):276-88.
2. Ciepiela O, Ostafin M, Demkow U. Neutrophils in asthma--a review. *Respir Physiol Neurobiol.* 2015;209:13-6.
3. Cote O, Clark ME, Viel L, Labbe G, Seah SY, Khan MA, et al. Secretoglobin 1A1 and 1A1A differentially regulate neutrophil reactive oxygen species production, phagocytosis and extracellular trap formation. *PLoS One.* 2014;9(4):e96217.
4. Farah CS, Keulers LA, Hardaker KM, Peters MJ, Berend N, Postma DS, et al. Association between peripheral airway function and neutrophilic inflammation in asthma. *Respirology.* 2015;20(6):975-81.
5. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Joubert P, Relave F, Setlakwe EL, Beauchamp G, et al. Corticosteroids and antigen avoidance decrease airway smooth muscle mass in an equine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;47(5):589-96.
6. Lavoie JP, Pasloske K, Joubert P, Cordeau ME, Mancini J, Girard Y, et al. Lack of clinical efficacy of a phosphodiesterase-4 inhibitor for treatment of heaves in horses. *J Vet Intern Med.* 2006;20(1):175-81.
7. Rush BR, Raub ES, Rhoads WS, Flaminio MJ, Matson CJ, Hakala JE, et al. Pulmonary function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *Am J Vet Res.* 1998;59(8):1039-43.
8. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology.* 2011;16(7):1027-46.
9. Traboulsi T, El Ezzy M, Gleason JL, Mader S. Antiestrogens: structure-activity relationships and use in breast cancer treatment. *J Mol Endocrinol.* 2017;58(1):R15-R31.

10. Howell SJ, Johnston SR, Howell A. The use of selective estrogen receptor modulators and selective estrogen receptor down-regulators in breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2004;18(1):47-66.
11. Behjati S, Frank MH. The effects of tamoxifen on immunity. *Curr Med Chem.* 2009;16(24):3076-80.
12. Colon JM, Miranda JD. Tamoxifen: an FDA approved drug with neuroprotective effects for spinal cord injury recovery. *Neural Regen Res.* 2016;11(8):1208-11.
13. Sereda D, Werth VP. Improvement in dermatomyositis rash associated with the use of antiestrogen medication. *Arch Dermatol.* 2006;142(1):70-2.
14. Few J, Thompson NW, Angelos P, Simeone D, Giordano T, Reeve T. Riedel's thyroiditis: treatment with tamoxifen. *Surgery.* 1996;120(6):993-8; discussion 8-9.
15. Chandler MH, Schuldheisz S, Phillips BA, Muse KN. Premenstrual asthma: the effect of estrogen on symptoms, pulmonary function, and beta 2-receptors. *Pharmacotherapy.* 1997;17(2):224-34.
16. Troisi RJ, Speizer FE, Willett WC, Trichopoulos D, Rosner B. Menopause, postmenopausal estrogen preparations, and the risk of adult-onset asthma. A prospective cohort study. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152(4 Pt 1):1183-8.
17. Borlone C, Morales N, Henriquez C, Folch H, Olave C, Sarmiento J, et al. In Vitro effects of tamoxifen on equine neutrophils. *Res Vet Sci.* 2017;110:60-4.
18. Sarmiento J, Perez B, Morales N, Henriquez C, Vidal L, Folch H, et al. Apoptotic effects of tamoxifen on leukocytes from horse peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid. *Vet Res Commun.* 2013;37(4):333-8.
19. Perez B, Henriquez C, Sarmiento J, Morales N, Folch H, Galesio JS, et al. Tamoxifen as a new therapeutic tool for neutrophilic lung inflammation. *Respirology.* 2016;21(1):112-8.

20. Gerber V, Straub R, Marti E, Hauptman J, Herholz C, King M, et al. Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Vet J.* 2004;36(7):576-82.
21. Robinson NE, Olszewski MA, Boehler D, Berney C, Hakala J, Matson C, et al. Relationship between clinical signs and lung function in horses with recurrent airway obstruction (heaves) during a bronchodilator trial. *Equine Vet J.* 2000;32(5):393-400.
22. Courouce-Malblanc A, Fortier G, Pronost S, Siliart B, Brachet G. Comparison of prednisolone and dexamethasone effects in the presence of environmental control in heaves-affected horses. *Vet J.* 2008;175(2):227-33.
23. Bekele RT, Venkatraman G, Liu RZ, Tang X, Mi S, Benesch MG, et al. Oxidative stress contributes to the tamoxifen-induced killing of breast cancer cells: implications for tamoxifen therapy and resistance. *Sci Rep.* 2016;6:21164.
24. Corriden R, Hollands A, Olson J, Derieux J, Lopez J, Chang JT, et al. Tamoxifen augments the innate immune function of neutrophils through modulation of intracellular ceramide. *Nat Commun.* 2015;6:8369.
25. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Gelinas-Lymburner E, David F, Martin JG, Lavoie JP. 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):181-7.
26. Tavares IA, Stamford IF, Bennett A. Tamoxifen inhibits 5-lipoxygenase in human polymorphonuclear leucocytes. *J Pharm Pharmacol.* 1987;39(4):323-4.
27. Wei HY, Ma X. Tamoxifen reduces infiltration of inflammatory cells, apoptosis and inhibits IKK/NF- κ B pathway after spinal cord injury in rats. *Neurol Sci.* 2014;35(11):1763-8.
28. Dworski R, Simon HU, Hoskins A, Yousefi S. Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(5):1260-6.
29. Komi J, Lassila O. Nonsteroidal anti-estrogens inhibit the functional differentiation of human monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 2000;95(9):2875-82.

30. Lavoie JP, Maghni K, Desnoyers M, Taha R, Martin JG, Hamid QA. 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):1410-3.
31. Cordeau ME, Joubert P, Dewachi O, Hamid Q, Lavoie JP. IL-4, IL-5 and IFN-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004;97(1-2):87-96.
32. Smith RP, Dewar JA, Winter JH. Tamoxifen-induced asthma. *Lancet.* 1993;341(8847):772.
33. Fairbairn SM, Page CP, Lees P, Cunningham FM. Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure. *Clin Exp Allergy.* 1993;23(10):821-8.
34. Townsend EA, Sathish V, Thompson MA, Pabelick CM, Prakash YS. Estrogen effects on human airway smooth muscle involve cAMP and protein kinase A. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;303(10):L923-8.
35. Song J, Standley PR, Zhang F, Joshi D, Gappy S, Sowers JR, et al. Tamoxifen (estrogen antagonist) inhibits voltage-gated calcium current and contractility in vascular smooth muscle from rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;277(3):1444-53.
36. Glade MJ, Krook L, Schryver HF, Hintz HF. Calcium metabolism in glucocorticoid-treated pony foals. *J Nutr.* 1982;112(1):77-86.
37. Liamis G, Milionis HJ, Elisaf M. A review of drug-induced hypocalcemia. *J Bone Miner Metab.* 2009;27(6):635-42.

Figures

Figure 1. Values of transpulmonary pressure (P_L) on day 1 (before administration of medication), day 6 and day 13 of treatment with tamoxifen (black circles) and dexamethasone (white circles).

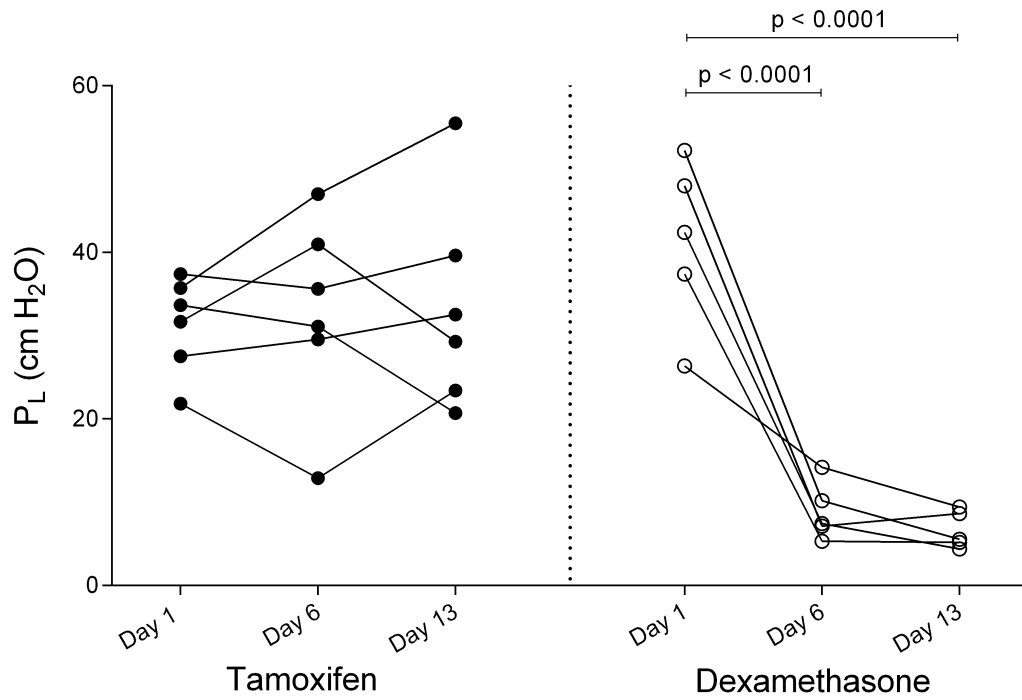


Figure 2. Values of pulmonary resistance (R_L) on day 1 (before administration of medication), day 6 and day 13 of treatment with tamoxifen (black circles) and dexamethasone (white circles).

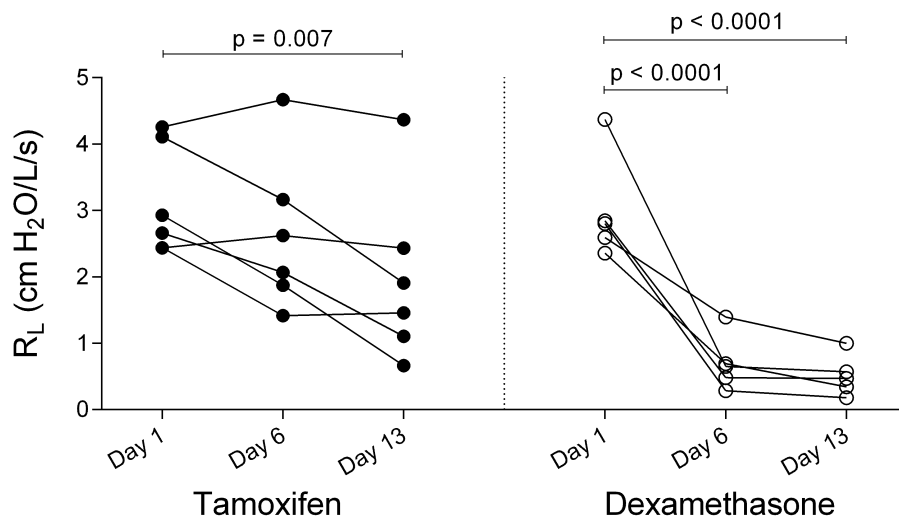


Figure 3. Values of pulmonary elastance (E_L) on day 1 (before administration of medication), day 6 and day 13 of treatment with tamoxifen (black circles) and dexamethasone (white circles).

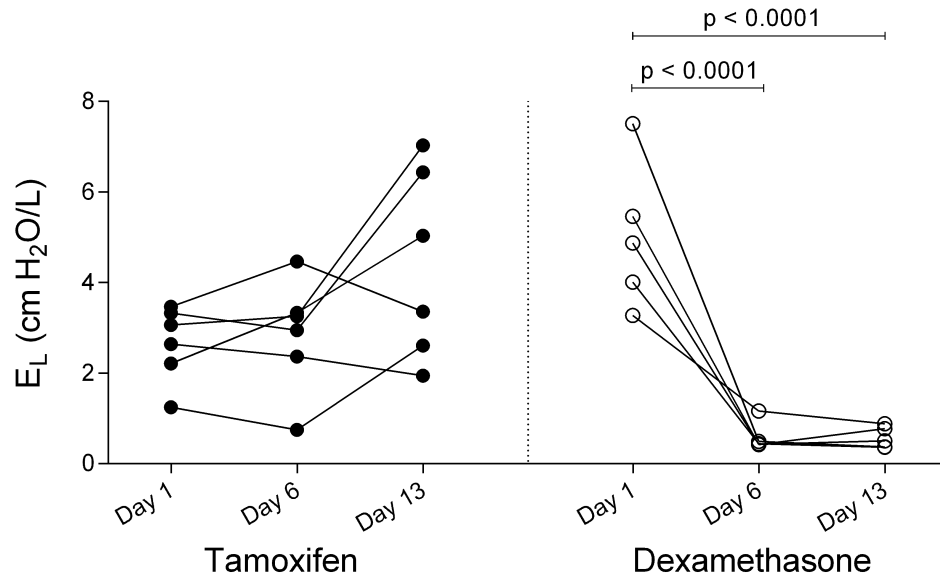


Figure 4. Daily clinical respiratory scores (means and standard deviations) from day 1 (before administration of medication) to day 13 of treatment with tamoxifen (black circles) and dexamethasone (white circles). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (significant differences from baseline).

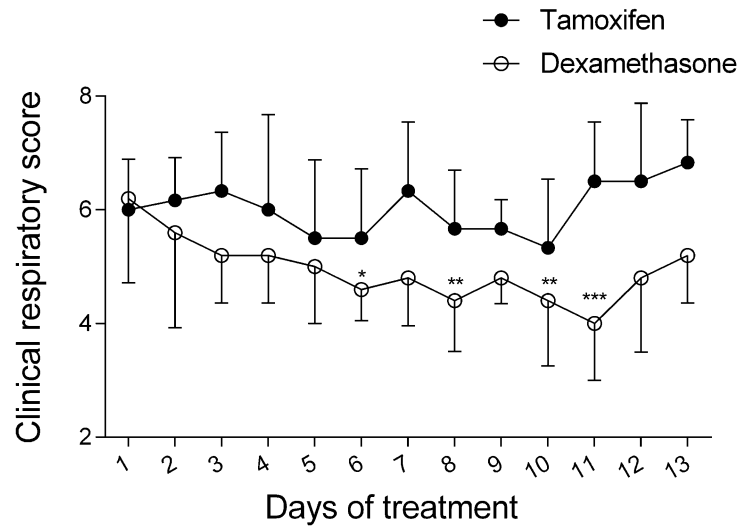


Figure 5. Tracheal mucus scores on day 1 (before administration of medication) and day 13 of treatment with tamoxifen (black circles) and dexamethasone (white circles).

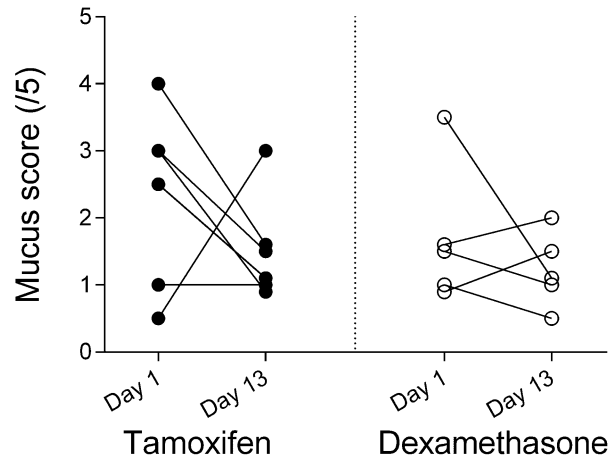
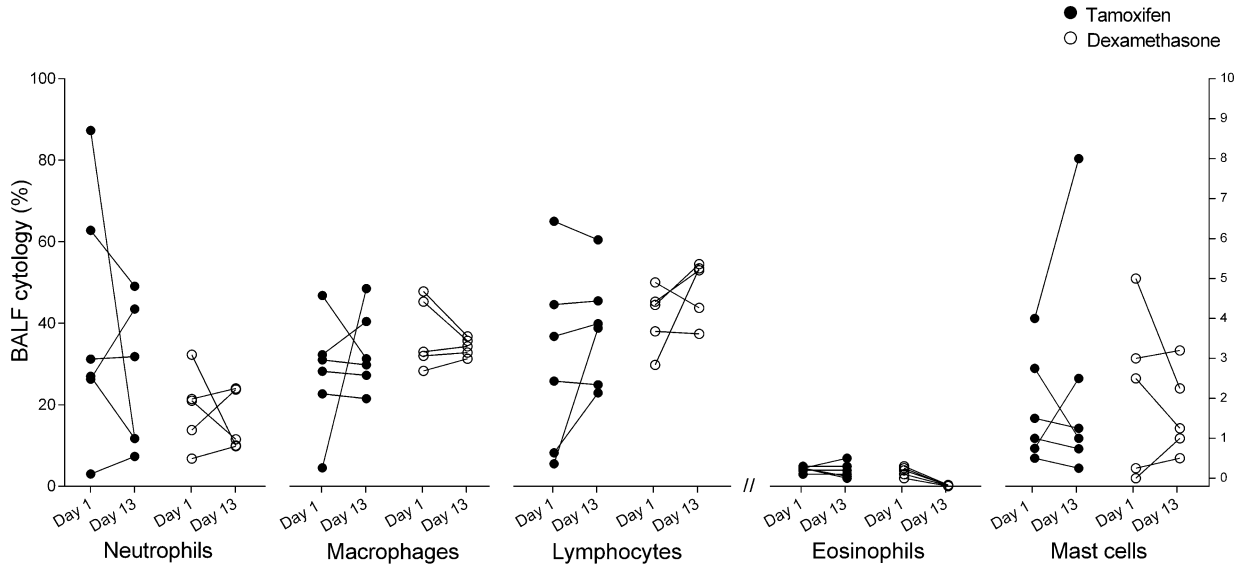


Figure 6. Percentage of each leucocyte population in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) before (day 1) and after treatment (day 13) with tamoxifen (black circles) and dexamethasone (white circles). The left Y axis applies to the percentage of neutrophils, macrophages and lymphocytes. The right Y axis applies to the percentage of eosinophils and mast cells.



Article 3 - Randomised study of the immunomodulatory effects of azithromycin in severely asthmatic horses

Sommaire

Les effets d'un traitement de dix jours à l'azithromycine, un macrolide possédant des propriétés immunomodulatrices, et au ceftiofur, un autre antibiotique à large spectre, mais n'ayant pas d'effet anti-inflammatoire rapporté, ont été comparés dans l'asthme équin sévère. La fonction respiratoire, l'inflammation pulmonaire et les lésions de remodelage des voies respiratoires centrales ont été évaluées. Alors que le ceftiofur n'a eu aucun impact sur les paramètres examinés, l'azithromycine a réduit l'expression génique des cellules du lavage bronchoalvéolaire pour le CXCL8 et l'IL-1 β , sans modifier la neutrophilie pulmonaire ni la sévérité de l'obstruction respiratoire.

Contribution

J'ai participé à l'élaboration des protocoles de déontologie et des demandes de subvention (60%), à la réalisation des procédures expérimentales (mesures de fonction pulmonaire, endoscopies respiratoires avec lavage trachéal, lavage bronchoalvéolaire et biopsies endobronchiques; 70%), à l'administration des médicaments (80%), aux analyses histologiques (20%), à la réalisation des analyses PCR (10%), aux analyses statistiques (80%) et à la rédaction du manuscrit (90%).

Article publié

Vet Rec. 2019;185(5):143. Reprinted with permission of John Wiley and Sons publishing.
Copyright © 2019 John Wiley and Sons publishing.

<https://doi.org/10.1136/vr.105260>

Randomised study of the immunomodulatory effects of azithromycin in severely asthmatic horses

Sophie Mainguy-Seers¹, Amandine Vargas¹, Olivia Labrecque², Christian Bédard³, Pierre Hélie³, Jean-Pierre Lavoie*¹.

¹Université de Montréal, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Clinical Sciences, St-Hyacinthe, Canada.

²Laboratoire d'épidémiosurveillance animale du Québec, Saint-Hyacinthe, Canada.

³Université de Montréal, Faculty of Veterinary Medicine, Department of pathology and microbiology, St-Hyacinthe, Canada.

*Corresponding author: Jean-Pierre Lavoie, Université de Montréal, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Clinical Sciences, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, J2S 2M2, QC, Canada.

Abstract

Neutrophilic inflammation is believed to contribute to the airway obstruction and remodelling in equine asthma. Azithromycin, an antibiotic with immunomodulatory properties, reduces pulmonary neutrophilia and hyper-responsiveness in human asthmatics and decreases airway remodelling in rodent models of asthma. It was therefore hypothesized that azithromycin would improve lung function, mucus accumulation and central airway remodelling by decreasing luminal neutrophilia in severe equine asthma. The effects of a 10-day treatment with either azithromycin or ceftiofur, an antimicrobial without immune-modulating activity, were assessed using a blind, randomised, cross-over design with six severe asthmatic horses in clinical exacerbation. Lung function, tracheal mucus accumulation, tracheal wash bacteriology, bronchial remodelling, airway neutrophilia and mRNA expression of proinflammatory cytokines (IL-8, IL-17A, IL-1 β , tumor necrosis factor- α) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were evaluated. Azithromycin decreased the expression of IL-8 ($p = 0.03$, one-tailed) and IL-1 β ($p = 0.047$, one-tailed) but failed to improve the other variables evaluated. Ceftiofur had no effect on any parameter. The reduction of neutrophilic chemoattractants (IL-8, IL-1 β) justifies further efforts to investigate the effects of a prolonged treatment with macrolides on airway neutrophilia and remodelling. The lack of efficacy of ceftiofur suggests that severe equine asthma should not be treated with antibiotics at first-line therapy.

Introduction

Severe equine asthma, also known as heaves or recurrent airway obstruction, is a non-infectious respiratory disease of middle-aged to older horses. The disease is characterized by bronchospasm, mucus accumulation, luminal neutrophilia and airway remodelling (1). Because neutrophils are associated with the release of metalloproteinases, neutrophil extracellular traps (NETs), myeloperoxidase and reactive oxygen species in severe equine asthma (2-5) these leucocytes likely participate in the chronic tissue damage leading to airway structural changes. As exosomes from lipopolysaccharide-stimulated equine neutrophils amplify the proliferation of airway smooth muscle cells, these leucocytes might contribute to the increased airway smooth muscle mass in asthmatic horses (6). Furthermore, airway neutrophilia has been associated with heterogeneity of small airway ventilation (7), and air trapping (8) in human asthmatics.

Conventional treatments with corticosteroids and bronchodilators fail to normalize luminal neutrophilia, and uninterrupted treatments are necessary to control the clinical signs if strict antigen avoidance is not implemented (9-11). Although prolonged environmental management improves lung function and airway neutrophilia, it is still insufficient to normalize the airway smooth muscle thickening, even with concurrent administration of inhaled corticosteroids (10). Therefore, treatments specifically targeting airway neutrophil recruitment (12) and tissue remodelling are required to determine whether airway structural changes can be improved to a greater extent than currently achieved through the use of conventional therapies.

The macrolide family are structurally composed of a macrocyclic lactone ring and includes antibiotic, antifungal, immunosuppressive and prokinetic molecules. In addition to their antimicrobial properties, the 14-membered and 15-membered macrolides, such as erythromycin, clarithromycin and azithromycin, possess immunomodulatory activity (13). Those characteristics have led to their extensive use for the treatment of non-infectious pulmonary diseases in humans. In diffuse panbronchiolitis, cystic fibrosis and asthma, prolonged macrolide therapy can improve airway inflammation and lung function (13). However, divergent results were obtained in the numerous studies conducted in asthmatics patients, bringing controversy on the beneficial effects of macrolides in this condition. Contradictions might have arisen from the heterogeneity of the

disease, as distinct sub-groups respond differently to treatment. Importantly, macrolides might be more effective in human patients with neutrophilic asthma (14, 15).

In addition to the regulation of inflammatory cells, macrolides can modulate key structural components contributing to airway obstruction. Reduction of epithelial mucus secretion in vitro and in vivo, enhancement of mucociliary clearance (16-18), and improvement in smooth muscle thickening in rodent models of asthma are reported effects of these molecules (19-22).

Combined, these findings suggest that macrolides could be of benefit for the treatment of severe equine asthma, a neutrophilic disease. Therefore, the hypothesis of this study was that administration of azithromycin to severe asthmatic horses would improve lung function and attenuate airway remodelling and mucus accumulation by decreasing luminal neutrophilia and neutrophilic mediators. To attempt differentiation between the immunomodulatory and antimicrobial activity of the macrolide, the results were compared to those obtained after treatment with ceftiofur, a broad-spectrum antibiotic without reported anti-inflammatory properties. The primary objectives of this proof-of-concept experiment were to investigate if a short macrolide treatment was sufficient to improve pulmonary inflammation and lung function. The effects of treatments on tracheal mucus accumulation, tracheal bacterial populations and central airway remodelling were the secondary outcomes.

Materials and methods

Animals

Six severe asthmatic horses (three mares and three geldings) from a research herd were studied. Horses were mixed breeds, aged 13 ± 2.5 years and weighed 534 ± 53 kg. Diagnosis of severe asthma was established according to the history and previous pulmonary function measurements and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology. When stabled and fed hay, these horses had greater than 25 per cent neutrophils on BALF cytology and a transpulmonary pressure change of greater than 15 cm of H₂O. The presence of a concomitant medical condition was ruled out based on physical examination and complete blood count. The horses were stabled and fed hay starting

at least three weeks before the study to induce clinical exacerbation. The duration of turnout (dirt paddock) was predetermined for each horse according to the severity of their disease. Other than regular anthelmintic treatments and vaccination, no medication was given to the animals for at least two months prior to the trial.

Study protocol

Horses were allocated randomly by coin toss to one of the two treatment regimens. Using a cross-over design, three horses initially received azithromycin (PMS-Azithromycin 250 mg/co, Pharmascience, Montreal, Quebec, Canada) (10 mg/kg, orally) once daily for five days, then every other day for two additional doses for a total of seven doses (23, 24). The three other horses were first treated with ceftiofur crystalline free acid (Excede, Zoetis, Florham Park, New Jersey, USA) (6.6 mg/kg, intramuscularly) twice, four days apart (25). The medication administration began after the baseline measurements, and post-treatment evaluation was performed ten days after initiation of therapy. There was a wash-out period of three weeks during which the management (diet and turnout) was planned to remain unchanged. After the washout period, the treatments were inverted for each horse. To confirm the reversibility of airway obstruction, lung function was measured two months after the end of the study, while the horses were kept outside and fed haylage.

Pulmonary function tests

Lung function measurements were performed in standing unsedated horses. Briefly, oesophageal pressure was measured as an index of transpulmonary pressure via a balloon sealed over the end of a polyethylene catheter placed in the distal third of the oesophagus. Flow rates were obtained with a heated pneumotachograph and a differential pressure transducer fitted to a mask placed over the horse's nose. The head was positioned to minimize upper airway resistance during measurements (26). The system (Flexiware 7.6, SCIREQ, Montreal, Quebec, Canada) allowed electronic integration of the flow signal to provide tidal volume. Values of pulmonary resistance (R_L) and elastance (E_L) were obtained by applying the measured data to the multiple regression equation for the single compartment model of the lung ($P_L = E_L V + R_L \dot{V} + K$) where V is the

volume, \dot{V} the airflow and K the transpulmonary end-expiratory pressure. All the valid breaths were used for analysis.

Endoscopic tracheal mucus scoring, tracheal wash bacteriology and bronchoalveolar lavage

Horses were sedated with detomidine (Dormosedan, Zoetis) (8-12 $\mu\text{g}/\text{kg}$, intravenously) and butorphanol (Torbugesic, Zoetis) (20 to 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, intravenously) and tracheoscopy was performed with a 1.6-m videoendoscope (12.8-mm external diameter) (Evis Exera II CV-180, Olympus Canada, Richmond Hill, Ontario, Canada). Tracheal mucus was scored during blinded reviewing of video recordings (27). Tracheal wash was performed using a sterile triple-lumen transendoscopic catheter (Tracheal Wash/Aspiration, Triple Stage Catheter (2.3 mm x 190 cm), MILA International, Florence, Kentucky, USA) to avoid upper airway contamination. Briefly, 15 ml of sterile saline (0.9 per cent Sodium Chloride Injection, USP, Baxter, Mississauga, Ontario, Canada) was instilled in the distal trachea and then aspirated. The samples were kept on ice until reaching the bacteriology laboratory within two hours. Ten microliters were plated on blood agar, incubated at 35°C with 5 per cent CO_2 , and bacterial species identification and quantification were performed 48 hours later. The sample would be considered contaminated if more than six bacterial species were recovered.

Bronchoalveolar lavage were performed immediately following the tracheal wash as previously described (9). Briefly, two 250-ml boluses of warm sterile isotonic saline (0.9 per cent Sodium Chloride Injection, USP, Baxter) were sequentially instilled through the videoendoscope into a main bronchus and then aspirated with a suction pump. The samples were kept on ice until reaching the laboratory for processing within 90 minutes. Cytocentrifuged preparations of BALF were stained with a modified Wright–Giemsa solution (Diff-Quik, Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). BALF were centrifuged at 1500 rpm (500g) for five minutes then cell pellets were washed twice in PBS, resuspended in Trizol reagent and kept at -80°C until RNA extraction. Differential leucocyte counts were performed blindly from 400 cells by a boarded clinical pathologist. Subsequently, apoptotic neutrophils (polymorphonuclear cells with densely staining pyknotic nuclear remnants) were identified by a blinded investigator as previously reported (28, 29). The percentage of apoptosis was evaluated by counting 500 neutrophils.

Reverse transcription quantitative PCR

Absolute quantification of the messenger ribonucleic acid (mRNA) expression of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-17 isoform A (IL-17A), interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were measured by RT-qPCR before and after each treatment period from the BALF cells. Briefly, mRNA was extracted from BALF cell pellets with Trizol reagent according to manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific, Burlington, Ontario, Canada). Purity and concentration were assessed with a spectrophotometer (Nanodrop ND1000) (Fisher Scientific). One microgram of total mRNA was reverse transcribed in duplicate using Superscript III 200 U/ μ L (Thermo Fisher Scientific) with RNase inhibitor (Promega, Madison, Wisconsin, USA) (20 U), oligo(dT) (Thermo Fisher Scientific) (25 ng/ μ l), DTT (Thermo Fisher Scientific) (dithiothreitol; 10 mM) and dNTP (Thermo Fisher Scientific) (deoxynucleotide triphosphate; 100 μ M). Quantitative PCR reactions were performed using QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Toronto, Ontario, Canada) according to the manufacturer's instructions with the Rotor-Gene RG3000 (Corbett Research, Sydney, Australia) as described before (30). Briefly, 1 μ l of cDNA was used in a final volume of 20 μ l for the PCR reaction, containing 0.5 μ M of sense and antisense primers (Thermo Fisher Scientific) and 2.75 mM magnesium chloride. Primers were designed to span exon–intron boundaries to prevent amplification of genomic DNA (table 1) (28, 31). Samples were run with a negative control and with samples with known quantity of the evaluated gene (internal calibration curve) to obtain the absolute quantitative gene expression (ng/ μ l). Relative gene expression was then calculated using the ratio of the target gene absolute concentration divided by the expression level of the reference gene GAPDH (32), as previously described (10).

Endobronchial biopsies

Bronchial carinas were anesthetized by the topical application of lidocaine hydrochloride (0.5 per cent). Endobronchial biopsies were harvested using smooth oval forceps (Standard Fenestrated and Smooth, 2.3 m, Olympus Medical Systems, Tokyo, Japan) from different branching sites. Biopsies were fixed for 24 hours in 10 per cent neutral-buffered formalin and then embedded in paraffin. Histologic sections of 3- μ m thickness were stained with Hematoxylin Eosin Saffron (HES).

Coded slides were evaluated under bright-field microscopy by a blinded boarded pathologist using a score evaluating several components of the epithelium, submucosa and airway smooth muscle (33).

Statistical analysis

Considering the marked decrease in airway neutrophilia induced by macrolides in foals (34), in some human studies (15, 35), and in rodent experimental models (36, 37), power analysis showed that five horses in a one-tailed analysis were sufficient to observe a 50 per cent reduction in luminal inflammation with a power of 80 per cent at a significance level of 0.05. As some data sets were not normally distributed (evaluated with Shapiro-Wilk normality tests), results are reported as median with the 25 per cent (Q1) and 75 per cent (Q3) percentile and Wilcoxon matched-pairs signed rank tests were used to identify differences within treatment groups (pretreatment and post-treatment values), between the baseline values of the two treatment groups and between the baseline values of the two treatment periods of the crossover. P values <0.05 were considered statistically significant, and one-tail tests were used when the direction of the change was predicted according to the hypothesis. Values of the two-tailed test are also provided. GraphPad Prism 7.0e (GraphPad Software, La Jolla, California, USA) was used for statistical calculations.

Results

No adverse effect requiring an intervention occurred with either treatment. During azithromycin administration, two horses developed soft fecal consistency that resolved within 48 hours. Two horses necessitated increased daily turnout during the washout period due to the severity of their respiratory condition. More precisely, one horse showed tachycardia of more than 80 beats per minute attributed to its respiratory distress prior to its ceftiofur treatment period and his turnout time was consequently extended for three consecutive days. The other horse was in respiratory distress transiently prior to its azithromycin treatment and its turnout was prolonged for one day. Their regular management was resumed at least 48 hours prior to the second baseline measurements and treatments.

Pulmonary function

Horses were in clinical exacerbation of the disease at baseline (R_L and E_L values, respectively, above 1 cm H₂O/L/s and 1 cm H₂O/L). R_L and E_L values were not statistically different prior to each treatment administration or between the beginnings of each treatment period of the crossover. Both drugs had no effect on pulmonary function tests. Lung function normalised in all horses with a low antigen environment (figure 1).

Tracheal mucus score

No difference was observed in the tracheal mucus scores between the baseline values for each treatment group nor between the beginnings of each treatment period. Neither treatment decreased tracheal mucus accumulation (figure 2).

BALF cytology

All horses had airway neutrophilia consistent with severe asthma at the beginning of the study (> 25 per cent). Neutrophil percentages in BALF were not different between groups at baseline nor between the beginnings of each treatment period. The two horses with transient modification of their turnout time during the washout period maintained a marked airway neutrophilia (BALF neutrophilia of 62.8 per cent and 64.8 per cent of at the beginning of the second treatment period). Macrophages were significantly higher at the second baseline measurements (21.8 per cent (Q1: 19.9 per cent; Q3: 46 per cent) compared to the first baseline measurements of the study (11 per cent (Q1: 7.2 per cent; Q3: 16.8 per cent), $P=0.03$).

Treatment with azithromycin reduced airway neutrophilia in four of six horses, but those results were not significant (66.1 per cent (Q1: 34.1 per cent; Q3: 80.1 per cent) before and 37.3 per cent (Q1: 25.1 per cent; Q3: 63.8 per cent) after azithromycin administration, $P=0.11$ with one-tailed and $P=0.22$ with two-tailed analysis). Treatment with ceftiofur had no effect on BALF differential cell counts (figure 3). No difference was observed in the proportion of apoptotic cells between the baseline values for each treatment group nor between the beginnings of each treatment period, and neither treatment modified neutrophilic apoptosis (figure 4).

Reverse transcription quantitative PCR

The mRNA expressions of all evaluated cytokines were not different between the baseline values for each treatment group nor between the beginnings of each treatment period. Azithromycin reduced the mRNA expression of IL-8 (ratio to GAPDH of 1.8 (Q1: 1.3; Q3: 4.3) before and 0.6 (Q1: 0.2; Q3: 2.3) after treatment; P=0.03 with one-tailed and P=0.06 with two-tailed analysis) and IL-1 β (ratio to GAPDH of 0.018 (Q1: 0.008; Q3: 0.044) before and 0.0045 (Q1: 0.0041; Q3: 0.0193) after treatment; P=0.047 with one-tailed and P=0.09 with two-tailed analysis) in BALF cells. Treatment with ceftiofur did not modify the gene expression of these cytokines. The expressions of IL-17A and TNF- α were unchanged in both treatment groups (figure 5).

Bacterial cultures

Three samples were contaminated; more precisely one horse had its sample contaminated prior to and after azithromycin treatment, and one had its sample contaminated prior to ceftiofur administration. Various bacterial species were cultured from tracheal washes as the bacteriology was positive in the majority of samples (supplementary file). The total bacterial count was elevated (>10³ colony forming units/ml) in four samples. Tracheal bacterial populations were variable, and neither treatment had a consistent effect on bacterial species or counts.

Endobronchial histology

As airway smooth muscle was absent from 6 of 24 biopsies, this portion of the score was not evaluated. The score was lower for the second baseline measurements (median score of 4 (Q1: 3.5; Q3: 5.3) at first baseline measurements and median score of 2.5 (Q1: 1.9; Q3: 3.3) at the second baseline measurements; P=0.03). The baseline values prior to each treatment were not different. No effect was observed on the endobronchial biopsy score with azithromycin nor ceftiofur (figure 6).

Discussion

This randomized controlled crossover study failed to detect a reduction of luminal neutrophils with a short azithromycin treatment in severe equine asthma despite a decreased expression of

IL-1 β and IL-8, both potent neutrophilic chemoattractants. The macrolide did not improve lung function, mucus accumulation and central airway remodelling. These results suggest that this molecule might not improve structural components that contribute to airway obstruction in asthmatic horses, that the administration was of too short a duration, or that this study lacked power to detect subtle changes.

Several studies reported a diminution of airway neutrophilia in asthma and other human neutrophilic lung diseases with macrolide treatment (15, 35, 38, 39). In agreement with those human studies, the only previous *in vivo* experiment evaluating anti-inflammatory effects of macrolides in the equine species (healthy foals) showed that erythromycin attenuated leucocyte migration as well as recruitment (34). The expectation of a marked reduction in airway neutrophilic recruitment was the main justification for including a relatively low number of horses in the study. Unfortunately, the magnitude of airway neutrophilia reduction was inconsistent, and post-hoc calculations showed that 21 horses would have been required to obtain significant results in a one-tailed analysis with a power of 80 per cent at a level of significance of 0.05. The results of the current experiment are in agreement with those which also failed to show a reduction in luminal neutrophil recruitment (40, 41). Because IL-8 and IL-1 β participate in the activation of neutrophils (including neutrophilic recruitment, priming of the respiratory burst, secretion of matrix metalloproteases and NETs formation) (42), the findings of the present study might be as relevant as a decrease in airway neutrophil numbers. Unfortunately, the degree of neutrophil's activation was not assessed in this study.

The difference in macrophage differential counts between the two treatment periods could have been related to a slightly different antigenic exposure as experimental hay-dust extract nebulisation has been reported to influence macrophage counts and gene expression in severe asthmatic horses (43). The increase in macrophage percentage was present in all horses, irrespectively of the treatments they received, indicating that this variation was probably not related to the medications.

The evaluation of the cytokines IL-8, IL-1 β , IL-17A and TNF- α was specifically selected as their gene expression is upregulated in asthmatic horses, is associated with airway neutrophilia, and

is reportedly decreased by macrolides in other species (13, 28, 44-46). The reduced expression of the potent chemoattractant IL-8 in BALF in severe equine asthma is indeed in agreement with previous studies where macrolides reduced this chemokine in the sputum of asthmatic patients, and in BALF of non-infectious murine models of asthma (C-X-C motif chemokine ligand 1; the mouse homolog of IL-8) (15, 19, 36). As IL-8 is produced by several cell types, including neutrophils, it is unclear whether the diminution observed with the macrolide was a reflection of the non-significantly reduced luminal neutrophilia, or conversely, if the reduction of this potent neutrophilic chemoattractant influenced the degree of airway neutrophilic recruitment.

Apoptosis of airway neutrophils was also investigated, because it contributes to neutrophil persistence in equine asthma (47) and is reportedly induced by macrolides *in vitro* (48, 49), and *in vivo* (49). However, azithromycin failed to influence neutrophilic apoptosis in this study, possibly due to the complex interactions between the several cell types and signaling pathways occurring in a spontaneous natural disease. Other mechanisms leading to decreased neutrophilia, such as an enhancement of macrophage phagocytic activity and reduced expression of adhesion molecules (13, 50) are known effects of macrolides, but were not investigated.

In addition to the evaluation of airway inflammation, lung function was measured as two meta-analyses concluded that airway hyper-responsiveness and peak expiratory flow were improved in human asthmatic patients after macrolide therapy (39, 51). However, other studies failed to detect changes in lung function despite improvement of clinical outcomes (symptoms, quality of life and rate of exacerbations) (14, 40) and airway hyper-responsiveness (35, 52). Therefore, the lack of measurable improvement in R_L and E_L in the present study is not overly surprising. Assessment of airway hyper-responsiveness with a methacholine challenge might have been more sensitive to detect subtle differences, but would have been ethically inappropriate in horses with severe airway obstruction. Extrapolation from human studies is complex because macrolides are not used as a monotherapy in asthmatic patients, but rather as an add-on medication to conventional therapy (inhaled corticosteroids and bronchodilators). Furthermore, low-dose macrolide therapy lasting weeks to months are generally used, so it is possible that the duration of the treatment was not sufficiently long in this trial. However, extending therapy or using more adult horses in this preliminary study was not deemed ethical.

No modification of the tracheal nor endobronchial biopsy mucus scores was observed with azithromycin, which contrasts with in vitro and in vivo experimental studies showing macrolide-induced reduction of mucus secretion and increase in mucociliary clearance (16, 17, 36, 53, 54). Endoscopic tracheal mucus score is a convenient but possibly oversimplified method to evaluate the kinetics of mucus production and clearance in asthmatic horses. Likewise, no modification of central airway remodelling was observed. A reduction of the airway smooth muscle thickness, Goblet cells metaplasia and inflammatory score was reported after a 7-day treatment with azithromycin in two rodent experimental models, justifying the investigation of a short-term macrolide treatment on airway remodelling (21, 22). However, another study reported improvement in smooth muscle thickening and Goblet cell hyperplasia in a murine model after three months of high-dose azithromycin treatment (19). Therefore, a longer therapy might have been required to restore the architecture of chronically remodeled airways.

Despite research on specific cytokine and receptor antagonists such as anti-IL-8 and C-X-C motif chemokine receptor, there is no medication which improves the neutrophilic inflammation seen in severe equine asthma. Consequently, the finding that azithromycin reduced neutrophilic chemoattractants in asthmatic horses is noteworthy. However, and regardless of this finding, the use of an antimicrobial as an immunomodulatory agent poses an ethical concern considering the likely induction of bacterial resistance and adverse effects. Indeed, development of resistance has been reported with the long-term use of azithromycin in chronic lung diseases in some studies (55), but not in others (40). Development of macrolides without antibiotic properties is an active field of research, and the inhalation of which could enable direct targeting of the airways, limiting undesirable systemic effects (56-59). Of note, only limited gastrointestinal events were observed in this experiment, as previously described with azithromycin administration in adult horses (23). However, enterocolitis susceptibility might vary depending on the geographical areas (60, 61).

The complete lack of efficacy of ceftiofur in this study is an additional important finding. Horses diagnosed with asthma frequently receive courses of antibiotics prior to lung disease investigation. However, the results of the present study discourage the administration of antimicrobials in these animals unless a concurrent medical condition justify their use, even though the bacteriology was positive in the majority of samples. These results are in disagreement

with a recent study that showed an improvement of the respiratory clinical scores of severe asthmatic horses having a positive tracheal wash culture when they were treated with ceftiofur as an add-on medication to corticosteroids, bronchodilators and environmental changes (62). Therefore, antibiotics might have a potentiating effect when added to more conventional therapeutic approaches, but the results of the current study suggest that their use is not justified as a monotherapy. A lack of bacterial count change in respiratory secretions despite macrolide treatment was previously reported in human asthmatics (41).

In conclusion, the decreased expression of neutrophilic chemoattractants by azithromycin is noteworthy considering the lack of medication reliably improving pulmonary inflammation in severe asthmatic horses (1). Additional studies investigating extended macrolide treatment in a research setting are warranted to corroborate these results and to investigate the effect on respiratory function and airway remodelling. However, the clinical use of macrolides in asthmatic horses is not recommended, as no improvement in lung function was observed in the present study along with the inherent concerns of antimicrobial resistance and gastrointestinal adverse effects. Therefore, studying macrolides lacking antibiotic activity will be preferable when available.

Funding: This study was funded by the Equine Research Funds of the Université de Montréal, an unrestricted research grant of Zoetis, the Fonds du Centenaire of the Université de Montréal and the Canadian Institutes of Health Research (grant # PJT-148807).

Ethics statement: All experimental procedures were performed in accordance with the Canadian Council for Animal Care guidelines and were approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal (Protocol # Rech-1801).

Conflicts of interest: Authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements: The authors would like to thank Michela Bullone, Nicolas Herteman, Roxane Boivin and Mohamed Issouf for the technical and laboratory support through this study.

References

1. Couetil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Leguillette R, Richard EA. Inflammatory Airway Disease of Horses--Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med.* 2016;30(2):503-15.
2. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology.* 2011;16(7):1027-46.
3. Nevalainen M, Raulo SM, Brazil TJ, Pirie RS, Sorsa T, McGorum BC, 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):150-5.
4. Cote O, Clark ME, Viel L, Labbe G, Seah SY, Khan MA, et al. Secretoglobin 1A1 and 1A1A differentially regulate neutrophil reactive oxygen species production, phagocytosis and extracellular trap formation. *PLoS One.* 2014;9(4):e96217.
5. Art T, Franck T, Lekeux P, de Moffarts B, Couetil L, Becker M, et al. Myeloperoxidase concentration in bronchoalveolar lavage fluid from healthy horses and those with recurrent airway obstruction. *Can J Vet Res.* 2006;70(4):291-6.
6. Vargas A, Roux-Dalvai F, Droit A, Lavoie JP. Neutrophil-Derived Exosomes: A New Mechanism Contributing to Airway Smooth Muscle Remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;55(3):450-61.
7. Farah CS, Keulers LA, Hardaker KM, Peters MJ, Berend N, Postma DS, et al. Association between peripheral airway function and neutrophilic inflammation in asthma. *Respirology.* 2015;20(6):975-81.
8. Fain SB, Gonzalez-Fernandez G, Peterson ET, Evans MD, Sorkness RL, Jarjour NN, et al. Evaluation of structure-function relationships in asthma using multidetector CT and hyperpolarized He-3 MRI. *Acad Radiol.* 2008;15(6):753-62.
9. Lavoie JP, Pasloske K, Joubert P, Cordeau ME, Mancini J, Girard Y, et al. Lack of clinical efficacy of a phosphodiesterase-4 inhibitor for treatment of heaves in horses. *J Vet Intern Med.* 2006;20(1):175-81.

10. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Joubert P, Relave F, Setlakwe EL, Beauchamp G, et al. Corticosteroids and antigen avoidance decrease airway smooth muscle mass in an equine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;47(5):589-96.
11. Gerber V, Schott li HC, Robinson NE. Owner assessment in judging the efficacy of airway disease treatment. *Equine Vet J*. 2011;43(2):153-8.
12. Uberti B, Moran G. Role of neutrophils in equine asthma. *Anim Health Res Rev*. 2018:1-9.
13. Kanoh S, Rubin BK. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(3):590-615.
14. Brusselle GG, Vanderstichele C, Jordens P, Deman R, Slabbynck H, Ringoet V, et al. Azithromycin for prevention of exacerbations in severe asthma (AZISAST): a multicentre randomised double-blind placebo-controlled trial. *Thorax*. 2013;68(4):322-9.
15. Simpson JL, Powell H, Boyle MJ, Scott RJ, Gibson PG. Clarithromycin targets neutrophilic airway inflammation in refractory asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(2):148-55.
16. Shimizu T, Shimizu S, Hattori R, Gabazza EC, Majima Y. In vivo and in vitro effects of macrolide antibiotics on mucus secretion in airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(5):581-7.
17. Shimizu T, Shimizu S. Azithromycin inhibits mucus hypersecretion from airway epithelial cells. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:265714.
18. Rubin BK, Druce H, Ramirez OE, Palmer R. Effect of clarithromycin on nasal mucus properties in healthy subjects and in patients with purulent rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(6):2018-23.
19. Kang JY, Jo MR, Kang HH, Kim SK, Kim MS, Kim YH, et al. Long-term azithromycin ameliorates not only airway inflammation but also remodeling in a murine model of chronic asthma. *Pulm Pharmacol Ther*. 2016;36:37-45.

20. Wu LQ, Wang RL, Dai YR, Li FQ, Wu HY, Yan SS, et al. Roxithromycin suppresses airway remodeling and modulates the expression of caveolin-1 and phospho-p42/p44MAPK in asthmatic rats. *Int Immunopharmacol*. 2015;24(2):247-55.
21. Liu Y, Pu Y, Li D, Zhou L, Wan L. Azithromycin ameliorates airway remodeling via inhibiting airway epithelium apoptosis. *Life Sci*. 2017;170:1-8.
22. Pu Y, Liu Y, Liao S, Miao S, Zhou L, Wan L. Azithromycin ameliorates OVA-induced airway remodeling in Balb/c mice via suppression of epithelial-to-mesenchymal transition. *Int Immunopharmacol*. 2018;58:87-93.
23. Leclere M, Magdesian KG, Cole CA, Szabo NJ, Ruby RE, Rhodes DM, et al. Pharmacokinetics and preliminary safety evaluation of azithromycin in adult horses. *J Vet Pharmacol Ther*. 2012;35(6):541-9.
24. Jacks S, Giguere S, Gronwall PR, Brown MP, Merritt KA. Pharmacokinetics of azithromycin and concentration in body fluids and bronchoalveolar cells in foals. *Am J Vet Res*. 2001;62(12):1870-5.
25. Fultz L, Giguere S, Berghaus LJ, Davis JL. Plasma and pulmonary pharmacokinetics of desfuroylceftiofur acetamide after weekly administration of ceftiofur crystalline free acid to adult horses. *Equine Vet J*. 2014;46(2):252-5.
26. Lavoie JP, Pascoe JR, Kurpershoek CJ. Effect of head and neck position on respiratory mechanics in horses sedated with xylazine. *Am J Vet Res*. 1992;53(9):1652-7.
27. Gerber V, Straub R, Marti E, Hauptman J, Herholz C, King M, et al. Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Vet J*. 2004;36(7):576-82.
28. Murcia RY, Vargas A, Lavoie JP. The Interleukin-17 Induced Activation and Increased Survival of Equine Neutrophils Is Insensitive to Glucocorticoids. *PLoS One*. 2016;11(5):e0154755.

29. Brazil TJ, Dagleish MP, McGorum BC, Dixon PM, Haslett C, Chilvers ER. Kinetics of pulmonary neutrophil recruitment and clearance in a natural and spontaneously resolving model of airway inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(7):854-65.
30. Lavoie-Lamoureux A, Moran K, Beauchamp G, Mauel S, Steinbach F, Lefebvre-Lavoie J, 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):L472-82.
31. Vargas A, Boivin R, Cano P, Murcia Y, Bazin I, Lavoie JP. Neutrophil extracellular traps are downregulated by glucocorticosteroids in lungs in an equine model of asthma. *Respir Res*. 2017;18(1):207.
32. Beekman L, Tohver T, Dardari R, Leguillette R. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bronchoalveolar lavage cells from horses with inflammatory airway disease. *BMC Mol Biol*. 2011;12:5.
33. Bullone M, Helie P, Joubert P, Lavoie JP. Development of a Semiquantitative Histological Score for the Diagnosis of Heaves Using Endobronchial Biopsy Specimens in Horses. *J Vet Intern Med*. 2016;30(5):1739-46.
34. Lakritz J, Wilson WD, Watson JL, Hyde DM, Mihalyi J, Plopper CG. Effect of treatment with erythromycin on bronchoalveolar lavage fluid cell populations in foals. *Am J Vet Res*. 1997;58(1):56-61.
35. Piacentini GL, Peroni DG, Bordini A, Pigozzi R, Costella S, Loiacono A, et al. Azithromycin reduces bronchial hyperresponsiveness and neutrophilic airway inflammation in asthmatic children: a preliminary report. *Allergy Asthma Proc*. 2007;28(2):194-8.
36. Beigelman A, Gunsten S, Mikols CL, Vidavsky I, Cannon CL, Brody SL, et al. Azithromycin attenuates airway inflammation in a noninfectious mouse model of allergic asthma. *Chest*. 2009;136(2):498-506.

37. Essilfie AT, Horvat JC, Kim RY, Mayall JR, Pinkerton JW, Beckett EL, et al. Macrolide therapy suppresses key features of experimental steroid-sensitive and steroid-insensitive asthma. *Thorax*. 2015;70(5):458-67.
38. Sakito O, Kadota J, Kohno S, Abe K, Shirai R, Hara K. Interleukin 1 beta, tumor necrosis factor alpha, and interleukin 8 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis: a potential mechanism of macrolide therapy. *Respiration*. 1996;63(1):42-8.
39. Tong X, Guo T, Liu S, Peng S, Yan Z, Yang X, et al. Macrolide antibiotics for treatment of asthma in adults: a meta-analysis of 18 randomized controlled clinical studies. *Pulm Pharmacol Ther*. 2015;31:99-108.
40. Gibson PG, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, Hodge S, James AL, et al. Effect of azithromycin on asthma exacerbations and quality of life in adults with persistent uncontrolled asthma (AMAZES): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2017;390(10095):659-68.
41. Cameron EJ, Chaudhuri R, Mair F, McSharry C, Greenlaw N, Weir CJ, et al. Randomised controlled trial of azithromycin in smokers with asthma. *Eur Respir J*. 2013;42(5):1412-5.
42. Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci*. 2008;13:2400-7.
43. Laan TT, Bull S, Pirie R, Fink-Gremmels J. The role of alveolar macrophages in the pathogenesis of recurrent airway obstruction in horses. *J Vet Intern Med*. 2006;20(1):167-74.
44. Korn A, Miller D, Dong L, Buckles EL, Wagner B, Ainsworth DM. Differential Gene Expression Profiles and Selected Cytokine Protein Analysis of Mediastinal Lymph Nodes of Horses with Chronic Recurrent Airway Obstruction (RAO) Support an Interleukin-17 Immune Response. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142622.
45. Padoan E, Ferrareso S, Pegolo S, Castagnaro M, Barnini C, Bargelloni L. Real time RT-PCR analysis of inflammatory mediator expression in recurrent airway obstruction-affected horses. *Vet Immunol Immunopathol*. 2013;156(3-4):190-9.

46. Vanaudenaerde BM, Wuyts WA, Geudens N, Dupont LJ, Schoofs K, Smeets S, et al. Macrolides inhibit IL17-induced IL8 and 8-isoprostane release from human airway smooth muscle cells. *Am J Transplant*. 2007;7(1):76-82.
47. Niedzwiedz A, Jaworski Z, Tykalowski B, Smialek M. Neutrophil and macrophage apoptosis in bronchoalveolar lavage fluid from healthy horses and horses with recurrent airway obstruction (RAO). *BMC Vet Res*. 2014;10:29.
48. Inamura K, Ohta N, Fukase S, Kasajima N, Aoyagi M. The effects of erythromycin on human peripheral neutrophil apoptosis. *Rhinology*. 2000;38(3):124-9.
49. Fischer CD, Beatty JK, Zvaigzne CG, Morck DW, Lucas MJ, Buret AG. Anti-Inflammatory benefits of antibiotic-induced neutrophil apoptosis: tulathromycin induces caspase-3-dependent neutrophil programmed cell death and inhibits NF-kappaB signaling and CXCL8 transcription. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(1):338-48.
50. Kusano S, Kadota J, Kohno S, Iida K, Kawakami K, Morikawa T, et al. Effect of roxithromycin on peripheral neutrophil adhesion molecules in patients with chronic lower respiratory tract disease. *Respiration*. 1995;62(4):217-22.
51. Reiter J, Demirel N, Mendy A, Gasana J, Vieira ER, Colin AA, et al. Macrolides for the long-term management of asthma--a meta-analysis of randomized clinical trials. *Allergy*. 2013;68(8):1040-9.
52. Kostadima E, Tsiodras S, Alexopoulos EI, Kaditis AG, Mavrou I, Georgatou N, et al. Clarithromycin reduces the severity of bronchial hyperresponsiveness in patients with asthma. *Eur Respir J*. 2004;23(5):714-7.
53. Poachanukoon O, Koontongkaew S, Monthanapisut P, Pattanacharoenchai N. Macrolides attenuate phorbol ester-induced tumor necrosis factor-alpha and mucin production from human airway epithelial cells. *Pharmacology*. 2014;93(1-2):92-9.
54. Tamaoki J, Takeyama K, Tagaya E, Konno K. Effect of clarithromycin on sputum production and its rheological properties in chronic respiratory tract infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(8):1688-90.

55. Li H, Liu DH, Chen LL, Zhao Q, Yu YZ, Ding JJ, et al. Meta-analysis of the adverse effects of long-term azithromycin use in patients with chronic lung diseases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):511-7.
56. Tomaskovic L, Komac M, Makaruha Stegic O, Munic V, Ralic J, Stanic B, et al. Macrolactonolides: a novel class of anti-inflammatory compounds. *Bioorg Med Chem.* 2013;21(1):321-32.
57. Tojima I, Shimizu S, Ogawa T, Kouzaki H, Omura S, Sunazuka T, et al. Anti-inflammatory effects of a novel non-antibiotic macrolide, EM900, on mucus secretion of airway epithelium. *Auris Nasus Larynx.* 2015;42(4):332-6.
58. Erakovic Haber V, Bosnar M, Kragol G. The design of novel classes of macrolides for neutrophil-dominated inflammatory diseases. *Future Med Chem.* 2014;6(6):657-74.
59. Haghi M, Saadat A, Zhu B, Colombo G, King G, Young PM, et al. Immunomodulatory effects of a low-dose clarithromycin-based macrolide solution pressurised metered dose inhaler. *Pharm Res.* 2015;32(6):2144-53.
60. Gustafsson A, Baverud V, Gunnarsson A, Rantzien MH, Lindholm A, Franklin A. The association of erythromycin ethylsuccinate with acute colitis in horses in Sweden. *Equine Vet J.* 1997;29(4):314-8.
61. Baverud V, Franklin A, Gunnarsson A, Gustafsson A, Hellander-Edman A. *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mares when their foals are treated with erythromycin and rifampicin for *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Vet J.* 1998;30(6):482-8.
62. Husulak ML, Manning ST, Meachem MD, Burgess HJ, Epp TY, Montgomery JB. Does antimicrobial therapy improve outcomes in horses with severe equine asthma and a positive tracheal wash bacterial culture? *Can J Vet Res.* 2018;82(3):184-91.

Table and figures

Table 1. Sequences of forward (F) and reverse (R) primer pairs used for quantitative PCR analysis.

| Genes | Sequences |
|---|---------------------------------------|
| Equus caballus C-X-C motif chemokine ligand 8 (accession number NM_001083951) | F : 5'- CTTTCTGCAGCTCTGTGTGAAG -3' |
| | R : 5'- GCAGACCTCAGCTCCGTTGAC -3' |
| Equus caballus interleukin 17A (accession number NM_001143792) | F : 5'- AATCCGGAATGCCGAACAC -3' |
| | R : 5'- CTACCTTCCCTTCGGCATTG -3' |
| Equus caballus interleukin 1 β (accession number NM_001082526) | F : 5'- GACTGACAAGATACCTGTGGCCT -3' |
| | R : 5'- AGACAACAGTGAAGTGCAGCCT -3' |
| Equus caballus tumor necrosis factor- α (accession number NM_001081819) | F : 5'- CTTGTGCCTCAGCCTCTTCTCCTTC -3' |
| | R : 5'- CAGCTGGTTGTCTGTCAGCTTC -3' |
| Equus caballus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (accession number NM_001163856) | F : 5'- CACCCAGAAGACCGTGGATG -3' |
| | R : 5'- TGCCAGTGAGCTTCCCATTTC -3' |

Figure 1. Values of pulmonary resistance (A) and elastance (B) before and after treatment with azithromycin and ceftiofur. Each individual horse is shown with a different color. Circle and squared symbols are used, respectively, for horses first treated with azithromycin and ceftiofur.

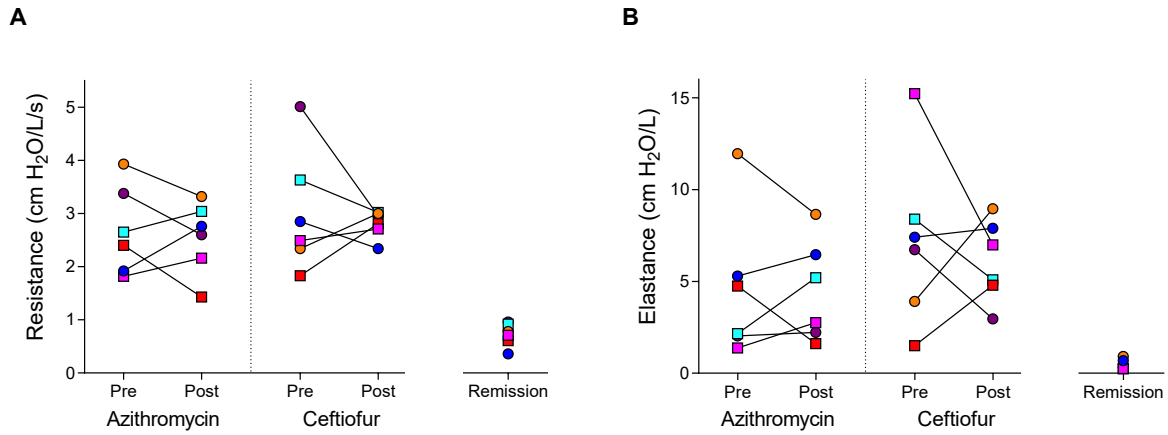


Figure 2. Tracheal mucus score before and after treatment with azithromycin and ceftiofur. Each individual horse is shown with a different color. Circle and squared symbols are used, respectively, for horses first treated with azithromycin and ceftiofur.

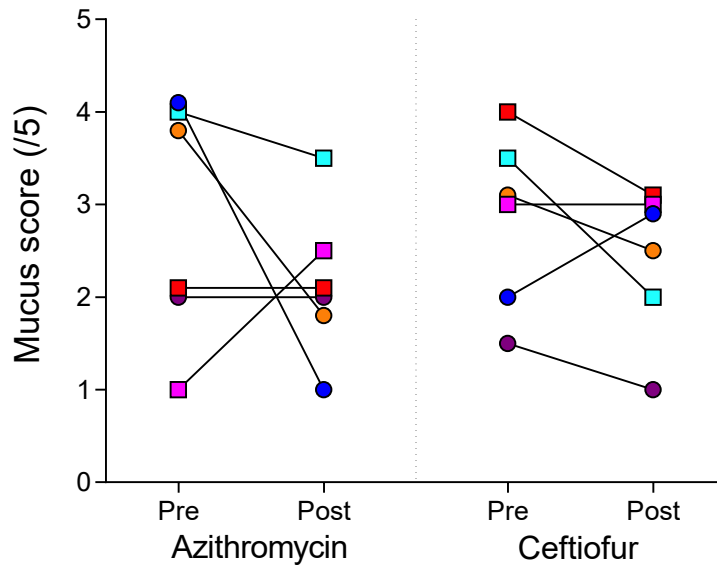


Figure 3. Percentage of airway neutrophils (A) and of the other leucocytes (B) in the bronchoalveolar lavage fluid before and after treatment with azithromycin (Azi) and ceftiofur (Ceft). In panel B, the left Y axis applies to the percentage of macrophages and lymphocytes. The right Y axis applies to the percentage of eosinophils and mast cells. Each individual horse is shown with a different color. Circle and squared symbols are used, respectively, for horses first treated with azithromycin and ceftiofur.

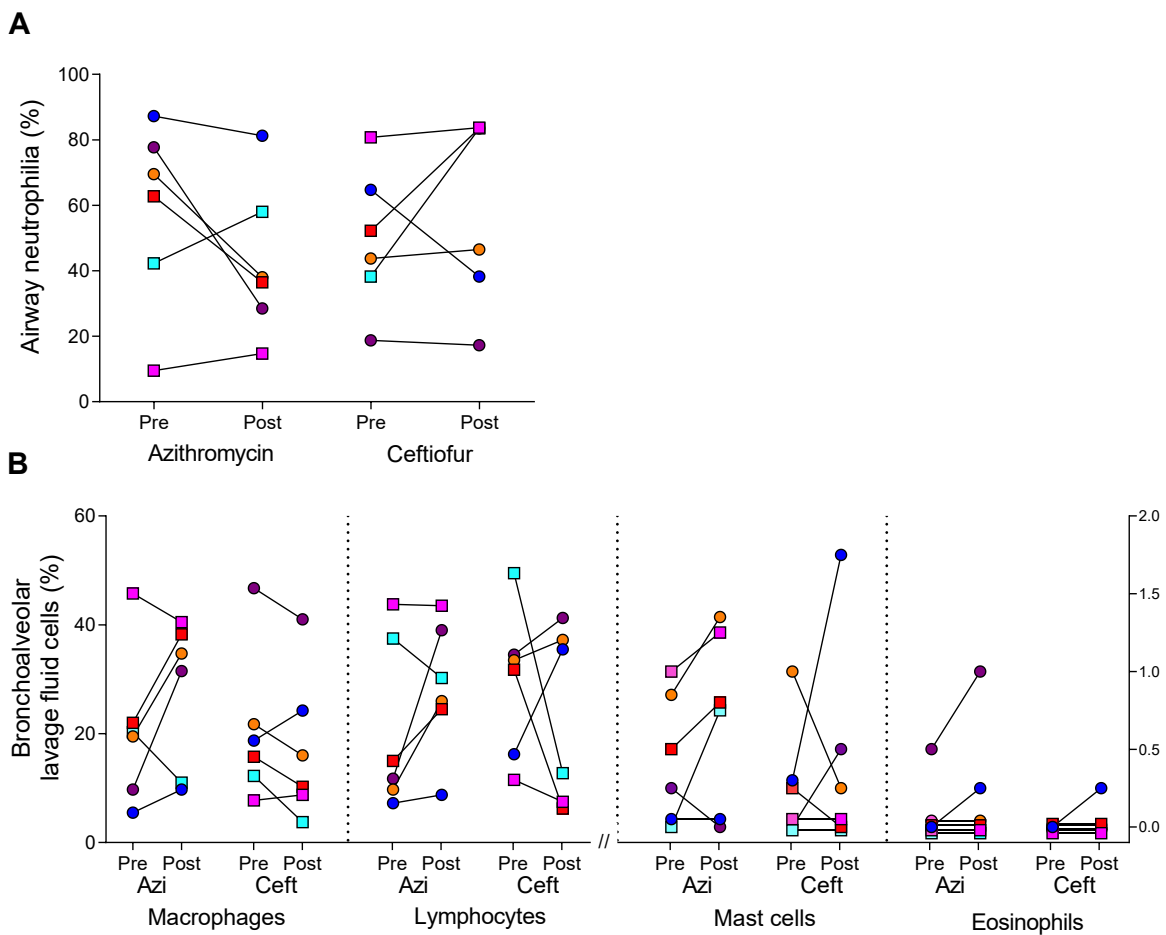


Figure 4. Percentage of apoptotic neutrophils before and after treatment with azithromycin and ceftiofur. Each individual horse is shown with a different color. Circle and squared symbols are used, respectively, for horses first treated with azithromycin and ceftiofur.

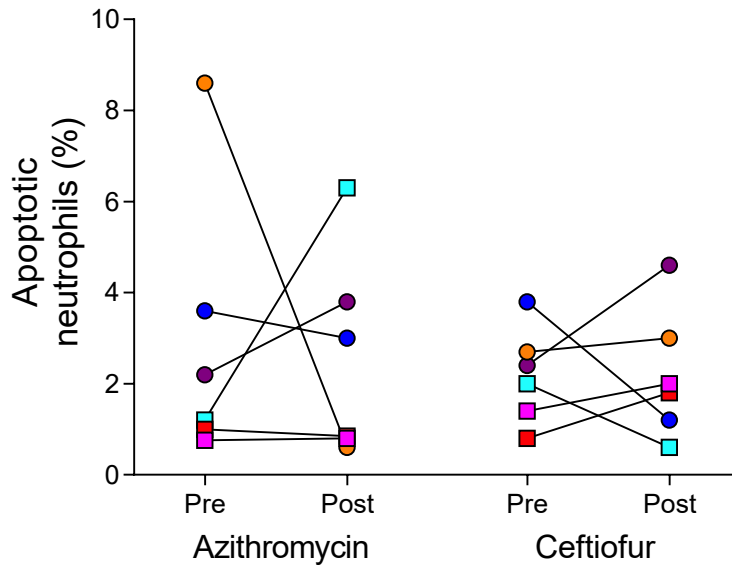


Figure 5. mRNA expression of interleukin-8 (A), interleukin-1 β (B), interleukin-17A (C) and tumor necrosis factor- α (D) before and after treatment with azithromycin (Azi) and ceftiofur (Ceft). Each individual horse is shown with a different color. Circle and squared symbols are used, respectively, for horses first treated with azithromycin and ceftiofur. *Significantly different from pre values ($P < 0.05$). GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

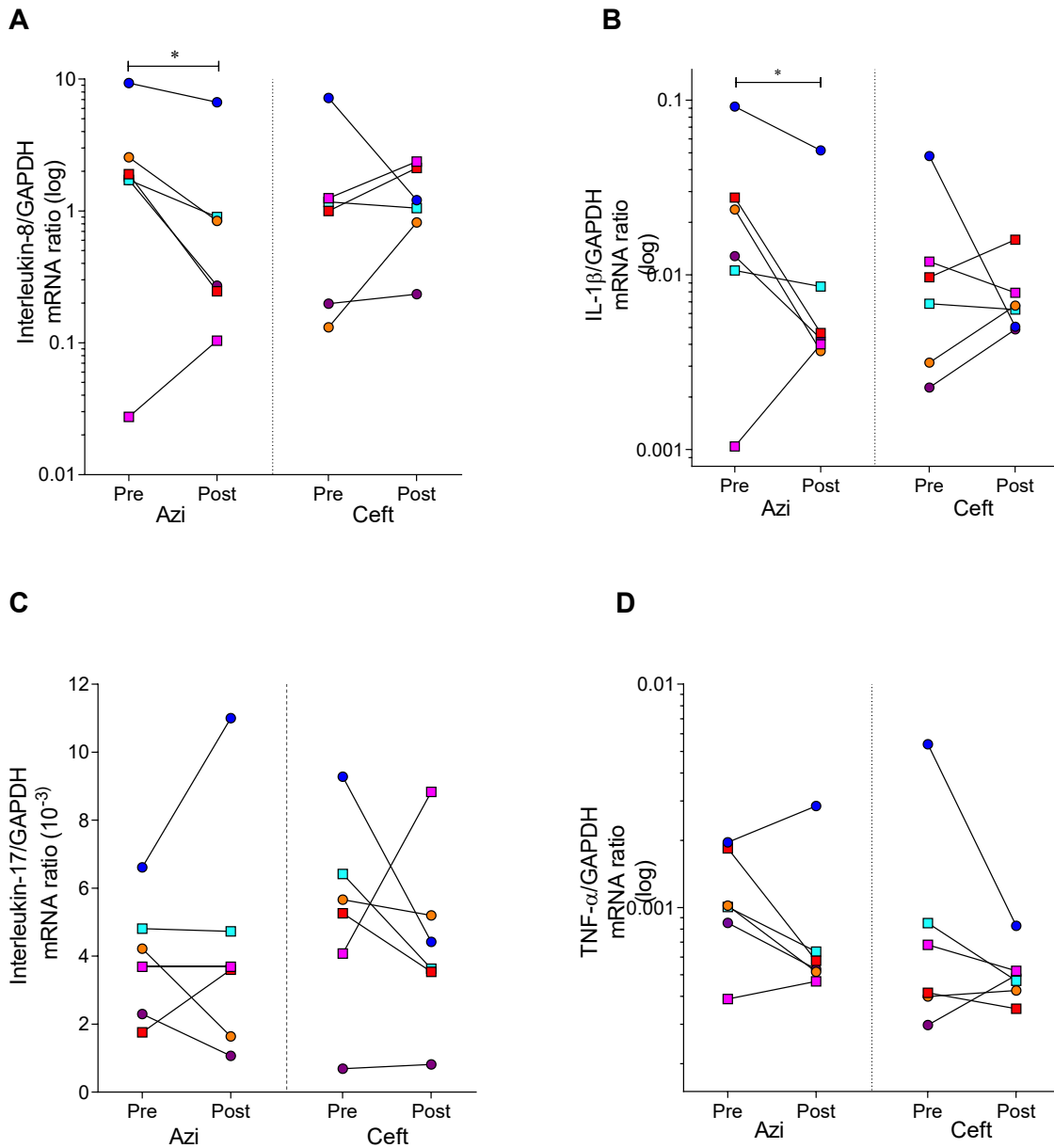
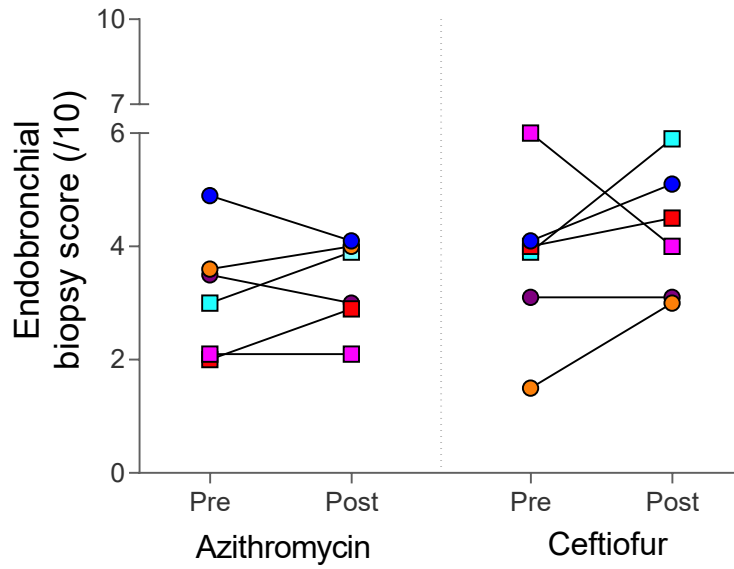








Figure 6. Endobronchial biopsy score before and after treatment with azithromycin and ceftiofur. Each individual horse is shown with a different color. Circle and squared symbols are used, respectively, for horses first treated with azithromycin and ceftiofur.



Supplementary table

Supplementary table 1. Bacterial count in tracheal wash samples

| Horse | <u>Azithromycin</u> | | <u>Ceftiofur</u> | |
|---|---|--|---|---|
| | Pre-treatment | Post-treatment | Pre-treatment | Post-treatment |
| 1  | <i>Staphylococcus</i> spp (200 CFU/ml) Fungi (100 CFU/ml) | <i>Pantoea</i> (100 CFU/ml) | <i>Bacillus</i> (200 CFU/ml) | <i>Nocardia</i> (400 CFU/ml) Fungi (100 CFU/ml) |
| 2  | <i>Bacillus</i> (100 CFU/ml) <i>Streptococcus</i> alpha- hemolytic (100 CFU/ml) Non-fermenting bacteria (100 CFU/ml) | <i>Bacillus</i> spp (300 CFU/ml) <i>Staphylococcus</i> spp (600 CFU/ml) | <i>Nocardia</i> (100 CFU/ml) | Non-fermenting bacteria (200 CFU/ml) Non-fermenting bacteria (200 CFU/ml) Non-fermenting bacteria (100 CFU/ml) |
| 3  | <i>Streptococcus equi</i> spp. <i>zooepidemicus</i> (group C; 2300 CFU/ml) <i>Actinobacillus equuli</i> (300 CFU/ml) | No growth | <i>Staphylococcus</i> spp (100 CFU/ml) <i>Bacillus</i> spp (300 CFU/ml) | <i>Corynebacterium</i> (100 CFU/ml) |

| | | | | | |
|---|---|---|---|--|--|
| 4 |  | Contaminated | Contaminated | Fungi (100 CFU/ml) | Fungi (100 CFU/ml) Pasteurellaceae (100 CFU/ml) <i>Enterococcus</i> spp (100 CFU/ml) |
| 5 |  | Non-fermenting bacteria (100 CFU/ml) | <i>Staphylococcus</i> (100 CFU/ml) | <i>Actinobacillus equuli</i> (3200 CFU/ml) | No growth |
| 6 |  | <i>Actinobacillus equuli</i> spp <i>hemolyticus</i> (9400 CFU/ml) <i>Actinobacillus equuli</i> (3600 CFU/ml) <i>Streptococcus equi</i> spp <i>zooepidemicus</i> (group C; 300 CFU/ml) | <i>Corynebacterium</i> spp (> 10 000 CFU/ml) <i>Enterococcus</i> spp (800 CFU/ml) Non-fermenting bacteria (1000 CFU/ml) | Contaminated | <i>Staphylococcus</i> spp (200 CFU/ml) <i>Corynebacterium</i> (100 CFU/ml) |

CFU , colony-forming units.

Article 4 - Effects of azithromycin on bronchial remodeling in the natural model of severe neutrophilic asthma in horses

Sommaire

L'objectif de cette étude était d'évaluer si l'addition d'un macrolide potentialiserait les effets de l'administration prolongée des CSI sur la fonction pulmonaire, l'inflammation neutrophilique et le remodelage bronchique central et périphérique. Bien que l'azithromycine ait engendré une diminution de la neutrophilie pulmonaire, ceci n'a pas accentué l'amélioration de l'obstruction bronchique et la réduction de la masse du MLB obtenues par les CSI.

Contribution

J'ai participé à la préparation des protocoles (60%), aux procédures expérimentales (mesures de la fonction pulmonaire, endoscopies respiratoires, lavages bronchoalvéolaires, biopsies et échographies endobronchiques, prise de sang, isolation des neutrophiles; 70%), à l'administration des médicaments (50%), aux analyses histomorphométriques (80%), aux analyses PCR (50%), aux analyses statistiques et à la rédaction du manuscrit (90%). Les chirurgies thoracoscopiques ont été effectuées par un chirurgien équin (Alvaro G. Bonilla) et j'ai contribué à la préparation préchirurgicale et à la surveillance pré et postopératoire (70%). Les analyses de la concentration plasmatique d'azithromycine ont été effectuées par Francis Beaudry.

Article publié

Sci Rep. 2022;12(1):446. Reproduced with permission from Springer Nature, without content modification. Copyright © 2022 Springer Nature.

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-03955-9>

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Effects of azithromycin on bronchial remodeling in the natural model of severe neutrophilic asthma in horses

Sophie Mainguy-Seers¹, Roxane Boivin^{1,2}, Sheila Pourali Dogaheh¹, Francis Beaudry³, Pierre Hélie⁴, Alvaro G. Bonilla¹, James G. Martin⁵, Jean-Pierre Lavoie^{1*}

¹ Université de Montréal, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Clinical Sciences, St-Hyacinthe, J2S 2M2, Quebec, Canada.

² Current address: Laboratoire de sciences judiciaires et de médecine légale, Ministère de la Sécurité Publique, Montreal, H2K 3S7, Quebec, Canada.

³ Université de Montréal, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Biomedical Sciences, St-Hyacinthe, J2S 2M2, Quebec, Canada.

⁴ Université de Montréal, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology and Microbiology, St-Hyacinthe, J2S 2M2, Quebec, Canada.

⁵ McGill University, Meakins Christie Laboratories, McGill University Health Center Research Institute, Montreal, H4A 3J1, Quebec, Canada.

Abstract

Steroid resistance in asthma has been associated with neutrophilic inflammation and severe manifestations of the disease. Macrolide add-on therapy can improve the quality of life and the exacerbation rate in refractory cases, possibly with greater effectiveness in neutrophilic phenotypes. The mechanisms leading to these beneficial effects are incompletely understood and whether macrolides potentiate the modulation of bronchial remodeling induced by inhaled corticosteroids (ICS) is unknown. The objective of this study was to determine if adding azithromycin to ICS leads to further improvement of lung function, airway inflammation and bronchial remodeling in severe asthma. The combination of azithromycin (10 mg/kg q48h PO) and inhaled fluticasone (2500 µg q12) was compared to the sole administration of fluticasone for five months in a randomized blind trial where the lung function, airway inflammation and bronchial remodeling (histomorphometry of central and peripheral airways and endobronchial ultrasound) of horses with severe neutrophilic asthma were assessed. Although the proportional reduction of airway neutrophilia was significantly larger in the group receiving azithromycin, the lung function and the peripheral and central airway smooth muscle mass decreased similarly in both groups. Despite a better control of airway neutrophilia, azithromycin did not potentiate the other clinical effects of fluticasone.

Introduction

Although asthma is uniformly described as a chronic inflammatory disease resulting in expiratory airflow limitation, it is a highly heterogeneous condition with a large spectrum of severity (1). Despite affecting only \approx 5-20% of asthmatic subjects (2, 3), severe asthma is a major burden considering its negative impact on quality of life and its considerable healthcare costs (4, 5). High-dose inhaled, or even oral, corticosteroids are often insufficient in these patients (3), prompting the need for additional treatment options.

Airway neutrophilia has been associated to negative clinical outcomes including severe manifestations of the disease (6), acute exacerbations (7), persistent fixed airway obstruction (8) and corticosteroid resistance (9). The release of inflammatory mediators with the propensity to damage airway architecture, such as elastase (7) and neutrophil extracellular traps (10), partly explains why neutrophils are deemed harmful. However, whether these leukocytes are causative or simply bystanders in the natural history of asthma is speculative. Therefore, studying clinical outcomes when airway neutrophilia is controlled could help elucidate its involvement in asthma pathophysiology.

The macrolide antimicrobials have proven useful in respiratory conditions characterized by neutrophilic inflammation such as diffuse panbronchiolitis and chronic obstructive pulmonary disease (11), and have been the focus of recent large clinical trials in asthma (12, 13). Notably, the prolonged use of azithromycin, combined with standard therapy, improved the quality of life and reduced the frequency of exacerbations in patients with uncontrolled asthma (12). However, the mechanisms underlying these positive outcomes are unclear as the spectrum of action of macrolides goes beyond antimicrobial and immunomodulatory effects (11). The modulation of airway smooth muscle (ASM) biology *in vitro* (14-17) and the decrease of ASM mass in experimental models of asthma by macrolides (18-21) might explain their attenuation of bronchial hyperresponsiveness (22, 23). However, these results need confirmation in humans as treatment success obtained in rodent models frequently fails to translate to clinical therapy (24). Results of studies from species naturally affected by asthma may possibly better translate to humans (25).

Asthma is a prevalent and heterogenous disease of horses. The milder forms of equine asthma are considered transient in most cases (26) in contrast with the incurable severe form (“heaves”) which affects approximately 14% of horses in temperate climates (27). Severe equine asthma is characterized by variable airway obstruction, bronchial remodeling and inflammation (28) and it occurs in genetically susceptible subjects in which periods of exacerbation and remission alternate concurring with environmental antigenic exposure, similarly to the fluctuating symptomatology in human asthmatics. This disease is well suited for the evaluation of azithromycin’s clinical effects as neutrophils are the predominant leukocyte in the airways during exacerbation and corticosteroids do not resolve airway neutrophilia despite being more effective to relieve airway obstruction (29). Also, the large size of the horse allows sequential sampling of lung tissues by thoracoscopy for the assessment of peripheral airway remodeling (28). Inhaled corticosteroids (ICS), combined or not with bronchodilators, only partially reduce the ASM mass in equine asthma (30, 31). Whether bronchial remodeling can be further improved with medication targeting neutrophilic inflammation and ASM biology is unknown. The hypothesis of this study was that the administration of azithromycin would potentiate the effects of ICS on lung function, airway inflammation and bronchial remodeling in asthma. The primary outcome was the evaluation of airway remodeling in central and peripheral airways in response to treatment. Other objectives were to characterize the effects of adding azithromycin to ICS on measurements of airway obstruction, luminal neutrophilia and neutrophilic mediators.

Materials and methods

Study protocol

All experimental procedures were performed in accordance with the Canadian Council for Animal Care guidelines and were approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal on October 11, 2016 (Protocol # Rech-1324). This manuscript follows the recommendations of the ARRIVE guidelines.

Twelve horses with severe asthma were studied in this randomized blind controlled clinical trial. The group allocation was based on resistance ranking values. In the fluticasone and the

fluticasone + azithromycin (F+A) groups respectively, horses weighed 506 ± 35 kg and 481 ± 18 kg and were aged 13.6 ± 1.4 and 13.8 ± 2.5 years (p-NS). There were four females and one castrated male in the fluticasone group and two females and four castrated males in F+A group. For five months, all horses were treated with fluticasone (GlaxoSmithKline Inc., Mississauga, ON, Canada; 2500 μ g q12h by inhalation) and six of these horses also received azithromycin orally (Pharmascience, Montreal, QC, Canada and Sandoz, Boucherville, QC, Canada; 10 mg/kg q24h for five days, then q48h). Because of poor clinical response based on lung function data, the fluticasone dose was increased to 3000 μ g q12h five weeks after initiation of therapy in two horses (one horse in each group) for ethical reasons. One horse in the fluticasone-treated group was excluded as it developed a persistent pneumothorax after the first thoracoscopy, which resolved after specific treatment.

Pulmonary function tests

Lung function measurements (standard lung mechanics and oscillometry) were performed at baseline, at week (W) two, W4, W6, W8, W12, W16 and W20 (details in online Supplement). At the end of the study, lung function was assessed after the administration of an anticholinergic bronchodilator (N-butylscopolammonium bromide, 0.3 mg/kg IV; Boehringer Ingelheim, Burlington, ON, Canada) to determine if residual bronchospasm persisted (32).

Bronchoscopy and thoracoscopy

Bronchoscopies were performed at baseline, on W2, W4, W6, W8, W12, W16 and W20 to sample bronchoalveolar lavage fluid (BALF), endobronchial biopsies (EBBs) and to record endobronchial ultrasound (EBUS; baseline, W8, W20). The BALF samples were processed for cytology and gene expression studies and the EBBs for histomorphometry and gene expression analysis. A blinded pathologist evaluated several components of the epithelium, submucosa and ASM to attribute a remodeling score to each biopsy (33) and the thickness of the extracellular matrix (ECM; region between the basal membrane and the ASM) was measured. On EBUS images, the area of the second layer (L2; corresponding to 70% of ASM (34)), and the internal perimeter (Pi) were measured and $L2 \text{ area}/Pi^2$ calculated. Biopsies of the caudo-dorsal region of the lungs were obtained at baseline, at W8 and at W20 by thoracoscopy to evaluate the ASM and ECM areas in

peripheral airways. Detailed bronchoscopy and thoracoscopy procedures are described in the online Supplement.

Peripheral polymorphonuclear isolation and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry

Plasma azithromycin concentration was measured by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry at W2, W8 and W20. Polymorphonuclear cells (PMNs), mostly composed of neutrophils, were isolated by density gradient centrifugation at baseline, W8 and W20 for gene expression studies and for determination of intracellular azithromycin concentration at W20 (details in online Supplement).

Transcriptomic analysis

Messenger ribonucleic acid (mRNA) expression of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-8 (CXCL-8) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; table 1) was assessed by RT-qPCR from BALF cells, EBBs and PMNs at baseline, W8 and W20. The absolute quantitative gene expression was normalized to the expression level of the reference gene GAPDH. The ratio of the smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC) (+) insert, which is implicated in faster rate of muscle contraction (35), to total SMMHC gene expression was evaluated in EBBs (36) (details in online Supplement).

Statistical analysis

Power calculations (G*Power 3.1.9.4, Kiel, Germany) indicated that six horses per group were required to detect a two-fold difference in the reduction of the ASM mass between groups (alpha of 0.05 and power of 80%) considering the expected improvement of 30% by fluticasone (30, 31). Two-way repeated measures ANOVA followed by Dunnett's or Sidak's multiple comparison tests were performed as appropriate using GraphPad Prism version 8.4.3 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Normality was assessed with Shapiro-Wilk tests and visual analysis of QQ-plot, and most data sets respected normality. As log transformations did not substantially modify the results when raw data were not normally distributed, the latter were used for all analysis. In the few instances where data were missing, mixed-effect models were used and

indicated as such in the figure legends. Associations between lung function, inflammation and remodeling data were explored with Pearson correlations. Descriptive data are expressed as means and standard error of the mean, or with the median and interquartile range when not normally distributed. Results were considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

Results

Lung function

All horses were in exacerbation of the disease prior to the beginning of the study (resistance [R_L] > 1 cm H₂O/L/s and elastance [E_L] > 1 cm H₂O/L).

Lung resistance and elastance decreased over time ($p < 0.0001$; Fig. 1) similarly between the two groups. However, the R_L and/or E_L values remained above normal (> 1 cm H₂O/L/s and > 1 cm H₂O/L respectively) in 8/11 horses at the end of the study. The lung function measured by oscillometry (Supplementary Fig. 1) showed similar results; the R_5/R_{10} ratio, an indicator of the frequency dependence of the respiratory system resistance, decreased over time ($p < 0.0001$) with no difference between groups. The resistance at 3 Hz (R_3), R_3 during expiration, the reactance at 3 Hz (X_3) and X_3 during expiration improved similarly over time ($p < 0.02$; data not shown) while R_3 and X_3 during inspiration remained unchanged. The administration of N-butylscopolammonium bromide did not modify resistance, elastance and X_3 . However, R_3 decreased significantly in response to the anti-cholinergic bronchodilator ($p = 0.002$; Fig. 2), with no difference between groups. Overall, the bronchodilation test showed minimal bronchospasm at the end of the study.

Airway inflammation

A significant reduction of airway neutrophilia was observed over time ($p < 0.0001$) with a difference from W2 to W20 compared to baseline in the F+A group and at W8 and W12 in the fluticasone group (Fig. 3). The proportional change compared to the baseline value was also analyzed due to the large variation in airway neutrophilia at the beginning of the study. The proportional improvement of airway neutrophilia was significantly larger in the F+A group (group

difference; $p = 0.02$). At the end of the study, normalization of airway neutrophilia (neutrophils $\leq 10\%$) occurred in 4/6 horses in the F+A group and 0/5 in the fluticasone group. As the proportion of neutrophils decreased over time, concurrent increases in the percentage of macrophages ($p = 0.0004$) and of lymphocytes ($p = 0.01$) were observed in the BALF, without group differences. The proportions of mast cells and eosinophils were low and did not vary during the study (data not shown). The percentage of BALF volume recovered increased over time ($p = 0.0002$). The BALF total cell counts did not vary over time or between groups, but there was an interaction between time and groups ($p = 0.009$; Supplementary table 1).

Transcriptomic analysis

The gene expression of GAPDH did not vary over time or between groups in BALF cells, PMNs and EBBs, and was therefore considered an appropriate reference gene. There was no group difference for all the genes examined. In BALF cells (Supplementary Fig. 2), the expression of IL-1 β decreased over time ($p = 0.003$), while CXCL-8 gene expression did not vary significantly ($p = 0.08$). The viability and purity of PMNs (neutrophils) were respectively $98\% \pm 0.3\%$ and $99\% \pm 0.1\%$ and were considered adequate for assessment. In those cells, the gene expression of CXCL-8 ($p = 0.006$), but not of IL-1 β ($p = 0.09$), decreased over time (Supplementary Fig. 3). In EBBs, the gene expression of IL-1 β ($p = 0.001$) and CXCL-8 ($p = 0.01$), and the ratio of the (+) insert isoform on total SMMHC ($p = 0.002$) were reduced over time (Supplementary Fig. 4).

Histomorphometry of central and peripheral airways

The quality score of the EBBs was 3.8 ± 0.07 (good to optimal quality) and did not vary over time or between groups. In central airways (Fig. 4C), the score reflecting severity of asthma-related architectural changes decreased over time ($p = 0.001$) in both groups (Fig. 4A), as did the thickness of the ECM ($p < 0.0001$; Fig. 4B; median decrease of 67.6% (44.1-71.3) and 51.3% (29.8-63.0) in the F+A group and fluticasone group, respectively at W20 compared to baseline).

Peripheral airway remodeling was evaluated in 7.2 ± 0.5 (range 2-19) airways per horse per time point (Fig. 5C). The peripheral ASM mass decreased over time ($p = 0.05$; Fig. 5A) with no difference between groups. This represented a median decrease of 21.7% (-110.8-40.7) and 24.7% (-31.1-47.6) at W8 and W20 for the F+A group, and of 38.2% (17.1-52.8) and 34.3% (7.6-48.0) at W8 and

W20 for the fluticasone group. The peripheral ECM area did not vary over time or between treatment groups (Fig. 5B).

Endobronchial ultrasound

Central airway remodeling was assessed in 6.3 ± 0.3 (range 4-9) bronchi per horse per time point. The ASM mass ($L2/Pi^2$) in central airways decreased significantly over time ($p = 0.0002$), similarly in each group (Fig. 6; mean decrease of $13.4 \pm 7.4\%$ and $21.1 \pm 5.5\%$ at W8 and W20 for the F+A group, and of $10.1 \pm 8.1\%$ and $25.7 \pm 8.2\%$ at W8 and W20 for the fluticasone group).

Azithromycin concentration

In the six horses receiving azithromycin, the plasma concentration at W2, W8 and W20 was 85.5 ± 29.6 , 84.8 ± 20.4 and 86.9 ± 22.1 ng/ml. Mean intracellular concentration of azithromycin at W20 was $10,758 \pm 3,224$ ng/ml of PMNs. On average, intracellular concentration of azithromycin was 158 times higher than in plasma at W20.

Associations between clinicopathological data and remodeling

At baseline, airway neutrophilia correlated with lung function data evaluated with oscillometry (significant correlations between neutrophilia and R3 [$r = 0.75$, $p = 0.01$] and X3 [$r = -0.75$, $p = 0.01$] during inspiration). The BALF neutrophil percentage at baseline was also associated with poorer lung function improvement at W20 (correlations between BALF neutrophilia and R_L W20/ R_L baseline [$r = 0.65$, $p = 0.03$] and E_L W20/ E_L baseline [$r = 0.67$, $p = 0.02$]). At baseline, the gene expression of IL-1 β in PMNs correlated with the R5/R10 ratio ($r = 0.80$, $p = 0.003$), while its expression in BALF cells correlated with airway neutrophilia ($r = 0.71$, $p = 0.02$). At the beginning of the study, the $L2/Pi^2$ area measured with EBUS correlated with the ASM mass in peripheral airways ($r = 0.61$, $p = 0.05$). Pulmonary resistance ($r = -0.69$, $p = 0.02$) and elastance ($r = -0.74$, $p = 0.009$) were negatively correlated with the ECM area in peripheral airways at baseline.

Adverse effects

The horses receiving azithromycin displayed softer manure for the duration of the study, as previously reported in horses (37, 38) and concordant with diarrhea being a frequent side effect in humans (12). At the end of the study, all horses had localized alopecia around the nares, where

the inhaler device was positioned on the skin. Bacteriological and fungal cultures did not reveal infectious pathogens. Histologic evaluation of skin biopsies showed follicular and epidermal atrophy compatible with corticosteroid topical effects. The results of the complete blood counts and serum chemistry were within the expected values for horses affected by severe asthma at baseline and at the end of the study except for two mares that had a mild increase in liver enzymes at W20 (fluticasone group), without any related clinical signs.

Discussion

The administration of azithromycin has beneficial effects on some features of asthma, however, whether these favorable properties extend to the airway architectural changes has not been assessed in natural models of asthma. Combining azithromycin to ICS reduced airway neutrophilia further than the sole administration of fluticasone in severe equine asthma. Yet, the improvement of lung function and bronchial remodeling obtained with fluticasone were not potentiated by the macrolide, refuting the initial hypothesis.

Macrolides have been proposed as an add-on medication in patients with neutrophilic inflammation when symptoms are not adequately relieved by standard therapy (39). However, conclusions from meta-analysis are conflicting regarding their effects on lung function (40-42), and it is unclear how these drugs modulate clinical signs and exacerbation frequency in asthma. The results of the current study are consistent with reports that did not observe an improvement in respiratory mechanics with add-on macrolide administration (12, 13, 43). Furthermore, the persistence of abnormal lung function in 8/11 horses at the end of the study, along with the presence of some residual bronchoconstriction, suggest a degree of corticosteroid resistance that was not reversed by the addition of azithromycin. Interestingly, the remaining bronchospasm was not detected by standard respiratory mechanics, but only by oscillometry, which supports the latter's sensitivity for the detection of bronchodilation and poor asthma control (44).

The negative clinical outcomes associated with the presence of neutrophils in asthma (including acute exacerbation (7) and steroid resistance (9)), justify the search of therapies targeting this leukocyte. Macrolides decreased airway neutrophilia in some (23, 41, 43), but not in all asthma

reports (12) and they are possibly more useful in face of neutrophilic inflammation (13), although again this is not a consistent finding (12). In the present study, the greater reduction of airway neutrophilia in the group receiving azithromycin was not accompanied by enhanced effects on remodeling and lung function, questioning the role of this leukocyte, and its different subsets and by-products, in the disease. However, it is possible that a longer control of inflammation is required to reverse bronchial remodeling.

Interleukin-1 β and CXCL-8 are both secreted by neutrophils and are potent activators of these cells. The pro-inflammatory cytokine IL-1 β is associated with decreased lung function, poor asthma control and requirement for high doses of ICS (10, 45), and its sputum gene expression and protein content are elevated in neutrophilic asthma (45, 46). The gene expression of IL-1 β in BALF decreased after a short-term azithromycin treatment in severe equine asthma (38). However, azithromycin did not enhance the fluticasone-induced reduction of IL-1 β in BALF cells and EBBs in the current study. There is little information on the impact of glucocorticoids on IL-1 β expression in human asthma and data in animal models are conflicting (45, 47, 48). In contrast to the current results, others reported an increased expression of IL-1 β in the sputum from patients with stable persistent asthma after one month of fluticasone treatment (46). Species difference and varying degree of asthma severity could have contributed to those discordant results. The chemokine CXCL-8 is also elevated in neutrophilic asthma (49). Clarithromycin decreased CXCL-8 protein content in sputum from patients with a severe refractory phenotype (43) and a short-term azithromycin treatment reduced its expression in BALF cells from horses with severe asthma (38). Although a significant decrease in CXCL-8 gene expression in PMNs and in EBBs occurred over time in the current study, there was no potentiation by azithromycin.

Despite airway remodeling, especially the increased ASM mass, being a major contributor to airway obstruction in asthma, it is not a consistent consideration in clinical decisions related to therapeutic interventions (50). This study was performed to investigate whether modulation of ASM biology by macrolides contribute to their clinical efficacy. Indeed, azithromycin induces autophagy in human bronchial ASM (15) and relaxes pre-contracted human bronchial muscle strips (17). In vivo, macrolide administration decreases ASM mass in rodents with an induced asthma-like disease (18-21) and in healthy mice (51). However, these studies have assessed the

effects of high doses (≥ 25 mg/kg azithromycin) while asthmatic patients usually receive much lower dosages (≤ 10 mg/kg) (12, 13). In the present clinical trial, fluticasone reduced the ASM mass to a similar extent than previous results in this equine model (30, 31). However, this parameter was not further improved by the administration of azithromycin at a dose representative of current asthma therapy. Similarly, the macrolide did not modify the ASM mass in the central airways. The L2/ Pi^2 area measured with EBUS decreased by $\approx 25\%$ after five months of treatment in both groups, an improvement similar to previously reported with the combination of fluticasone and salmeterol (31) and comparable to what was observed for peripheral airways. The multivariate score used to evaluate histological lesions in the epithelium, submucosa and ASM in central airways (33) also showed that therapy lessened the architectural alterations in this asthma model, but without a group difference. Combined, these results contrast with mathematical models predicting a similar effectiveness of azithromycin and bronchial thermoplasty for the treatment of asthma via a reduction of the ASM mass (51).

The increased gene expression of the SMMHC (+) insert isoform in ASM from human (35) and equine (36) central asthmatic bronchi could be implicated in airway hyperresponsiveness because it induces a faster rate of muscle contraction. In the current study, the mRNA expression of the (+) insert isoform to total SMMHC ratio was concordant to previous results in asthmatic horses (36), but the improvement (\approx two-fold reduction) obtained with ICS was not potentiated by azithromycin. Based on this finding, perhaps the decreased airway hyperresponsiveness observed with macrolides in some studies (22, 23) is not related to the modulation of the SMMHC (+) insert isoform and ASM remodeling.

This study revealed several relevant associations between histomorphometry and clinical data. First, the correlation between the ASM mass in small bronchi and the L2/ Pi^2 area in the central airways was confirmed (31) and supports the utility of EBUS as a surrogate marker of peripheral remodeling. Surprisingly, negative correlations between lung function data and the ECM area in peripheral biopsies were observed at baseline, indicating that subjects with higher deposition of ECM had less airway obstruction. A potential explanation would be that the increased stiffness provided by these tissues could partially prevent the ASM-induced bronchoconstriction or that the increased matrix deposition may enhance the forces of interdependence between

parenchyma and airway. This study also identified associations between BALF neutrophilia and parameters of lung function measured by oscillometry, which has been previously described in human asthma (52) and suggests that this technique may be useful to detect peripheral dysfunction related to inflammation-mediated bronchoconstriction. Finally, the poorer improvement of lung function in subjects with higher airway neutrophilia at baseline is consistent with the corticosteroid resistance reported in human asthmatics with this type of inflammation (9).

A limitation of this study was the low number of horses evaluated, which could have precluded the detection of differences between groups. However, there was no trend suggesting that azithromycin would be useful in reversing bronchial remodeling in this natural model of asthma. Severe equine asthma is a condition also known as heaves, recurrent airway obstruction and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The use of the latter has been abandoned as the disease in horses do not share etiological or histopathological findings with COPD, in contrast with the comparable bronchial remodeling and response to therapy of asthma in humans (28). Despite these similarities, it remains possible that macrolides have different effects in human subjects than observed in the current study with horses. Furthermore, the inclusion of an untreated control group would have been preferable to assess the impact of external factors, but it would have been unethical as no improvement of lung function is expected when horses are kept in an antigenic environment.

As specific pathogens can play a role in human asthmatic exacerbations, macrolide benefits might originate from their antimicrobial properties. Thus, assessing the influence of antibiotic treatment on the microbiome and particularly antimicrobial resistance is important. Indeed, azithromycin reduced bacterial density and increased macrolide and non-macrolide resistance genes from sputum samples of asthmatic subjects (53). Therefore, another limitation of this study was the lack of microbiological assessment in the airways. On the other hand, viral and bacterial infections are not contributing to exacerbations in severe equine asthma, and azithromycin administration does not improve lung function or modify tracheal bacterial counts in this disease (38).

Of note, the plasma and PMN intracellular concentrations of azithromycin obtained in asthmatic horses were comparable to those found in humans (54) and were concordant with previous pharmacokinetic results in the equine species (37). Therefore, the poor clinical response to azithromycin in this trial is unlikely related to insufficient drug concentrations.

In conclusion, this study indicates that the positive clinical outcomes observed with macrolides are perhaps not due to modulation of bronchial remodeling. Understanding how azithromycin is clinically useful is still pertinent to further uncover asthma pathophysiology, to justify its use in severe cases and ultimately to guide the development of non-antimicrobial macrolides.

Acknowledgements: We thank Khristine Picotte, Amandine Bessonnat, Julie-Anne Carrier, Amandine Vargas, Selma Ben Hamouda, Camille Rolland, Alexandra J. Lemoyne, Marine Rullier, Valérie Dubuc and Elizabeth Pépin for their technical help. This work was made possible by funding from the Fonds de Recherche du Québec en Santé and the Canadian Institutes of Health Research (grant #PJT-148807). The funders had no role in the design, analysis, or reporting of the study.

Author's contributions: S.M-S. participated in the planning of the trial, experimental manipulations, data analysis, and writing and reviewing of the manuscript. R.B., S.P.D., F.B., P.H. and A.G.B. participated in the experimental manipulations and reviewing of the manuscript. J.G.M. and J-P.L. participated in the planning of the trial, data analysis, writing and reviewing of the manuscript.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

The datasets generated in the current study are available in the Dataverse UdeM repository, [<https://doi.org/10.5683/SP2/QM67NC>].

References

1. Cevhertas L, Ogulur I, Maurer DJ, Burla D, Ding M, Jansen K, et al. Advances and Recent Developments in Asthma in 2020. *Allergy*. 2020.
2. Backman H, Jansson SA, Stridsman C, Eriksson B, Hedman L, Eklund BM, et al. Severe asthma-A population study perspective. *Clinical and Experimental Allergy*. 2019;49(6):819-28.
3. Peters SP, Ferguson G, Deniz Y, Reisner C. Uncontrolled asthma: a review of the prevalence, disease burden and options for treatment. *Respir Med*. 2006;100(7):1139-51.
4. FitzGerald JM, Lemiere C, Loughheed MD, Ducharme FM, Dell SD, Ramsey C, et al. Recognition and management of severe asthma: A Canadian Thoracic Society position statement. *Canadian Journal of Respiratory, Critical Care, and Sleep Medicine*. 2017;1(4):199-221.
5. Bahadori K, Doyle-Waters MM, Marra C, Lynd L, Alasaly K, Swiston J, et al. Economic burden of asthma: a systematic review. *BMC Pulm Med*. 2009;9:24.
6. Moore WC, Hastie AT, Li X, Li H, Busse WW, Jarjour NN, et al. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(6):1557-63 e5.
7. Fahy JV, Kim KW, Liu J, Boushey HA. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;95(4):843-52.
8. Smith BM, Zhao N, Olivenstein R, Lemiere C, Hamid Q, Martin JG. Asthma and fixed airflow obstruction: Long-term trajectories suggest distinct endotypes. *Clin Exp Allergy*. 2020.
9. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax*. 2002;57(10):875-9.
10. Lachowicz-Scroggins ME, Dunican EM, Charbit AR, Raymond W, Looney MR, Peters MC, et al. Extracellular DNA, Neutrophil Extracellular Traps, and Inflammasome Activation in Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;199(9):1076-85.

11. Kanoh S, Rubin BK. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(3):590-615.
12. Gibson PG, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, Hodge S, James AL, et al. Effect of azithromycin on asthma exacerbations and quality of life in adults with persistent uncontrolled asthma (AMAZES): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2017;390(10095):659-68.
13. Brusselle GG, Vanderstichele C, Jordens P, Deman R, Slabbynck H, Ringoet V, et al. Azithromycin for prevention of exacerbations in severe asthma (AZISAST): a multicentre randomised double-blind placebo-controlled trial. *Thorax.* 2013;68(4):322-9.
14. Stamatiou R, Paraskeva E, Boukas K, Gourgoulisanis KI, Molyvdas PA, Hatziefthimiou AA. Azithromycin has an antiproliferative and autophagic effect on airway smooth muscle cells. *Eur Respir J.* 2009;34(3):721-30.
15. Stamatiou R, Boukas K, Paraskeva E, Molyvdas PA, Hatziefthimiou A. Azithromycin reduces the viability of human bronchial smooth muscle cells. *J Antibiot (Tokyo).* 2010;63(2):71-5.
16. Daenas C, Hatziefthimiou AA, Gourgoulisanis KI, Molyvdas PA. Azithromycin has a direct relaxant effect on precontracted airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 2006;553(1-3):280-7.
17. Wang Q, Yu MF, Zhang WJ, Liu BB, Zhao QY, Luo X, et al. Azithromycin inhibits muscarinic 2 receptor-activated and voltage-activated Ca(2+) permeant ion channels and Ca(2+) sensitization, relaxing airway smooth muscle contraction. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2019.
18. Wu LQ, Wang RL, Dai YR, Li FQ, Wu HY, Yan SS, et al. Roxithromycin suppresses airway remodeling and modulates the expression of caveolin-1 and phospho-p42/p44MAPK in asthmatic rats. *Int Immunopharmacol.* 2015;24(2):247-55.
19. Kang JY, Jo MR, Kang HH, Kim SK, Kim MS, Kim YH, et al. Long-term azithromycin ameliorates not only airway inflammation but also remodeling in a murine model of chronic asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 2016;36:37-45.

20. Liu Y, Pu Y, Li D, Zhou L, Wan L. Azithromycin ameliorates airway remodeling via inhibiting airway epithelium apoptosis. *Life Sci.* 2017;170:1-8.
21. Pu Y, Liu Y, Liao S, Miao S, Zhou L, Wan L. Azithromycin ameliorates OVA-induced airway remodeling in Balb/c mice via suppression of epithelial-to-mesenchymal transition. *Int Immunopharmacol.* 2018;58:87-93.
22. Kostadima E, Tsiodras S, Alexopoulos EI, Kaditis AG, Mavrou I, Georgatou N, et al. Clarithromycin reduces the severity of bronchial hyperresponsiveness in patients with asthma. *Eur Respir J.* 2004;23(5):714-7.
23. Piacentini GL, Peroni DG, Bodini A, Pigozzi R, Costella S, Loiacono A, et al. Azithromycin reduces bronchial hyperresponsiveness and neutrophilic airway inflammation in asthmatic children: a preliminary report. *Allergy Asthma Proc.* 2007;28(2):194-8.
24. Wenzel S, Holgate ST. The mouse trap: It still yields few answers in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(11):1173-6; discussion 6-8.
25. Rosenberg HF, Druey KM. Modeling asthma: Pitfalls, promises, and the road ahead. *J Leukoc Biol.* 2018;104(1):41-8.
26. Couetil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Leguillette R, Richard EA. Inflammatory Airway Disease of Horses--Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med.* 2016;30(2):503-15.
27. Hotchkiss JW, Reid SW, Christley RM. 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):301-8.
28. Bullone M, Lavoie JP. Asthma "of horses and men"--how can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences? *Mol Immunol.* 2015;66(1):97-105.
29. Mainguy-Seers S, Lavoie JP. Glucocorticoid treatment in horses with asthma: A narrative review. *J Vet Intern Med.* 2021;35(4):2045-57.

30. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Joubert P, Relave F, Setlakwe EL, Beauchamp G, et al. Corticosteroids and antigen avoidance decrease airway smooth muscle mass in an equine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;47(5):589-96.
31. Bullone M, Vargas A, Elce Y, Martin JG, Lavoie JP. Fluticasone/salmeterol reduces remodelling and neutrophilic inflammation in severe equine asthma. *Sci Rep*. 2017;7(1):8843.
32. Couetil L, Hammer J, Miskovic Feutz M, Nogradi N, Perez-Moreno C, Ivester K. Effects of N-butylscopolammonium bromide on lung function in horses with recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med*. 2012;26(6):1433-8.
33. Bullone M, Helie P, Joubert P, Lavoie JP. Development of a Semiquantitative Histological Score for the Diagnosis of Heaves Using Endobronchial Biopsy Specimens in Horses. *J Vet Intern Med*. 2016;30(5):1739-46.
34. Bullone M, Beauchamp G, Godbout M, Martin JG, Lavoie JP. Endobronchial Ultrasound Reliably Quantifies Airway Smooth Muscle Remodeling in an Equine Asthma Model. *PLoS One*. 2015;10(9):e0136284.
35. Leguillette R, Laviolette M, Bergeron C, Zitouni N, Kogut P, Solway J, et al. Myosin, transgelin, and myosin light chain kinase: expression and function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179(3):194-204.
36. Boivin R, Vargas A, Lefebvre-Lavoie J, Lauzon AM, Lavoie JP. Inhaled corticosteroids modulate the (+)insert smooth muscle myosin heavy chain in the equine asthmatic airways. *Thorax*. 2014;69(12):1113-9.
37. Leclere M, Magdesian KG, Cole CA, Szabo NJ, Ruby RE, Rhodes DM, et al. Pharmacokinetics and preliminary safety evaluation of azithromycin in adult horses. *J Vet Pharmacol Ther*. 2012;35(6):541-9.
38. Mainguy-Seers S, Vargas A, Labrecque O, Bedard C, Helie P, Lavoie JP. Randomised study of the immunomodulatory effects of azithromycin in severe asthmatic horses. *Vet Rec*. 2019;185(5):143.

39. Henderson I, Caiazzo E, McSharry C, Guzik TJ, Maffia P. Why do some asthma patients respond poorly to glucocorticoid therapy? *Pharmacol Res.* 2020;160:105189.
40. Reiter J, Demirel N, Mendy A, Gasana J, Vieira ER, Colin AA, et al. Macrolides for the long-term management of asthma--a meta-analysis of randomized clinical trials. *Allergy.* 2013;68(8):1040-9.
41. Tong X, Guo T, Liu S, Peng S, Yan Z, Yang X, et al. Macrolide antibiotics for treatment of asthma in adults: a meta-analysis of 18 randomized controlled clinical studies. *Pulm Pharmacol Ther.* 2015;31:99-108.
42. Kew KM, Undela K, Kotortsi I, Ferrara G. Macrolides for chronic asthma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015(9):CD002997.
43. Simpson JL, Powell H, Boyle MJ, Scott RJ, Gibson PG. Clarithromycin targets neutrophilic airway inflammation in refractory asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(2):148-55.
44. Cottee AM, Seccombe LM, Thamrin C, King GG, Peters MJ, Farah CS. Bronchodilator Response Assessed by the Forced Oscillation Technique Identifies Poor Asthma Control With Greater Sensitivity Than Spirometry. *Chest.* 2020;157(6):1435-41.
45. Kim RY, Pinkerton JW, Essilfie AT, Robertson AAB, Baines KJ, Brown AC, et al. Role for NLRP3 Inflammasome-mediated, IL-1beta-Dependent Responses in Severe, Steroid-Resistant Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;196(3):283-97.
46. Baines KJ, Simpson JL, Wood LG, Scott RJ, Fibbens NL, Powell H, et al. Sputum gene expression signature of 6 biomarkers discriminates asthma inflammatory phenotypes. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(4):997-1007.
47. Giguere S, Viel L, Lee E, MacKay EJ, Hernandez J, Franchini M. Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002;85(3-4):147-58.

48. Guan M, Ma H, Fan X, Chen X, Miao M, Wu H. Dexamethasone alleviate allergic airway inflammation in mice by inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome. *Int Immunopharmacol.* 2020;78:106017.
49. Pabreja K, Gibson P, Lochrin AJ, Wood L, Baines KJ, Simpson JL. Sputum colour can identify patients with neutrophilic inflammation in asthma. *BMJ Open Respir Res.* 2017;4(1):e000236-e.
50. Wang KCW, Donovan GM, James AL, Noble PB. Asthma: Pharmacological degradation of the airway smooth muscle layer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2020;126:105818.
51. Donovan GM, Wang KCW, Shamsuddin D, Mann TS, Henry PJ, Larcombe AN, et al. Pharmacological ablation of the airway smooth muscle layer-Mathematical predictions of functional improvement in asthma. *Physiol Rep.* 2020;8(11):e14451.
52. Higaki N, Iwamoto H, Yamaguchi K, Sakamoto S, Horimasu Y, Masuda T, et al. Correlations of forced oscillometric bronchodilator response with airway inflammation and disease duration in asthma. *Clin Respir J.* 2020.
53. Taylor SL, Leong LEX, Mobegi FM, Choo JM, Wesselingh S, Yang IA, et al. Long-Term Azithromycin Reduces Haemophilus influenzae and Increases Antibiotic Resistance in Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;200(3):309-17.
54. Culic O, Erakovic V, Cepelak I, Barisic K, Brajsa K, Ferencic Z, et al. Azithromycin modulates neutrophil function and circulating inflammatory mediators in healthy human subjects. *Eur J Pharmacol.* 2002;450(3):277-89.

Tables and figures

Table 1. Sequences of primer pairs used for quantitative PCR analysis

| Genes | Sequences |
|--|-------------------------------------|
| EC C-X-C motif chemokine ligand 8 | F: 5'- CAAGCTGGCTGTTGCTCTCTTG -3' |
| | R: 5'- CTCAGTCCTCTTTAGAAACGCC -3' |
| EC interleukin-1 β | F: 5'- AGTGGTGTCTGCATGAGCTTTG -3' |
| | R: 5'- GTATTGGGGTCTACTGTCTCCA -3' |
| EC glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | F: 5'- CACCCAGAAGACCGTGGATG -3' |
| | R: 5'- TGCCAGTGAGCTTCCCATTC -3' |
| EC smooth muscle myosin heavy chain | F: 5'- TGAACAAGGCCCTGGACAAGAC -3' |
| | R: 5'- TGCAGCTTCTCGTTGGTGTAGT -3' |
| EC smooth muscle myosin heavy chain (+) insert isoform | F: 5'- ATTCTATGCACAGGCGAGTCTGGA -3' |
| | R: 5'- GTAGGCAAGAGGTGGGCCTTG -3' |
| EC, Equus caballus | |

Figure 1. Lung function measured by standard respiratory mechanics. Values of pulmonary resistance (R_L ; a) and pulmonary elastance (E_L ; b) (mean and standard error of the mean). There was a significant main time effect but not group difference with the two-way ANOVA ($p < 0.0001$) for both R_L and E_L . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared to baseline values with Dunnett's multiple comparison tests.

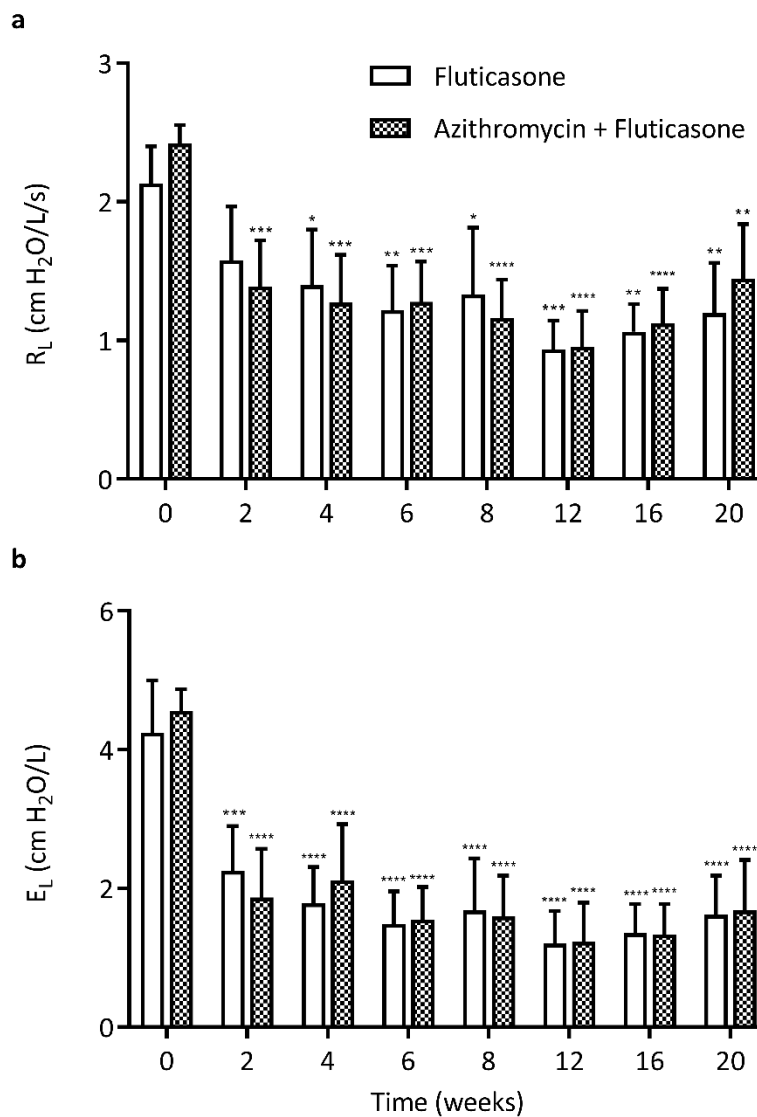


Figure 2. Bronchodilator test. Values of pulmonary resistance (R_L ; a), elastance (E_L ; b) and resistance at 3 Hz (R_3 ; c) before and after administration of N-butylscopolammonium bromide (NBB) (mean and standard error of the mean). ** $p < 0.01$ compared to pre-NBB with Sidak's multiple comparison tests and ## $p < 0.001$ for the main bronchodilator effect.

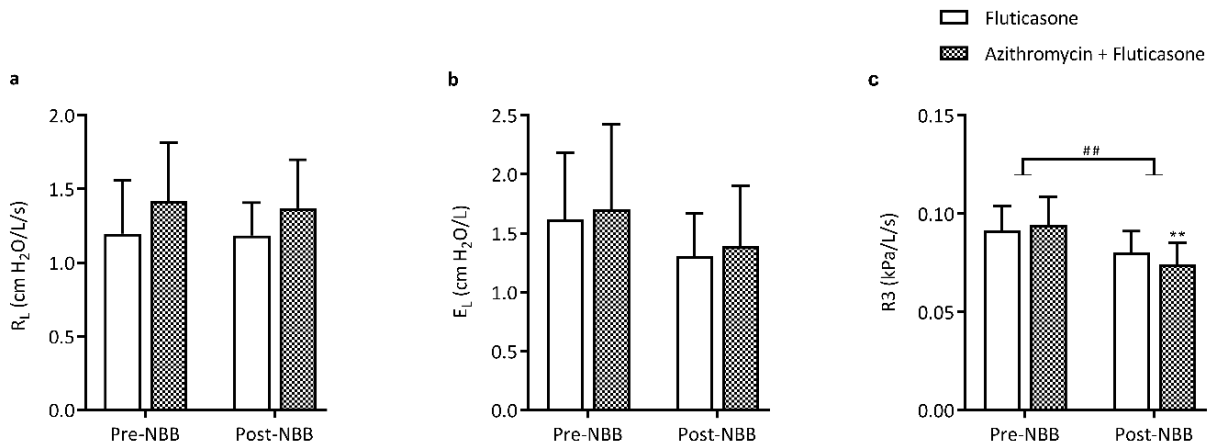


Figure 3. Bronchoalveolar lavage fluid cytology (mean and standard error of the mean). There was a significant time main effect but no group difference with the two-way ANOVA for neutrophils ($p < 0.0001$), macrophages ($p = 0.0004$) and lymphocytes ($p = 0.01$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared to baseline values with Dunnett's multiple comparison tests.

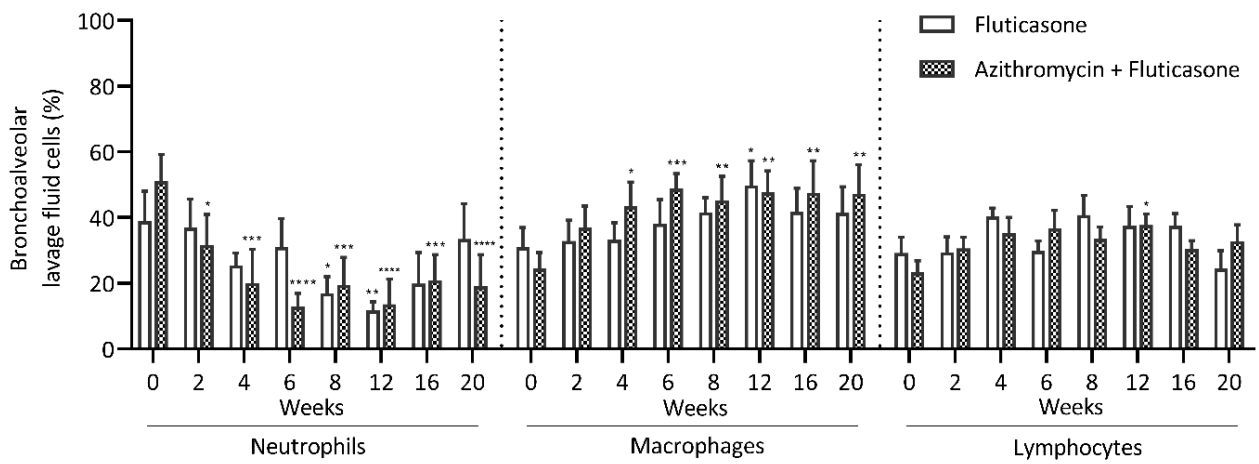


Figure 4. Endobronchial biopsies. Histological score (a) and extracellular matrix thickness (b) of the endobronchial biopsies (mean and standard error of the mean). There was a significant time main effect but no group difference with the two-way ANOVA for the score ($p = 0.001$) and the extracellular matrix thickness ($p < 0.0001$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared to baseline values with Dunnett's multiple comparison tests. c) Epithelium from a central airway stained with Russell-Movat-pentachrome.

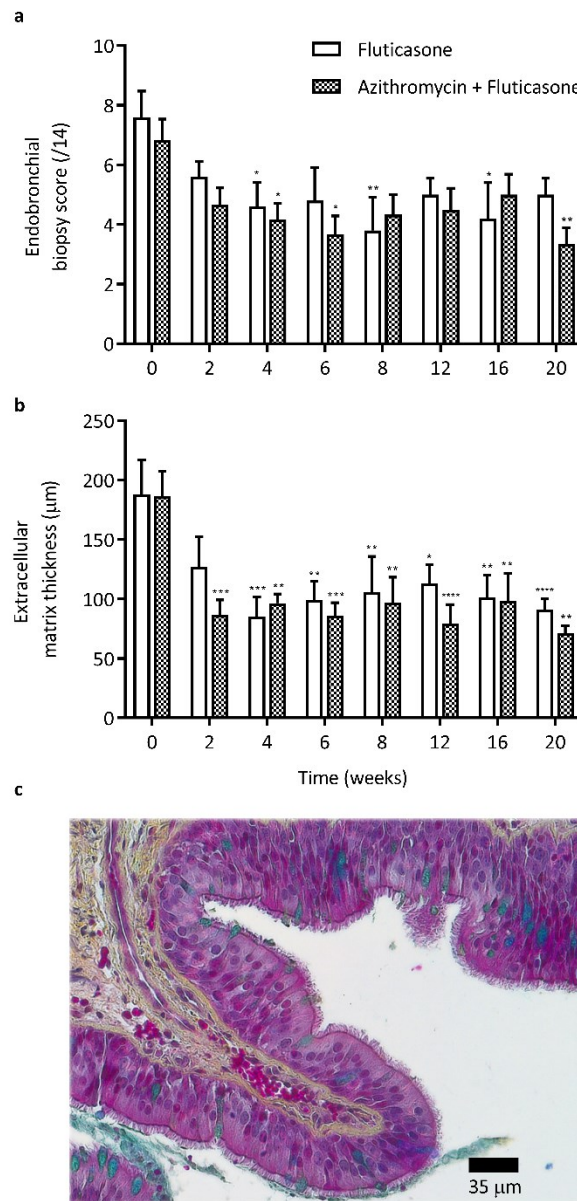


Figure 5. Peripheral bronchial remodeling. a) Airway smooth muscle mass (ASM) corrected for the perimeter of basal membrane where the muscle was located (corrected Pbm²) (mean and standard error of the mean). There was a significant time main effect but not group difference with the two-way ANOVA (p = 0.05). b) Extracellular matrix area (ECM) corrected for the length of the basal membrane (Pbm²). * p < 0.05 compared to baseline values with Dunnett's multiple comparison tests. c) Peripheral bronchi stained with Russell-Movat-pentachrome.

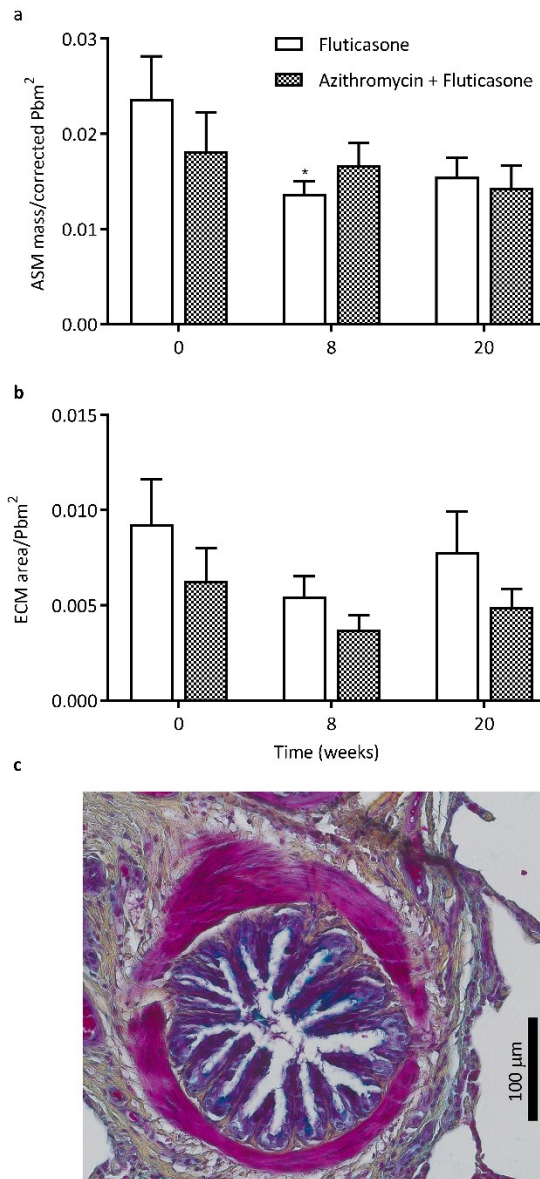
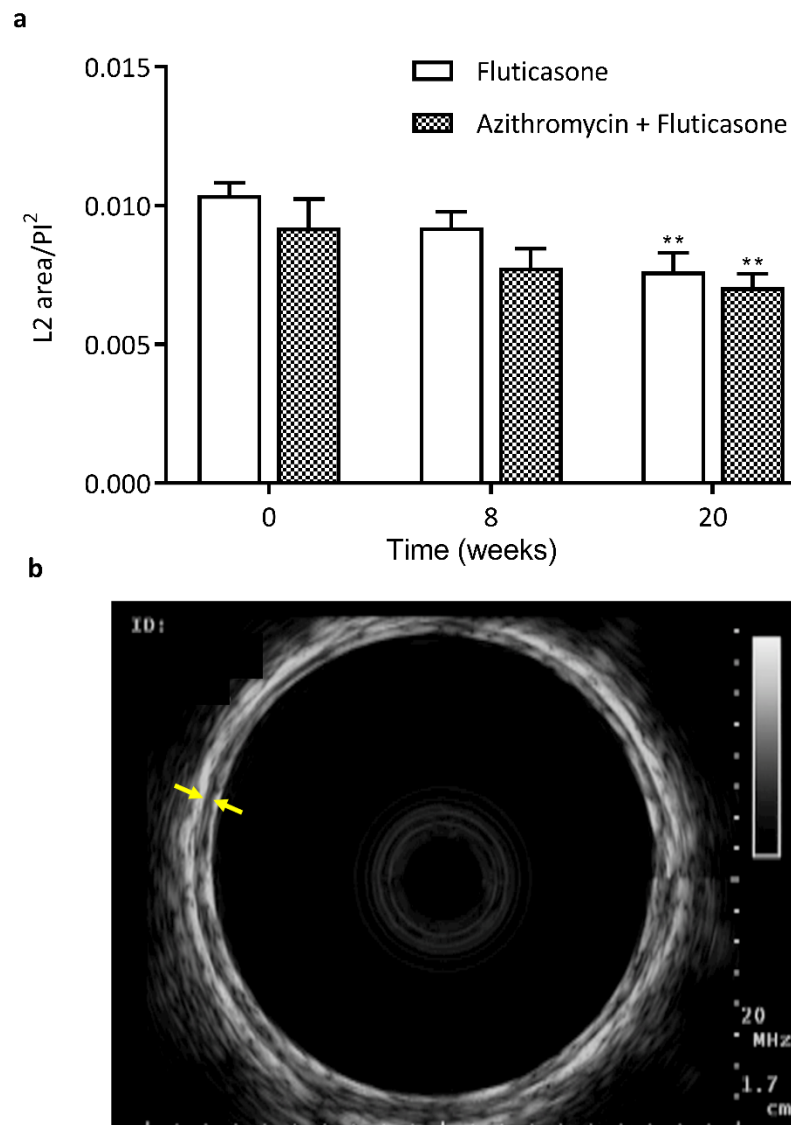


Figure 6. Endobronchial ultrasound. a) Area of the second layer (L2) corrected by the internal perimeter (PI) (mean and standard error of the mean). There was a significant time main effect but no group difference with the two-way ANOVA ($p = 0.0002$). ** $p < 0.01$ compared to baseline values with Dunnett's multiple comparison tests. b) Central airway obtained with endobronchial ultrasound. The distance between the yellow arrows illustrates the thickness of L2.



Supplementary File

Supplement to “Effects of azithromycin on bronchial remodeling in the natural model of severe neutrophilic asthma in horses”

Sophie Mainguy-Seers, Roxane Boivin, Sheila Pourali Dogaheh, Francis Beaudry, Pierre Hélie, Alvaro G. Bonilla, James G. Martin, Jean-Pierre Lavoie

Materials and methods

The protocol of this study was designed and described in the grant application for the Canadian Institutes of Health Research. The protocol was not registered.

Animals

Horses were donated to the research herd because of severe asthma. The diagnosis was confirmed based on history of chronic respiratory signs, pulmonary function test results and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology (1). During antigenic exposure (stabling and hay feeding), these horses had > 25% neutrophils on BALF cytology (normal \leq 10%) and a pulmonary resistance (R_L) and elastance (E_L) > 1 cm H₂O/L/s and > 1 cm H₂O/L, respectively. Physical examination, complete blood count, serum biochemistry and thoracic radiographs were assessed to rule out other respiratory conditions. To induce and maintain clinical exacerbation, horses were stabled (wood shaving bedding) and fed dry hay starting one month before and for the duration of the trial. Daily outdoor turnout times were predetermined based on the individual clinical severity during asthma exacerbation. The management of each horse remained the same throughout the study period. Horses were conditioned to wear a mask, to stand in a stock and to receive inhaled medication delivered with the AeroHippus inhaler mask (Trudell Medical International, London, ON, Canada). Horses were monitored twice daily for the duration of the study. Human endpoints included anorexia, abnormal fecal output, hyperthermia, colic, respiratory distress, or any other medical conditions. If the condition or its treatment interfered with the study, the horse would be excluded. Housing and manipulations occurred at the research

farm, except for the thoracoscopies which were performed at the Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire of the Université de Montréal. Each horse was ranked based on the baseline resistance value (horse with the highest resistance in group A, horse with the second highest resistance in group B, horse with the third highest resistance in group A and so on), then groups were randomly allocated by coin toss.

Pulmonary function tests

The standard respiratory mechanics were performed in unsedated standing horses. Briefly, a polyethylene catheter with an air-filled (5 ml) balloon at its tip was inserted in the distal third of the esophagus to obtain a measurement of the pleural pressure (P_L). Flow rates were measured during a two-minute period with a heated pneumotachograph and a differential pressure transducer fitted to a mask placed over the horse's nose. The head was positioned to minimize upper airway resistance during measurements (2). The commercial software (Flexiware 7.6, SCIREQ, Montreal, QC, Canada) allowed electronic integration of the flow to obtain volume, and together with the pressure signals to obtain values of pulmonary resistance (R_L) and elastance (E_L) by applying multiple linear regression to the equation for the single compartment model of the lung ($P_L = E_L V + R_L \dot{V} + K$); V is the volume, \dot{V} the airflow and K the transpulmonary end-expiratory pressure. All valid breaths obtained over the two-minute period were averaged for analysis.

Lung function was also measured with oscillometry as previously described (3) as it is possibly more sensitive than standard lung function measurements for detecting airway obstruction (4). The Equine MasterScreen impulse oscillometry system (Jaeger GmbH, Würzburg, Germany) was calibrated before each use. Multi-frequency impulses generated by a loudspeaker were superimposed on the tidal breathing by an airtight mask placed over the horse's nose. The pressure-flow signal response of the respiratory system was measured by a pressure transducer connected to a pneumotachograph attached to the front of the facemask. Three recordings of 30 seconds duration were acquired. Analysis were performed with LabManager (version 4.53, Jaeger, Würzburg, Germany) and FAMOS (IMC, Meßsysteme, Berlin, Germany) using Fast-Fourier transform. Inspiratory (insp), expiratory (exp) and resistance (R3) and reactance (X3) of the

respiratory system at 3 Hz were analyzed. The ratio of resistance at 5 Hz and 10 Hz (R5/R10) was used as an indicator of the frequency dependence of the respiratory system resistance.

Bronchoscopy and bronchoalveolar lavage (BAL)

Endoscopy was performed in sedated horses (detomidine [Dormosedan, Zoetis, Kirkland, QC, Canada; 0.01 mg/kg, IV] and butorphanol [Torbugesic, Zoetis; 0.02 mg/kg, IV]) with a 1.6 m videoendoscope (12.8-mm external diameter; Evis Exera II CV-180, Olympus Canada, Richmond Hill, ON, Canada). The bronchoalveolar lavages (BAL) were performed as previously described (5) by instilling 250 ml of warm sterile isotonic saline into a main bronchus through the videoendoscope and immediately aspirated with a suction pump, and this was repeated once in the same airway. The samples were kept on ice until processing within 90 minutes. Cytocentrifuged preparations of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were stained with a modified Wright–Giemsa solution (Diff-Quik, Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Differential leukocyte counts were performed blindly from 400 cells. In the equine species, BALF differential cell count is provided instead of total counts for each leukocyte as the BALF volume recovered is dependent on the degree of airway obstruction (6). BALF was centrifuged at 500 x *g* for five minutes, then the pelleted cells were washed twice in PBS, and 10 million cells were re-suspended in Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and kept at –80°C until RNA extraction.

Endobronchial ultrasound

Endobronchial ultrasound was performed as previously reported (7) with a 20 MHz radial miniature probe (UM-BS20-26R, Olympus Canada) with the compatible balloon-ended sheath (MAJ-643R, Olympus Canada). The images with the highest quality were analyzed by a blinded investigator (at least 3 images/airway) (7) with Image J (version 1.52a, NIH, Bethesda, USA).

Endobronchial biopsies

Endobronchial biopsies were collected after BAL and EBUS, as previously described (8). Topical 0.5% lidocaine hydrochloride (Vétoquinol N.-A. Inc., Lavaltrie, QC, Canada) was used to anesthetize bronchial carinae and endobronchial biopsies were harvested using smooth oval forceps (Standard Fenestrated and Smooth, 2.3 m, Olympus Medical Systems, Tokyo, Japan) from

different branching sites as previously reported (8). The biopsies were mainly collected between the second and ninth bronchial bifurcations. Ten biopsies were collected at each time point. Six were fixed for 2-4 h in 10% neutral-buffered formalin and then embedded in paraffin and four were saved to preserve RNA (RNAlater™ Stabilization Solution, Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada). Histologic sections of 4 µm thickness were obtained from several biopsies, stained with Russell-Movat-pentachrome and digitized at 40x magnification with a Leica microscope (DCF320, Leica Microsystems, Cambridge, UK) and the Panoptiq software (ViewsIQ, version 1.4.3, Vancouver, BC, Canada). A quality score was attributed to each biopsy (8) and for each horse at each time point, the highest quality biopsy was used. The thickness of the extracellular matrix (ECM; area between the basal membrane and airway smooth muscle) was measured five times with Image J (version 1.52a, NIH) and averaged on each biopsy.

Peripheral lung biopsies

Peripheral biopsies of the caudo-dorsal region of the lungs were obtained by thoracoscopy by a board-certified surgeon in large animal surgery under standing intravenous sedation, with a bolus of detomidine [0.01 mg/kg] and butorphanol [0.02 mg/kg] being followed by a detomidine (0.08 mg/ml) continuous rate of infusion titrated to effect. Similarly to previously described (9), one portal at the dorsal aspect of the 13th or 14th intercostal space was performed for the thoracoscope and two instrument portals were then added at the 13th and 15th intercostal space (10 cm distally to the thoracoscope portal). Pulmonary wedge biopsies were obtained with an endoscopic stapler (60-mm or 45-mm of operating length and a staple size of 4.8-mm, Endo GIA, Covidien) and were retrieved using an endoscopic specimen bag (AKYQWA-80, Disposable Endo Bags, Changzhou Ankang Medical Instruments Co, Ltd., Changzhou, Jiangsu, China). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (phenylbutazone 200 mg/ml; McCarthy and Sons Service, Calgary, AB, Canada; 4.4 mg/kg IV q24 for 48 hours) were given to all horses and an antimicrobial (penicillin; Intervet Canada Corp., subsidiary of Merck & Co., Inc., Kirkland, QC, Canada; 22 000 IU/kg IM once) was administered to horses not receiving azithromycin directly after biopsy retrieval. Biopsies were fixed in 10% neutral-buffered formalin for 24 hours and then processed as were the endobronchial biopsies. Peripheral bronchi with a diameter <2 mm and a major to minor axis ratio ≤ 1.5 were analyzed using Image J (version 1.52a, NIH). The airway smooth muscle (ASM)

and ECM areas were measured manually by tracing the external borders of each region. The ECM corresponded to the area between the basal membrane (Pmb) and ASM. The Pmb length was traced manually and used for correction attributable to variation of airway size (10).

Blood collection and peripheral polymorphonuclear isolation

Blood was collected in the morning via jugular venipuncture into K₃-EDTA tubes (Covidien, Mansfield, MA, USA). After resting for 40 minutes, plasma was isolated by centrifugation at 900 x *g* for 10 minutes at room temperature and stored at -80°C. For neutrophil isolation, the plasma-rich layer was recovered after 40 minutes of sedimentation and subjected to a density gradient centrifugation with Ficoll-Paque™ Premium 1.084 (GE Healthcare Bio-sciences Corp., Mississauga, Ontario, Canada) from blood drawn in K₃-EDTA tubes. Erythrocytes were removed from the samples by hypotonic lysis with distilled water (Thermo Fisher Scientific). Peripheral polymorphonuclear cells (PMNs) were then washed and suspended in a buffer solution (PBS 1X, EDTA 0.5 mM [Thermo Fisher Scientific], BSA 0.2% [Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA]), followed by assessment of cell concentration and viability with an ADAM automatic Cell Counter (Montreal-Biotech Inc., Montreal, QC, Canada). Cytopreparations were stained with a modified Wright–Giemsa solution (Diff-Quik, Fisher Scientific) and purity was assessed by counting 400 cells. PMNs were then mixed with one millilitre of Trizol (Invitrogen) and stored at -80°C until analysis.

Azithromycin concentration

Azithromycin was extracted from plasma using protein precipitation. Two hundred µl of internal standard solution (100 ng/ml of azithromycin-d3 in acetonitrile) was added to 50 µl of plasma samples. The sample was vortexed for five seconds and rested for 10 minutes, then centrifuged at 12 000 x *g* for 10 minutes. The supernatant was transferred into an injection vial. The chromatography was performed using a gradient mobile phase along with a microbore column Thermo Biobasic Phenyl 50 × 1 mm, with a particle size of 5 µm. The initial mobile phase condition consisted of acetonitrile and water (both fortified with 0.1% of formic acid) at a ratio of 5:95. From 0 to 1 minute, the ratio was maintained at 5:95. From 1 to 5 minutes, a linear gradient was applied up to a ratio of 20:80 and maintained for three minutes. The mobile phase composition

ratio reverted to the initial conditions and the column was allowed to re-equilibrate for seven minutes for a total run time of 15 minutes. The flow rate was fixed at 75 $\mu\text{l}/\text{min}$ and 2 μl of samples were injected. A Thermo Scientific Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometer (San Jose, CA, USA) was interfaced with the Thermo Scientific Vanquish FLEX UHPLC system using a pneumatic assisted heated electrospray ion source. MS detection was performed in positive ion mode and operating in scan mode at high-resolution, and accurate-mass (HRAM). Nitrogen was used for sheath and auxiliary gases and they were set at 10 and 5 arbitrary units. The heated ESI probe was set to 4000 V and the ion transfer tube temperature was set to 300°C. The scan range was set to m/z 500-1000. Data was acquired at a resolving power of 140,000 (FWHM) using automatic gain control target of 3.0×10^6 and maximum ion injection time of 200 msec. Targeted drug quantification was performed at MS1 level using specific precursor masses based on the monoisotopic masses (i.e. $[\text{M}+\text{H}]^+$ ions). Quantification was performed by extracting specific precursor ions using a 5 ppm mass window. Instrument calibration was performed prior to all analysis and mass accuracy was notably below 1 ppm using Thermo Pierce calibration solution and automated instrument protocol. Azithromycin quantification was performed using peak-area ratio of azithromycin and deuterated analog azithromycin-d3 and concentrations were determined by interpolating unknowns from the calibration curve (i.e. 2 to 1,000 ng/ml) constructed with standards prepared in plasma. The observed precision and accuracy were within $\pm 15\%$. Intracellular concentration of azithromycin in PMNs was estimated as previously described (11) at W20.

Transcriptomic analysis by qRT-PCR

For the PMN cells and the BALF pelleted cells, mRNA was extracted from Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. For the endobronchial biopsies (two biopsies per extraction), mRNA was extracted using the RNeasy Plus Mini Kits (Qiagen, Burlington, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. Concentration and purity of total mRNA were assessed by spectrophotometry (Nanodrop ND1000, ThermoScientific, Wilmington, DE, USA) by measuring the 260/280 absorbance ratio. Total mRNA (0.3 μg) was reverse transcribed in duplicate using SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, 200 U), Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Thermo Fisher Scientific; 40 U), one microliter of

oligo(dT) (Thermo Fisher Scientific), one microliter of DTT (Thermo Fisher Scientific; 0.1 M), one microliter of dNTP (Thermo Fisher Scientific; 100 mM) and 5X first-strand buffer (Thermo Fisher Scientific). QuantiTect SYBR Green PCR kits (Qiagen) were used according to the manufacturer's instructions with the Rotor-Gene RG3000 (Corbett Research, Sydney, Australia)(12). Two microliters of cDNA were used in a final volume of 20 μ l with 0.5 μ M of sense and antisense primers (Thermo Fisher Scientific). For quantification of SMMHC and its (+) insert isoform, 2.75 mM $MgCl_2$ was added to the reactions. Samples were run with negative controls (reverse transcription negative and PCR negative controls) and with samples with known quantity of the evaluated gene (standard curves).

References in Supplement

1. Couetil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Leguillette R, Richard EA. Inflammatory Airway Disease of Horses--Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med.* 2016;30(2):503-15.
2. Lavoie JP, Pascoe JR, Kurpershoek CJ. Effect of head and neck position on respiratory mechanics in horses sedated with xylazine. *Am J Vet Res.* 1992;53(9):1652-7.
3. van Erck E, Votion D, Art T, Lekeux P. Measurement of respiratory function by impulse oscillometry in horses. *Equine Vet J.* 2004;36(1):21-8.
4. Van Erck E, Votion D, Art T, Lekeux P. Qualitative and quantitative evaluation of equine respiratory mechanics by impulse oscillometry. *Equine Vet J.* 2006;38(1):52-8.
5. Lavoie JP, Pasloske K, Joubert P, Cordeau ME, Mancini J, Girard Y, et al. Lack of clinical efficacy of a phosphodiesterase-4 inhibitor for treatment of heaves in horses. *J Vet Intern Med.* 2006;20(1):175-81.
6. Koblinger K, Hecker K, Nicol J, Wasko A, Fernandez N, Leguillette R. Bronchial collapse during bronchoalveolar lavage in horses is an indicator of lung inflammation. *Equine Vet J.* 2014;46(1):50-5.
7. Bullone M, Beauchamp G, Godbout M, Martin JG, Lavoie JP. Endobronchial Ultrasound Reliably Quantifies Airway Smooth Muscle Remodeling in an Equine Asthma Model. *PLoS One.* 2015;10(9):e0136284.
8. Bullone M, Chevigny M, Allano M, Martin JG, Lavoie JP. Technical and physiological determinants of airway smooth muscle mass in endobronchial biopsy samples of asthmatic horses. *J Appl Physiol (1985).* 2014;117(7):806-15.
9. Lugo J, Stick JA, Peroni J, Harkema JR, Derksen FJ, Robinson NE. Safety and efficacy of a technique for thoroscopically guided pulmonary wedge resection in horses. *Am J Vet Res.* 2002;63(9):1232-40.
10. James AL, Hogg JC, Dunn LA, Pare PD. The use of the internal perimeter to compare airway size and to calculate smooth muscle shortening. *Am Rev Respir Dis.* 1988;138(1):136-9.

11. Leclere M, Magdesian KG, Cole CA, Szabo NJ, Ruby RE, Rhodes DM, et al. Pharmacokinetics and preliminary safety evaluation of azithromycin in adult horses. *J Vet Pharmacol Ther.* 2012;35(6):541-9.
12. Lavoie-Lamoureux A, Moran K, Beauchamp G, Mauel S, Steinbach F, Lefebvre-Lavoie J, 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):L472-82.

Tables and figures in Supplement

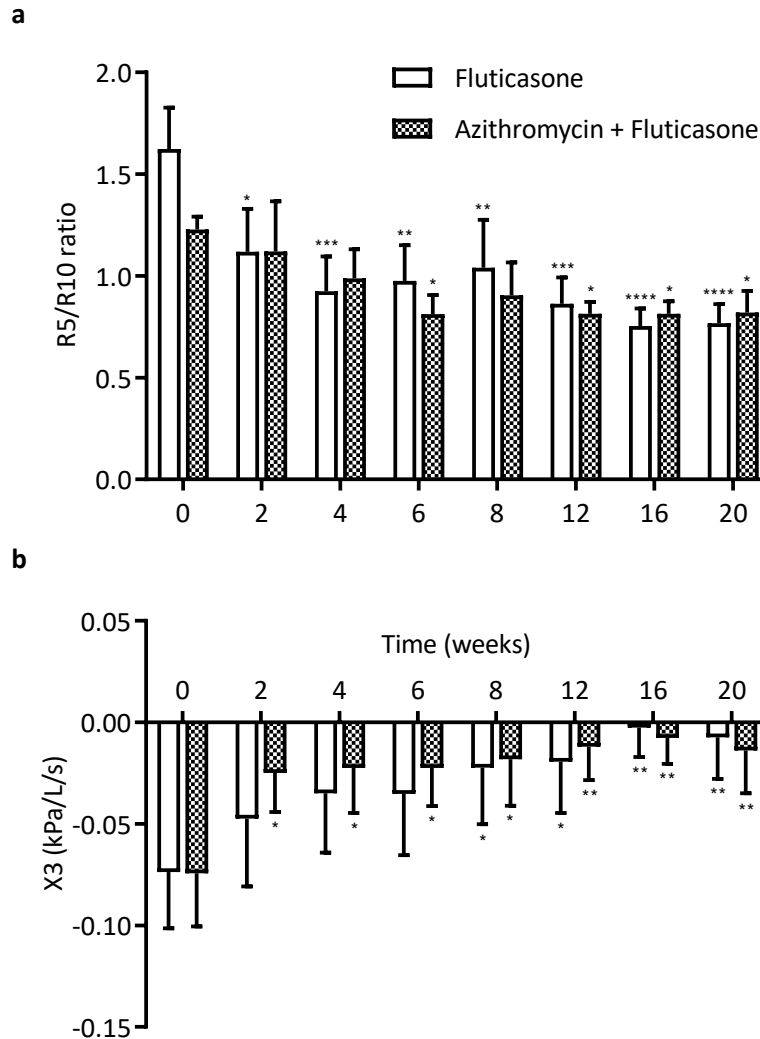
Supplementary table 1. Percentage of bronchoalveolar lavage fluid recovered and total cell counts.

Supplementary table 1 – Percentage of bronchoalveolar lavage fluid recovered and total cell counts (mean \pm standard error of the mean)

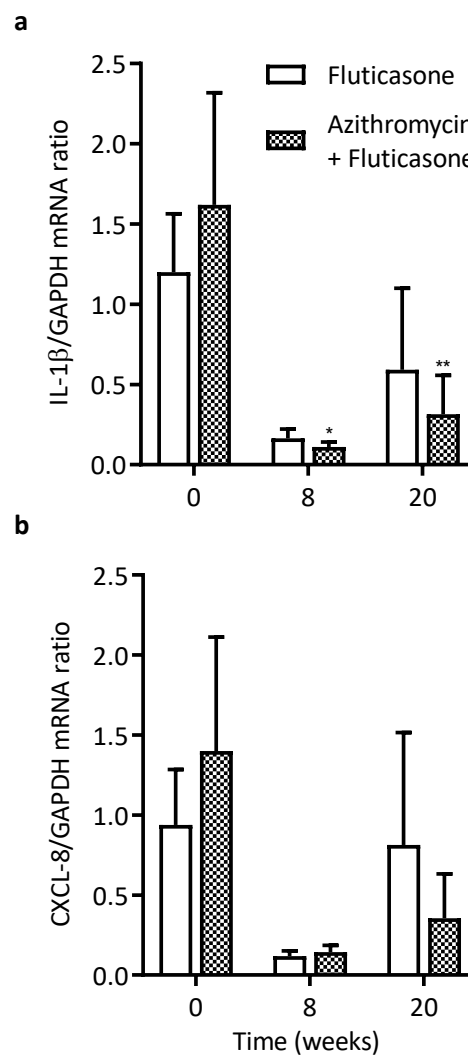
| Time (weeks) | Bronchoalveolar lavage fluid recovered (%) | | Total cell counts (*10 ⁶) | |
|-----------------|--|----------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| | Fluticasone | Fluticasone + azithromycin | Fluticasone | Fluticasone + azithromycin |
| Baseline | 36.9 \pm 2.4 | 43.9 \pm 6.8 | 72.9 \pm 19.8 | 200.7 \pm 120.0 |
| 2 | 55.8 \pm 4.9* | 51.2 \pm 7.4 | 252.8 \pm 60.1 | 91.2 \pm 18.1 |
| 4 | 44.4 \pm 4.7 | 56.3 \pm 4.0 | 97.5 \pm 16.8 | 181.6 \pm 44.1 |
| 6 | 57.0 \pm 3.0* | 68.8 \pm 4.7*** | 345.4 \pm 77.0** | 155.3 \pm 39.9 |
| 8 | 51.3 \pm 3.7 | 56.5 \pm 5.9 | 147.3 \pm 16.8 | 154.7 \pm 47.5 |
| 12 | 61.8 \pm 3.8** | 59.3 \pm 3.8 | 222.8 \pm 74.5 | 203.7 \pm 47.8 |
| 16 | 58.6 \pm 5.9** | 50.1 \pm 8.4 | 209.4 \pm 46.8 | 83.7 \pm 29.9 |
| 20 | 53.8 \pm 10.3 | 56.4 \pm 5.8 | 167.1 \pm 34.1 | 150.1 \pm 40.0 |

* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 compared to baseline values with Dunnett's multiple comparison tests.

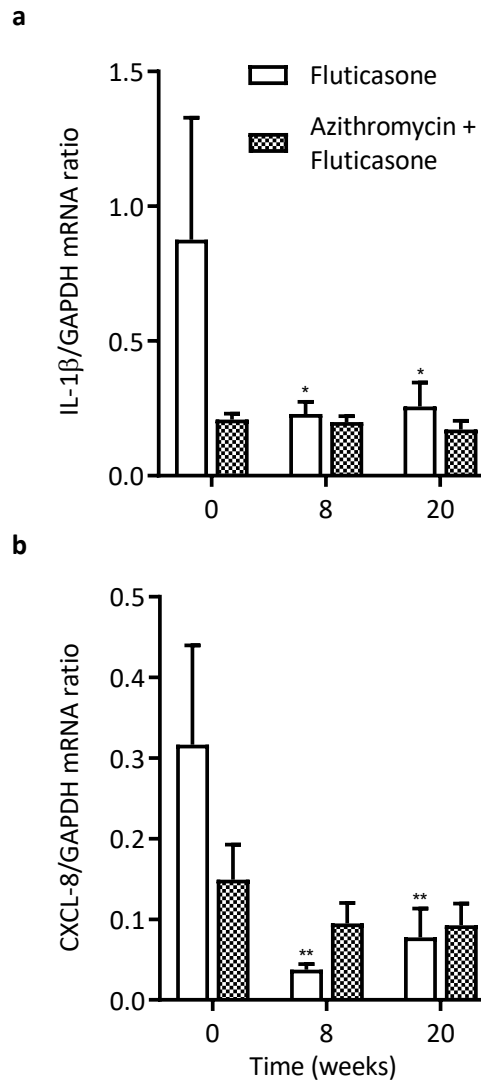
Supplementary figure 1. Lung function measured by impulse oscillometry. a) Ratio of the resistance at 5 Hz and 10 Hz (R5/R10). b) Reactance at 3 Hz (X3) (mean and standard error of the mean). There was a significant time main effect but no group difference with the two-way ANOVA for R5/R10 and X3 values ($p < 0.0001$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared to baseline values with Dunnett's multiple comparison tests.



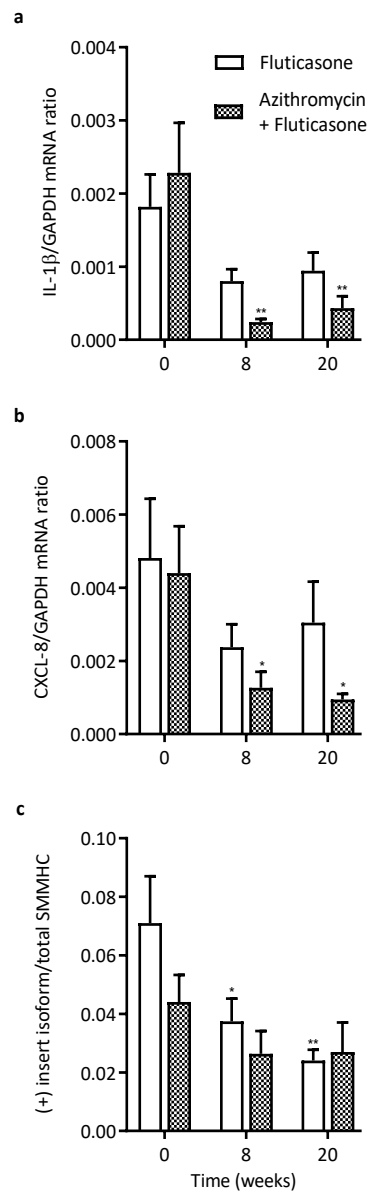
Supplementary figure 2. Gene expression in bronchoalveolar lavage fluid cells. mRNA expression of interleukin-1 β (a) and CXCL-8 (b) (mean and standard error of the mean). A mixed-effects multivariate analysis was used because of a missing datum from one horse at W8. There was a significant time main effect but no group difference for interleukin-1 β values ($p = 0.003$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to baseline values with Dunnett's multiple comparison tests. GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.



Supplementary figure 3. Gene expression in peripheral polymorphonuclear cells. mRNA expression of interleukin-1 β (a) and CXCL-8 (b) (mean and standard error of the mean). There was a significant time main effect but no group difference with the two-way ANOVA for CXCL-8 values ($p = 0.006$) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to baseline values with Dunnett's multiple comparison tests. GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.



Supplementary figure 4. Gene expression in endobronchial biopsies. mRNA expression of interleukin-1 β (a), CXCL-8 (b) and of the SMMHC (smooth muscle myosin heavy chain) (+) insert isoform to total myosin ratio (c) (mean and standard error of the mean). There was a significant time main effect but not group difference with the two-way ANOVA for interleukin-1 β ($p = 0.001$), CXCL-8 ($p = 0.01$) and SMMHC ratio ($p = 0.002$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to baseline values with Dunnett's multiple comparison tests. GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.



Article 5 - Neutrophil extracellular vesicles and airway smooth muscle proliferation in the natural model of severe asthma in horses

Sommaire

Dans cette étude, les caractéristiques et l'effet prolifératif des vésicules extracellulaires (VEs) neutrophiliques sur le muscle lisse bronchique ont été comparés entre les phases de rémission et d'exacerbation de l'asthme équin sévère. Deux protéines contenues dans les VEs se sont avérées surrégulées lors de l'exacerbation asthmatique (MAST4 et Lrch4). Les VEs provenant de neutrophiles non stimulés n'ont pas modifié la prolifération du muscle lisse bronchique, même lorsqu'ils ont été prélevés lors de la phase d'exacerbation de la maladie. Comparativement, la stimulation des neutrophiles au LPS a différenciellement régulé 210 protéines au sein des VEs, et leur a conféré un effet pro-prolifératif sur les cellules musculaires lisses.

Contribution

J'ai participé à la préparation des demandes de déontologie (90%), aux procédures expérimentales (fonction pulmonaire, endoscopies respiratoires, lavages bronchoalvéolaires, biopsies endobronchiques, prise de sang; 80%), à l'isolation des neutrophiles périphériques (80%) et des VEs (100%), à la culture du MLB (90%), aux analyses de prolifération cellulaire (100%) et statistiques (80%) et à la rédaction du manuscrit (90%). La microscopie à diffusion laser a été effectuée par Claudia Duquette (laboratoire du Dr Fernandez-Prada) et la protéomique par la Plateforme de Protéomique du CHU de Québec.

Article publié

Cells. 2022. Reproduced without content modification with permission from MDPI (open access, Creative Commons Attribution 4.0 International). Copyright © 2022 MDPI.

<https://doi.org/10.3390/cells11213347>

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Neutrophil extracellular vesicles and airway smooth muscle proliferation in the natural model of severe asthma in horses

Sophie Mainguy-Seers¹, Francis Beaudry², Christopher Fernandez-Prada³, James G. Martin⁴ and Jean-Pierre Lavoie^{1,*}

¹ Université de Montréal, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Clinical Sciences, St-Hyacinthe, J2S 2M2, Canada; sophie.mainguy-seers@umontreal.ca

² Université de Montréal, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Biomedical Sciences, St-Hyacinthe, J2S 2M2, Canada; francis.beaudry@umontreal.ca

³ Université de Montréal, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology and Microbiology, St-Hyacinthe, J2S 2M2, Canada; christopher.fernandez.prada@umontreal.ca

⁴ Meakins Christie Laboratories, Research Institute of the McGill University Health Centre, Montréal, H4A 3J1, Canada; james.martin@mcgill.ca

* Correspondence: jean-pierre.lavoie@umontreal.ca.

Abstract

Extracellular vesicles (EVs) contribute to intercellular communication through the transfer of their rich cargo to recipient cells. The EVs produced by LPS-stimulated neutrophils from healthy humans and horses increase airway smooth muscle (ASM) proliferation, but the roles of neutrophil EVs in asthma are largely unexplored. The aim of this study was to determine whether neutrophil-derived EVs isolated during remission or exacerbation of asthma influence ASM proliferation differentially. Peripheral blood neutrophils were collected during remission and exacerbation in eight horses affected by severe asthma. The cells were cultured (\pm LPS) and their EVs were isolated by ultracentrifugation and characterized by laser scattering microscopy and proteomic analysis. The proliferation of ASM co-incubated with EVs was monitored in real time by electrical impedance. Two proteins were significantly upregulated during disease exacerbation in neutrophil EVs (MAST4 and Lrch4), while LPS stimulation greatly altered the proteomic profile. Those changes involved the upregulation of neutrophil degranulation products, including proteases known to induce myocyte proliferation. In agreement with the proteomic results, EVs from LPS-stimulated neutrophils increased ASM proliferation, without an effect of the disease status. Inhalation of environmental LPS could contribute to asthma pathogenesis by activating neutrophils and leading to ASM hyperplasia.

Introduction

Asthma is a chronic and often debilitating respiratory disease affecting approximately 300 million people over the globe and causing over 400 000 deaths annually (1). Although often characterized as an eosinophilic and allergic condition, a substantial subset of patients with asthma, especially in its severe form, presents with airway neutrophilia (2, 3). Neutrophilic inflammation has been associated with several negative outcomes, including fatal episodes (4) and fixed airflow obstruction (5). The latter is believed to be a consequence of chronic bronchial remodeling, particularly of the increased mass of airway smooth muscle (ASM) which contributes to both fixed and dynamic obstruction through bronchospasm. Severe equine asthma is an incurable respiratory disease occurring in genetically predisposed horses and in which periods of clinical remission and exacerbation alternate in response to the degree of environmental antigenic exposure. The disease is characterized by expiratory airflow obstruction, airway neutrophilic inflammation, and bronchial remodeling, including an increase in the ASM mass (6). Similar to asthma in humans, pulmonary neutrophilia is associated with the degree of airway obstruction and a poor response to corticosteroid therapy in horses with severe asthma (7). Although equine asthma does not reproduce all the pathophysiological events occurring in humans, it is the only spontaneously occurring animal disease that shares many features with the severe neutrophilic form of asthma in human. The large size of horses is particularly amenable to the collection of bronchial biopsies and of the quantities of blood that allow the isolation of peripheral neutrophils; therefore, the equine model was used in this study with the aim to obtain results that could benefit both equine and human health.

The mechanisms responsible for the association of neutrophilic inflammation with the severity of human and equine asthma remain unclear. Neutrophilic proteases, such as elastase (8) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) (9), could contribute to the increase in ASM mass through their mitogenic effects. However, neutrophils are only rarely observed within the ASM (10), suggesting that a direct topical effect of neutrophil products is unlikely. Nevertheless, neutrophils could contribute to ASM remodeling through the release of extracellular vesicles (EVs). These nanoscale particles are produced by virtually all cell types and play significant roles in coagulation, intercellular communication and metabolic activity (11). EVs can influence local and distant

recipient cells that internalize their contents, which include, but are not limited to, nucleic acids, proteins, and lipids (11). Importantly, EVs from lipopolysaccharide (LPS)-stimulated neutrophils from healthy humans and horses have been shown to be internalized by and to increase ASM proliferation (12, 13).

This study aimed to determine whether the asthmatic disease status (clinical remission or exacerbation) alters the proteomic content and the biological effects of neutrophil EVs in asthma, using the natural model of severe asthma in horses. We hypothesized that EVs from neutrophils isolated during exacerbation would reflect the activated state of the parent cells, resulting in an enhanced proliferative effect on ASM (primary outcome). As endotoxins contribute to the development of airway neutrophilia and respiratory dysfunction in asthmatic humans (14, 15) and horses (16, 17) and are omnipresent in houses (18) and in barns (19), we also investigated whether treatment of neutrophils with LPS would enhance the biological effects and the protein content of neutrophil EVs in asthma.

Materials and Methods

Study protocol

All experimental procedures were performed in accordance with the Canadian Council for Animal Care guidelines and were approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal on February 10, 2021 (Protocol # 21-Rech-2108). This manuscript follows the recommendations of the ARRIVE guidelines.

This experimental study was performed with eight horses with well-characterized severe asthma and donated to a research herd. Remission or exacerbation of the disease was obtained by dietary and environmental management. Horses were first assessed when no clinical signs of asthma were present, while living in conditions known to maintain clinical remission (fed haylage and living outside (six horses) or fed oiled mixed hay (20) and living in the barn (two horses)). Exacerbation of the disease was induced by a natural antigenic exposure (by stabling and dry hay feeding, with daily access to turnout). The horses were evaluated after four to eight weeks of

stabling when respiratory distress was present at rest. At the end of the study, the horses were kept within the research herd and clinical remission was re-acquired by dietary and environmental modifications.

Pulmonary function test

The Equine MasterScreen impulse oscillometry system (Jaeger GmbH, Würzburg, Germany) was used to measure lung function in unsedated horses with the head positioned physiologically, as previously reported (21). Briefly, impulses produced by a loudspeaker were superimposed on the tidal breathing of the horse through an airtight mask. Simultaneously, a pneumotachograph connected to a pressure transducer and placed in front of the mask acquired the pressure-flow signal response of the respiratory system. Calibration of the device was performed on each test day, followed by a verification of the accuracy with a resistive test load. After data acquisition with LabManager (version 4.53, Jaeger, Würzburg, Germany), analysis was completed with Fast-Fourier transform with the FAMOS software (IMC, Meßsysteme, Berlin, Germany). The results of three 30 s recordings were averaged for analyses. Impulse oscillometry measures impedance which represents the forces opposing the sound wave imposed to the respiratory system and is composed of two parameters: pulmonary resistance and reactance. Resistance represents the resistive force opposing the airflow (mostly attributable to the central airways), while reactance is influenced by the elastic and inertance properties of the lung (22). Higher and lower frequency impulses represent changes occurring in upper/central and peripheral airways, respectively (23). Whole breath resistance and reactance from 2 to 7 Hertz were analyzed.

Endoscopy and collection of respiratory samples

Endoscopy was performed in sedated horses [detomidine (0.01 mg/kg, IV) or xylazine (0.3 mg/kg, IV), and butorphanol (0.02 mg/kg, IV)] with a 1.6 m video-endoscope (12.8 mm external diameter; Evis Exera II CV-180, Olympus Canada, Richmond Hill, ON, Canada). The bronchoalveolar lavages (BAL) were performed as previously described (24), with additional details in the online Supplement. Endobronchial biopsies (7-10) were collected with smooth oval forceps (Standard Fenestrated and Smooth, 2.3 m, Olympus Medical Systems, Tokyo, Japan) after topical anesthesia (0.5% lidocaine hydrochloride) (25) during the remission sampling.

Neutrophil isolation

Blood was drawn (160 mL) via jugular venipuncture into K₃-EDTA tubes. After a 40 min sedimentation, the plasma-rich layer was recovered and a density gradient centrifugation with Ficoll-Paque™ Premium 1.084 (GE Healthcare Bio-sciences Corp., Mississauga, Ontario, Canada) was applied. Erythrocytes were lysed with distilled water and the polymorphonuclear neutrophils were washed and suspended in a buffer solution (PBS 1X, EDTA 0.5 mM, BSA 0.2%). Cell concentration and viability were evaluated with the ADAM automatic Cell Counter (Montreal-Biotech Inc., Montreal, QC, Canada). Cytologic smears were stained with a modified Wright–Giemsa solution (Diff-Quik, Fisher Scientific) and purity was determined by counting 400 cells. Neutrophils were resuspended at 5×10^6 cells/mL in culture medium (RPMI 1640 + L-glutamine supplemented with 10% low-endotoxin heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste, QC) depleted of EVs by overnight ultracentrifugation, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (all products from GIBCO, Life Technologies, Burlington, Canada), and cultured in 6-well plates (non-treated plastic). Neutrophils were cultured with or without LPS (from *Escherichia coli* O:111B4; 100 ng/mL, Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) for 18 h in a humidified incubator (37°C, 5% CO₂) to obtain vesicles produced spontaneously, and from stimulated neutrophils. The supernatant from the neutrophil culture was centrifuged at 300x *g* for 10 min to remove cells, then at 2000x *g* for 10 min to remove dead cells and then were kept at –80°C until the next steps of EVs isolation.

Neutrophil-derived extracellular vesicles isolation and characterization

Extracellular vesicles isolation

Culture supernatant was thawed and centrifuged at 10,000x *g* for 30 min to remove cell debris. Then, the supernatant was filtered through a 0.22 µm polyvinylidene fluoride membrane and the EVs were pelleted by ultracentrifugation at 100,000x *g* for 60 min (Type 70Ti S/N O9U T301 fixed angle rotor in an Optima L-100 XP Beckman Coulter ultracentrifuge). The EVs pellet was resuspended in 15 mL of PBS and ultracentrifuged at 100,000x *g* for 60 min a second time to remove potential protein contaminants. The pellet containing EVs was resuspended in PBS (≈500 µL; divided into aliquots and stored at -80 °C) for functional assay and proteomic analysis.

Nanoparticle Tracking Analysis

The EVs size and quantification were performed by laser scattering microscopy with the ZetaView PMX 120 device (Particle Metrix, Meerbusch, Germany) and software (version 8.05.11 SP4) as described by the manufacturer (details in the Supplement).

Proteomics of neutrophil extracellular vesicles

Protein content of neutrophil EVs was analyzed in six horses that had adequate material in all four conditions. Protein digestion and mass spectrometry experiments were performed by the Proteomics platform of the CHU de Québec Research Center, Québec, Canada. For protein identification, mass spectra were searched against the Uniprot *Equus caballus* database (UniProt Reference Proteome – Proteome ID UP000002281– 44484 entries – 2021.05) using the search engine Andromeda integrated into the MaxQuant software (version 2.0.2.0). Detailed proteomic methodology and statistical analysis are provided in the online Supplement.

Airway smooth muscle isolation and characterization

Cell culture

The endobronchial biopsies collected from each horse were kept in transport media at 4 °C until processing within 60 min. Enzymatic digestion was performed as previously described (26). The ASM cells were passaged at a 1:3 ratio with trypsin when they reached ≈80% confluence (every ≈7 days, as expected for these cells (26)). Cells displayed the typical hill-and-valley appearance and spindle morphology of ASM cells (26), except for one horse in which multiples areas of vacuolized cells and poor cell membrane definition were observed; this sample was discarded. For this subject, co-culture with EVs was performed with ASM from another asthmatic horse. At passage (P) 2, cells were collected and slowly frozen using a commercial freezing container (ThermoFischer Scientific) for 48 h, and then kept in liquid nitrogen until used. Detailed culture conditions are provided in the online Supplement.

Flow cytometry

The purity of each ASM cell culture at the end of P4 was assessed by flow cytometry using specific contractile proteins (anti-smooth muscle α -actin (α -SMA) and anti-desmin) as previously described (details in online Supplement) (26).

Airway smooth muscle cells real-time proliferation assay

Cells at P5 were used for proliferation assay in the Xcelligence device, as previously described with minor modifications (12). The background impedance in each well was measured using 40 μ L of complete medium. Then, 14,000 ASM cells were seeded in 100 μ L of complete medium in each well and left to equilibrate at room temperature for 30 min before data recording. ASM cells were grown at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ for 20 h and monitored for impedance to assess baseline cell proliferation. Autologous extracellular vesicles from each condition (vesicles from neutrophils collected in remission or exacerbation, treated or not with LPS) were resuspended in 60 μ L of culture media (4000 EVs/ASM cell) and added after the first 20 h of culture, when proliferation was no longer exponential (plateau-phase cells), as previously described (12). Three types of control were used: negative (no cells, only culture medium), control with untreated ASM cells (cells with culture medium), and ASM cells incubated with supernatant from the last ultracentrifugation step of EVs isolation (to determine if residual LPS, if present, could influence ASM proliferation). In each condition, the same amount of culture medium and FBS was added to ensure comparable conditions. Each condition was performed in triplicate. The impedance value of each well was monitored every 15 min for a total duration of 50 h. Data were analyzed using the Xcelligence software (version 1.2.1) and expressed as the impedance normalized to the last cell index recorded before the time of EV addition (mean of the triplicates). The rate of cell growth was determined by calculating the slope of the line between the time point 20 h (just before addition of EVs) and until 50 h. Data are shown starting at 15 h after addition of EVs, when electrical impedance stabilized among the triplicates.

Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism version 9.3.1 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Normality was assessed with the Shapiro-Wilk test. Data are shown with the

mean and standard error of the mean when normally distributed, and with the median and 25th and 75th percentile when not. BAL fluid percentages were compared with paired T-tests, or Wilcoxon tests, as appropriate. Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison tests were used for the rest of the data (with the disease status and the cell treatment with or without LPS as independent variables for most analyses, and with the disease status and the impulse frequency as independent variables for lung function evaluation).

Results

Characterization of the clinical status of horses with severe asthma

Eight horses with well-characterized severe asthma were studied (aged 16.9 ± 2.0 years, mixed breeds, five mares and three geldings). The horses were first evaluated during disease remission, when no clinical signs of asthma were present, and after several weeks of antigenic exposure when respiratory efforts were visible at rest indicating the development of an exacerbation. As expected, the whole-breath resistance was significantly increased ($p < 0.0001$) during clinical exacerbation, particularly at low impulse frequencies, demonstrating peripheral airway obstruction (effect of the impulse frequency $p = 0.02$, interaction between impulse frequency and disease status $p < 0.0001$; Figure 1a). Similarly, the whole-breath reactance was significantly decreased ($p < 0.0001$), mainly at lower impulse frequencies ($p = 0.03$) after the antigenic exposure (Figure 1b).

The clinical status was also confirmed by cytology of bronchoalveolar lavage fluid, as horses with severe asthma are expected to develop substantial airway neutrophilia during exacerbation. The natural antigenic exposure with hay increased airway neutrophilia in all horses ($p = 0.008$), with a concomitant decrease in the percentages of lymphocytes ($p = 0.014$) and macrophages ($p = 0.003$; Figure 2). Percentages of mast cells and eosinophils were low and did not vary with the clinical status (data not shown; the complete datasets are provided in the UdeM Dataverse repository).

Neutrophil-derived extracellular vesicles

Peripheral blood neutrophils isolation

Once the clinical status had been characterized, blood neutrophils were isolated from each horse during disease remission and exacerbation by density gradient centrifugation. The mean neutrophil count per isolation was 332 (\pm 33) million. The neutrophil purity was 98.7% (\pm 0.2) in remission and 99.1% (\pm 0.2) in exacerbation (p -NS). The median viability was 98% (97-99) and 98.5% (97-99) in remission and exacerbation, respectively (p -NS). These results were considered adequate to pursue the isolation of neutrophil EVs.

Nanoparticle Tracking Analysis

After isolation of neutrophil-derived EVs by ultracentrifugation and filtration of the culture supernatant, the EVs were characterized by laser scattering microscopy. The mean size of EVs collected from neutrophils (\approx 200 nm) was similar to previous reports (27). There was an interaction between the disease status and the treatment of neutrophils with LPS (p = 0.04) as EVs produced by LPS-treated neutrophils were smaller, but only significantly during disease exacerbation (Figure 3a). There were more EVs produced when neutrophils were stimulated with LPS (p = 0.0002), without an effect of the disease status (Figure 3b).

Proteomic analysis of neutrophil extracellular vesicles

The protein content of the EVs was studied in six horses in which sufficient material was available in all four conditions (neutrophils isolated during remission or exacerbation, treated or not with LPS). Mass spectrometry analysis allowed the identification of 1403 proteins across all conditions. The differential regulation of proteins was compared between the disease status, and between the untreated and LPS-stimulated cells. Two proteins were regulated by the disease status; leucine-rich repeats and calponin homology domain-containing 4 (Lrch4) and microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 4 (MAST4) were upregulated during asthma exacerbation.

The stimulation of neutrophils with LPS resulted in the downregulation of 38 proteins and the upregulation of 172 proteins (Supplementary tables S1 and S2). There were 25 proteins in which

the LPS stimulation caused an upregulation solely during disease exacerbation (Supplementary table S3). Gene ontology analysis using Metascape allowed the determination of the biological processes altered by LPS (downregulation by LPS (Figure 4a), upregulation by LPS (Figure 5a), upregulation by LPS during disease exacerbation only (Figure 6a) and Supplementary table S4 which shows proteins involved in each biological process). These included the regulation of neutrophil degranulation products, the regulation of cell growth and activation, and the regulation of vesicle-mediated transport. The protein–protein interaction networks of the biological processes altered by LPS were visualized with the ClueGo and Cluepedia plugins in the Cytoscape software (downregulation by LPS (Figure 4b), upregulation by LPS (Figure 5b), upregulation by LPS during disease exacerbation only (Figure 6b)). Analysis performed with the Reactome database are provided in the supplement (Supplementary Figure S1-3).

Proliferative effects of extracellular vesicles on airway smooth muscle cells

ASM characterization

The percentages of positive cells for α -SMA and desmin were respectively 99.7% (98.4-99.9) and 78.4% \pm 4.9, confirming the selective culture of ASM cells isolated from the asthmatic horses (Supplementary Figure S4) (26).

ASM proliferation

The proliferative effects of neutrophil EVs on ASM cells were studied in real time by electrical impedance. The number of remaining EVs was insufficient to perform the co-culture in one horse, therefore, seven subjects were used for this experiment. In each well, ASM cells were co-incubated with a fixed quantity of EVs (4000 EVs/cell) to ensure comparable conditions. The EVs produced by LPS-treated neutrophils significantly increased ASM proliferation ($p = 0.0001$) starting 20 h after co-incubation and lasting until the end of the experiment at 30 h, while co-incubation with EVs from untreated neutrophils did not influence proliferation compared to control wells (Figure 7). The proliferation of ASM cells incubated with the remaining supernatant from the last ultracentrifugation step of EVs isolation (to assess if residual LPS could alter the results) was not different from that of the control wells, indicating that remaining LPS, if there was any, was not responsible for the proliferative effects in EVs-treated ASM cells. The clinical

status of the horses during neutrophil isolation (remission or exacerbation of asthma) did not influence the proliferation of ASM.

Discussion

Neutrophilic inflammation is associated with asthma severity and mortality, yet the mechanisms underlying these negative outcomes are poorly understood. Extracellular vesicles are increasingly recognized as key mechanistic players in disease pathophysiology, including asthma (28). The neutrophil activator LPS (29) greatly influenced the EV proteomic content in the current study, which was manifested by their pro-proliferative effect on ASM cells, as previously described (12). However, the disease status (remission or exacerbation of severe equine asthma) did not influence the proliferative effect of neutrophil EVs, refuting the initial hypothesis.

This latter finding was unexpected as the degree of neutrophil activation is enhanced in humans (30) and horses (31) affected by asthma. Indeed, peripheral blood neutrophils from asthmatic patients produce more reactive oxygen species compared to healthy individuals, and more so when asthma is uncontrolled (32, 33). Additionally, the activation markers CD11b and CD35 are increased in peripheral blood neutrophils from patients with corticosteroid-resistant severe asthma compared to those affected by a milder form and to healthy individuals (34). Similarly, neutrophils from horses with asthma have increased respiratory burst activity after an antigenic challenge (35). However, only two proteins in neutrophil EVs, Lrch4 and MAST4, were significantly upregulated during clinical exacerbation in the current study. Leucine-rich repeats and calponin homology domain-containing 4 (Lrch4) is a regulatory protein involved in toll-like receptors (TLR) signalling, including the classical LPS receptor TLR4, and it is involved in the production of cytokines (TNF- α and granulocyte-colony-stimulating factor) in response to LPS (36). Importantly, pulmonary knockdown of Lrch4 in mice reduces neutrophilic infiltration in response to LPS exposure and it was recently proposed as a therapeutic target in inflammatory disease (36). This finding merits attention in future studies as TLR4 gene expression and LPS levels are increased in sputum of neutrophilic asthmatics (37). The other protein upregulated during asthma exacerbation was the estrogen-responsive protein microtubule-associated serine/threonine

kinase family member 4 (MAST4). Although it has mainly been associated with central nervous system diseases and tumors, MAST4 is also related to asthma pathogenesis. In patients with mild asthma, its gene expression increases in sputum after an aerosol allergen bronchoprovocation (38) and computational analysis revealed that MAST4 methylation is involved in the regulation of ASM response to interleukins (39). Curiously, its gene expression is also upregulated in bronchoalveolar lavage fluid cells from horses with mastocytic, but not with neutrophilic airway inflammation (40). As horses in this latter study were free of respiratory signs, the results are not directly comparable to the current report.

In addition to studying spontaneously produced EVs, stimulation of neutrophils with LPS was performed as its level is correlated with airway neutrophilia in asthmatic children (41) and adults (37), and is inversely correlated with lung function (37). Similarly, the airway obstruction is exacerbated by inhalation of LPS in severe equine asthma (17). The increased production of EVs and the alteration of the proteomic signature by LPS, including an upregulation of degranulation products and of pro-inflammatory cytokine release, underline the expected activation of neutrophils by this stimulus. Results of this study are in agreement with, and extend, the previous report that EVs from LPS-treated neutrophils have a pro-proliferative effect by providing several potential mechanistic explanations. Multiple neutrophil biological processes upregulated by LPS involved the granular content (including elastase, cathepsin G, MMP-9 and lipocalin-2). The proteinase elastase is of particular interest as it is correlated with the degree of airway obstruction and neutrophilia in asthmatic humans (42) and horses (35). Importantly, elastase is mitogenic for ASM cells through the activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway (8). The tertiary granule protein MMP-9 also increases the proliferation of ASM (9) and is found in higher concentrations in the sputum of uncontrolled asthmatics (43). Similarly, its protein concentration is higher in the lungs of horses with SEA (44), and is further elevated after inhalation of LPS, and more so in asthmatic horses (45). The gelatinase-bound protein lipocalin-2 (NGAL) is associated with the degree of respiratory obstruction in asthma (46), and can induce ASM cell proliferation (47). Lipocalin-2 is also elevated in respiratory secretions of horses with severe asthma (44), and is further increased in lung tissue after an antigenic exposure (48). Other biological processes stimulated by LPS that could have contributed to ASM proliferation include

the regulation of reactive oxygen species metabolic process (through the protein 5-lipoxygenase (49)) and the regulation of the tumor-necrosis-factor superfamily (50). Proteins regulated by LPS and previously shown to be implicated in asthma and in ASM proliferation also include the upregulation of matrix-metalloproteinase-1 (MMP-1) (51) and Abelson interactor 1 (Abi1) (52), and the downregulation of insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP-2) (53). In the current investigation, the proteomic content of neutrophil EVs was explored to identify potential biological processes involved in ASM proliferation; future mechanistic studies should aim to confirm which neutrophil proteins are responsible for this effect by using specific inhibitors, but the remaining amount of EVs were insufficient to pursue such functional assays in the current study.

As peripheral blood neutrophils in asthma are increasingly activated, we postulated that LPS stimulation would enhance the difference in the proteomic content and the biological effects of EVs between the remission and exacerbation status. However, the clinical exacerbation had a marginal effect on neutrophil-derived EVs, limited to an interaction with LPS on their size and the expression of some proteins, without an impact on ASM proliferation. Indeed, LPS stimulation decreased the size of EVs, but only significantly so when horses were in exacerbation of the disease. This could be explained by a diminution of the proportion of apoptotic bodies, the largest form of EVs, as both LPS (54, 55) and an antigenic challenge in asthmatic horses (35) reduce neutrophil apoptosis. The fact that some proteins were upregulated by LPS only during disease exacerbation suggests that peripheral neutrophils might have been primed by the antigenic exposure, and several of these proteins were previously associated with asthma pathogenesis (including ADAM metalloproteinase domain 17 (56), formin-like protein 1 (57) and myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS)). The latter is a key protein in the regulation of mucus secretion by epithelial cells and in the degranulation and the migration of neutrophils (58). Interestingly, the biological process of endocytosis emerged in the proteins upregulated by LPS only during exacerbation, with the protein-protein network pointing to the involvement of vesicle-mediated transport. Although this was not reflected by an increased proliferation of ASM cells, it could have other biological effects not examined in the current study. Indeed, proteins included in the biological process endocytosis are implicated in neutrophil chemotaxis (DOCK2

(59), LYN (60)) and myelopoiesis (GRB2) (61), which might contribute to the perpetuation of pulmonary inflammation by neutrophil EVs.

One limitation of this study is the lack of control horses, precluding the evaluation of the effect of the disease itself on the EV content and activity, although the objective of the current study was to evaluate the impact of the allergenic challenge on neutrophil vesicles in asthmatic subjects. The regulation of proteins by LPS in asthmatic horses differed somewhat from previous results obtained in healthy animals (12). While lactotransferrin was upregulated in both studies, some proteins were upregulated by LPS in diseased horses, but downregulated in healthy ones (lipocalin-2, complement C3 and integrin- β 2) and vice versa (annexin A7, fibrinogen A- α chain). The disease status and methodological differences in the proteomic technology could have contributed to those results. Another limitation relates to the lack of standardization in the literature concerning the quantity of EVs optimal to perform functional assays, and the number of neutrophil EVs likely to reach ASM cells through the systemic circulation or from local neutrophils is unknown. However, as neutrophils are the most abundant leukocytes in circulation and are markedly increased in the lung of neutrophilic asthmatics, their EVs could have substantial biological effects. Whether circulating neutrophil EVs are increased in asthmatics, as other types of microvesicles are (62), remains to be determined. This study focused on the mitogenic effects of EVs due to the importance of ASM hyperplasia in asthma (63), but their impacts on other ASM biological functions, such as migration and contraction, require further investigations. Whether other EV components contributed to the ASM proliferation (such as microRNA and mRNA) would also merit attention. Finally, studying airway neutrophils would have been of interest as they might behave differently than circulating cells. Indeed, the biological functions of neutrophils might change during endothelial transmigration (64), which could consequently alter the content of their extracellular vesicles. However, predicting the changes occurring in EVs from airway neutrophils in asthma would be hazardous as there are contradictory reports of increased (65) or decreased (66) activation of sputum neutrophils compared to polymorphonuclear cells in human asthmatics. Furthermore, it is not currently possible to isolate airway neutrophils with sufficient purity in horses (67), and while studying the biological functions

of EVs in BAL fluid is a promising area of research, it would not permit the uncovering of the specific roles of EVs derived from neutrophils.

In conclusion, LPS-stimulated neutrophils release EVs with a pro-proliferative effect on ASM cells in horses with severe asthma, but an antigenic exposure did not enhance their biological activity. The absence of an accentuated proliferative effect of the vesicles during exacerbation of the disease in the equine species does not exclude that such a phenomenon could occur in humans in which the triggers of an asthma crisis are more numerous and heterogeneous. As many more neutrophils reside in the airways of human and equine asthmatics in the neutrophilic phenotype, these cells could still contribute to ASM hyperplasia by the production of bioactive EVs when exposed to LPS, a contaminant widely retrieved in the environment. The diagnostic potential of Lrch4 and MAST4 as biomarkers and the involvement of these proteins in asthma pathophysiology require further investigation.

Author Contributions: Conceptualization, S.M-S, J.G.M. and J-P.L.; methodology, S.M-S, F.B., C.F.P., J.G.M. and J-P.L; formal analysis, S.M-S, F.B., J.G.M. and J-P.L.; investigation, S.M-S., F.B. and C.F.P.; resources, J-P.L.; writing—original draft preparation, S.M-S.; writing—review and editing, S.M-S, F.B., C.F.P., J.G.M. and J-P.L.; funding acquisition, J-P.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Canadian Institutes of Health Research, grant #PJT-148807). This work was made possible by a doctoral grant from the Fonds de Recherche du Quebec en Santé, grant # 272483. The APC was waived for this special edition.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal (Protocol # 21-Rech-2108, February 10, 2021).

Data Availability Statement: The datasets generated in the current study are available in the UdeM Dataverse repository, [<https://doi.org/10.5683/SP3/UEWRWP>].

Acknowledgments: We would like to thank Claudia Duquette, Esther Millares Ramirez, Selma Ben Hamouda and H el ene Richard for technical help during the study

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Safiri S, Carson-Chahhoud K, Karamzad N, Sullman MJM, Nejadghaderi SA, Taghizadieh A, et al. Prevalence, Deaths, and Disability-Adjusted Life-Years Due to Asthma and Its Attributable Risk Factors in 204 Countries and Territories, 1990-2019. *Chest*. 2022;161(2):318-29.
2. Wenzel SE, Szefler SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(3 Pt 1):737-43.
3. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(5 Pt 1):1532-9.
4. Carroll N, Carello S, Cooke C, James A. Airway structure and inflammatory cells in fatal attacks of asthma. *Eur Respir J*. 1996;9(4):709-15.
5. Smith BM, Zhao N, Olivenstein R, Lemiere C, Hamid Q, Martin JG. Asthma and fixed airflow obstruction: Long-term trajectories suggest distinct endotypes. *Clin Exp Allergy*. 2021;51(1):39-48.
6. Bullone M, Lavoie JP. Asthma "of horses and men"--how can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences? *Mol Immunol*. 2015;66(1):97-105.
7. Mainguy-Seers S, Boivin R, Pournali Dogahneh S, Beaudry F, Helie P, Bonilla AG, et al. Effects of azithromycin on bronchial remodeling in the natural model of severe neutrophilic asthma in horses. *Sci Rep*. 2022;12(1):446.
8. Huang CD, Chen HH, Wang CH, Chou CL, Lin SM, Lin HC, et al. Human neutrophil-derived elastase induces airway smooth muscle cell proliferation. *Life Sci*. 2004;74(20):2479-92.
9. Malavia NK, Raub CB, Mahon SB, Brenner M, Panettieri RA, Jr., George SC. Airway epithelium stimulates smooth muscle proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;41(3):297-304.

10. Begueret H, Berger P, Vernejoux JM, Dubuisson L, Marthan R, Tunon-de-Lara JM. Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *Thorax*. 2007;62(1):8-15.
11. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(4):213-28.
12. Vargas A, Roux-Dalvai F, Droit A, Lavoie JP. Neutrophil-Derived Exosomes: A New Mechanism Contributing to Airway Smooth Muscle Remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;55(3):450-61.
13. Zhang XY, Chen ZC, Li N, Wang ZH, Guo YL, Tian CJ, et al. Exosomal transfer of activated neutrophil-derived lncRNA CRNDE promotes proliferation and migration of airway smooth muscle cells in asthma. *Hum Mol Genet*. 2021.
14. Lapa e Silva JR, Possebon da Silva MD, Lefort J, Vargaftig BB. Endotoxins, asthma, and allergic immune responses. *Toxicology*. 2000;152(1-3):31-5.
15. Michel O, Ginanni R, Duchateau J, Vertongen F, Le Bon B, Sergysels R. Domestic endotoxin exposure and clinical severity of asthma. *Clin Exp Allergy*. 1991;21(4):441-8.
16. Pirie RS, Collie DD, Dixon PM, McGorum BC. Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma). *Clin Exp Allergy*. 2003;33(5):676-83.
17. Pirie RS, Dixon PM, Collie DD, McGorum BC. Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses. *Equine Vet J*. 2001;33(3):311-8.
18. Mendy A, Wilkerson J, Salo PM, Zeldin DC, Thorne PS. Endotoxin clustering with allergens in house dust and asthma outcomes in a U.S. national study. *Environ Health*. 2020;19(1):35.
19. Siegers EW, Anthonisse M, van Eerdenburg F, van den Broek J, Wouters IM, Westermann CM. Effect of ionization, bedding, and feeding on air quality in a horse stable. *J Vet Intern Med*. 2018;32(3):1234-40.

20. Jochmans-Lemoine A, Picotte K, Beauchamp G, Vargas A, Lavoie JP. Effects of a propriety oiled mixed hay feeding system on lung function, neutrophilic airway inflammation and oxidative stress in severe asthmatic horses. *Equine Vet J.* 2020;52(4):564-71.
21. van Erck E, Votion D, Art T, Lekeux P. Measurement of respiratory function by impulse oscillometry in horses. *Equine Vet J.* 2004;36(1):21-8.
22. Bickel S, Popler J, Lesnick B, Eid N. Impulse oscillometry: interpretation and practical applications. *Chest.* 2014;146(3):841-7.
23. Desai U, Joshi JM. Impulse oscillometry. *Adv Respir Med.* 2019;87(4):235-8.
24. Lavoie JP, Pasloske K, Joubert P, Cordeau ME, Mancini J, Girard Y, et al. Lack of clinical efficacy of a phosphodiesterase-4 inhibitor for treatment of heaves in horses. *J Vet Intern Med.* 2006;20(1):175-81.
25. Bullone M, Chevigny M, Allano M, Martin JG, Lavoie JP. Technical and physiological determinants of airway smooth muscle mass in endobronchial biopsy samples of asthmatic horses. *J Appl Physiol (1985).* 2014;117(7):806-15.
26. Vargas A, Peltier A, Dube J, Lefebvre-Lavoie J, Moulin V, Goulet F, et al. Evaluation of contractile phenotype in airway smooth muscle cells isolated from endobronchial biopsy and tissue specimens from horses. *Am J Vet Res.* 2017;78(3):359-70.
27. Kolonics F, Szeifert V, Timar CI, Ligeti E, Lorincz AM. The Functional Heterogeneity of Neutrophil-Derived Extracellular Vesicles Reflects the Status of the Parent Cell. *Cells.* 2020;9(12).
28. Alashkar Alhamwe B, Potaczek DP, Miethe S, Alhamdan F, Hintz L, Magomedov A, et al. Extracellular Vesicles and Asthma-More Than Just a Co-Existence. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9).
29. Abraham E, Nick JA, Azam T, Kim SH, Mira JP, Svetkauskaite D, et al. Peripheral blood neutrophil activation patterns are associated with pulmonary inflammatory responses to lipopolysaccharide in humans. *J Immunol.* 2006;176(12):7753-60.
30. Baines KJ, Simpson JL, Bowden NA, Scott RJ, Gibson PG. Differential gene expression and cytokine production from neutrophils in asthma phenotypes. *Eur Respir J.* 2010;35(3):522-31.

31. Herteman N, Grimes C, Lavoie JP. Retrospective investigation of automated hematology analyzer-determined indicators of neutrophil activation in blood samples from horses with asthma. *Am J Vet Res.* 2021;82(9):737-45.
32. Vachier I, Chanez P, Le Doucen C, Damon M, Descomps B, Godard P. Enhancement of reactive oxygen species formation in stable and unstable asthmatic patients. *Eur Respir J.* 1994;7(9):1585-92.
33. Vargas L, Patino PJ, Montoya F, Vanegas AC, Echavarria A, Garcia de Olarte D. A study of granulocyte respiratory burst in patients with allergic bronchial asthma. *Inflammation.* 1998;22(1):45-54.
34. Mann BS, Chung KF. Blood neutrophil activation markers in severe asthma: lack of inhibition by prednisolone therapy. *Respir Res.* 2006;7:59.
35. Brazil TJ, Dagleish MP, McGorum BC, Dixon PM, Haslett C, Chilvers ER. Kinetics of pulmonary neutrophil recruitment and clearance in a natural and spontaneously resolving model of airway inflammation. *Clin Exp Allergy.* 2005;35(7):854-65.
36. Aloor JJ, Azzam KM, Guardiola JJ, Gowdy KM, Madenspacher JH, Gabor KA, et al. Leucine-rich repeats and calponin homology containing 4 (Lrch4) regulates the innate immune response. *J Biol Chem.* 2019;294(6):1997-2008.
37. Simpson JL, Grissell TV, Douwes J, Scott RJ, Boyle MJ, Gibson PG. Innate immune activation in neutrophilic asthma and bronchiectasis. *Thorax.* 2007;62(3):211-8.
38. Esnault S, Kelly EA, Schwantes EA, Liu LY, DeLain LP, Hauer JA, et al. Identification of genes expressed by human airway eosinophils after an in vivo allergen challenge. *PLoS One.* 2013;8(7):e67560.
39. Zhang YH, Li Z, Zeng T, Chen L, Li H, Huang T, et al. Detecting the Multiomics Signatures of Factor-Specific Inflammatory Effects on Airway Smooth Muscles. *Front Genet.* 2020;11:599970.

40. Davis KU, Sheats MK. Differential gene expression and Ingenuity Pathway Analysis of bronchoalveolar lavage cells from horses with mild/moderate neutrophilic or mastocytic inflammation on BAL cytology. *Vet Immunol Immunopathol.* 2021;234:110195.
41. Hauk PJ, Krawiec M, Murphy J, Boguniewicz J, Schiltz A, Goleva E, et al. Neutrophilic airway inflammation and association with bacterial lipopolysaccharide in children with asthma and wheezing. *Pediatr Pulmonol.* 2008;43(9):916-23.
42. Vignola AM, Bonanno A, Profita M, Riccobono L, Scichilone N, Spatafora M, et al. Effect of age and asthma duration upon elastase and alpha1-antitrypsin levels in adult asthmatics. *Eur Respir J.* 2003;22(5):795-801.
43. Kasaian MT, Lee J, Brennan A, Danto SI, Black KE, Fitz L, et al. Proteomic analysis of serum and sputum analytes distinguishes controlled and poorly controlled asthmatics. *Clin Exp Allergy.* 2018;48(7):814-24.
44. Raulo SM, Sorsa T, Tervahartiala T, Pirila E, Maisi P. MMP-9 as a marker of inflammation in tracheal epithelial lining fluid (TELF) and in bronchoalveolar fluid (BALF) of COPD horses. *Equine Vet J.* 2001;33(2):128-36.
45. Simonen-Jokinen T, Pirie RS, McGorum B, Maisi P. Dose responses to inhalation of endotoxin, hay dust suspension and *Aspergillus fumigatus* extract in horses as measured by levels and activation of matrix metalloproteinase-9. *Equine Vet J.* 2005;37(2):155-60.
46. Kawagoe J, Kono Y, Togashi Y, Ishiwari M, Toriyama K, Yajima C, et al. Serum Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin (NGAL) Is Elevated in Patients with Asthma and Airway Obstruction. *Curr Med Sci.* 2021;41(2):323-8.
47. Wang Y, Jia M, Yan X, Cao L, Barnes PJ, Adcock IM, et al. Increased neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) promotes airway remodelling in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Sci (Lond).* 2017;131(11):1147-59.
48. Lavoie JP, Lefebvre-Lavoie J, Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Chamberland A, Laprise C, et al. Profiling of differentially expressed genes using suppression subtractive hybridization in an equine model of chronic asthma. *PLoS One.* 2012;7(1):e29440.

49. Svensson Holm AC, Bengtsson T, Grenegard M, Lindstrom EG. Platelets stimulate airway smooth muscle cell proliferation through mechanisms involving 5-lipoxygenase and reactive oxygen species. *Platelets*. 2008;19(7):528-36.
50. Khan MA. Inflammation signals airway smooth muscle cell proliferation in asthma pathogenesis. *Multidiscip Respir Med*. 2013;8(1):11.
51. Naveed SU, Clements D, Jackson DJ, Philp C, Billington CK, Soomro I, et al. Matrix Metalloproteinase-1 Activation Contributes to Airway Smooth Muscle Growth and Asthma Severity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195(8):1000-9.
52. Wang R, Wang Y, Liao G, Chen B, Panettieri RA, Jr., Penn RB, et al. Abi1 mediates airway smooth muscle cell proliferation and airway remodeling via Jak2/STAT3 signaling. *iScience*. 2022;25(2):103833.
53. Cohen P, Noveral JP, Bhala A, Nunn SE, Herrick DJ, Grunstein MM. Leukotriene D4 facilitates airway smooth muscle cell proliferation via modulation of the IGF axis. *Am J Physiol*. 1995;269(2 Pt 1):L151-7.
54. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*. 1992;80(8):2012-20.
55. Anderson SL, Townsend HGG, Singh B. Role of toll-like receptor 4 and caspase-3, -8, and -9 in lipopolysaccharide-induced delay of apoptosis in equine neutrophils. *Am J Vet Res*. 2018;79(4):424-32.
56. Chen JY, Cheng WH, Lee KY, Kuo HP, Chung KF, Chen CL, et al. Abnormal ADAM17 expression causes airway fibrosis in chronic obstructive asthma. *Biomed Pharmacother*. 2021;140:111701.
57. Do AN, Chun Y, Grishina G, Grishin A, Rogers AJ, Raby BA, et al. Network study of nasal transcriptome profiles reveals master regulator genes of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147(3):879-93.

58. Green TD, Crews AL, Park J, Fang S, Adler KB. Regulation of mucin secretion and inflammation in asthma: a role for MARCKS protein? *Biochim Biophys Acta*. 2011;1810(11):1110-3.
59. Sai J, Raman D, Liu Y, Wikswo J, Richmond A. Parallel phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-dependent and Src-dependent pathways lead to CXCL8-mediated Rac2 activation and chemotaxis. *J Biol Chem*. 2008;283(39):26538-47.
60. Yoo SK, Starnes TW, Deng Q, Huttenlocher A. Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. *Nature*. 2011;480(7375):109-12.
61. Frelin C, Ofran Y, Ruston J, Hayun M, Derdikman Y, Khier Y, et al. Grb2 regulates the proliferation of hematopoietic stem and progenitors cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2017;1864(12):2449-59.
62. Duarte D, Taveira-Gomes T, Sokhatska O, Palmares C, Costa R, Negrao R, et al. Increased circulating platelet microparticles as a potential biomarker in asthma. *Allergy*. 2013;68(8):1073-5.
63. Elliot JG, Jones RL, Abramson MJ, Green FH, Mauad T, McKay KO, et al. Distribution of airway smooth muscle remodelling in asthma: relation to airway inflammation. *Respirology*. 2015;20(1):66-72.
64. Luo D, McGettrick HM, Stone PC, Rainger GE, Nash GB. The roles of integrins in function of human neutrophils after their migration through endothelium into interstitial matrix. *PLoS One*. 2015;10(2):e0118593.
65. Tak T, Hilvering B, Tesselaar K, Koenderman L. Similar activation state of neutrophils in sputum of asthma patients irrespective of sputum eosinophilia. *Clin Exp Immunol*. 2015;182(2):204-12.
66. Baines KJ, Simpson JL, Scott RJ, Gibson PG. Immune responses of airway neutrophils are impaired in asthma. *Exp Lung Res*. 2009;35(7):554-69.

67. Brazil TJ. Pulmonary neutrophil recruitment, activation and clearance in equine chronic obstructive pulmonary disease [Thesis presented for the degree of Doctor of Philosophy]. Edinburgh: The University of Edinburgh; 1999.

Figures

Figure 1. Lung function measured by oscillometry. Whole-breath resistance (a) and reactance (b) during remission and exacerbation of severe equine asthma (mean \pm SEM). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ between remission and exacerbation with Bonferroni multiple comparison tests.

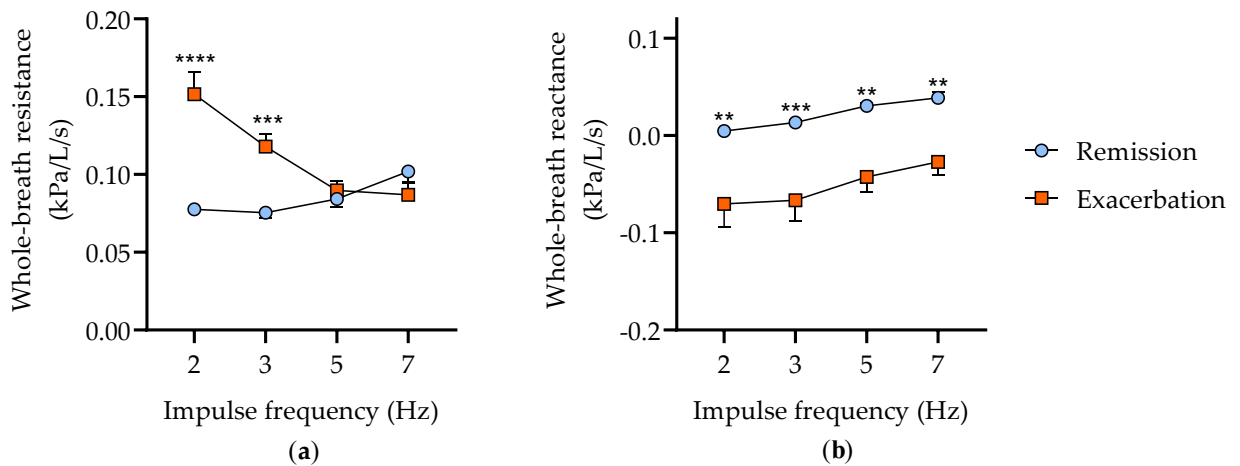


Figure 2. Percentages of inflammatory cells in the bronchoalveolar lavage fluid cytology of horses during remission (Rem) and exacerbation (Exa) of severe equine asthma (dot plot with mean) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ with paired T-tests or Wilcoxon tests.

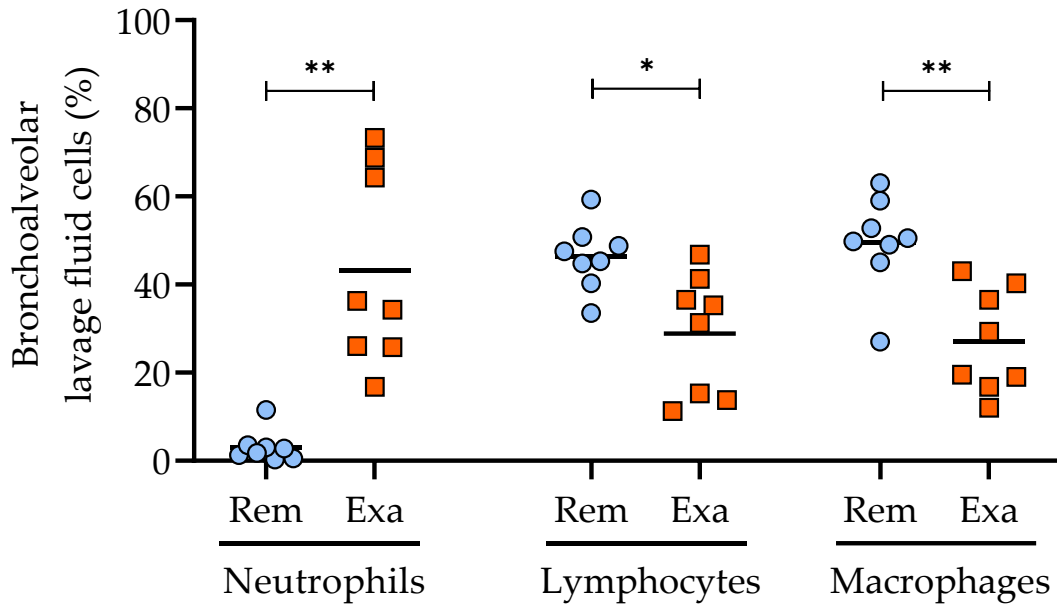


Figure 3. Neutrophil extracellular vesicle characterization by laser scattering microscopy. Size (a) and production per neutrophil (b) during remission (Rem) and exacerbation (Exa) (dot plot with mean) ϕ : untreated cells; LPS: cells treated with 100 ng/mL LPS. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ with Bonferroni multiple comparison tests.

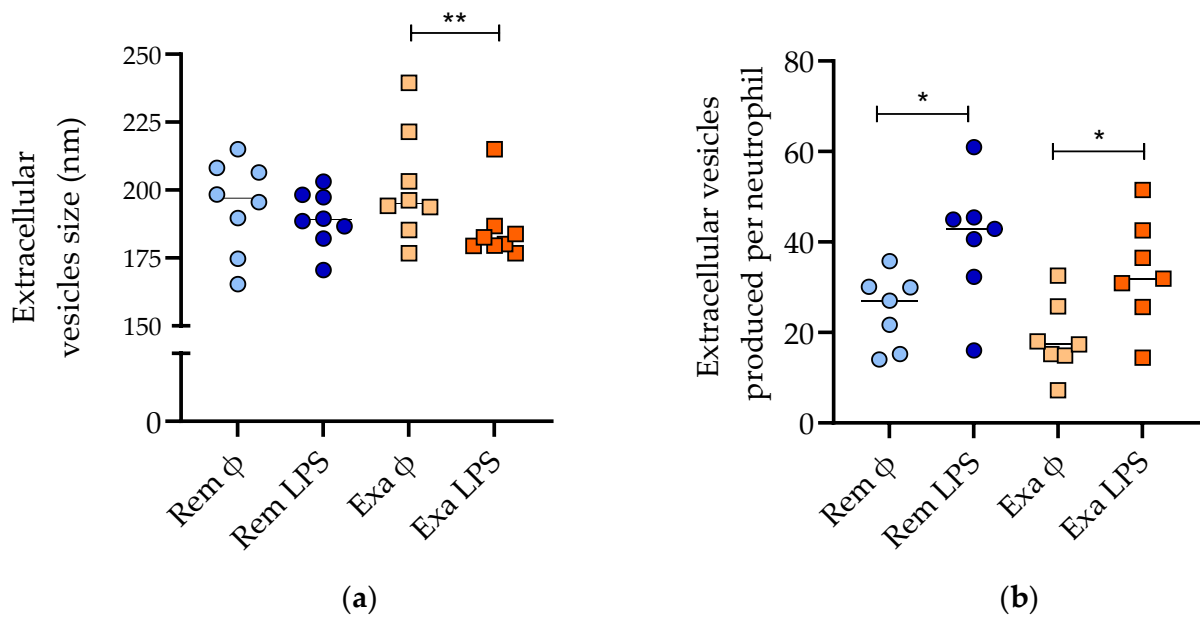


Figure 4. Gene ontology enrichment analysis of proteins downregulated by LPS in neutrophil-derived EVs. Enrichment clusters identified by Metascape (a) and functional analysis of enriched GO terms from the parent node to the root node illustrated with ClueGo and Cluepedia in Cytoscape (b).

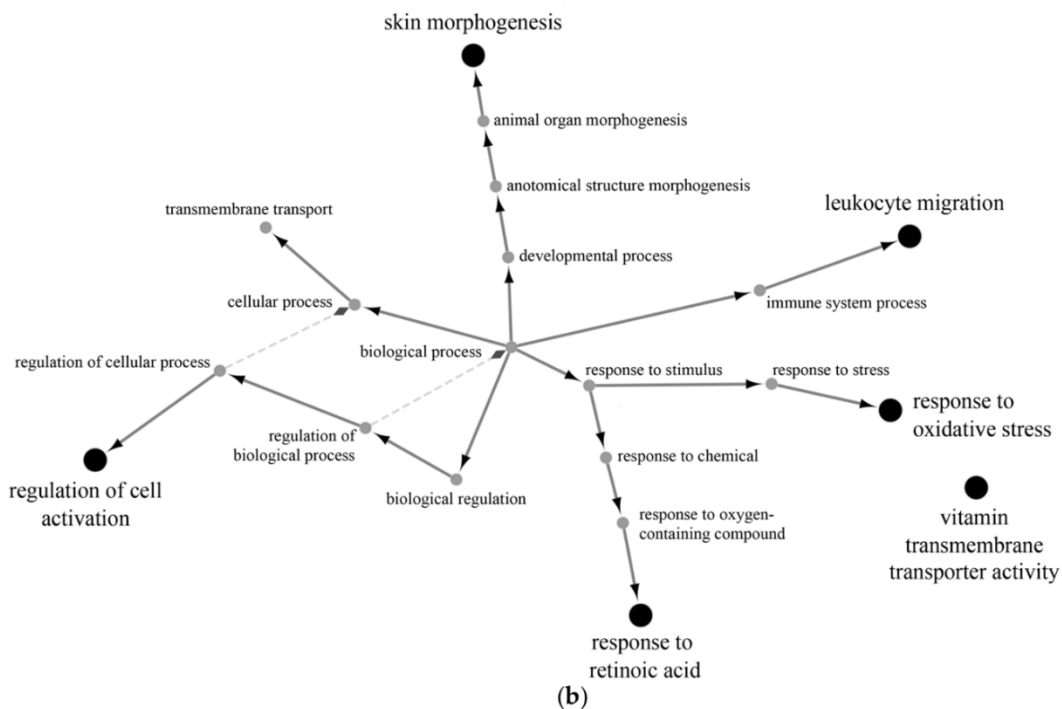
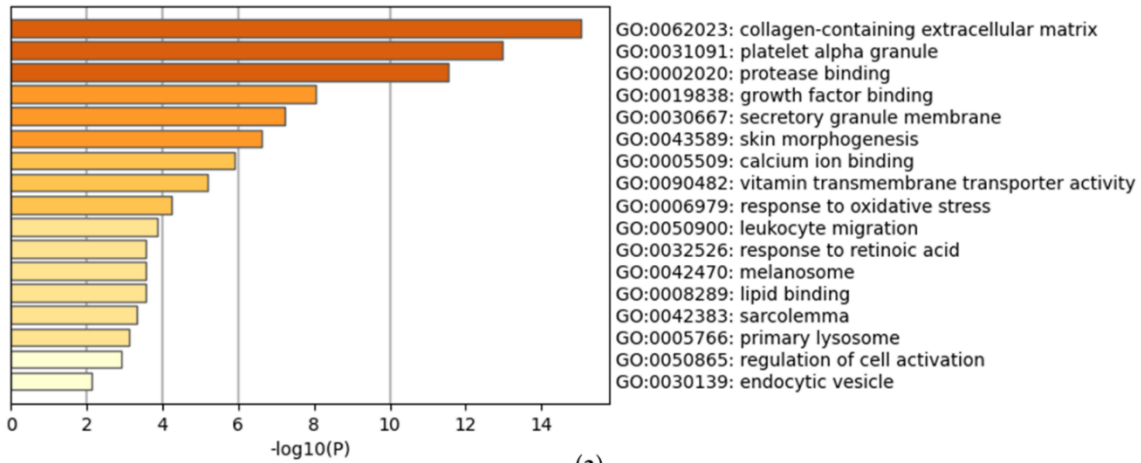


Figure 5. Gene ontology enrichment analysis of proteins upregulated by LPS in neutrophil-derived EVs. Enrichment clusters identified by Metascape (a) and functional analysis of enriched GO terms from the parent node to the root node illustrated with ClueGo and Cluepedia in Cytoscape (b).

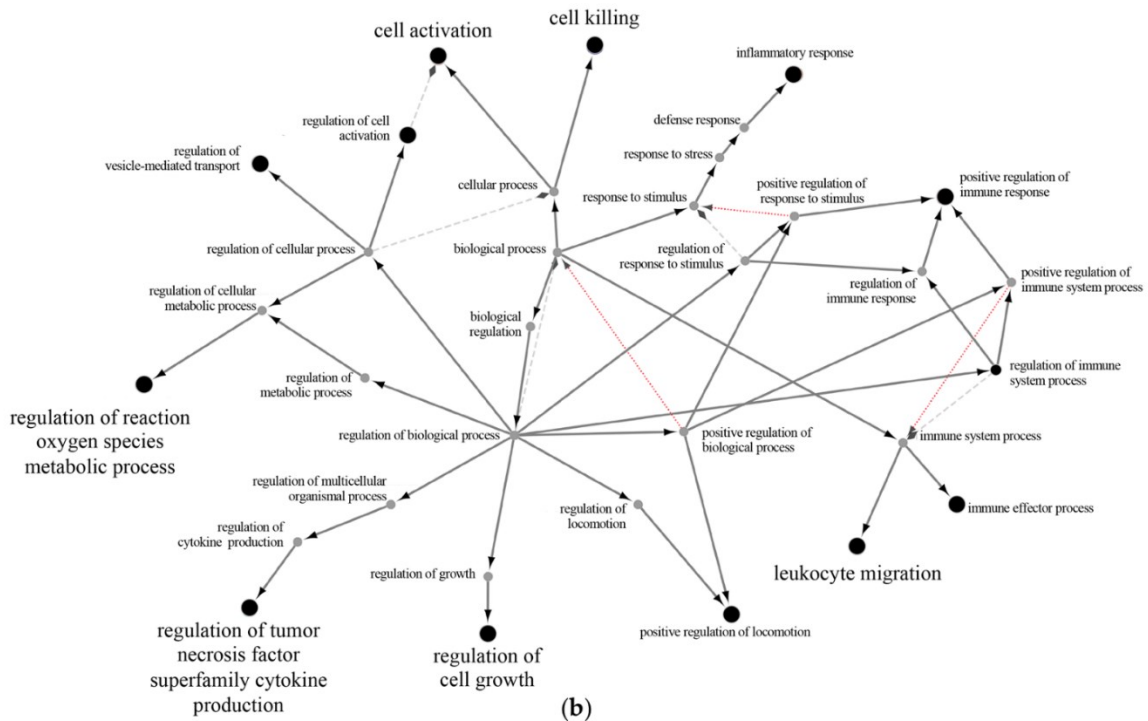
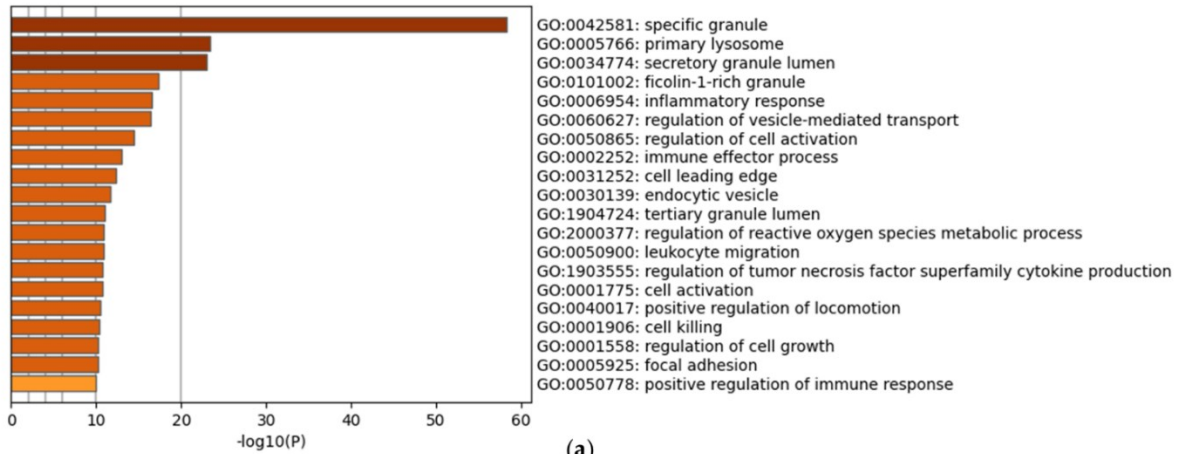
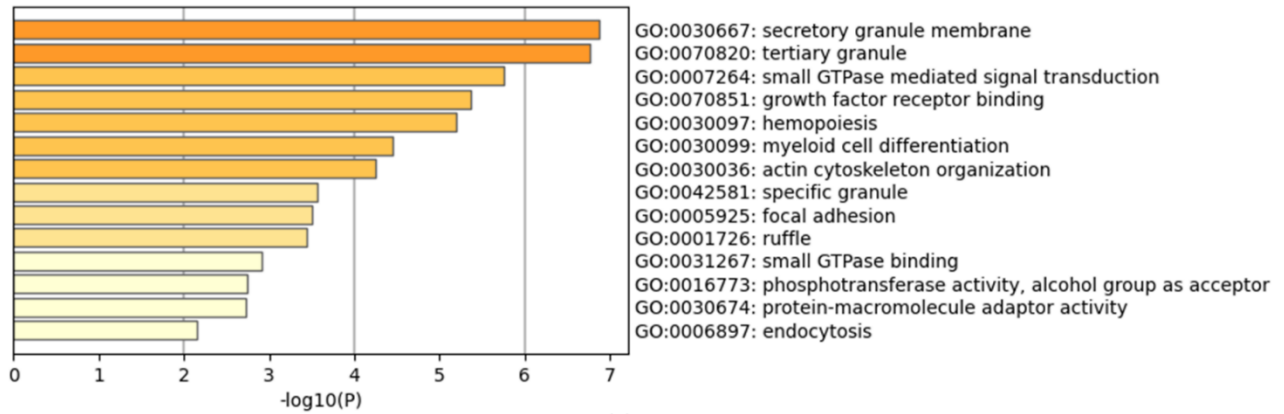
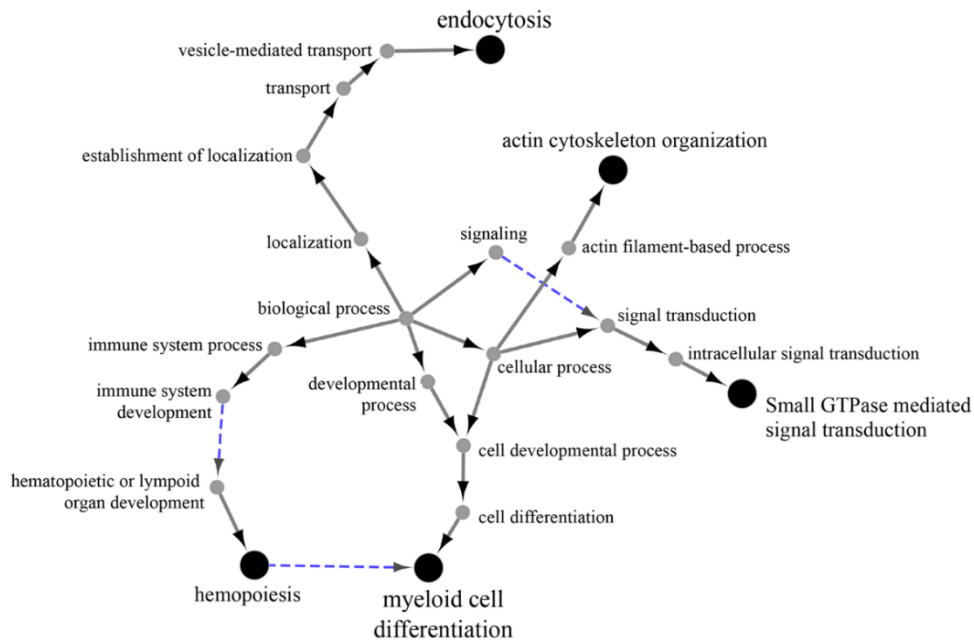


Figure 6. Gene ontology enrichment analysis of proteins upregulated by LPS in neutrophil-derived EVs only during asthmatic exacerbation. Enrichment clusters identified by Metascape (a) and functional analysis of enriched GO terms from the parent node to the root node illustrated with ClueGo and Cluepedia in Cytoscape (b).

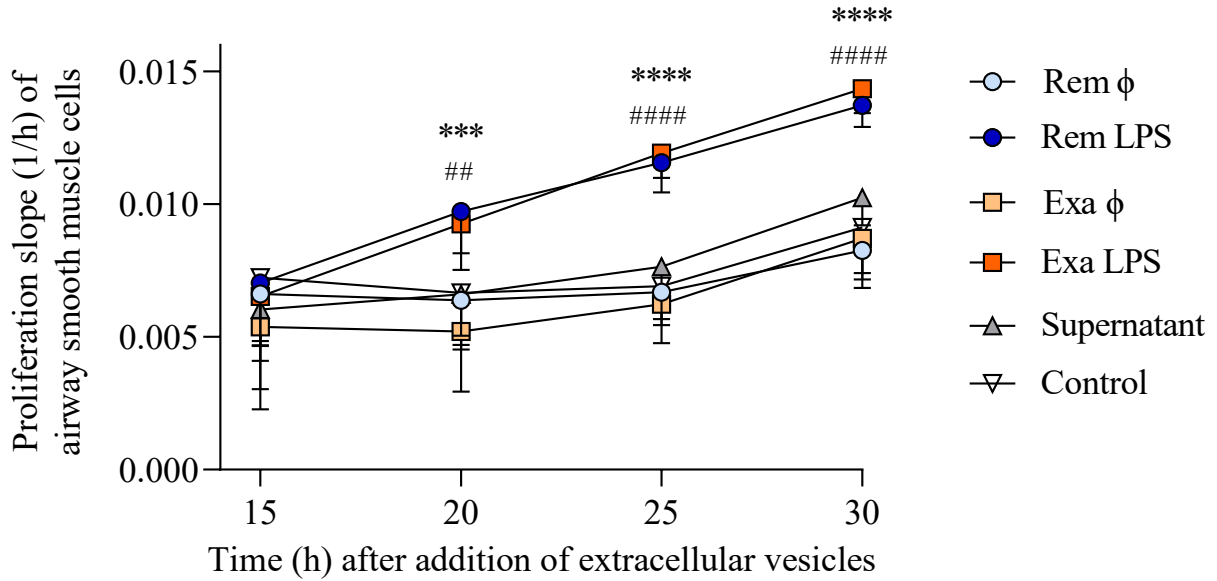


(a)



(b)

Figure 7. Airway smooth muscle proliferation studied with the Xcelligence device (mean \pm SEM). Φ : untreated cells; LPS: cells treated with 100 ng/mL of LPS. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ between REM (remission) + LPS and control; ## $p < 0.01$, #### $p < 0.0001$ between EXA (exacerbation) + LPS and control with Bonferroni multiple comparison tests.



Supplementary File

Supplement to: Neutrophil extracellular vesicles and airway smooth muscle proliferation in the natural model of severe asthma in horses

Supplementary methods

Animals

The neutrophil EVs from eight horses with severe asthma were compared between remission and exacerbation of the disease. No data were available for power analysis, but eight horses were considered sufficient as previous studies demonstrated differences in peripheral neutrophil biology after an antigenic challenge by using six horses with severe asthma (1, 2). All procedures on animals were performed at a research farm, where they are housed all year round. Horses were conditioned to stand in a stock and to wear a facemask for lung function measurements. The horses were monitored daily, and humane endpoints included reduced appetite, abnormal fecal output, hyperthermia, colic, respiratory distress, or any other medical conditions that could have interfered with the study. No adverse events occurred during the experiment and clinical remission was re-obtained at the end of the study by dietary and environmental modifications.

Endoscopic bronchoalveolar lavage

With endoscopic guidance, two boluses of 250 mL of warm sterile isotonic saline were sequentially instilled into a main bronchus and aspirated via a suction pump. The samples were kept on ice until processing within 60 minutes. A modified Wright–Giemsa solution (Diff-Quik, Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) was used to stain cytocentrifuged preparations of BALF. Differential cell counts were performed blindly from 400 leukocytes. In horses, BALF differential cell counts are preferred to the total counts as the BALF volume recovered depends on the degree of airway obstruction (3).

Extracellular vesicles characterization

Nanoparticle tracking analysis

The ZetaView device allows the evaluation of the particle size and quantification by tracking and videorecording the movement of individual EVs by using Brownian motion. The instrument was used as previously described with minor modifications (4). Briefly, the device evaluated 11 different positions throughout the cell for each sample, with two readings at each position. The device software provided the EVs concentration and size (mean, median, and 10th and 90th percentile diameter) of the sample after automated removal of outlier positions. The pre-acquisition parameters were set to a sensitivity of 79, a shutter speed of 96 and a frame rate of 30 frames per second. Post-acquisition parameters were set to a maximum size of 1000 pixels, a minimum size of 10 pixels and a minimum brightness of 25.

Sample preparation for proteomic analysis: protein extraction and digestion

Protein digestion and mass spectrometry experiments were performed by the Proteomics platform of the CHU de Québec Research Center, Québec, Canada. Solubilization of membranes was performed with the addition of sodium deoxycholate (DOC; final concentration of 1%) and ultrasonication on a Bioruptor (high intensity, 15 cycles of 30 s on/off, Diagenode). Precipitation of proteins was carried out by adding five volumes of cold acetone (-20°C) for overnight incubation. After a 15-minute centrifugation at 10,000x *g*, proteins from the dry pellet were resuspended in 50 mM ammonium bicarbonate and 1% DOC and quantified with a Bradford assay (580 nm, Biorad). Protein denaturation prior to digestion was done by heating at 95 °C for 5 min, cysteine disulfide bond reduction with dithiothreitol (0.2 mM at 37 °C for 30 min) and cysteine alkylation with iodoacetamide (0.8 mM at 37 °C for 30 min). Protein digestion was obtained by overnight incubation at 37°C with trypsin (1:50 protease:protein ratio, sequencing grade, Promega, Madison, WI). A solution of acetonitrile 3 % (ACN) trifluoroacetic acid 1 % (TFA) and acetic acid 0.5% was used to stop the digestion. Tryptic peptides were desalted on C18 StageTips (Empore), vacuum dried and stored at -20 °C prior to mass spectrometry analysis.

Mass spectrometry

Samples were resuspended in 2% ACN;0.05% TFA in water and their concentration adjusted with 205 nm absorbance readings (Nanodrop, Thermo Fischer) for the injection of 1 µg of samples on the liquid chromatography system. Samples were analyzed by nanoLC/MSMS using a Dionex UltiMate 3000 nanoRSLC chromatography system (Thermo Fisher Scientific) coupled to an Orbitrap Fusion mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA,USA) equipped with a nanoelectrospray ion source. Peptides were trapped at 20 µL/min in loading solvent (2% ACN, 0.05% TFA) on a 5 mm x 300 µm C18 pepmap cartridge (Thermo Fisher Scientific) for 5 minutes. Then, the pre-column was switched online with a separation column of 50 cm x 75 µm internal diameter (Pepmap Acclaim column, ThermoFisher) and the peptides were eluted with a linear gradient from 5-40% solvent B (A: 0.1% formic acid, B: 80% acetonitrile, 0.1% formic acid) in 90 minutes, at 300 nL/min. Mass spectra were acquired using a data-dependent acquisition mode using Thermo XCalibur software (v4.1.50). Full scan mass spectra (m/z 350 to m/z 1800) were acquired in the Orbitrap using an AGC target of 4×10^5 , a maximum injection time of 50 ms with a resolution of 120 000 (FWHM). Lock mass on the m/z 445.12003 siloxane ion was used for internal calibration. Each MS scan was followed by acquisition of fragmentation MS2 spectra of the most intense ions for a total cycle time of 3 seconds (top speed mode). The selected ions were isolated using the quadrupole analyzer width of 1.6 Da and fragmented by Higher energy Collision-induced Dissociation (HCD) with 35% of collision energy. The resulting fragments were detected by the linear ion trap in rapid scan rate with an AGC target of 1×10^4 and a maximum injection time of 50 ms. Dynamic exclusion of previously fragmented peptides was set for a period of 30 sec and a tolerance of 10 ppm.

Protein identification and data analysis

Mass spectra were searched against the Uniprot *Equus caballus* database (UniProt Reference Proteome – Proteome ID UP000002281– 44484 entries – 2021.05) using the search engine Andromeda integrated into the MaxQuant software (version 2.0.2.0) assuming the digestion enzyme trypsin. Cysteine carbamidomethylation was set as fixed modification and protein N-terminal acetylation and methionine oxidation were set as variable modifications. For protein

validation, a false discovery rate (FDR) of 1% was allowed at peptide and protein level based on a target/decoy search. Label-free quantification (LFQ) was done with MaxQuant using a minimum of two unique peptides.

Text files generated by MaxQuant were analyzed using the R software (version 3.6.1). Only regular intensities from the proteinGroups.txt file were considered for data processing. Decoy proteins and potential contaminants were excluded from the analysis. The determination of a normalization factor was calculated for each sample by dividing their median intensity by the median of all the median intensities. For each sample, a noise value corresponding to the 0.01 percentile of all intensities of said sample was calculated and was imputed when an intensity value was missing from a sample. Only proteins identified with at least two razor unique peptides were considered as quantified proteins and kept in the analysis. The average intensity values from each experimental condition were calculated for each protein. Proteins with a ≥ 2 -fold difference between the different conditions were analyzed with repeated two-Way ANOVA (with the disease status and the cell treatment with or without LPS as the independent variables) and were considered significantly regulated with a $p < 0.05$. Data were not analyzed when a protein was not quantified in a sample from more than one condition. The human orthologs of differentially regulated proteins were searched with the Uniprot Database; an ortholog protein could not be found for 14 equine proteins that were not used in the gene ontology analysis.

Gene ontology was evaluated with Metascape using the GO Biological processes and Reactome Databases. Briefly, the Metascape online platform (5) identify gene ontology terms significantly enriched within a provided list of proteins. Statistical analysis includes corrections with the Benjamini-Hochberg tests for multiple comparisons. The software Cytoscape (6) (version 3.9.1) with the ClueGo (7) (version 2.5.9) and Cluepedia (8) (version 11.0_9606) plugins was used to visualize protein-protein interactions networks using preselected functions (gene ontology and Reactome pathways identified by Metascape), automatic parameters, yFiles Organic Layouts and the option connecting parent nodes up to the root node with Cluepedia.

Airway smooth muscle isolation and characterization

Cell culture

The endobronchial biopsies collected from each horse were kept in transport medium at 4 °C until processing within 60 minutes. Enzymatic digestion was performed as previously described (9). Briefly, the biopsies were immersed for three hours in a digestion medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F12 nutrient mix (Thermofisher, Waltham, MA) with 0.125 U/mL Collagenase H (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA), 1 mg/mL Trypsin inhibitor (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), 1 U/mL elastase (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ), 1% Penicillin-Streptomycin (Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste, QC) and 0.1% Fungizone (Fisher Scientific, Hampton, NH). Then, the digested cells were seeded (50 000 cells/cm³) into ventilated cell culture flasks with DMEM/F12 (3:1) medium (Life Technologies), supplemented with adenine 2.4 mg/L, 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin and 0.1% fungizone. The medium was changed every 24 h for the first 3 days and then every 48 h.

Flow cytometry

The purity of each ASM cell culture at the end of P4 was assessed by flow cytometry using specific contractile proteins (anti- α -SMA and anti-desmin) as previously described (9). Briefly, ASM cells were counted, washed in PBS1X twice, and fixed for 20 min with 4% paraformaldehyde and then washed three times in PBS 1X and kept at 4 °C for no longer than a month prior to analysis. After non-specific blocking with 5% normal horse serum and permeabilization with Cytofix-cytoperm, ASM cells (10⁶) were stained for anti- α -SMA (mouse IgG2a, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, 1:250) and anti-desmin (rabbit polyclonal IgG, Abcam, Cambridge, UK, 1:200) antibodies for one hour. Then, cells were incubated in the dark for 40 min with fluorescent dye-conjugated anti-IgG antibodies. Isotype-matched control antibodies (mouse IgG2a and rabbit serum) were used as negative controls. Flow cytometry acquisition of 10,000 events was performed using CellQuest Pro software on a FACSCalibur instrument (BD Bioscience). Signals greater than those of the isotype controls were considered positive, and the mean percentage of positive cells were evaluated.

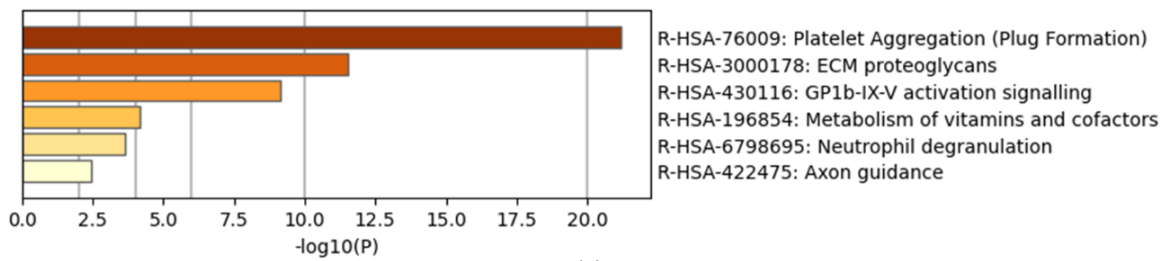
References in Supplement

1. Brazil TJ, Dagleish MP, McGorum BC, Dixon PM, Haslett C, Chilvers ER. Kinetics of pulmonary neutrophil recruitment and clearance in a natural and spontaneously resolving model of airway inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(7):854-65.
2. Dunkel B, Rickards KJ, Werling D, Page CP, Cunningham FM. Neutrophil and platelet activation in equine recurrent airway obstruction is associated with increased neutrophil CD13 expression, but not platelet CD41/61 and CD62P or neutrophil-platelet aggregate formation. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009;131(1-2):25-32.
3. Koblinger K, Hecker K, Nicol J, Wasko A, Fernandez N, Leguillette R. Bronchial collapse during bronchoalveolar lavage in horses is an indicator of lung inflammation. *Equine Vet J*. 2014;46(1):50-5.
4. Douanne N, Dong G, Amin A, Bernardo L, Blanchette M, Langlais D, et al. Leishmania parasites exchange drug-resistance genes through extracellular vesicles. *Cell Rep*. 2022;40(3):111121.
5. Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun*. 2019;10(1):1523.
6. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003;13(11):2498-504.
7. Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*. 2009;25(8):1091-3.
8. Bindea G, Galon J, Mlecnik B. CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics*. 2013;29(5):661-3.

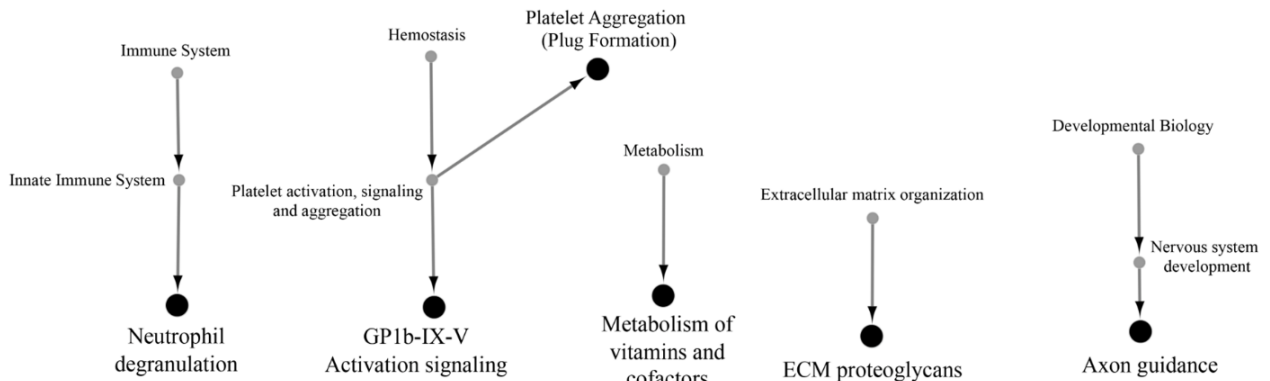
9. Vargas A, Peltier A, Dube J, Lefebvre-Lavoie J, Moulin V, Goulet F, et al. Evaluation of contractile phenotype in airway smooth muscle cells isolated from endobronchial biopsy and tissue specimens from horses. *Am J Vet Res.* 2017;78(3):359-70.

Tables and Figures in Supplement

Supplementary Figure S1. Reactome enrichment analysis of proteins downregulated by LPS in neutrophil-derived EVs. Enrichment clusters identified by Metascape (a) and functional analysis of enriched GO terms from the parent node to the root node illustrated with ClueGo and Cluepedia in Cytoscape (b).

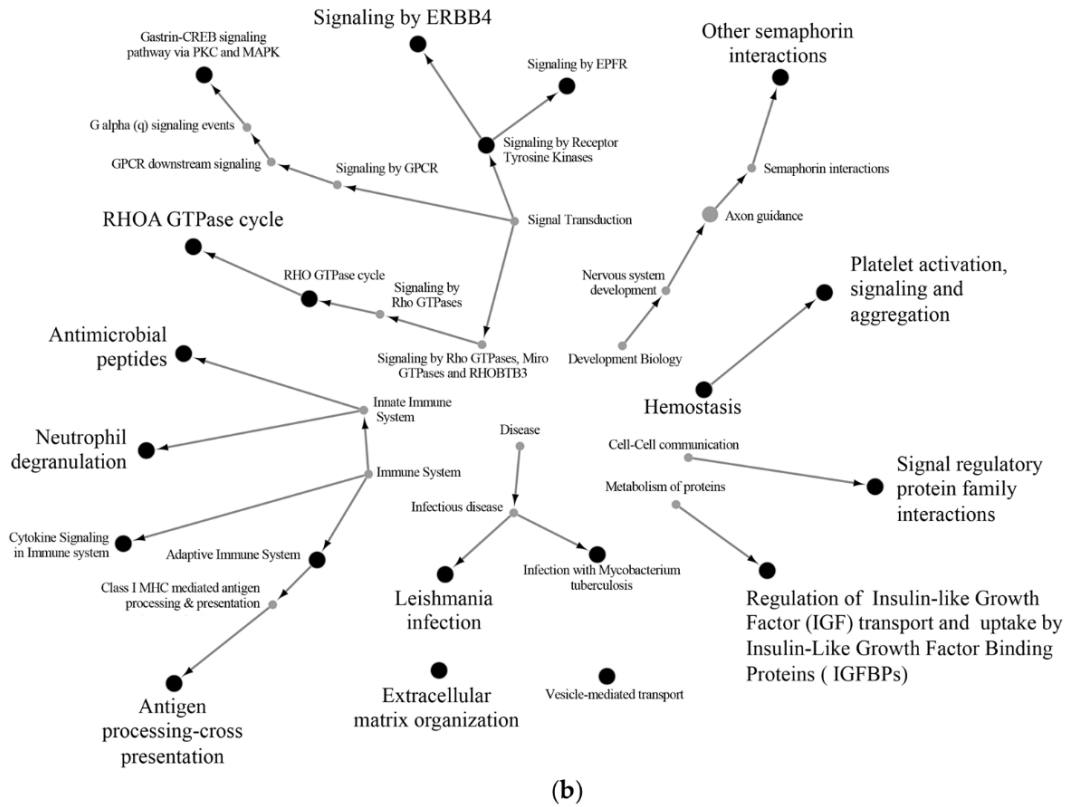
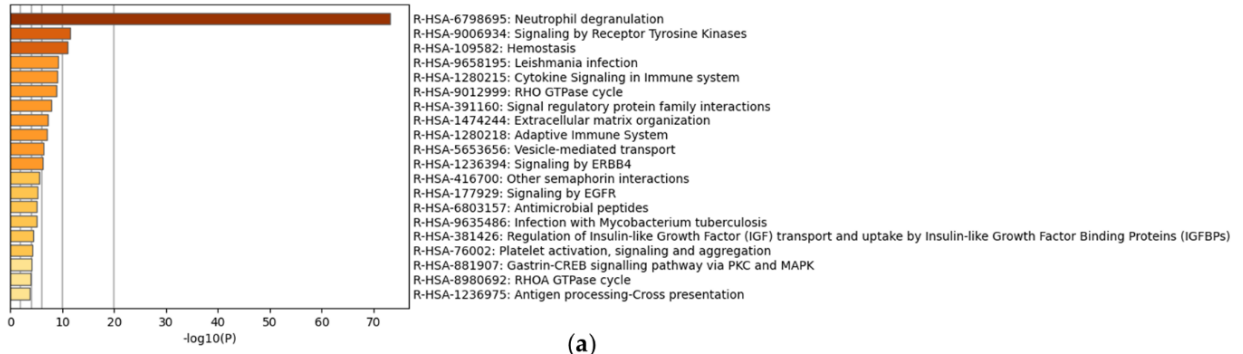


(a)

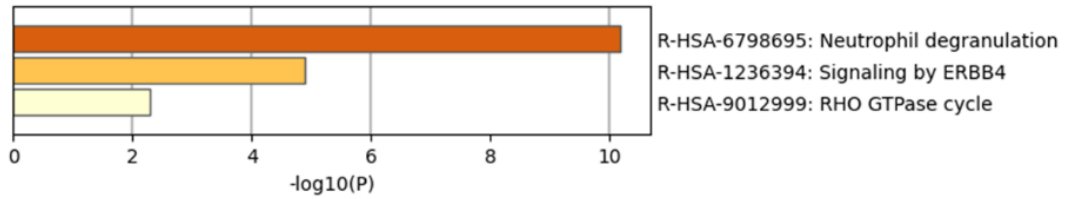


(b)

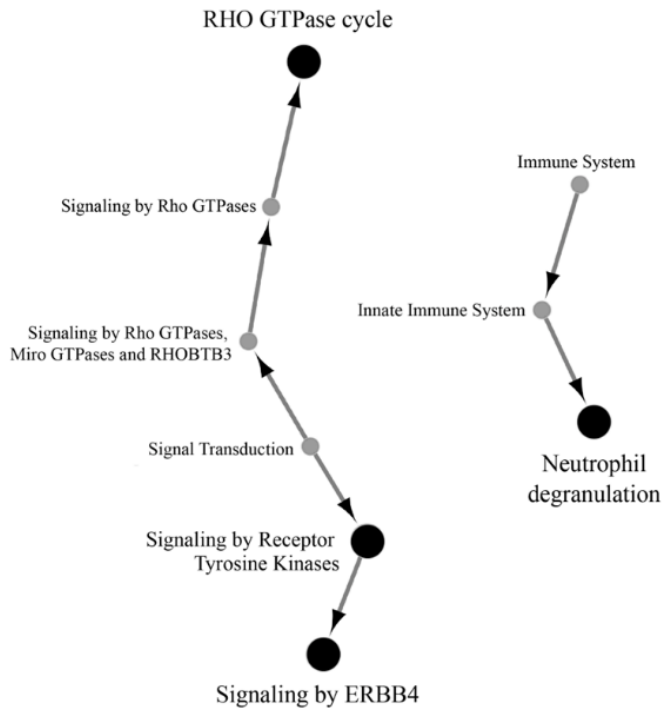
Supplementary Figure S2. Reactome enrichment analysis of proteins upregulated by LPS in neutrophil-derived EVs. Enrichment clusters identified by Metascape (a) and functional analysis of enriched GO terms from the parent node to the root node illustrated with ClueGo and Cluepedia in Cytoscape (b).



Supplementary figure S3. Reactome enrichment analysis of proteins upregulated by LPS in neutrophil-derived EVs only during asthmatic exacerbation. Enrichment clusters identified by Metascape (a) and functional analysis of enriched GO terms from the parent node to the root node illustrated with ClueGo and Cluepedia in Cytoscape (b).

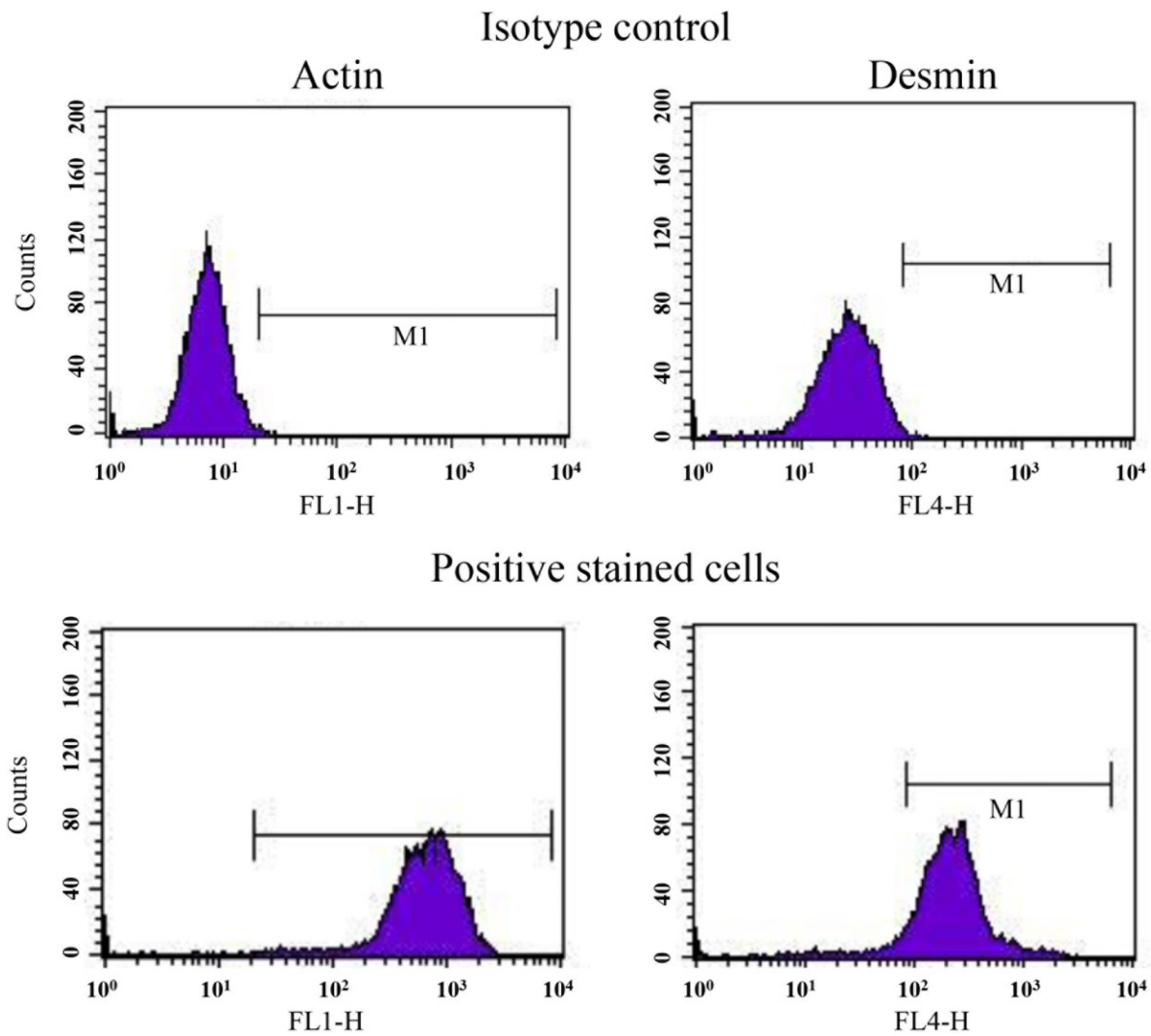


(a)



(b)

Supplementary Figure S4. Representative ASM cell flow cytometry analysis histograms for α -SMA (actin) and desmin. FL1-H = Intensity (height) in the FL1 channel (green fluorescence). FL4-H = Intensity (height) in the FL4 channel (red fluorescence). M1 = Histogram marker 1.



Supplementary table S1. Proteins significantly downregulated in EVs produced by LPS-stimulated neutrophils.

| Proteins downregulated by LPS in neutrophil-derived EVs | | | | |
|--|---|-----------------------|----------------|--------------------------------|
| Accession No. | Name | Human ortholog | p-value | Percentage of variation |
| F7ALC9 | Annexin A7 | P20073 | 0.0074 | 45.3 |
| F7BAT4 | von Willebrand factor | P04275 | 0.0374 | 22.0 |
| A0A5F5Q281 | Collagen type I alpha 1 chain | P02452 | 0.0006 | 45.7 |
| A0A5F5PJM9 | Sorcin | P30626 | 0.0384 | 28.4 |
| F6WG72 | Penta-EF-hand domain containing 1 | Q9UBV8 | 0.0074 | 40.3 |
| F7DE06 | Annexin | P50995 | 0.0063 | 51.1 |
| A0A5F5PV90 | Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3 | P62318 | 0.033 | 19.1 |
| A0A5F5PKJ8 | Signal transducing adaptor molecule | Q92783 | 0.0138 | 25.9 |
| A0A5F5PN66 | RNA-binding protein with serine-rich domain 1 | Q15287 | 0.0198 | 46.0 |
| A0A3Q2HK18 | L-selectin | P14151 | 0.0304 | 26.5 |
| A0A3Q2KNS3 | Zinc finger DBF-type containing 2 | Q9HCK1 | 0.0015 | 37.1 |
| F7CBT8 | Glucose transporter type 1, erythrocyte/brain | P11166 | 0.0234 | 7.5 |
| A0A3Q2H0K6 | ABC-type glutathione-S-conjugate transporter | P33527 | 0.0017 | 44.4 |
| F7B6G4 | Integrin subunit alpha 6 | P23229 | 0.0123 | 13.2 |
| A0A5F5PR12 | Vanin 1 | O95497 | <0.0001 | 38.6 |
| A0A3Q2KM06 | Collagen type VI alpha 1 chain | P12109 | 0.0083 | 11.3 |
| F7APH4 | Osteonectin | P09486 | 0.0015 | 32.2 |
| F7CYR1 | Antithrombin-III | P01008 | 0.0009 | 30.7 |
| Q28369 | Retinol-binding protein 4 | P02753 | 0.043 | 11.6 |
| F6Y5W8 | Rho guanine nucleotide exchange factor 5 | Q12774 | 0.007 | 20.8 |

| | | | | |
|-------------------|--|--------|--------|------|
| A0A3Q2HL62 | Glycoprotein Ib platelet subunit beta | P13224 | 0.0167 | 17.2 |
| F7CN11 | Fibronectin | P02751 | 0.0262 | 19.8 |
| A0A3Q2H143 | Thromboxane A synthase 1 | P24557 | 0.0084 | 21.1 |
| F6YUE1 | SPARC like 1 | Q14515 | 0.0459 | 36.9 |
| A0A3Q2GXP0 | Grancalcin | P28676 | 0.0266 | 36.5 |
| A0A3Q2HNV2 | Insulin-like growth factor-binding protein 2 | P18065 | 0.0134 | 11.4 |
| F6RTI8 | Collagen type I alpha 2 chain | P08123 | 0.0057 | 36.8 |
| F6TQF7 | Integrin subunit alpha 2b | P08514 | 0.0062 | 18.9 |
| F6RBT1 | Eosinophil peroxidase | P11678 | 0.0247 | 20.4 |
| A0A5F5PQ9 | Fibrinogen beta chain | P02675 | 0.031 | 25.3 |
| A0A3Q2HJP2 | Integrin beta | P05106 | 0.0085 | 23.4 |
| P02062 | Hemoglobin subunit beta | P68871 | 0.0493 | 10.5 |
| F6W2Y1 | Fibrinogen gamma chain | P02679 | 0.0193 | 27.5 |
| A0A3Q2HTG2 | Fibrinogen alpha chain | P02671 | 0.0247 | 20.0 |
| F6XVR0 | Sulfotransferase | P50225 | 0.0375 | 33.9 |
| H9GZN9 | Uncharacterized protein | P01871 | 0.0321 | 12.4 |

Supplementary table S2. Proteins significantly upregulated in EVs produced by LPS-stimulated neutrophils.

| Proteins upregulated by LPS in neutrophil-derived EVs | | | | |
|--|---|-----------------------|----------------|--------------------------------|
| Accession No. | Name | Human ortholog | p-value | Percentage of variation |
| A0A3Q2KJ87 | Bactericidal permeability-increasing protein | P17213 | 0.0009 | 68.4 |
| F7B3H1 | Procollagen-lysine 5-dioxygenase | O60568 | 0.0032 | 60.3 |
| F6VS59 | Parvin gamma | Q9HB10 | 0.0225 | 29.8 |
| F7DPD7 | Torsin | Q8N2E6 | <0.0001 | 71.9 |
| A0A3Q2L464 | Multiple inositol-polyphosphate phosphatase 1 | Q9UNW1 | 0.0025 | 43.5 |
| F6V0F7 | Hexosyltransferase | Q8N6G5 | 0.001 | 53.4 |
| F6VBP9 | Apolipoprotein E | P02649 | 0.0322 | 29.4 |
| A0A3Q2I4A5 | Elastase, neutrophil expressed | P08246 | 0.0018 | 65.4 |
| F7AED2 | Alpha-1-acid glycoprotein 2 | P19652 | 0.0431 | 22.2 |
| F7CQ86 | Alpha-1-acid glycoprotein 2 | P19652 | 0.0072 | 39.3 |
| A0A3Q2HNI5 | Glucosidase II alpha subunit | Q14697 | 0.0005 | 76.0 |
| A0A3Q2HWQ6 | Complement C3 | P01024 | 0.0007 | 64.4 |
| F7CE24 | Tetraspanin | Q8NG11 | 0.0002 | 72.7 |
| F6TIR2 | Lipocalin 2 | P80188 | 0.0026 | 51.4 |
| A0A5F5PES5 | Rho guanine nucleotide exchange factor 1 | Q92888 | 0.0018 | 40.0 |
| F7BAR6 | Transmembrane 9 superfamily member | Q9HD45 | 0.0102 | 31.6 |
| F6W1S0 | Resistin | Q9HD89 | 0.0003 | 46.7 |
| F6PYT5 | Transmembrane channel-like protein | Q8IU68 | 0.0007 | 45.3 |
| A0A3Q2GT20 | Versican | P13611 | 0.0069 | 46.6 |
| A0A3Q2LEE0 | Protease, serine 57 | Q6UWY2 | 0.0013 | 46.8 |

| | | | | |
|-------------------|--|--------|--------|------|
| F7DPZ6 | Olfactomedin 4 | Q6UX06 | 0.0005 | 39.4 |
| F7C5U7 | DENN domain containing 3 | A2RUS2 | 0.0087 | 36.8 |
| A0A3Q2I8H8 | Galectin-3-binding protein | Q08380 | 0.0368 | 42.5 |
| F6VFN4 | Sushi domain containing 3 | Q96L08 | 0.0002 | 62.3 |
| A0A3Q2LDY0 | Syntaxin 2 | P32856 | 0.0038 | 41.6 |
| F7E191 | Phospholipid-transporting ATPase | Q8TF62 | 0.0079 | 29.7 |
| F6XKR9 | Late endosomal/lysosomal adaptor and MAPK and MTOR activator 1 | Q6IAA8 | 0.0088 | 43.0 |
| F6Y9M7 | C-X-C chemokine receptor type 4 | P61073 | 0.0011 | 41.9 |
| F6TZ61 | Aldehyde dehydrogenase | P43353 | 0.0083 | 46.8 |
| F7CUM5 | Calcium and integrin binding 1 | Q99828 | 0.002 | 38.9 |
| A0A3Q2HS16 | ADAM metallopeptidase domain 8 | P78325 | 0.0026 | 35.3 |
| A0A3Q2HJN8 | Interleukin-1 | P18510 | 0.0025 | 66.6 |
| F6T7K7 | Transcobalamin 1 | P20061 | 0.0016 | 50.5 |
| F7E4J9 | Synaptotagmin like 1 | Q8IYJ3 | 0.004 | 44.4 |
| F7D6J0 | Myeloid associated differentiation marker | Q96S97 | 0.006 | 35.6 |
| F6Y4R0 | Thioredoxin related transmembrane protein 1 | Q9H3N1 | 0.0081 | 29.6 |
| A0A3Q2HBT4 | HORSE Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase | Q10471 | 0.0093 | 55.3 |
| F7C456 | CD177 antigen | Q8N6Q3 | 0.0004 | 55.9 |
| A0A3Q2H4P6 | Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 | P13688 | 0.0006 | 32.5 |
| A0A3Q2I5A5 | Beta-1,4-galactosyltransferase 1 | P15291 | 0.0048 | 52.2 |
| F7ADT4 | N-formyl peptide receptor 2 | P25090 | 0.0014 | 42.1 |
| F6YZ58 | Solute carrier organic anion transporter family member | Q6ZQN7 | 0.0216 | 33.2 |
| F6WUK1 | ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 1 | Q96P48 | 0.0369 | 24.5 |

| | | | | |
|-------------------|--|--------|---------|------|
| F6USJ2 | Phospholipid-transporting ATPase | Q9Y2Q0 | 0.0124 | 37.4 |
| Q9MYW3 | Toll-like receptor 4 | O00206 | 0.0004 | 42.1 |
| F7DTB6 | Karyopherin subunit beta 1 | Q14974 | 0.0008 | 59.6 |
| F7AGL5 | 92 kDa gelatinase (MMP9) | P14780 | 0.0067 | 53.7 |
| F6UG91 | Golgin A7 | Q7Z5G4 | 0.0027 | 48.4 |
| A0A5F5PKL6 | Cathepsin G | P08311 | 0.0009 | 75.5 |
| H9GZT7 | Extended synaptotagmin 2 | A0FGR8 | 0.0459 | 15.5 |
| F6SCH8 | Target of myb1 membrane trafficking protein | O60784 | 0.0008 | 45.2 |
| A0A3Q2GTF2 | Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 | P13688 | <0.0001 | 51.2 |
| F6T1X0 | Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 | P13688 | 0.0009 | 45.2 |
| F6XN76 | E3 ubiquitin-protein ligase | Q96J02 | 0.002 | 49.5 |
| F6R7B4 | Matrix metalloproteinase 1 (MMP1) | P03956 | 0.0461 | 31.7 |
| A0A3Q2GS71 | Alpha-1-acid glycoprotein 2 | P19652 | 0.0266 | 24.9 |
| A0A5F5Q329 | Ribosomal protein S6 kinase | Q15349 | 0.0051 | 21.5 |
| F6QGF7 | DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member | Q9H3Z4 | 0.0001 | 44.5 |
| F7BK19 | Toll interacting protein | Q9H0E2 | 0.0032 | 55.2 |
| O77811 | Lactotransferrin (Fragment) | P02788 | 0.0003 | 56.1 |
| A0A3Q2GSF8 | Nucleosome assembly protein 1 like 1 | P55209 | 0.0335 | 5.7 |
| A0A5F5PT74 | Paxillin | P49023 | 0.0126 | 30.8 |
| A0A5F5PJ10 | Drebrin like | Q9UJU6 | 0.0130 | 32.1 |
| A0A3Q2HVS2 | RAB11 family interacting protein 1 | Q6WKZ4 | 0.028 | 17.0 |
| F7B4U0 | Disco interacting protein 2 homolog B | Q9P265 | 0.0005 | 39.9 |
| F6U6V3 | Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 | O14672 | 0.0004 | 59.6 |
| F6XWM5 | Haptoglobin | P00738 | 0.0017 | 34.2 |

| | | | | |
|-------------------|--|--------|--------|-------|
| A0A3Q2H2V4 | HECT-type E3 ubiquitin transferase | P46934 | 0.0063 | 21.4 |
| F7BTZ8 | Atlastin GTPase 3 | Q6DD88 | 0.0302 | 25.8 |
| F6YTR6 | Rhomboid 5 homolog 2 | Q6PJF5 | 0.0038 | 41.4 |
| F6U8J5 | Sialic acid-binding Ig-like lectin 5 | O15389 | 0.0045 | 52.6 |
| A0A3Q2GWA2 | Thioredoxin interacting protein | Q9H3M7 | 0.0102 | 35.3 |
| F7D1W9 | Ficolin-1 | O00602 | 0.0148 | 47.5 |
| F6RIG2 | ADP ribosylation factor like GTPase 8B | Q9NVJ2 | 0.0262 | 26.0 |
| A0A3Q2HG96 | ADAM metallopeptidase domain 17 | P78536 | 0.0029 | 40.1 |
| A0A3Q2HGY5 | Tyrosine-protein kinase | P41240 | 0.0137 | 26.1 |
| A0A3Q2GTT1 | Ribosomal protein S6 kinase | Q15418 | 0.0398 | 13.0 |
| F7B7Q0 | Dedicator of cytokinesis 2 | Q92608 | 0.01 | 20.9 |
| A0A3Q2I8S7 | Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1B | Q5T764 | 0.0059 | 44.4 |
| F6YTU4 | Docking protein 3 | Q7L591 | 0.0111 | 27.4 |
| F7CGD4 | Non-specific protein-tyrosine kinase | Q14289 | | |
| A0A3Q2GSP8 | Signal regulatory protein alpha | P78324 | 0.0011 | 20.18 |
| F7DB64 | Cytochrome b-245 light chain | P13498 | 0.0375 | 16.7 |
| F6U8Z5 | Calcium binding protein 39 | Q9Y376 | 0.0015 | 35.8 |
| A0A3Q2HZX9 | Azurocidin 1 | P20160 | 0.0028 | 41.2 |
| A0A3Q2I177 | Pleckstrin homology domain containing O2 | Q8TD55 | 0.0008 | 30.3 |
| A0A3Q2HVB6 | Complement component 4 binding protein alpha | P04003 | 0.0106 | 49.6 |
| F6ZNQ1 | Regulator of G protein signaling 14 | O43566 | 0.0013 | 19.9 |
| F6QXT2 | VAMP associated protein A | Q9P0L0 | 0.0118 | 13.7 |
| F7B7M3 | Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-interacting protein | Q8IWB1 | 0.0137 | 28.5 |
| A0A3Q2LPJ8 | Adhesion G protein-coupled receptor E1 | Q14246 | 0.0004 | 49.8 |

| | | | | |
|-------------------|---|--------|---------|------|
| A0A3Q2I7B5 | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 | O95819 | 0.0035 | 40.9 |
| F6U8F1 | Formin like 1 | O95466 | <0.0001 | 45.8 |
| F6RBQ4 | Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 | O75355 | 0.0002 | 26.4 |
| F6WSK2 | Sialic acid-binding Ig-like lectin 5 | O15389 | <0.0001 | 45.3 |
| F7AT17 | Tyrosine-protein kinase | P08631 | 0.0002 | 47.8 |
| A0A5F5PWD5 | Serine/threonine kinase 26 | Q9P289 | 0.0191 | 12.7 |
| A0A3Q2I8D8 | Glia-derived nexin | P07093 | 0.0053 | 53.3 |
| A0A5F5PG05 | Integrin beta | P05107 | <0.0001 | 44.2 |
| F6WQL1 | Ecotropic viral integration site 2B | P34910 | 0.0232 | 12.7 |
| F7A0H6 | Folate receptor beta | P14207 | 0.0002 | 46.1 |
| F7AA00 | GRB2 binding adaptor protein, transmembrane | Q8N292 | 0.0002 | 29.5 |
| F7DA90 | Cytochrome b-245 beta chain | P04839 | <0.0001 | 47.9 |
| F7AZ73 | Syntaxin binding protein 2 | Q15833 | 0.0077 | 26.5 |
| F6QC17 | V-set immunoregulatory receptor | Q9H7M9 | 0.0063 | 21.5 |
| A0A5F5PLR4 | 2,3-cyclic-nucleotide 3-phosphodiesterase | P09543 | 0.004 | 30.8 |
| F6TLH4 | Secretory carrier-associated membrane protein | O15127 | 0.0049 | 34.7 |
| A0A5F5PF14 | Brain abundant membrane attached signal protein 1 | P80723 | 0.0001 | 21.3 |
| F6PUW3 | Maltase-glucoamylase | O43451 | <0.0001 | 27.0 |
| A0A3Q2HN26 | Pleckstrin | P08567 | 0.0004 | 38.7 |
| F7CK20 | Tyrosine-protein kinase | P09769 | 0.0006 | 46.4 |
| F7BQS3 | Growth factor receptor bound protein 2 | P62993 | 0.0042 | 33.8 |
| A0A3Q2IBB5 | Golgi apparatus protein 1 | Q92896 | 0.0128 | 35.0 |
| F7BBA7 | Solute carrier family 44 member 2 | Q8IWA5 | 0.0004 | 39.4 |
| F6RA08 | Stomatin | P27105 | 0.0297 | 22.4 |

| | | | | |
|-------------------|--|--------|---------|------|
| F6XAB0 | Synaptosomal-associated protein | O00161 | 0.0014 | 33.5 |
| F7ASL2 | DNAX-activation protein 12 | O43914 | 0.0003 | 23.8 |
| F6QRY3 | Peptide-methionine (S)-S-oxide reductase | Q9UJ68 | 0.0047 | 37.6 |
| F6PM31 | Leukocyte specific transcript 1 | O00453 | 0.0008 | 20.7 |
| A0A3Q2L513 | Sialic acid-binding Ig-like lectin 14 | Q08ET2 | 0.0005 | 36.8 |
| F6WA92 | RAB5B, member RAS oncogene family | P61020 | 0.0019 | 30.4 |
| F7AQZ6 | Tyrosine-protein kinase | P07948 | 0.0004 | 47.0 |
| F6Z904 | RAB5A, member RAS oncogene family | P20339 | 0.0005 | 26.7 |
| A0A5F5PWB4 | Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type | P29350 | <0.0001 | 48.2 |
| F6RL28 | Protein XRP2 | O75695 | 0.0003 | 42.9 |
| F6YW90 | Urokinase plasminogen activator surface receptor | Q03405 | 0.0043 | 29.0 |
| A0A5F5Q058 | Pleckstrin homology domain containing B2 | Q96CS7 | 0.014 | 33.7 |
| F6Y9X0 | Hydrogen voltage-gated channel 1 | Q96D96 | 0.0004 | 43.7 |
| A0A3Q2HX75 | Semaphorin 7A | O75326 | 0.0153 | 29.6 |
| F6PNU9 | ADP-ribosylation factor 6 | P62330 | <0.0001 | 38.4 |
| A0A5F5PRD3 | Non-specific serine/threonine protein kinase | O94804 | 0.0032 | 17.7 |
| A0A3Q2GZC0 | Cysteine rich secretory protein LCCL domain containing 2 | Q9H0B8 | 0.0021 | 49.2 |
| F6QK77 | Deoxyribonuclease | P49184 | <0.0001 | 36.1 |
| A0A3Q2LJE9 | Nicastrin | Q92542 | 0.0124 | 17.1 |
| A0A3Q2GYF6 | Protein-tyrosine-phosphatase | P08575 | <0.0001 | 32.4 |
| F6S0P5 | ADP ribosylation factor 4 | P18085 | 0.0368 | 29.5 |
| F7DGE2 | Vesicle-fusing ATPase | P46459 | 0.0208 | 22.3 |
| F6QUD4 | Wiskott-Aldrich syndrome protein family member | Q9Y6W5 | 0.0021 | 29.2 |

| | | | | |
|-------------------|---|--------|--------|------|
| A0A3Q2HC74 | Plexin C1 | O60486 | 0.0002 | 28.4 |
| F7CEP4 | G protein-coupled receptor kinase | P43250 | 0.0027 | 23.6 |
| F6PM70 | Arachidonate 5-lipoxygenase | P09917 | 0.0061 | 28.1 |
| F6U4Y1 | TNF alpha induced protein 8 | O95379 | 0.0035 | 16.6 |
| A0A3Q2IDH0 | CMRF35-like molecule 1 | Q8TDQ1 | 0.0488 | 23.2 |
| F6SP02 | 14-3-3 protein theta | P27348 | 0.0203 | 37.6 |
| F6X8Y3 | GNAS complex locus | P63092 | 0.0015 | 32.0 |
| F6VWQ7 | Thymocyte selection associated family member 2 | Q5TEJ8 | 0.0121 | 27.1 |
| F6YR57 | Vesicle associated membrane protein 8 | Q9BV40 | 0.0163 | 33.9 |
| F6R869 | Pre-mRNA processing factor 38B | Q5VTL8 | 0.0014 | 22.5 |
| A0A3Q2I008 | Ras-related protein Rap-2 | P61225 | 0.0008 | 49.6 |
| A0A5F5PWD2 | RAB18, member RAS oncogene family | Q9NP72 | 0.0179 | 25.2 |
| F6YSK7 | Myristoylated alanine rich protein kinase C substrate | P29966 | 0.0116 | 20.5 |
| A0A3Q2HV04 | Reticulon | Q9NQC3 | 0.0146 | 30.7 |
| F6VYP4 | Abl interactor 1 | Q8IZP0 | 0.0012 | 19.3 |
| F7B9Q9 | Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 2 | Q9UNF0 | 0.0037 | 19.8 |
| A0A3Q2GTT9 | Macrophage-capping protein | P40121 | 0.0003 | 18.9 |
| F6TGW2 | Histidine ammonia-lyase | P42357 | 0.0489 | 22.7 |
| A0A3Q2HM94 | Solute carrier family 2 member 3 | P11169 | 0.0001 | 37.1 |
| F6PSF7 | Triggering receptor expressed on myeloid cells 1 | Q9NP99 | 0.0003 | 39.0 |
| F6QB61 | Peptidoglycan-recognition protein | O75594 | 0.0041 | 32.9 |
| F7B1Q3 | N-formyl peptide receptor 2-like | P25090 | 0.0004 | 44.2 |

Supplementary table S3. Proteins significantly upregulated in EVs produced by LPS-stimulated neutrophils, only during asthmatic exacerbation.

| Proteins upregulated by LPS only or more during the exacerbation phase of the disease in neutrophil-derived EVs | | | | |
|--|---|-----------------------|-----------------|---------------------------------|
| Accession No. | Name | Human ortholog | p-value* | Percentage of variation* |
| F6WZ50 | Splicing factor 3b subunit 1 | O75533 | 0.0034 | 4.3 |
| F7E0S8 | Regulator of G protein signaling 19 | P49795 | 0.0151 | 13.0 |
| F6T0R5 | V-type proton ATPase subunit a | Q13488 | 0.0179 | 3.8 |
| A0A3Q2I8C1 | Phosphoglucomutase 2 | Q96G03 | 0.0075 | 16.5 |
| A0A3Q2HG96 | ADAM metallopeptidase domain 17 | P78536 | 0.0135 | 5.5 |
| F6WQL1 | Ecotropic viral integration site 2B | P34910 | 0.0067 | 9.2 |
| F6YTU4 | Docking protein 3 | Q7L591 | 0.042 | 14.1 |
| A0A3Q2I427 | Leucine rich alpha-2-glycoprotein 1 | P02750 | 0.0286 | 15.7 |
| F7CUM5 | Calcium and integrin binding 1 | Q99828 | 0.0259 | 1.1 |
| F6U8J5 | Sialic acid-binding Ig-like lectin 5 | O15389 | 0.0176 | 6.8 |
| F7B7Q0 | Dedicator of cytokinesis 2 | Q92608 | 0.0422 | 3.4 |
| A0A3Q2I7B5 | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4 | O95819 | 0.003 | 9.7 |
| F6U8F1 | Formin like 1 | O95466 | 0.0269 | 4.4 |
| F7BQS3 | Growth factor receptor bound protein 2 | P62993 | 0.0455 | 5.1 |
| F6QRY3 | Peptide-methionine (S)-S-oxide reductase | Q9UJ68 | 0.0491 | 4.8 |
| F6WA92 | RAB5B, member RAS oncogene family | P61020 | 0.0364 | 3.3 |
| F7AQZ6 | Tyrosine-protein kinase | P07948 | 0.0334 | 1.7 |
| F6RL28 | Protein XRP2 | O75695 | 0.0317 | 1.9 |
| A0A3Q2LJE9 | Nicastrin | Q92542 | 0.0115 | 2.9 |
| A0A3Q2HC74 | Plexin C1 | O60486 | 0.0469 | 2.7 |

| | | | | |
|--|---|--------|--------|------|
| F7CEP4 | G protein-coupled receptor kinase | P43250 | 0.0143 | 0.81 |
| A0A3Q2I008 | Ras-related protein Rap-2 | P61225 | 0.0244 | 3.5 |
| A0A3Q2GTT9 | Macrophage-capping protein | P40121 | 0.0038 | 20.9 |
| F6YSK7 | Myristoylated alanine rich protein kinase C substrate | P29966 | 0.0189 | 5.5 |
| * p-value and % of variation of the factor interaction of the disease status and cell treatment | | | | |

Supplementary table S4. Biological processes enriched in proteins from neutrophil-derived EVs stimulated with LPS.

| Biological processes enriched in proteins from neutrophil-derived EVs stimulated with LPS | | |
|--|--|--|
| Downregulation by LPS | | |
| Biological process | Description | Proteins involved (symbol) |
| GO:0062023 | Collagen-containing extracellular matrix | ANXA7, ANXA11, SERPINC1, COL1A1, COL1A2, COL6A1, FGA, FGB, FGG, FN1, SPARC, VWF, SPARCL1 |
| GO:0031091 | Platelet alpha granule | FGA, FGB, FGG, FN1, ITGA2B, ITGB3, SPARC, VWF, GP1BB, HBB, SERPINC1, COL1A1, SLC2A1, ITGA6, SELL, SPARCL1, VNN1, EPX, GCA, ANXA7, TBXAS1, RBP4, SRI, COL1A2, ABCC1, ANXA11, IGFBP2, PEF1, STAM, ARHGEF5, SULT1A1 |
| GO:0002020 | Protease binding | SERPINC1, COL1A1, COL1A2, FN1, ITGB3, SELL, SRI, VWF, SULT1A1 |
| GO:0019838 | Growth factor binding | COL1A1, COL1A2, COL6A1, IGFBP2, ITGA6, ITGB3, ANXA7, FN1, ITGA2B, VWF, SPARC, SPARCL1, GP1BB, RBP4 |
| GO:0030667 | Secretory granule membrane | ANXA7, ITGA2B, ITGB3, SELL, SPARC, SRI, VNN1 |
| GO:0043589 | Skin morphogenesis | COL1A1, COL1A2, ITGA6, COL6A1, GP1BB, RBP4, ABCC1 |
| GO:0005509 | Calcium ion binding | ANXA7, ANXA11, SELL, SPARC, SRI, SPARCL1, GCA, PEF1 |
| GO:0090482 | Vitamin transmembrane transporter activity | ABCC1, RBP4, SLC2A1, VNN1, FN1, IGFBP2 |
| GO:0006979 | Response to oxidative stress | COL1A1, HBB, ABCC1, EPX, VNN1, TBXAS1 |
| GO:0050900 | Leukocyte migration | ITGA6, SELL, ARHGEF5, EPX |
| GO:0032526 | Response to retinoic acid | COL1A1, IGFBP2, RBP4, ABCC1, SULT1A1, SLC2A1 |

| | | |
|----------------------------|-------------------------------|---|
| GO:0042470 | Melanosome | ANXA11, ITGB3, SLC2A1 |
| GO:0008289 | Lipid binding | ANXA7, ANXA11, RBP4, SELL, ARHGEF5, STAM |
| GO:0042383 | Sarcolemma | COL6A1, SLC2A1, SRI |
| GO:0005766 | Primary lysosome | ANXA11, VNN1, GCA |
| GO:0050865 | Regulation of cell activation | FGG, FN1, GP1BB, IGFBP2, VNN1 |
| GO:0030139 | Endocytic vesicle | ANXA11, HBB, SPARC |
| Upregulation by LPS | | |
| GO:0042581 | Specific granule | ADAM8, ADAM10, ALDH3B1, CEACAM1, BPI, CYBA, CYBB, DNASE1L1, DOCK2, ELANE, STOM, FPR2, HP, ITGB2, KPNB1, LCN2, LTF, ORM2, PLAUR, PTPN6, RAP2B, SLC2A3, STK10, STXBP2, TCN1, VAMP8, SNAP23, PGLYRP1, TOM1, ATP8A1, OLFM4, TOLLIP, LAMTOR1, RETN, CD177, SLC44A2, ATP8B4, DNAJC5, TSPAN14, HVCN1, SLCO4C1, AZU1, B4GALT1, PTPRC, RAB5B, TYROBP, SIGLEC5, MGAM, VAPA, RAB18, NCSTN, DOK3, SIRPA, SIGLEC14, MMP9, DBNL, GOLGA7 |
| GO:0005766 | Primary lysosome | AZU1, BPI, C3, CTSG, ELANE, STOM, B4GALT1, ORM2, STXBP2, VAMP8, SNAP23, VAPA, TOM1, ATP8A1, NCSTN, TOLLIP, LAMTOR1, RETN, DNAJC5, SLCO4C1, PRSS57, ADAM8, VCAN, HCK, LYN, NSF, CXCR4, ARL8B, SLC44A2 |
| GO:0034774 | Secretory granule lumen | ALOX5, AZU1, BPI, C3, CTSG, DNASE1L1, DOCK2, ELANE, FCN1, FGR, HP, KPNB1, LCN2, LGALS3BP, LTF, ORM2, PTPN6, TCN1, PGLYRP1, OLFM4, DBNL, CAB39, TOLLIP, RETN, CRISPLD2, PRSS57, VCAN |
| GO:0101002 | Ficolin-1-rich granule | ADAM8, ALOX5, FCN1, FPR2, ITGB2, KPNB1, MMP9, SLC2A3, SIGLEC5, MGAM, DBNL, CAB39, LAMTOR1, DOK3, PLEKHO2, CRISPLD2, SIRPA, SIGLEC14 |
| GO:0006954 | Inflammatory response | ADAM8, ALOX5, AZU1, C3, CYBA, CYBB, ELANE, FOLR2, FPR2, B4GALT1, HCK, HP, IL1RN, ITGB2, LYN, ORM2, TLR4, TYROBP, CXCR4, SEMA7A, SNAP23, THEMIS2, TREM1, TOLLIP, ITCH |

| | | |
|-------------------|---|--|
| GO:0060627 | Regulation of vesicle-mediated transport | APOE, ARF6, AZU1, CEACAM1, C3, CSK, CYBA, DOCK2, FCN1, FGR, FPR2, HCK, ITGB2, LYN, NSF, PTPRC, RAB5A, RAB5B, STXBP2, VAMP8, PACSIN2, CD177, DNAJC5, SIRPA, CD300LF, ADAM8, ALOX5, ELANE, MMP9, PTPN6, TLR4, TYROBP, SEMA7A, PGLYRP1, RHBDF2, ITCH, IFIT1B, LTF, SERPINE2 |
| GO:0050865 | Regulation of cell activation | ADAM8, APOE, CEACAM1, BPI, CSK, CTSG, FGR, ITGB2, LYN, SERPINE2, PLEK, PTPN6, PTPRC, RPS6KA1, STXBP2, TLR4, TYROBP, LST1, VAMP8, PGLYRP1, THEMIS2, CD177, VSIR, ITCH, SIRPA, CD300LF, ADAM10, ALOX5, AZU1, ELANE, PTK2B, IL1RN, PLAUR, CXCR4, MAP4K4, PLXNC1, CIB1, OLFM4, MYADM, C4BPA, HCK, LTF, RHBDF2, C3, FCN1, SEMA7A, EVI2B, B4GALT1, RPS6KA2, ABI1 |
| GO:0002252 | Immune effector process | AZU1, C3, C4BPA, CTSG, DOCK2, ELANE, PTK2B, FCN1, FGR, HCK, LYN, PTPN6, STXBP2, ADAM17, TLR4, TYROBP, SNAP23, TREM1, ARL8B, GAPT, CSK, ADGRE1, DBNL |
| GO:0031252 | Cell leading edge | ARF4, ARF6, CAPG, STX2, PTK2B, FGR, PLEK, PXN, RAB5A, ADAM17, TLR4, CXCR4, ABI1, WASF2, CIB1, PACSIN2, DBNL, CD177, MYADM, CEACAM1, B4GALT1, SYTL1 |
| GO:0030139 | Endocytic vesicle | ADAM8, APOE, ARF6, FMNL1, CYBA, CYBB, ELANE, HP, LTF, LYN, RAB5A, RAB5B, VAMP8, SNAP23, PGLYRP1, RAB11FIP1, HVCN1 |
| GO:1904724 | Tertiary granule lumen | HP, LTF, MMP9, PTPN6, TCN1, PGLYRP1, OLFM4, DBNL, GOLGA7, APOE |
| GO:2000377 | Regulation of reactive oxygen species metabolic process | ALOX5, ARF4, CYBA, PTK2B, FPR2, GRB2, HP, ITGB2, TLR4, TYROBP, CD177, HVCN1, AZU1, FOLR2, LGALS3BP, APOE, KPNB1, CD300LF |
| GO:0050900 | Leukocyte migration | ADAM8, ALOX5, AZU1, CTSG, ELANE, B4GALT1, HCK, ITGB2, LYN, MMP9, CXCR4, TREM1, CD177, SIRPA, DOCK2, FPR2, PLAUR, SEMA7A, PLXNC1 |
| GO:1903555 | Regulation of tumor necrosis factor superfamily cytokine production | ADAM8, AZU1, BPI, CYBA, CYBB, LTF, ORM2, PTPN6, PTPRC, TLR4, TYROBP, VSIR, SIRPA, C3, |

| | | |
|--|--|--|
| | | ELANE, FCN1, FGR, ADAM17, SEMA7A, CEACAM1 |
| GO:0001775 | Cell activation | ADAM10, AZU1, CTSG, DOCK2, PTK2B, FPR2, GNAS, ITGB2, LYN, PLEK, PTPN6, PTPRC, RAP2B, STXBP2, ADAM17, TLR4, TYROBP, SNAP23, NCSTN, TOLLIP, GAPT, HCK |
| GO:0040017 | Positive regulation of locomotion | ADAM8, ADAM10, ARF6, AZU1, PTK2B, FGR, FPR2, LYN, MMP9, PTPRC, ADAM17, TLR4, CXCR4, SEMA7A, MAP4K4, ATP8A1, CIB1, RTN4, VSIR, MYADM, APOE, CEACAM1, CSK, ELANE, LTF, PTPN6, RAP2B, ABI1, RGS14, CAB39, GRB2, LAMTOR1, ITCH, SIRPA, C3, PLAUR |
| GO:0001906 | Cell killing | AZU1, C3, CTSG, ELANE, LTF, PTPN6, STXBP2, PGLYRP1, TREM1, ARL8B, LYN, ADAM17, SNAP23, APOE, STOM, CXCR4, VAMP8, VAPA, ITCH, BPI, C4BPA, CNP, FGR, FPR2, HCK, HP, LCN2, TLR4, SIRPA, VCAN, SERPINE2, PTPRC, CRISPLD2, PRSS57, ALOX5, FCN1 |
| GO:0001558 | Regulation of cell growth | ADAM10, APOE, CEACAM1, CYBA, PTK2B, SERPINE2, RPS6KA1, ADAM17, CXCR4, SEMA7A, CIB1, DBNL, LAMTOR1, RTN4, DIP2B, ITCH, TMC8, BASP1, ARF4, CYBB, NEDD4, NSF, RAB5A, RGS14, SLC2A3 |
| GO:0005925 | Focal adhesion | ADAM10, ARF6, CYBA, PTK2B, HCK, ITGB2, MARCKS, PLAUR, PTPRC, PXN, ADAM17, SNAP23, MAP4K4, YWHAQ, PACSIN2, NCSTN, PARVG |
| GO:0050778 | Positive regulation of immune response | ADAM8, C3, C4BPA, CSK, CTSG, ELANE, FCN1, FGR, FPR2, HCK, ITGB2, LYN, PTPN6, PTPRC, TLR4, TYROBP, VAMP8, THEMIS2, CD177, APOE, CEACAM1, CYBA, LTF, ITCH, IFIT1B, ADAM10, AZU1, PTK2B, ADAM17, CXCR4, CD300LF, RAB5A, ARL8B, FOLR2, STK26 |
| Only or more upregulated by LPS during exacerbation | | |
| GO:0030667 | Secretory granule membrane | RAB5B, RAP2B, SIGLEC5, TCIRG1, NCSTN, DOK3, CAPG, RGS19, RP2 |
| GO:0070820 | Tertiary granule | RAP2B, SIGLEC5, TCIRG1, DOK3, LRG1, PGM2 |

| | | |
|-------------------|--|---|
| GO:0007264 | Small GTPase mediated signal transduction | DOCK2, GRB2, RAP2B, RGS19, DOK3 |
| GO:0070851 | Growth factor receptor binding | GRB2, LYN, ADAM17, NCSTN, RAP2B, RGS19, CAPG, DOK3, LRG1 |
| GO:0030097 | Hemopoiesis | DOCK2, EVI2B, LYN, ADAM17, TCIRG1, CIB1, RAP2B, NCSTN, FMNL1, RAB5B |
| GO:0030099 | Myeloid cell differentiation | EVI2B, LYN, TCIRG1, CIB1, ADAM17, MAP4K4, PLXNC1, RAP2B, GRB2 |
| GO:0030036 | Actin cytoskeleton organization | FMNL1, CAPG, DOCK2, GRB2, MARCKS |
| GO:0042581 | Specific granule | DOCK2, RAP2B, LRG1, PGM2 |
| GO:0005925 | Focal adhesion | MARCKS, ADAM17, MAP4K4, NCSTN |
| GO:0001726 | Ruffle | CAPG, ADAM17, CIB1, MARCKS, MSRA, LYN |
| GO:0031267 | Small GTPase binding | FMNL1, DOCK2, CIB1, PLXNC1 |
| GO:0016773 | Phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor | GRK6, LYN, MAP4K4, PGM2 |
| GO:0030674 | Protein-macromolecule adaptor activity | GRB2, CIB1, NCSTN, CAPG, MARCKS |
| GO:0006897 | Endocytosis | DOCK2, GRB2, RAB5B, LYN |

Discussion générale

Retour sur les objectifs de la thèse

Les études réalisées dans ce projet doctoral ont permis de répondre aux objectifs spécifiques prévus. D'abord, l'article de revue sur l'utilisation des GC dans l'asthme équin a mis en évidence leur efficacité pour améliorer la fonction pulmonaire, mais a aussi démontré qu'ils sont insuffisants pour contrôler la neutrophilie et renverser entièrement les lésions de remodelage, tel qu'observé dans l'asthme humain. Le deuxième objectif d'identifier une thérapie permettant de contrôler l'inflammation neutrophilique a été partiellement atteint puisque certains traitements étudiés ont atténué, mais sans normaliser complètement la neutrophilie pulmonaire. Effectivement, le tamoxifène s'est avéré inefficace dans ce rôle, mais la capacité des macrolides à diminuer l'expression de médiateurs neutrophiliques dans l'asthme a été confirmée, bien qu'un court traitement en monothérapie (10 jours) n'ait pas été suffisant pour réduire l'obstruction bronchique et les lésions de remodelage dans les bronches centrales. Les données obtenues ont tout de même justifié l'élaboration du projet expérimental subséquent où l'effet de l'administration à long terme (cinq mois) d'azithromycine combinée à la fluticasone (comparativement à la fluticasone seule) a été évalué, dans le but de déterminer si le contrôle prolongé de la neutrophilie par les macrolides permettrait d'amoindrir la sévérité du remodelage bronchique. Effectivement, les effets cliniques bénéfiques des macrolides dans l'asthme sévère sont généralement observés après plusieurs mois de traitement. Toutefois, malgré l'atténuation de l'inflammation pulmonaire obtenue par l'administration d'azithromycine combinée aux CSI, les effets des GC sur la fonction pulmonaire et sur la réduction de la masse du muscle lisse n'ont pas été potentialisés, illustrant la complexité de l'interaction entre l'inflammation et le remodelage dans l'asthme. Cependant, le simple dénombrement des neutrophiles est possiblement une méthode trop élémentaire pour évaluer leurs conséquences potentielles. C'est avec cette dernière considération que l'étude 5 a été entamée, avec comme objectif d'investiguer un aspect précis de la biologie des neutrophiles, soit la contribution des vésicules extracellulaires à la prolifération du MLB. Cette étude a permis d'identifier des mécanismes potentiellement impliqués dans l'effet mitogène des vésicules extracellulaires provenant de neutrophiles activés, mais davantage d'investigations sont requises pour clarifier leur impact réel dans l'asthme.

Réflexions sur les résultats obtenus

Une diminution de l'inflammation neutrophilique n'améliore pas la réduction de la masse du muscle lisse bronchique obtenue par l'administration de glucocorticoïdes inhalés

Puisque les lésions architecturales des bronches sont une conséquence présumée de l'inflammation chronique, l'hypothèse générale de cette thèse était que la diminution de la neutrophilie pulmonaire résulterait en une atténuation des lésions de remodelage. Toutefois, cette hypothèse est réfutée puisque les macrolides n'ont pas potentialisé l'effet des CSI sur la réduction de la masse du MLB, ni de la matrice extracellulaire, dans l'AES malgré leur capacité à amoindrir la neutrophilie pulmonaire (article 4, p.204 (558)) ou ses médiateurs cytokiniques (article 3, p.173 (557)).

Il est envisageable que la réduction de l'inflammation neutrophilique ne suffise pas à rétablir l'homéostasie tissulaire une fois les lésions architecturales chroniquement établies (559). Effectivement, le changement phénotypique du muscle lisse vers un profil synthétique pourrait autoentretenir la prolifération et l'inflammation locale (269). Si tel est le cas, des thérapies ciblant directement la réduction de la masse du MLB, comme des traitements pharmacologiques visant la prolifération des cellules musculaires lisses ou bien la thermoplastie bronchique, seraient possiblement préférables pour renverser les lésions de remodelage. Cette dernière technique consiste en l'insertion endoscopique d'une sonde à radiofréquence avec laquelle une hyperthermie locale au niveau des bronches est créée. Ceci engendre une réduction de l'aire du MLB, de l'épaisseur de la membrane basale et de l'innervation bronchique (560-563). Ces modifications structurelles par la thermoplastie bronchique s'accompagnent d'une diminution de certains marqueurs inflammatoires pulmonaires (563), suggérant que les lésions de remodelage pourraient être la cause et non une conséquence de l'inflammation. Cette option thérapeutique pourrait éventuellement bénéficier aux patients souffrant du phénotype neutrophilique puisqu'elle est réservée aux asthmatiques sévères caractérisés par l'endotype non-T2, et qui ne sont donc pas éligibles aux thérapies biologiques (106). Cette thérapie permet de réduire la dose de GC, de diminuer la fréquence d'exacerbation et d'améliorer la qualité de vie chez les

asthmatiques sévères (320), avec des effets bénéfiques persistants jusqu'à plus de 10 ans après le traitement (564), illustrant l'importance de cibler directement le remodelage dans l'asthme.

Alternativement, l'inflammation pourrait contribuer surtout au développement initial du remodelage, et n'avoir qu'un rôle mineur, ou même aucun impact sur l'entretien des lésions chroniques. Ceci n'a pas été évalué dans cette thèse étant donné l'inclusion exclusive de chevaux atteints d'asthme sévère avec un remodelage bronchique chronique; des études longitudinales qui évalueraient des patients avant même le développement de la maladie seraient requises pour explorer cette hypothèse. Enfin, il est possible que l'augmentation de la masse du muscle lisse soit présente dès la naissance ou très tôt dans la vie, comme le suggèrent des études effectuées chez des enfants asthmatiques et qui laissent présumer que l'inflammation n'est pas impliquée dans le développement du remodelage (200). Le fait que la sévérité de l'asthme atteigne généralement un plateau, et que la masse du muscle lisse soit plutôt liée à la sévérité et non à la durée de l'asthme est compatible avec cette proposition (3).

Une limite à l'interprétation des données de cette thèse est que la neutrophilie pulmonaire n'a pas été complètement normalisée par l'azithromycine administrée seule (article 3) ou combinée à la fluticasone (article 4). Il est donc possible que l'inflammation résiduelle ait été suffisante pour entretenir les lésions de remodelage. Effectivement, la neutrophilie pulmonaire a été améliorée après deux semaines et normalisée à la fin de la période de traitement chez 4/6 chevaux recevant la combinaison de macrolide et de CSI, mais des augmentations transitoires de la neutrophilie se sont produites chez la plupart des individus au courant de l'étude. L'administration d'une thérapie qui supprime l'inflammation neutrophilique de façon encore plus prolongée et soutenue pourrait permettre de conclure plus aisément sur le rôle de ce leucocyte. Cependant, un tel traitement pourrait aussi s'avérer risqué étant donné l'implication essentielle des neutrophiles à l'immunité innée et à la protection contre les infections. La variation temporelle de l'inflammation neutrophilique dans l'étude 4 est une conséquence probable d'un changement naturel du degré d'exposition antigénique. Même si les conditions alimentaires et de régimes étaient fixes lors des études expérimentales, certains paramètres ne peuvent pas être contrôlés, comme la température extérieure, l'humidité ou la concentration d'antigènes présents dans le foin (même s'il provient d'une même source). Bien que ceci complique l'interprétation des données, la

variation de l'exposition antigénique reflète la réalité clinique et pourrait contribuer à une meilleure translation des résultats chez l'humain des études effectuées chez l'espèce équine.

Bien que l'atténuation de l'inflammation n'ait pas engendré une amélioration concomitante du remodelage et de la fonction pulmonaire dans les études de ce projet doctoral, il demeure pertinent de rappeler que dans l'article 4, le degré de neutrophilie pulmonaire était corrélé à l'obstruction respiratoire, et que plus il était marqué, moins la réponse clinique aux CSI était satisfaisante (558). Ceci suggère que l'inflammation peut moduler certaines propriétés des cellules musculaires lisses, comme leur force contractile et la propension au bronchospasme, des paramètres qui n'ont pas été directement évalués dans cette thèse. L'association de la neutrophilie avec une moins bonne réponse au traitement indique aussi que les conséquences de l'infiltration cellulaire peuvent se prolonger dans le temps, puisque le degré de neutrophilie au début de l'étude a influencé la réponse thérapeutique mesurée cinq mois plus tard.

Les études précédemment effectuées chez le modèle de l'AES n'avaient pas été conçues pour évaluer le rôle de la neutrophilie dans le remodelage, mais les résultats existants suggéraient déjà une dissociation entre le contrôle de l'inflammation pulmonaire et de la masse du MLB. Effectivement, un retrait antigénique a amélioré la fonction pulmonaire après un mois, a normalisé la neutrophilie après six mois, mais ce n'est qu'après un an que la masse du muscle lisse a diminué (357). Inversement, dans cette même étude, la fluticasone a diminué la masse du MLB à partir de 6 mois de traitement, sans aucune atténuation de l'inflammation neutrophilique (357). Encore chez le modèle équin, la combinaison de fluticasone et de salmétérol a amélioré la fonction pulmonaire dès une semaine de traitement, la neutrophilie après huit semaines, mais ce n'est qu'après trois mois que la masse du MLB a diminué, dans une proportion similaire à ce qui a été observé avec la fluticasone seule, qui elle n'a pas atténué la neutrophilie (435). Ces derniers résultats, et ceux obtenus dans cette thèse, concordent avec plusieurs études réalisées dans l'asthme humain où des thérapies ciblant spécifiquement l'inflammation neutrophilique ont eu des résultats cliniques mitigés qui ne permettent pas de conclure définitivement sur l'importance du neutrophile dans l'asthme. Par exemple, l'administration d'inhibiteur des récepteurs CXCR2, un ligand de la chimiokine CXCL8, réduit la neutrophilie dans les expectorations d'asthmatiques sévères et diminue le nombre d'exacerbations légères, mais sans améliorer la fonction

pulmonaire (119). Il convient toutefois de noter que le traitement était relativement court (quatre semaines), et que des marqueurs d'activation neutrophilique (élastase, MPO et CXCL8) n'étaient pas atténués, indiquant que le simple dénombrement des neutrophiles est peut-être insuffisant pour caractériser leurs répercussions potentielles. Un autre antagoniste des récepteurs CXCR2, cette fois-ci administré pour une période prolongée (six mois), n'améliore pas la fonction pulmonaire ni l'incidence d'exacerbations chez des asthmatiques non contrôlés (473). Une faiblesse de cette étude demeure toutefois que le phénotype neutrophilique n'était pas un critère d'inclusion et qu'il est peu probable que des patients avec de l'asthme éosinophilique bénéficient d'un tel traitement. L'IL-17 est aussi une cible thérapeutique dans le phénotype neutrophilique considérant son rôle indirect dans le chimiotactisme des neutrophiles et son association avec la sévérité de l'asthme. L'anticorps monoclonal contre les récepteurs à l'IL-17, le brodalumab, n'a toutefois pas diminué l'obstruction respiratoire dans l'asthme non contrôlé, bien qu'une amélioration du contrôle de la maladie ait été obtenue chez certains patients (474). Encore une fois, le phénotype neutrophilique n'a pas été spécifiquement investigué dans cette étude. Enfin, le nemiralisib, un inhibiteur des phosphoinositide 3-kinase δ (impliqués dans le recrutement neutrophilique) n'est pas efficace dans l'asthme incontrôlé (475).

Comme mentionné ci-haut, la simple quantification des neutrophiles n'est possiblement pas un indicateur suffisant pour élucider leur impact potentiel. Par exemple, dans l'étude AMAZES, l'azithromycine n'a pas réduit pas la neutrophilie dans les expectorations, mais elle a tout de même diminué la concentration d'IL-1 β et de l'ADN extracellulaire (un marqueur des NETs) dans l'asthme sévère (165), ce qui pourrait contribuer à atténuer les dommages tissulaires. Ainsi, un des objectifs initiaux de l'article 4 était de mesurer l'effet des macrolides sur l'activation des neutrophiles périphériques et pulmonaires par cytométrie de flux (via les marqueurs MPO et CD11b), mais en raison d'un bris d'équipement, cette portion du projet a dû être interrompue, amenuisant la portée de cette étude.

Pour mieux comprendre le rôle du neutrophile, il convient d'éliminer les paradigmes longtemps entretenus – entre autres concernant leur courte durée de vie et leur différenciation terminale. Au contraire, ces cellules sont hétérogènes, plastiques et peuvent adopter différents phénotypes en réponse au milieu environnant (565). L'implication du neutrophile ne pourra être clairement

établie que lorsque leurs multiples facettes auront été évaluées dans l'asthme, incluant leur production et l'effet de leurs vésicules extracellulaires, étudiés dans l'article 5.

Le degré de réversibilité maximale de la réduction de la masse du muscle lisse est possiblement atteint

Il est possible que l'azithromycine n'ait pas potentialisé l'effet des CSI si le degré de réversibilité maximale du remodelage a été atteint. L'article 4 est la troisième étude qui obtient une diminution de la masse du MLB d'environ 30% avec les CSI, qui n'est pas potentialisée par un retrait antigénique (357), l'addition de salmétérol (435) et ni d'un macrolide (558). Il est à noter que ces études ont été effectuées chez des chevaux différents, et de races et d'âges variables, illustrant la répétabilité de ce résultat. L'administration seule de l'azithromycine aurait donc été idéale pour clarifier l'interaction de la neutrophilie dans la réversibilité du remodelage, mais le choix de l'administration combinée avec un CSI a été basé sur l'utilisation actuelle en médecine humaine, les macrolides n'étant pas utilisés seuls ni en première instance dans le traitement de l'asthme sévère. De plus, l'article 3 n'ayant démontré aucune amélioration de la fonction pulmonaire par l'azithromycine administrée seule, il n'aurait pas été éthiquement responsable d'étudier le macrolide en monothérapie de manière prolongée chez des chevaux en exacerbation de la maladie.

En plus de leurs effets anti-inflammatoires sur le neutrophile, les macrolides influencent aussi directement la biologie de certaines cellules respiratoires, incluant le MLB (dont une augmentation de l'apoptose (546) et de l'autophagie (546, 547) et une diminution de la prolifération des cellules musculaires lisses (547)). Bien que des études sur des modèles expérimentaux d'asthme chez les rongeurs aient démontré une diminution de la masse du MLB avec les macrolides (533-536), l'étude 4 était la première à évaluer ses effets sur le MLB dans un modèle naturel de la maladie. L'absence de réduction de sa masse par l'azithromycine dans l'AES concorde avec une étude humaine où l'ajout de ce médicament à la thérapie usuelle n'a pas modifié l'épaisseur de la paroi bronchique mesurée par tomodensitométrie dans l'asthme sévère (515).

Précisions sur l'étude du remodelage dans l'asthme équin sévère

Les différents projets effectués dans ce doctorat ont permis d'obtenir quelques données nouvelles sur l'évaluation et la réversibilité du remodelage. D'abord, l'article 4 a démontré que la diminution de 30% de la masse du MLB se produit après deux mois de thérapie aux CSI; une étude précédente ayant observé cette diminution après trois, mais pas un mois de traitement (435). Cette information pourrait être considérée dans la gestion clinique des chevaux atteints d'asthme sévère où un traitement initial aux CSI est généralement recommandé pour accélérer la résolution des signes cliniques. Les changements de régime seuls prenant plusieurs semaines pour normaliser la fonction pulmonaire, et jusqu'à un an pour réduire la masse du MLB (357), il pourrait être bénéfique d'accélérer l'amélioration des lésions de remodelage (et ainsi atténuer l'auto-entretien des lésions architecturales) par un traitement avec les CSI. L'effet réel d'une telle intervention sur le pronostic à long terme reste toutefois à démontrer et la compliance des propriétaires de chevaux pour une telle recommandation pourrait être faible étant donné le coût important des CSI chez cette espèce. Les glucocorticoïdes systémiques sont beaucoup plus abordables, mais leur utilisation prolongée est contre-indiquée en raison de leurs effets adverses potentiels qui ont été décrits dans l'article 1. Cette considération pratique a mené à la réalisation d'une étude connexe de ce projet doctoral où l'effet de la nébulisation de la dexaméthasone injectable, une molécule peu dispendieuse, a été évalué dans l'AES (annexe 2 - *Nebulisation of dexamethasone sodium phosphate for the treatment of severe asthmatic horses*, p.402 (566)). Ce projet a été entamé après la démonstration que cette thérapie était sécuritaire chez les chevaux sains et qu'elle ait été proposée pour le traitement de l'AES (567). Malheureusement, ce traitement n'a pas amélioré la fonction pulmonaire et a engendré une suppression de l'axe hypothalamo-pituitaire-surrénalien (indiquant une absorption systémique), excluant donc son utilité dans le traitement de l'asthme équin.

L'étude 4 a aussi confirmé que la masse du MLB au niveau des voies respiratoires centrales évaluée par échographie endobronchique est corrélée à celle observée au niveau périphérique, comme précédemment démontré (435). Cet outil sera donc particulièrement utile dans les études où les biopsies pulmonaires transcutanées ou thoracoscopiques (qui permettent l'évaluation des voies respiratoires périphériques) ne sont pas envisageables éthiquement, comme lors de

l'investigation du remodelage chez les chevaux atteints d'asthme léger à modéré appartenant à des clients. Les biopsies endobronchiques sont aussi importantes pour l'étude du remodelage central, mais elles sont limitées pour l'évaluation du MLB puisqu'elles ne permettent pas de quantifier adéquatement sa masse chez l'espèce équine et seulement un peu plus de la moitié des biopsies récoltées sont adéquates pour l'évaluation histologique (423). Effectivement, le muscle est parfois absent des biopsies, particulièrement dans l'asthme sévère où l'épaississement des tissus peut empêcher le prélèvement du MLB sous-jacent. Ceci fut le cas dans le ¼ des biopsies effectuées dans l'article 3, ce qui a limité l'utilité de cette technique diagnostique dans ce projet (557). La fiabilité des biopsies endobronchiques pour quantifier la masse du MLB dans l'asthme humain n'est pas clairement établie, mais des évidences indirectes suggèrent que la mesure peut être biaisée par différents facteurs. Par exemple, la proportion occupée par le MLB dans les biopsies endobronchiques diminue avec l'inhalation expérimentale d'allergènes chez des patients asthmatiques (310), et sa masse est corrélée avec l'obstruction expiratoire dans l'asthme sévère, mais pas modéré (293). La masse du MLB dans les biopsies endobronchiques est corrélée avec le VEMS post-bronchodilatation, ce qui démontre tout de même l'utilité de cet outil dans l'évaluation d'une obstruction bronchique fixe chez l'humain (318).

Alors qu'aucune modification de l'épaisseur de la sous-muqueuse des voies respiratoires centrales n'a été obtenue après l'administration de fluticasone durant trois mois (435), une normalisation de l'épaississement (423) a été observée dès un mois de traitement avec les CSI dans l'article 4. Malgré cette diminution rapide, l'amélioration de la fonction pulmonaire a été plus lente dans cette étude, nécessitant près de 12 semaines pour atteindre des valeurs près de la normale, contrairement à une semaine dans l'étude précédente. Ceci suggère que l'épaississement de la sous-muqueuse a un effet relativement mineur sur le degré de l'obstruction bronchique. D'ailleurs, son épaisseur est similaire entre les chevaux asthmatiques sévères et ceux atteints de la forme légère-modérée (424), une maladie dans laquelle la fonction respiratoire basale est normale. Toutefois, la masse de la matrice extracellulaire au niveau périphérique est demeurée inchangée dans l'article 4, tel que précédemment rapporté (435), même chez les chevaux recevant le macrolide et chez qui l'inflammation neutrophilique a été atténuée. Curieusement, la masse de la matrice extracellulaire périphérique était corrélée à une meilleure

fonction pulmonaire dans l'article 4, suggérant que ce changement architectural pourrait être un mécanisme de protection en amoindrissant la force de contraction du muscle lisse bronchique, ou en modifiant les relations d'interdépendance entre le parenchyme pulmonaire et les voies respiratoires.

La corticorésistance et la bronchoconstriction résiduelle

Les études réalisées ont confirmé une des conclusions de l'article de revue sur les GC dans l'asthme équin (article 1), soit que cette thérapie, administrée oralement ou par inhalation, ne normalise pas la neutrophilie pulmonaire, comme observé dans la maladie humaine (161, 185). De plus, les CSI semblent insuffisants pour atténuer complètement le bronchospasme, puisque même après cinq mois de traitement dans l'étude 4, un certain degré de bronchoconstriction résiduelle a persisté, combiné à une fonction pulmonaire améliorée, mais toujours anormale chez la majorité des sujets. Un bronchospasme résiduel a aussi été rapporté après un an de traitement, même lorsque les CSI ont été combinés à un retrait antigénique (357). Ceci supporte la nécessité de définir le phénomène de corticorésistance dans l'asthme équin pour améliorer la translation des résultats obtenus vers l'asthme humain et pour faciliter l'étude des mécanismes pathophysiologiques impliqués de façon plus objective. Ensuite, la présence de bronchoconstriction résiduelle soulève des interrogations sur le tonus normal du MLB chez l'espèce équine. Chez les humains, un test de bronchodilatation doit améliorer de plus de 12% le VEMS pour être considéré cliniquement significatif (2). Similairement, les techniques d'oscillométrie démontrent une diminution moyenne de 11% de la résistance chez les individus sains après l'administration de salbutamol (568). Ainsi, l'auteure de cette thèse collabore, sans être l'instigatrice, à plusieurs études du laboratoire de recherche sur l'asthme équin visant à déterminer si l'oscillométrie permet de détecter de l'obstruction respiratoire sous clinique via un test de bronchodilatation dans l'AES et dans l'asthme équin léger à modéré comparativement à des individus sains. Finalement, une étude d'efficacité comparative des deux bronchodilatateurs les plus utilisés en médecine équine, le salbutamol et le N-butylscopolammonium bromide (un anticholinergique) a récemment été effectuée avec la contribution de l'auteure de cette thèse.

L'article 4 ayant démontré que l'oscillométrie pulsée est plus sensible que la mécanique standard pour détecter une obstruction respiratoire résiduelle, comme dans l'asthme humain (569), c'est cette technique qui est utilisée dans ces dernières études.

Le statut de la maladie n'influence pas l'effet prolifératif des vésicules extracellulaires neutrophiliques sur le MLB

Les neutrophiles ne sont pas directement localisés au sein du muscle lisse, ce qui complexifie la compréhension des mécanismes qui pourraient être impliqués dans l'association entre la neutrophilie et la sévérité de l'obstruction bronchique. Puisque les vésicules extracellulaires ont la capacité de modifier la biologie de cellules distantes, elles pourraient être responsables de certaines modifications structurelles dans l'asthme. Il a été précédemment démontré que l'activation des neutrophiles par le LPS stimule la production de VEs qui augmentent la prolifération du MLB (416). Cependant, cette dernière étude ayant été effectuée avec des tissus et des neutrophiles provenant de chevaux sains, l'article 5 a évalué ce phénomène dans l'AES, avec l'objectif de déterminer si le statut d'exacerbation de la maladie, où les neutrophiles périphériques sont davantage activés, accentuerait l'effet des VEs neutrophiliques. Toutefois, le statut clinique n'a eu qu'un effet mineur sur les caractéristiques des VEs neutrophiliques, et n'a pas altéré leur effet prolifératif. Seulement la stimulation des neutrophiles au LPS a engendré la production de vésicules augmentant la prolifération des cellules musculaires lisses, comme démontré initialement chez les chevaux sains (416), puis chez les humains en santé (253). Tout de même, les VEs pourraient contribuer à l'augmentation de la prolifération du MLB bronchique dans l'asthme puisque l'infiltration pulmonaire par les neutrophiles y est substantielle, et l'inhalation de LPS est inévitable vu l'omniprésence de ce fragment bactérien dans l'environnement.

Un des objectifs initiaux de ce dernier projet était d'évaluer l'impact des GC sur l'effet prolifératif des VEs neutrophiliques sur le MLB, puisque l'investigation des processus impliqués dans la réduction de la masse du MLB par les GC était une des pistes de recherche proposées dans l'article 1. Toutefois, les résultats initiaux ont démontré que la dexaméthasone augmentait l'index

cellulaire mesuré par impédance électrique, suggérant un effet pro-prolifératif. Puisque les GC diminuent normalement la prolifération des cellules musculaires lisses (216, 232, 274), les résultats ont été vérifiés par une quantification directe des cellules (par un compteur cellulaire à fluorescence automatisé; n = 3). Cette technique a plutôt démontré une réduction de la prolifération des cellules musculaires lisses par la dexaméthasone. La quantification directe des cellules a confirmé l'augmentation de la prolifération cellulaire par les VEs provenant de neutrophiles stimulés au LPS, comme préalablement validé dans des tests antérieurs, et justifiant la poursuite de l'étude seulement avec la co-incubation avec des VEs. Effectivement, la quantité de VEs n'était pas suffisante pour étudier l'effet de la co-incubation de dexaméthasone et des VEs sur le MLB avec une autre technique. Ces résultats inattendus concernant l'effet de la dexaméthasone sur la prolifération proviennent vraisemblablement d'un artefact de mesure par la technique d'impédance électrique utilisée par le système Xcelligence. Effectivement, l'impédance aurait pu être altérée par une modification de la taille des cellules, par la sécrétion de matériel dans le milieu de culture ou par une modification du degré d'adhérence des cellules. Cette limite justifiera la validation préalable de la mesure de la prolifération dans toute étude subséquente utilisant le système Xcelligence. Cet appareil demeure intéressant, car il permet d'évaluer la réponse à différents médiateurs sans interrompre la culture cellulaire puisqu'il fournit des données en continu.

Le tamoxifène, un modulateur sélectif des récepteurs à l'œstrogène, réduit marginalement la résistance pulmonaire

Bien que les investigations concernant le tamoxifène, un modulateur sélectif des récepteurs à l'œstrogène, ont été cessées considérant l'absence d'effet sur l'inflammation neutrophilique, les résultats de l'étude 2 ont tout de même soulevé des questions intéressantes. À noter qu'une étude de pharmacocinétique (570) parue après la réalisation de l'étude 2 a rapporté une faible biodisponibilité du tamoxifène chez l'espèce équine (13%), ce qui aurait pu contribuer à l'absence d'impact sur la neutrophilie et aux effets limités sur la fonction pulmonaire.

L'effet différentiel du tamoxifène observé sur la résistance et l'élastance pulmonaires dans l'AES est inhabituel (une amélioration significative de la résistance et une tendance vers une augmentation de l'élastance ont été observées dans l'article 2). Bien que ces deux paramètres n'évaluent pas les mêmes aspects de la fonction pulmonaire, ils sont généralement modifiés parallèlement en réponse à un traitement, bien que pas nécessairement à la même vitesse. Par exemple, la résistance s'améliore plus lentement que l'élastance lors d'un retrait antigénique dans l'AES (357, 435) ou avec les CSI, comme observé dans l'étude 4. La résistance représente principalement la résistance frictionnelle au passage de l'air dans les grosses voies respiratoires (571). L'élastance est la réciproque mathématique de la compliance, qui est définie par une variation de volume donnée par un changement de pression (ou la capacité du poumon à se distendre), et représente surtout la fonction des voies périphériques et la résistance tissulaire. Ainsi, une action du tamoxifène limitée aux voies centrales ou périphériques aurait pu engendrer une dissociation de la résistance et de l'élastance pulmonaire. Toutefois, bien que les récepteurs à l'œstrogène soient présents dans les poumons humains (572), leur localisation et leur concentration le long des voies respiratoires sont indéterminées tant chez l'humain que chez le cheval aux meilleurs des connaissances de l'auteure de cette thèse. Un effet œstrogénique aurait pu contribuer à l'amélioration de la résistance puisque cette hormone relaxe le MLB (92, 491). Toutefois, le tamoxifène peut agir comme agoniste ou antagoniste de ces récepteurs (573), complexifiant davantage l'interprétation des données et requérant des études supplémentaires pour comprendre ce résultat inhabituel. Ainsi, les données obtenues avec le tamoxifène ont soulevé un intérêt pour l'étude des effets du sexe et des hormones sexuelles dans l'asthme dans ce projet doctoral. En plus d'être surreprésentées dans la forme sévère et corticorésistante de l'asthme (55, 86), les femmes sont aussi plus souvent affectées que les hommes par le phénotype neutrophilique (10, 55, 115, 122). Alors qu'un effet du cycle œstral sur les symptômes et la fonction pulmonaire est décrit chez la femme (87-90), aucune donnée n'existait sur ce phénomène dans l'AES, bien qu'une large étude rétrospective ait démontré une prédisposition des juments (369). Ainsi, l'amélioration de la résistance pulmonaire engendrée par le tamoxifène et les données de la littérature humaine suggérant un effet des hormones sexuelles dans l'asthme ont mené à la réalisation d'un projet pilote sur la variation de l'obstruction respiratoire en

fonction du cycle œstral chez des juments asthmatiques sévères (annexe 1 - *Lung Function Variation during the Estrus Cycle of Mares Affected by Severe Asthma*, p.378 (392)). L'amélioration de la résistance et de la réactance inspiratoires lors de la phase lutéale du cycle œstral et les corrélations entre la variation de l'obstruction respiratoire et de la concentration de progestérone et de la taille du follicule dominant (corrélée à la concentration en œstrogène) qui ont été observées supportent la poursuite des investigations sur le rôle des hormones sexuelles dans l'AES.

L'utilisation d'antibiotiques dans l'asthme équin sévère n'est pas indiquée

Bien que l'évaluation de la contribution des infections bactériennes dans l'asthme n'était pas un objectif de cette thèse, l'article 3 a mis en évidence un fait pertinent en médecine équine : l'administration d'antimicrobiens ne devrait pas être utilisée en première intention, ni seule dans le traitement de l'AES. Bien qu'il soit établi auprès des praticiens équins que l'asthme n'est pas une pathologie infectieuse, l'usage des antibiotiques demeure courant. Plusieurs aspects cliniques incitent les vétérinaires à effectuer un essai thérapeutique avec des antibiotiques, incluant l'aspect purulent du jetage nasal, la chronicité de la condition et la présence occasionnelle de changements hématologiques indiquant un foyer inflammatoire. D'ailleurs, une étude a précédemment rapporté que l'ajout d'une céphalosporine au traitement usuel de l'AES (changements environnementaux, GC et bronchodilatateurs), engendre une amélioration clinique, mais l'absence de différence avec le groupe placebo suggère un effet limité. Dans l'article 3, en plus de ne pas modifier la fonction pulmonaire, ni une céphalosporine (ceftiofur) ni un macrolide (azithromycine) n'ont modifié les comptages bactériens en culture. Ceci n'exclut pas qu'une surinfection bactérienne puisse parfois survenir dans l'AES, mais des examens complémentaires devraient être effectués pour justifier l'utilisation ponctuelle d'antibiotiques.

Conclusions et perspectives

Comment continuer à investiguer le rôle des neutrophiles dans la pathophysiologie de l'asthme et de son remodelage

Bien que l'article 4 ait investigué l'effet d'un traitement anti-neutrophilique relativement prolongé (cinq mois), il est possible qu'une normalisation complète et continue de l'inflammation pulmonaire sur une plus longue période soit nécessaire pour obtenir une réversibilité accrue des lésions de remodelage, et incidemment, une amélioration de l'obstruction respiratoire. Même si le retrait antigénique normalise éventuellement la neutrophilie pulmonaire, un certain degré d'activation neutrophilique (400) et de l'inflammation systémique (355) persistent même chez des animaux asymptomatiques, justifiant l'ajout d'une thérapie anti-inflammatoire. Pour rendre une telle investigation réalisable dans le modèle de l'AES, les thérapies potentielles nécessiteraient idéalement des administrations ponctuelles (et non quotidiennes comme les CSI) et un prix abordable. Les thérapies biologiques utilisées en médecine humaine ne sont pas envisageables puisque l'adaptation des anticorps monoclonaux à l'espèce équine n'est pas économiquement justifiée. Toutefois, un vaccin induisant la production d'auto-anticorps contre l'IL-5 fut récemment décrit chez le cheval (574). Contrairement aux neutrophiles humains (575), les neutrophiles équins possèdent des récepteurs à l'IL-5, et ils sont plus nombreux dans l'AES (404). Ce vaccin réduit les lésions dermatologiques causées par l'hypersensibilité aux piqûres de *Culicoides* (574), une condition allergique associée à l'AES (368). Il serait donc intéressant d'investiguer si ce traitement est efficace dans l'AES, ou si cette technique de production de vaccin peut s'appliquer à d'autres cytokines impliquées dans le chimiotactisme et l'activation des neutrophiles et dans la pathophysiologie de l'asthme, particulièrement le CXCL8 (400), l'IL-17 (407) et l'IL-4 (367).

Enfin, l'hypothèse que l'inflammation est impliquée dans le développement initial, mais pas nécessairement dans le maintien des lésions de remodelage mérite aussi d'être investiguée par des études longitudinales. C'est dans cette optique qu'une étude caractérisant de manière exhaustive des chevaux atteints d'AELM présentés au Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire

est en cours depuis plusieurs années au sein du laboratoire, avec la collaboration de l'auteure de cette thèse. Par l'évaluation de l'inflammation systémique et pulmonaire et la caractérisation du remodelage par biopsies et échographie endobronchiques, ce projet contribuera à élucider si l'initiation de l'inflammation bronchique et du remodelage sont concomitantes, ou plutôt si ces deux phénomènes surviennent indépendamment dans le cours naturel de la maladie.

Clarifier le rôle des vésicules extracellulaires neutrophiliques dans l'asthme

La compréhension du rôle des vésicules extracellulaires dans la santé comme dans la maladie n'en est qu'à ses balbutiements. L'article 5 a démontré que la stimulation des neutrophiles asthmatiques au LPS induit la production de VEs qui augmentent la prolifération du MLB, tel que précédemment rapporté chez les chevaux sains (416). Cependant, plusieurs investigations sont encore requises pour déterminer si ce mécanisme contribue réellement à l'augmentation du MLB dans l'asthme neutrophilique. D'abord, les VEs étudiées dans l'article 5 ont été produites en culture afin d'obtenir des quantités suffisantes à la réalisation d'études fonctionnelles; il serait toutefois intéressant d'étudier les VEs neutrophiliques circulantes et dans les sécrétions respiratoires afin de déterminer si la maladie modifie la quantité et les caractéristiques intrinsèques de ces dernières. Effectivement, il est possible d'identifier l'origine cellulaire des vésicules par cytométrie de flux, mais une telle étude nécessiterait de multiples étapes de validation et des appareils spécialisés. Il serait aussi pertinent d'étudier les VEs produites en culture par les neutrophiles retrouvés dans les sécrétions respiratoires (la culture cellulaire étant nécessaire à l'obtention de quantités adéquates pour la réalisation d'études fonctionnelles), mais il n'est actuellement pas possible d'isoler cette cellule avec suffisamment de pureté des lavages bronchoalvéolaires chez l'espèce équine (147). Enfin, bien que de multiples hypothèses ont été émises dans l'article 5, déterminer précisément quelles protéines sont impliquées dans l'effet prolifératif des VEs stimulés au LPS, en utilisant des inhibiteurs spécifiques, pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans l'asthme.

Le rôle des hormones sexuelles dans l'asthme neutrophilique

Les résultats de nos études, notamment l'effet du tamoxifène sur la résistance pulmonaire (556) et la démonstration de l'influence du cycle œstral sur le degré d'obstruction respiratoire dans l'AES (392), combinés aux données de la littérature humaine, justifient la poursuite des investigations du rôle des hormones sexuelles dans la pathophysiologie de l'asthme. Parmi les prochaines étapes envisagées, la localisation par immunohistochimie et PCR des récepteurs à l'œstrogène et à la progestérone le long des voies respiratoires humaines et équine est requise pour mieux comprendre les résultats obtenus et les impacts potentiels de ces hormones. Leurs effets sur l'inflammation pulmonaire lors d'exacerbation de l'asthme requièrent aussi une attention puisque jusqu'à présent, ce sont plutôt les impacts sur les symptômes ou sur la fonction pulmonaire qui ont été étudiés. Par exemple, une étude clinique sur l'administration de progestérone synthétique (altrénogest) dans l'AES pourrait contribuer à améliorer notre compréhension de son effet physiologique respiratoire. Cette molécule étant déjà couramment utilisée chez les juments de sport pour la gestion des comportements indésirables liés à l'œstrus et possiblement pour ses propriétés sédatives (576), une évaluation de ses effets respiratoires (et donc éventuellement son impact sur les performances sportives) serait pertinente tant d'un point de vue scientifique que réglementaire.

Il est aussi important de mieux comprendre le rôle des hormones sexuelles pour favoriser l'application de la médecine personnalisée chez les femmes. Par exemple, la surreprésentation du sexe féminin dans le phénotype neutrophilique a entre autres été attribuée à une réponse de type T17 plus prononcée (219). Ainsi, il serait intéressant de vérifier si le brodalumab, un anticorps monoclonal contre les récepteurs à l'IL-17 est davantage bénéfique dans l'asthme chez la femme.

Références bibliographiques

1. Canada PHAo. Fast facts about asthma: Data compiled from the 2011 Survey on Living with Chronic Diseases in Canada.
2. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2021.
3. James AL, Bai TR, Mauad T, Abramson MJ, Dolhnikoff M, McKay KO, et al. Airway smooth muscle thickness in asthma is related to severity but not duration of asthma. *Eur Respir J.* 2009;34(5):1040-5.
4. Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest.* 2001;119(5):1329-36.
5. Smith BM, Zhao N, Olivenstein R, Lemiere C, Hamid Q, Martin JG. Asthma and fixed airflow obstruction: Long-term trajectories suggest distinct endotypes. *Clin Exp Allergy.* 2021;51(1):39-48.
6. Shaw DE, Berry MA, Hargadon B, McKenna S, Shelley MJ, Green RH, et al. Association between neutrophilic airway inflammation and airflow limitation in adults with asthma. *Chest.* 2007;132(6):1871-5.
7. Carroll N, Carello S, Cooke C, James A. Airway structure and inflammatory cells in fatal attacks of asthma. *Eur Respir J.* 1996;9(4):709-15.
8. Farah CS, Keulers LA, Hardaker KM, Peters MJ, Berend N, Postma DS, et al. Association between peripheral airway function and neutrophilic inflammation in asthma. *Respirology.* 2015;20(6):975-81.
9. Bullone M, Lavoie JP. Asthma "of horses and men"--how can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences? *Mol Immunol.* 2015;66(1):97-105.
10. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax.* 2002;57(10):875-9.

11. Borlone C, Morales N, Henriquez C, Folch H, Olave C, Sarmiento J, et al. In Vitro effects of tamoxifen on equine neutrophils. *Res Vet Sci.* 2017;110:60-4.
12. Olave C, Alvarez P, Uberti B, Morales N, Henriquez C, Folch H, et al. Tamoxifen induces apoptosis and inhibits respiratory burst in equine neutrophils independently of estrogen receptors. *J Vet Pharmacol Ther.* 2018.
13. Gibson PG, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, Hodge S, James AL, et al. Effect of azithromycin on asthma exacerbations and quality of life in adults with persistent uncontrolled asthma (AMAZES): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2017;390(10095):659-68.
14. Kanoh S, Rubin BK. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(3):590-615.
15. Michel O, Ginanni R, Duchateau J, Vertongen F, Le Bon B, Sergysels R. Domestic endotoxin exposure and clinical severity of asthma. *Clin Exp Allergy.* 1991;21(4):441-8.
16. Pirie RS, Dixon PM, Collie DD, McGorum BC. Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses. *Equine Vet J.* 2001;33(3):311-8.
17. Collaborators GBDCRD. Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Respir Med.* 2020;8(6):585-96.
18. Safiri S, Carson-Chahhoud K, Karamzad N, Sullman MJM, Nejadghaderi SA, Taghizadieh A, et al. Prevalence, Deaths, and Disability-Adjusted Life-Years Due to Asthma and Its Attributable Risk Factors in 204 Countries and Territories, 1990-2019. *Chest.* 2022;161(2):318-29.
19. Zafari Z, Sadatsafavi M, Chen W, FitzGerald JM. The projected economic and health burden of sub-optimal asthma control in Canada. *Respir Med.* 2018;138:7-12.
20. Cruz AA, Stelmach R, Ponte EV. Asthma prevalence and severity in low-resource communities. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2017;17(3):188-93.
21. Chen W, Safari A, FitzGerald JM, Sin DD, Tavakoli H, Sadatsafavi M. Economic burden of multimorbidity in patients with severe asthma: a 20-year population-based study. *Thorax.* 2019;74(12):1113-9.

22. Hekking PW, Wener RR, Amelink M, Zwinderman AH, Bouvy ML, Bel EH. The prevalence of severe refractory asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(4):896-902.
23. Backman H, Jansson SA, Stridsman C, Eriksson B, Hedman L, Eklund BM, et al. Severe asthma-A population study perspective. *Clin Exp Allergy*. 2019;49(6):819-28.
24. Rabe KF, Adachi M, Lai CK, Soriano JB, Vermeire PA, Weiss KB, et al. Worldwide severity and control of asthma in children and adults: the global asthma insights and reality surveys. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(1):40-7.
25. Schoettler N, Strek ME. Recent Advances in Severe Asthma: From Phenotypes to Personalized Medicine. *Chest*. 2020;157(3):516-28.
26. Kuruvilla ME, Lee FE, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2019;56(2):219-33.
27. Asher MI, Rutter CE, Bissell K, Chiang CY, El Sony A, Ellwood E, et al. Worldwide trends in the burden of asthma symptoms in school-aged children: Global Asthma Network Phase I cross-sectional study. *Lancet*. 2021;398(10311):1569-80.
28. Chen A, Nowrouzi-Kia B, Usuba K. Health-related quality of life in Canadians with asthma: A case-control study using census data. *Respir Med*. 2018;140:82-6.
29. Hinks TSC, Brown T, Lau LCK, Rupani H, Barber C, Elliott S, et al. Multidimensional endotyping in patients with severe asthma reveals inflammatory heterogeneity in matrix metalloproteinases and chitinase 3-like protein 1. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(1):61-75.
30. To T, Ryckman K, Zhu J, Williams D, Feldman LY, Larsen K, et al. Mental Health Services Claims and Adult Onset Asthma in Ontario, Canada. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2017;5(5):1388-93 e3.
31. Malo JL, Tarlo SM, Sastre J, Martin J, Jeebhay MF, Le Moual N, et al. An official American Thoracic Society Workshop Report: presentations and discussion of the fifth Jack Pepys Workshop on Asthma in the Workplace. Comparisons between asthma in the workplace and non-work-related asthma. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12(7):S99-S110.
32. Foster JM, McDonald VM, Guo M, Reddel HK. "I have lost in every facet of my life": the hidden burden of severe asthma. *Eur Respir J*. 2017;50(3).

33. Koinis-Mitchell D, Kopel SJ, Farrow ML, McQuaid EL, Nassau JH. Asthma and academic performance in urban children. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2019;122(5):471-7.
34. Ebmeier S, Thayabaran D, Braithwaite I, Benamara C, Weatherall M, Beasley R. Trends in international asthma mortality: analysis of data from the WHO Mortality Database from 46 countries (1993-2012). *Lancet.* 2017;390(10098):935-45.
35. Saetta M, Di Stefano A, Rosina C, Thiene G, Fabbri LM. Quantitative structural analysis of peripheral airways and arteries in sudden fatal asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1991;143(1):138-43.
36. Fujisawa T, Kephart GM, Gray BH, Gleich GJ. The neutrophil and chronic allergic inflammation. Immunochemical localization of neutrophil elastase. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141(3):689-97.
37. Dunnill MS. The pathology of asthma, with special reference to changes in the bronchial mucosa. *J Clin Pathol.* 1960;13:27-33.
38. Bai TR, Cooper J, Koelmeyer T, Pare PD, Weir TD. The effect of age and duration of disease on airway structure in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(2 Pt 1):663-9.
39. Dusser D, Montani D, Chanez P, de Blic J, Delacourt C, Deschildre A, et al. Mild asthma: an expert review on epidemiology, clinical characteristics and treatment recommendations. *Allergy.* 2007;62(6):591-604.
40. Reddel HK, FitzGerald JM, Bateman ED, Bacharier LB, Becker A, Brusselle G, et al. GINA 2019: a fundamental change in asthma management: Treatment of asthma with short-acting bronchodilators alone is no longer recommended for adults and adolescents. *Eur Respir J.* 2019;53(6).
41. Ivanova JI, Bergman R, Birnbaum HG, Colice GL, Silverman RA, McLaurin K. Effect of asthma exacerbations on health care costs among asthmatic patients with moderate and severe persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(5):1229-35.
42. Kuruvilla ME, Vanijcharoenkarn K, Shih JA, Lee FE. Epidemiology and risk factors for asthma. *Respir Med.* 2019;149:16-22.
43. Restori KH, Srinivasa BT, Ward BJ, Fixman ED. Neonatal Immunity, Respiratory Virus Infections, and the Development of Asthma. *Front Immunol.* 2018;9:1249.

44. Pividori M, Schoettler N, Nicolae DL, Ober C, Im HK. Shared and distinct genetic risk factors for childhood-onset and adult-onset asthma: genome-wide and transcriptome-wide studies. *Lancet Respir Med.* 2019;7(6):509-22.
45. Bouzigon E, Corda E, Aschard H, Dizier MH, Boland A, Bousquet J, et al. Effect of 17q21 variants and smoking exposure in early-onset asthma. *N Engl J Med.* 2008;359(19):1985-94.
46. Ober C. Asthma Genetics in the Post-GWAS Era. *Ann Am Thorac Soc.* 2016;13 Suppl 1:S85-90.
47. Liu X, Agerbo E, Schlunssen V, Wright RJ, Li J, Munk-Olsen T. Maternal asthma severity and control during pregnancy and risk of offspring asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(3):886-92 e3.
48. Ospina MB, Voaklander DC, Stickland MK, King M, Senthilselvan A, Rowe BH. Prevalence of asthma and chronic obstructive pulmonary disease in Aboriginal and non-Aboriginal populations: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Can Respir J.* 2012;19(6):355-60.
49. Gomez JL. Epigenetics in Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2019;19(12):56.
50. Yang IV, Pedersen BS, Liu A, O'Connor GT, Teach SJ, Kattan M, et al. DNA methylation and childhood asthma in the inner city. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(1):69-80.
51. Fu A, Leaderer BP, Gent JF, Leaderer D, Zhu Y. An environmental epigenetic study of ADRB2 5'-UTR methylation and childhood asthma severity. *Clin Exp Allergy.* 2012;42(11):1575-81.
52. Maes T, Cobos FA, Schleich F, Sorbello V, Henket M, De Preter K, et al. Asthma inflammatory phenotypes show differential microRNA expression in sputum. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(5):1433-46.
53. Gunawardhana LP, Gibson PG, Simpson JL, Benton MC, Lea RA, Baines KJ. Characteristic DNA methylation profiles in peripheral blood monocytes are associated with inflammatory phenotypes of asthma. *Epigenetics.* 2014;9(9):1302-16.
54. Gunawardhana LP, Baines KJ, Mattes J, Murphy VE, Simpson JL, Gibson PG. Differential DNA methylation profiles of infants exposed to maternal asthma during pregnancy. *Pediatr Pulmonol.* 2014;49(9):852-62.

55. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(4):315-23.
56. Pakkasela J, Ilmarinen P, Honkamaki J, Tuomisto LE, Andersen H, Piiirila P, et al. Age-specific incidence of allergic and non-allergic asthma. *BMC Pulm Med*. 2020;20(1):9.
57. Vrugt B, Wilson S, Underwood J, Bron A, de Bruyn R, Bradding P, et al. Mucosal inflammation in severe glucocorticoid-dependent asthma. *Eur Respir J*. 1999;13(6):1245-52.
58. Ronmark E, Andersson C, Nystrom L, Forsberg B, Jarvholm B, Lundback B. Obesity increases the risk of incident asthma among adults. *Eur Respir J*. 2005;25(2):282-8.
59. Ownby DR. Will the real inner-city allergen please stand up? *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(4):836-7.
60. Mendy A, Wilkerson J, Salo PM, Zeldin DC, Thorne PS. Endotoxin clustering with allergens in house dust and asthma outcomes in a U.S. national study. *Environ Health*. 2020;19(1):35.
61. Sears MR, Greene JM, Willan AR, Wiecek EM, Taylor DR, Flannery EM, et al. A longitudinal, population-based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood. *N Engl J Med*. 2003;349(15):1414-22.
62. Takkouche B, Gonzalez-Barcala FJ, Etminan M, Fitzgerald M. Exposure to furry pets and the risk of asthma and allergic rhinitis: a meta-analysis. *Allergy*. 2008;63(7):857-64.
63. Cullinan P, Vandenplas O, Bernstein D. Assessment and Management of Occupational Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020;8(10):3264-75.
64. Nelson HS. The importance of allergens in the development of asthma and the persistence of symptoms. *Dis Mon*. 2001;47(1):5-15.
65. Dales RE, Cakmak S, Judek S, Dann T, Coates F, Brook JR, et al. Influence of outdoor aeroallergens on hospitalization for asthma in Canada. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(2):303-6.
66. Villeneuve PJ, Chen L, Rowe BH, Coates F. Outdoor air pollution and emergency department visits for asthma among children and adults: a case-crossover study in northern Alberta, Canada. *Environ Health*. 2007;6:40.

67. McCreanor J, Cullinan P, Nieuwenhuijsen MJ, Stewart-Evans J, Malliarou E, Jarup L, et al. Respiratory effects of exposure to diesel traffic in persons with asthma. *N Engl J Med*. 2007;357(23):2348-58.
68. Chatkin J, Correa L, Santos U. External Environmental Pollution as a Risk Factor for Asthma. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2022;62(1):72-89.
69. Ege MJ, Mayer M, Normand AC, Genuneit J, Cookson WO, Braun-Fahrlander C, et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med*. 2011;364(8):701-9.
70. Oluwole O, Rennie DC, Senthilselvan A, Dyck R, Afanasieva A, Adamko DJ, et al. Asthma diagnosis among children along an urban-rural gradient. *J Asthma*. 2018;55(11):1242-52.
71. McGeachie MJ, Yates KP, Zhou X, Guo F, Sternberg AL, Van Natta ML, et al. Patterns of Growth and Decline in Lung Function in Persistent Childhood Asthma. *N Engl J Med*. 2016;374(19):1842-52.
72. Forno E, Young OM, Kumar R, Simhan H, Celedon JC. Maternal obesity in pregnancy, gestational weight gain, and risk of childhood asthma. *Pediatrics*. 2014;134(2):e535-46.
73. Gao Y, Nanan R, Macia L, Tan J, Sominsky L, Quinn TP, et al. The maternal gut microbiome during pregnancy and offspring allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;148(3):669-78.
74. Beigelman A, Rosas-Salazar C, Hartert TV. Childhood Asthma: Is It All About Bacteria and Not About Viruses? A Pro/Con Debate. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2018;6(3):719-25.
75. Jartti T, Gern JE. Role of viral infections in the development and exacerbation of asthma in children. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(4):895-906.
76. Johnston NW, Johnston SL, Duncan JM, Greene JM, Kebabze T, Keith PK, et al. The September epidemic of asthma exacerbations in children: a search for etiology. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(1):132-8.
77. Nicholson KG, Kent J, Ireland DC. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ*. 1993;307(6910):982-6.
78. Wark PA, Johnston SL, Moric I, Simpson JL, Hensley MJ, Gibson PG. Neutrophil degranulation and cell lysis is associated with clinical severity in virus-induced asthma. *Eur Respir J*. 2002;19(1):68-75.

79. Kermani NZ, Song WJ, Badi Y, Versi A, Guo Y, Sun K, et al. Sputum ACE2, TMPRSS2 and FURIN gene expression in severe neutrophilic asthma. *Respir Res.* 2021;22(1):10.
80. Williamson EJ, Walker AJ, Bhaskaran K, Bacon S, Bates C, Morton CE, et al. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature.* 2020;584(7821):430-6.
81. Bisgaard H, Hermansen MN, Buchvald F, Loland L, Halkjaer LB, Bonnelykke K, et al. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. *N Engl J Med.* 2007;357(15):1487-95.
82. Sutherland ER, Martin RJ. Asthma and atypical bacterial infection. *Chest.* 2007;132(6):1962-6.
83. Stokholm J, Thorsen J, Blaser MJ, Rasmussen MA, Hjelmso M, Shah S, et al. Delivery mode and gut microbial changes correlate with an increased risk of childhood asthma. *Sci Transl Med.* 2020;12(569).
84. de Marco R, Locatelli F, Sunyer J, Burney P. Differences in incidence of reported asthma related to age in men and women. A retrospective analysis of the data of the European Respiratory Health Survey. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(1):68-74.
85. Chen Y, Stewart P, Johansen H, McRae L, Taylor G. Sex difference in hospitalization due to asthma in relation to age. *J Clin Epidemiol.* 2003;56(2):180-7.
86. Wu W, Bang S, Bleecker ER, Castro M, Denlinger L, Erzurum SC, et al. Multiview Cluster Analysis Identifies Variable Corticosteroid Response Phenotypes in Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;199(11):1358-67.
87. Juniper EF, Kline PA, Roberts RS, Hargreave FE, Daniel EE. Airway responsiveness to methacholine during the natural menstrual cycle and the effect of oral contraceptives. *Am Rev Respir Dis.* 1987;135(5):1039-42.
88. Gibbs CJ, Coutts, II, Lock R, Finnegan OC, White RJ. Premenstrual exacerbation of asthma. *Thorax.* 1984;39(11):833-6.
89. Hanley SP. Asthma variation with menstruation. *Br J Dis Chest.* 1981;75(3):306-8.
90. Chandler MH, Schuldheisz S, Phillips BA, Muse KN. Premenstrual asthma: the effect of estrogen on symptoms, pulmonary function, and beta 2-receptors. *Pharmacotherapy.* 1997;17(2):224-34.

91. Weinmann GG, Zacur H, Fish JE. Absence of changes in airway responsiveness during the menstrual cycle. *J Allergy Clin Immunol.* 1987;79(4):634-8.
92. Dimitropoulou C, White RE, Ownby DR, Catravas JD. Estrogen reduces carbachol-induced constriction of asthmatic airways by stimulating large-conductance voltage and calcium-dependent potassium channels. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32(3):239-47.
93. Schatz M, Harden K, Forsythe A, Chilingar L, Hoffman C, Sperling W, et al. The course of asthma during pregnancy, post partum, and with successive pregnancies: a prospective analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 1988;81(3):509-17.
94. Britton J, Pavord I, Richards K, Knox A, Wisniewski A, Wahedna I, et al. Factors influencing the occurrence of airway hyperreactivity in the general population: the importance of atopy and airway calibre. *Eur Respir J.* 1994;7(5):881-7.
95. Miethe S, Karsonova A, Karaulov A, Renz H. Obesity and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;146(4):685-93.
96. Cardet JC, Ash S, Kusa T, Camargo CA, Jr., Israel E. Insulin resistance modifies the association between obesity and current asthma in adults. *Eur Respir J.* 2016;48(2):403-10.
97. Rosenberg SL, Miller GE, Brehm JM, Celedon JC. Stress and asthma: novel insights on genetic, epigenetic, and immunologic mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134(5):1009-15.
98. Oren E, Gerald L, Stern DA, Martinez FD, Wright AL. Self-Reported Stressful Life Events During Adolescence and Subsequent Asthma: A Longitudinal Study. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017;5(2):427-34 e2.
99. Marin TJ, Chen E, Munch JA, Miller GE. Double-exposure to acute stress and chronic family stress is associated with immune changes in children with asthma. *Psychosom Med.* 2009;71(4):378-84.
100. Heffler E, Crimi C, Mancuso S, Campisi R, Puggioni F, Brussino L, et al. Misdiagnosis of asthma and COPD and underuse of spirometry in primary care unselected patients. *Respir Med.* 2018;142:48-52.
101. Aaron SD, Boulet LP, Reddel HK, Gershon AS. Underdiagnosis and Overdiagnosis of Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;198(8):1012-20.

102. Seys SF, Lokwani R, Simpson JL, Bullens DMA. New insights in neutrophilic asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2019;25(1):113-20.
103. Kaur R, Chupp G. Phenotypes and endotypes of adult asthma: Moving toward precision medicine. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;144(1):1-12.
104. Opina MT, Moore WC. Phenotype-Driven Therapeutics in Severe Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2017;17(2):10.
105. Moore WC, Hastie AT, Li X, Li H, Busse WW, Jarjour NN, et al. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(6):1557-63 e5.
106. Al Heialy S, Ramakrishnan RK, Hamid Q. Recent advances in the immunopathogenesis of severe asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2022;149(2):455-65.
107. Peters MC, Mekonnen ZK, Yuan S, Bhakta NR, Woodruff PG, Fahy JV. Measures of gene expression in sputum cells can identify TH2-high and TH2-low subtypes of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(2):388-94.
108. Rossios C, Pavlidis S, Hoda U, Kuo CH, Wiegman C, Russell K, et al. Sputum transcriptomics reveal upregulation of IL-1 receptor family members in patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(2):560-70.
109. Cowan DC, Cowan JO, Palmay R, Williamson A, Taylor DR. Effects of steroid therapy on inflammatory cell subtypes in asthma. *Thorax*. 2010;65(5):384-90.
110. Peebles RS, Jr., Aronica MA. Proinflammatory Pathways in the Pathogenesis of Asthma. *Clin Chest Med*. 2019;40(1):29-50.
111. Schofield JPR, Burg D, Nicholas B, Strazzeri F, Brandsma J, Staykova D, et al. Stratification of asthma phenotypes by airway proteomic signatures. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;144(1):70-82.
112. Hudey SN, Ledford DK, Cardet JC. Mechanisms of non-type 2 asthma. *Curr Opin Immunol*. 2020;66:123-8.
113. Taylor SL, Leong LEX, Choo JM, Wesselingh S, Yang IA, Upham JW, et al. Inflammatory phenotypes in patients with severe asthma are associated with distinct airway microbiology. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(1):94-103 e15.

114. Schleich FN, Manise M, Sele J, Henket M, Seidel L, Louis R. Distribution of sputum cellular phenotype in a large asthma cohort: predicting factors for eosinophilic vs neutrophilic inflammation. *BMC Pulm Med.* 2013;13:11.
115. Demarche S, Schleich F, Henket M, Paulus V, Van Hees T, Louis R. Detailed analysis of sputum and systemic inflammation in asthma phenotypes: are paucigranulocytic asthmatics really non-inflammatory? *BMC Pulm Med.* 2016;16:46.
116. Raundhal M, Morse C, Khare A, Oriss TB, Milosevic J, Trudeau J, et al. High IFN-gamma and low SLPI mark severe asthma in mice and humans. *J Clin Invest.* 2015;125(8):3037-50.
117. Simpson JL, Grissell TV, Douwes J, Scott RJ, Boyle MJ, Gibson PG. Innate immune activation in neutrophilic asthma and bronchiectasis. *Thorax.* 2007;62(3):211-8.
118. Simpson JL, Phipps S, Baines KJ, Oreo KM, Gunawardhana L, Gibson PG. Elevated expression of the NLRP3 inflammasome in neutrophilic asthma. *Eur Respir J.* 2014;43(4):1067-76.
119. Nair P, Gaga M, Zervas E, Alagha K, Hargreave FE, O'Byrne PM, et al. Safety and efficacy of a CXCR2 antagonist in patients with severe asthma and sputum neutrophils: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Clin Exp Allergy.* 2012;42(7):1097-103.
120. Hastie AT, Mauger DT, Denlinger LC, Coverstone A, Castro M, Erzurum S, et al. Baseline sputum eosinophil + neutrophil subgroups' clinical characteristics and longitudinal trajectories for NHLBI Severe Asthma Research Program (SARP 3) cohort. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;146(1):222-6.
121. Green BJ, Wiriyaichaiorn S, Grainge C, Rogers GB, Kehagia V, Lau L, et al. Potentially pathogenic airway bacteria and neutrophilic inflammation in treatment resistant severe asthma. *PLoS One.* 2014;9(6):e100645.
122. McGrath KW, Icitovic N, Boushey HA, Lazarus SC, Sutherland ER, Chinchilli VM, et al. A large subgroup of mild-to-moderate asthma is persistently noneosinophilic. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(6):612-9.
123. Yang X, Li H, Ma Q, Zhang Q, Wang C. Neutrophilic Asthma Is Associated with Increased Airway Bacterial Burden and Disordered Community Composition. *Biomed Res Int.* 2018;2018:9230234.

124. Schleich F, Graff S, Guissard F, Henket M, Paulus V, Louis R. Asthma in elderly is characterized by increased sputum neutrophils, lower airway caliber variability and air trapping. *Respir Res.* 2021;22(1):15.
125. Nair P, Surette MG, Virchow JC. Neutrophilic asthma: misconception or misnomer? *Lancet Respir Med.* 2021;9(5):441-3.
126. Kasaian MT, Lee J, Brennan A, Danto SI, Black KE, Fitz L, et al. Proteomic analysis of serum and sputum analytes distinguishes controlled and poorly controlled asthmatics. *Clin Exp Allergy.* 2018;48(7):814-24.
127. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(5 Pt 1):1532-9.
128. Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun.* 2010;2(3):216-27.
129. Liew PX, Kubes P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol Rev.* 2019;99(2):1223-48.
130. De Santo C, Arscott R, Booth S, Karydis I, Jones M, Asher R, et al. Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. *Nat Immunol.* 2010;11(11):1039-46.
131. Basu S, Hodgson G, Katz M, Dunn AR. Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood.* 2002;100(3):854-61.
132. Price TH, Chatta GS, Dale DC. Effect of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil kinetics in normal young and elderly humans. *Blood.* 1996;88(1):335-40.
133. Carakostas MC, Moore WE, Smith JE. Intravascular neutrophilic granulocyte kinetics in horses. *Am J Vet Res.* 1981;42(4):623-5.
134. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, et al. In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood.* 2010;116(4):625-7.
135. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood.* 1992;80(8):2012-20.

136. Wang J, Hossain M, Thanabalasuriar A, Gunzer M, Meininger C, Kubes P. Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair. *Science*. 2017;358(6359):111-6.
137. Choudhury SR, Babes L, Rahn JJ, Ahn BY, Goring KR, King JC, et al. Dipeptidase-1 Is an Adhesion Receptor for Neutrophil Recruitment in Lungs and Liver. *Cell*. 2019;178(5):1205-21 e17.
138. Tsai CY, Hsieh SC, Liu CW, Lu CS, Wu CH, Liao HT, et al. Cross-Talk among Polymorphonuclear Neutrophils, Immune, and Non-Immune Cells via Released Cytokines, Granule Proteins, Microvesicles, and Neutrophil Extracellular Trap Formation: A Novel Concept of Biology and Pathobiology for Neutrophils. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6).
139. Sengelov H, Kjeldsen L, Borregaard N. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol*. 1993;150(4):1535-43.
140. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One*. 2012;7(2):e32366.
141. Muller I, Munder M, Kropf P, Hansch GM. Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? *Trends Immunol*. 2009;30(11):522-30.
142. Maletto BA, Ropolo AS, Alignani DO, Liscovsky MV, Ranocchia RP, Moron VG, et al. Presence of neutrophil-bearing antigen in lymphoid organs of immune mice. *Blood*. 2006;108(9):3094-102.
143. Beauvillain C, Delneste Y, Scotet M, Peres A, Gascan H, Guernonprez P, et al. Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood*. 2007;110(8):2965-73.
144. Bazzoni F, Tamassia N, Rossato M, Cassatella MA. Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: lessons from neutrophils. *Eur J Immunol*. 2010;40(9):2360-8.
145. Serhan CN. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? *Am J Pathol*. 2010;177(4):1576-91.
146. Filardy AA, Pires DR, Nunes MP, Takiya CM, Freire-de-Lima CG, Ribeiro-Gomes FL, et al. Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12(low)IL-10(high) regulatory phenotype in macrophages. *J Immunol*. 2010;185(4):2044-50.

147. Brazil TJ, Dagleish MP, McGorum BC, Dixon PM, Haslett C, Chilvers ER. Kinetics of pulmonary neutrophil recruitment and clearance in a natural and spontaneously resolving model of airway inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(7):854-65.
148. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(3):159-75.
149. Woodruff PG, Khashayar R, Lazarus SC, Janson S, Avila P, Boushey HA, et al. Relationship between airway inflammation, hyperresponsiveness, and obstruction in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(5):753-8.
150. Davidson WJ, The S, Leigh R. Establishing a normal range for induced sputum cell counts in Western Canada. *Can Respir J*. 2013;20(6):424-5.
151. Belda J, Leigh R, Parameswaran K, O'Byrne PM, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(2 Pt 1):475-8.
152. Yipp BG, Kim JH, Lima R, Zbytnuik LD, Petri B, Swanlund N, et al. The Lung is a Host Defense Niche for Immediate Neutrophil-Mediated Vascular Protection. *Sci Immunol*. 2017;2(10).
153. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(3):1001-8.
154. Simpson JL, Carroll M, Yang IA, Reynolds PN, Hodge S, James AL, et al. Reduced Antiviral Interferon Production in Poorly Controlled Asthma Is Associated With Neutrophilic Inflammation and High-Dose Inhaled Corticosteroids. *Chest*. 2016;149(3):704-13.
155. Simpson JL, Powell H, Boyle MJ, Scott RJ, Gibson PG. Clarithromycin targets neutrophilic airway inflammation in refractory asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(2):148-55.
156. Crisford H, Sapey E, Rogers GB, Taylor S, Nagakumar P, Lokwani R, et al. Neutrophils in asthma: the good, the bad and the bacteria. *Thorax*. 2021.
157. Scott HA, Gibson PG, Garg ML, Wood LG. Airway inflammation is augmented by obesity and fatty acids in asthma. *Eur Respir J*. 2011;38(3):594-602.
158. Zarkesh-Esfahani H, Pockley AG, Wu Z, Hellewell PG, Weetman AP, Ross RJ. Leptin indirectly activates human neutrophils via induction of TNF-alpha. *J Immunol*. 2004;172(3):1809-14.

159. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Brightling CE, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(3):218-24.
160. Telenga ED, Tideman SW, Kerstjens HA, Hacken NH, Timens W, Postma DS, et al. Obesity in asthma: more neutrophilic inflammation as a possible explanation for a reduced treatment response. *Allergy*. 2012;67(8):1060-8.
161. Basyigit I, Yildiz F, Ozkara SK, Boyaci H, Ilgazli A. Inhaled corticosteroid effects both eosinophilic and non-eosinophilic inflammation in asthmatic patients. *Mediators Inflamm*. 2004;13(4):285-91.
162. Vignola AM, Bonanno A, Profita M, Riccobono L, Scichilone N, Spatafora M, et al. Effect of age and asthma duration upon elastase and alpha1-antitrypsin levels in adult asthmatics. *Eur Respir J*. 2003;22(5):795-801.
163. Carpagnano GE, Resta O, Ventura MT, Amoruso AC, Di Gioia G, Giliberti T, et al. Airway inflammation in subjects with gastro-oesophageal reflux and gastro-oesophageal reflux-related asthma. *J Intern Med*. 2006;259(3):323-31.
164. Wood LG, Simpson JL, Hansbro PM, Gibson PG. Potentially pathogenic bacteria cultured from the sputum of stable asthmatics are associated with increased 8-isoprostane and airway neutrophilia. *Free Radic Res*. 2010;44(2):146-54.
165. Shukla SD, Taylor SL, Gibson PG, Barker D, Upham JW, Yang IA, et al. Add-on azithromycin reduces sputum cytokines in non-eosinophilic asthma: an AMAZES substudy. *Thorax*. 2021;76(7):733-6.
166. Brusselle GG, Vanderstichele C, Jordens P, Deman R, Slabbynck H, Ringoet V, et al. Azithromycin for prevention of exacerbations in severe asthma (AZISAST): a multicentre randomised double-blind placebo-controlled trial. *Thorax*. 2013;68(4):322-9.
167. Andersson CK, Adams A, Nagakumar P, Bossley C, Gupta A, De Vries D, et al. Intraepithelial neutrophils in pediatric severe asthma are associated with better lung function. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(6):1819-29 e11.
168. Hauk PJ, Krawiec M, Murphy J, Boguniewicz J, Schiltz A, Goleva E, et al. Neutrophilic airway inflammation and association with bacterial lipopolysaccharide in children with asthma and wheezing. *Pediatr Pulmonol*. 2008;43(9):916-23.

169. Tang FS, Van Ly D, Spann K, Reading PC, Burgess JK, Hartl D, et al. Differential neutrophil activation in viral infections: Enhanced TLR-7/8-mediated CXCL8 release in asthma. *Respirology*. 2016;21(1):172-9.
170. Dworski R, Simon HU, Hoskins A, Yousefi S. Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(5):1260-6.
171. Asman B, Strand V, Bylin G, Bergstrom K. Peripheral neutrophils after allergic asthmatic reactions. *Int J Clin Lab Res*. 1997;27(3):185-8.
172. Boulet LP, Turcotte H, Boutet M, Montminy L, Laviolette M. Influence of natural antigenic exposure on expiratory flows, methacholine responsiveness, and airway inflammation in mild allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1993;91(4):883-93.
173. Simpson JL, Gibson PG, Yang IA, Upham J, James A, Reynolds PN, et al. Impaired macrophage phagocytosis in non-eosinophilic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2013;43(1):29-35.
174. Siew LQC, Wu SY, Ying S, Corrigan CJ. Cigarette smoking increases bronchial mucosal IL-17A expression in asthmatics, which acts in concert with environmental aeroallergens to engender neutrophilic inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2017;47(6):740-50.
175. Chalmers GW, MacLeod KJ, Thomson L, Little SA, McSharry C, Thomson NC. Smoking and airway inflammation in patients with mild asthma. *Chest*. 2001;120(6):1917-22.
176. Shimoda T, Obase Y, Kishikawa R, Iwanaga T. Influence of cigarette smoking on airway inflammation and inhaled corticosteroid treatment in patients with asthma. *Allergy Asthma Proc*. 2016;37(4):50-8.
177. de Magalhaes Simoes S, dos Santos MA, da Silva Oliveira M, Fontes ES, Fernezlian S, Garippo AL, et al. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(5):602-11.
178. Hernandez ML, Lay JC, Harris B, Esther CR, Jr., Brickey WJ, Bromberg PA, et al. Atopic asthmatic subjects but not atopic subjects without asthma have enhanced inflammatory response to ozone. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(3):537-44 e1.
179. Bosson J, Barath S, Pourazar J, Behndig AF, Sandstrom T, Blomberg A, et al. Diesel exhaust exposure enhances the ozone-induced airway inflammation in healthy humans. *Eur Respir J*. 2008;31(6):1234-40.

180. Lemiere C, Chaboillez S, Malo JL, Cartier A. Changes in sputum cell counts after exposure to occupational agents: what do they mean? *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107(6):1063-8.
181. Lemiere C, Chaboillez S, Welman M, Maghni K. Outcome of occupational asthma after removal from exposure: A follow-up study. *Can Respir J*. 2010;17(2):61-6.
182. Maghni K, Lemiere C, Ghezzi H, Yuquan W, Malo JL. Airway inflammation after cessation of exposure to agents causing occupational asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(3):367-72.
183. Lemiere C, Romeo P, Chaboillez S, Tremblay C, Malo JL. Airway inflammation and functional changes after exposure to different concentrations of isocyanates. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(4):641-6.
184. Matulonga B, Rava M, Siroux V, Bernard A, Dumas O, Pin I, et al. Women using bleach for home cleaning are at increased risk of non-allergic asthma. *Respir Med*. 2016;117:264-71.
185. Maneechotesuwan K, Essilfie-Quaye S, Kharitonov SA, Adcock IM, Barnes PJ. Loss of control of asthma following inhaled corticosteroid withdrawal is associated with increased sputum interleukin-8 and neutrophils. *Chest*. 2007;132(1):98-105.
186. Cox G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol*. 1995;154(9):4719-25.
187. Boulet LP, Turcotte H, Turcot O, Chakir J. Airway inflammation in asthma with incomplete reversibility of airflow obstruction. *Respir Med*. 2003;97(6):739-44.
188. Ordonez CL, Shaughnessy TE, Matthay MA, Fahy JV. Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: Clinical and biologic significance. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(4 Pt 1):1185-90.
189. Silkoff PE, Moore WC, Sterk PJ. Three Major Efforts to Phenotype Asthma: Severe Asthma Research Program, Asthma Disease Endotyping for Personalized Therapeutics, and Unbiased Biomarkers for the Prediction of Respiratory Disease Outcome. *Clin Chest Med*. 2019;40(1):13-28.
190. Louis R, Lau LC, Bron AO, Roldaan AC, Radermecker M, Djukanovic R. The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(1):9-16.

191. Shannon J, Ernst P, Yamauchi Y, Olivenstein R, Lemiere C, Foley S, et al. Differences in airway cytokine profile in severe asthma compared to moderate asthma. *Chest*. 2008;133(2):420-6.
192. Wenzel SE, Szeffler SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(3 Pt 1):737-43.
193. Leckie MJ, Bryan SA, Khan J, Dewar A, Aikman SL, McGrath J, et al. Automated quantitation of circulating neutrophil and eosinophil activation in asthmatic patients. *Thorax*. 2000;55(6):471-7.
194. Zhang L, Zhang X, Zheng J, Liu Y, Wang J, Wang G, et al. Depressive-symptom-associated IL-1beta and TNF-alpha release correlates with impaired bronchodilator response and neutrophilic airway inflammation in asthma. *Clin Exp Allergy*. 2019.
195. Lemiere C, Ernst P, Olivenstein R, Yamauchi Y, Govindaraju K, Ludwig MS, et al. Airway inflammation assessed by invasive and noninvasive means in severe asthma: eosinophilic and noneosinophilic phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(5):1033-9.
196. Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(10):1360-8.
197. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology*. 2006;11(1):54-61.
198. Wright TK, Gibson PG, Simpson JL, McDonald VM, Wood LG, Baines KJ. Neutrophil extracellular traps are associated with inflammation in chronic airway disease. *Respirology*. 2016;21(3):467-75.
199. Berry M, Morgan A, Shaw DE, Parker D, Green R, Brightling C, et al. Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and non-eosinophilic asthma. *Thorax*. 2007;62(12):1043-9.
200. Tillie-Leblond I, de Blic J, Jaubert F, Wallaert B, Scheinmann P, Gosset P. Airway remodeling is correlated with obstruction in children with severe asthma. *Allergy*. 2008;63(5):533-41.

201. Kaminska M, Foley S, Maghni K, Storness-Bliss C, Coxson H, Ghezzi H, et al. Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(1):45-51 e1-4.
202. de Blic J, Tillie-Leblond I, Tonnel AB, Jaubert F, Scheinmann P, Gosset P. Difficult asthma in children: an analysis of airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(1):94-100.
203. Fahy JV, Kim KW, Liu J, Boushey HA. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;95(4):843-52.
204. Kurashima K, Mukaida N, Fujimura M, Schroder JM, Matsuda T, Matsushima K. Increase of chemokine levels in sputum precedes exacerbation of acute asthma attacks. *J Leukoc Biol*. 1996;59(3):313-6.
205. Lamblin C, Gosset P, Tillie-Leblond I, Saulnier F, Marquette CH, Wallaert B, et al. Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(2):394-402.
206. Sur S, Crotty TB, Kephart GM, Hyma BA, Colby TV, Reed CE, et al. Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? *Am Rev Respir Dis*. 1993;148(3):713-9.
207. James AL, Noble PB, Drew SA, Mauad T, Bai TR, Abramson MJ, et al. Airway smooth muscle proliferation and inflammation in asthma. *J Appl Physiol (1985)*. 2018;125(4):1090-6.
208. Baines KJ, Simpson JL, Scott RJ, Gibson PG. Immune responses of airway neutrophils are impaired in asthma. *Exp Lung Res*. 2009;35(7):554-69.
209. Mann BS, Chung KF. Blood neutrophil activation markers in severe asthma: lack of inhibition by prednisolone therapy. *Respir Res*. 2006;7:59.
210. Mosca T, Menezes MC, Silva AV, Stirbulov R, Forte WC. Chemotactic and Phagocytic Activity of Blood Neutrophils in Allergic Asthma. *Immunol Invest*. 2015;44(5):509-20.
211. Gao P, Gibson PG, Baines KJ, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, et al. Anti-inflammatory deficiencies in neutrophilic asthma: reduced galectin-3 and IL-1RA/IL-1beta. *Respir Res*. 2015;16:5.
212. Baines KJ, Simpson JL, Bowden NA, Scott RJ, Gibson PG. Differential gene expression and cytokine production from neutrophils in asthma phenotypes. *Eur Respir J*. 2010;35(3):522-31.

213. Halwani R, Al-Abri J, Beland M, Al-Jahdali H, Halayko AJ, Lee TH, et al. CC and CXC chemokines induce airway smooth muscle proliferation and survival. *J Immunol.* 2011;186(7):4156-63.
214. Lachowicz-Scroggins ME, Dunican EM, Charbit AR, Raymond W, Looney MR, Peters MC, et al. Extracellular DNA, Neutrophil Extracellular Traps, and Inflammasome Activation in Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;199(9):1076-85.
215. Kim RY, Pinkerton JW, Essilfie AT, Robertson AAB, Baines KJ, Brown AC, et al. Role for NLRP3 Inflammasome-mediated, IL-1beta-Dependent Responses in Severe, Steroid-Resistant Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;196(3):283-97.
216. Xie S, Sukkar MB, Issa R, Khorasani NM, Chung KF. Mechanisms of induction of airway smooth muscle hyperplasia by transforming growth factor-beta. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;293(1):L245-53.
217. Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Page N, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108(3):430-8.
218. Krishnamoorthy N, Douda DN, Bruggemann TR, Ricklefs I, Duvall MG, Abdulnour RE, et al. Neutrophil cytoplasts induce TH17 differentiation and skew inflammation toward neutrophilia in severe asthma. *Sci Immunol.* 2018;3(26).
219. Newcomb DC, Cephus JY, Boswell MG, Fahrenholz JM, Langley EW, Feldman AS, et al. Estrogen and progesterone decrease let-7f microRNA expression and increase IL-23/IL-23 receptor signaling and IL-17A production in patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(4):1025-34 e11.
220. Zhao Y, Yang J, Gao YD, Guo W. Th17 immunity in patients with allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010;151(4):297-307.
221. Al-Ramli W, Prefontaine D, Chouiali F, Martin JG, Olivenstein R, Lemiere C, et al. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(5):1185-7.

222. Chakir J, Shannon J, Molet S, Fukakusa M, Elias J, Laviolette M, et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(6):1293-8.
223. Chang Y, Al-Alwan L, Risse PA, Halayko AJ, Martin JG, Baglole CJ, et al. Th17-associated cytokines promote human airway smooth muscle cell proliferation. *FASEB J*. 2012;26(12):5152-60.
224. Chang Y, Al-Alwan L, Risse PA, Roussel L, Rousseau S, Halayko AJ, et al. TH17 cytokines induce human airway smooth muscle cell migration. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(4):1046-53 e1-2.
225. Thorpe JE, Murlas CG. Leukotriene B4 potentiates airway muscle responsiveness in vivo and in vitro. *Prostaglandins*. 1986;31(5):899-908.
226. Hallahan AR, Armour CL, Black JL. Products of neutrophils and eosinophils increase the responsiveness of human isolated bronchial tissue. *Eur Respir J*. 1990;3(5):554-8.
227. Anticevich SZ, Hughes JM, Black JL, Armour CL. Induction of hyperresponsiveness in human airway tissue by neutrophils--mechanism of action. *Clin Exp Allergy*. 1996;26(5):549-56.
228. Liu H, Lazarus SC, Caughey GH, Fahy JV. Neutrophil elastase and elastase-rich cystic fibrosis sputum degranulate human eosinophils in vitro. *Am J Physiol*. 1999;276(1):L28-34.
229. Baines KJ, Simpson JL, Wood LG, Scott RJ, Gibson PG. Systemic upregulation of neutrophil alpha-defensins and serine proteases in neutrophilic asthma. *Thorax*. 2011;66(11):942-7.
230. Huang CD, Chen HH, Wang CH, Chou CL, Lin SM, Lin HC, et al. Human neutrophil-derived elastase induces airway smooth muscle cell proliferation. *Life Sci*. 2004;74(20):2479-92.
231. Komiya K, Kawano S, Suzuki I, Akaba T, Kadota JI, Rubin BK. Tiotropium inhibits mucin production stimulated by neutrophil elastase but not by IL-13. *Pulm Pharmacol Ther*. 2018;48:161-7.
232. Malavia NK, Raub CB, Mahon SB, Brenner M, Panettieri RA, Jr., George SC. Airway epithelium stimulates smooth muscle proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;41(3):297-304.
233. Hoshino M, Takahashi M, Takai Y, Sim J. Inhaled corticosteroids decrease subepithelial collagen deposition by modulation of the balance between matrix metalloproteinase-9 and tissue

inhibitor of metalloproteinase-1 expression in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104(2 Pt 1):356-63.

234. Kanazawa H, Kurihara N, Hirata K, Takeda T. The role of free radicals in airway obstruction in asthmatic patients. *Chest.* 1991;100(5):1319-22.

235. Meltzer S, Goldberg B, Lad P, Easton J. Superoxide generation and its modulation by adenosine in the neutrophils of subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1989;83(5):960-6.

236. Vachier I, Chanez P, Le Doucen C, Damon M, Descomps B, Godard P. Enhancement of reactive oxygen species formation in stable and unstable asthmatic patients. *Eur Respir J.* 1994;7(9):1585-92.

237. Vargas L, Patino PJ, Montoya F, Vanegas AC, Echavarria A, Garcia de Olarte D. A study of granulocyte respiratory burst in patients with allergic bronchial asthma. *Inflammation.* 1998;22(1):45-54.

238. Henricks PA, Nijkamp FP. Reactive oxygen species as mediators in asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 2001;14(6):409-20.

239. Linssen RS, Chai G, Ma J, Kummarapurugu AB, van Woensel JBM, Bem RA, et al. Neutrophil Extracellular Traps Increase Airway Mucus Viscoelasticity and Slow Mucus Particle Transit. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2021;64(1):69-78.

240. Huang Y, Zhang S, Fang X, Qin L, Fan Y, Ding D, et al. Plasma miR-199a-5p is increased in neutrophilic phenotype asthma patients and negatively correlated with pulmonary function. *PLoS One.* 2018;13(3):e0193502.

241. Kolonics F, Szeifert V, Timar CI, Ligeti E, Lorincz AM. The Functional Heterogeneity of Neutrophil-Derived Extracellular Vesicles Reflects the Status of the Parent Cell. *Cells.* 2020;9(12).

242. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(4):213-28.

243. Zucca E, Corsini E, Galbiati V, Lange-Consiglio A, Ferrucci F. Evaluation of amniotic mesenchymal cell derivatives on cytokine production in equine alveolar macrophages: an in vitro approach to lung inflammation. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):137.

244. Bahmer T, Krauss-Etschmann S, Buschmann D, Behrends J, Watz H, Kirsten AM, et al. RNA-seq-based profiling of extracellular vesicles in plasma reveals a potential role of miR-122-5p in asthma. *Allergy*. 2021;76(1):366-71.
245. Lucchetti D, Santini G, Perelli L, Ricciardi-Tenore C, Colella F, Mores N, et al. Detection and characterisation of extracellular vesicles in exhaled breath condensate and sputum of COPD and severe asthma patients. *Eur Respir J*. 2021;58(2).
246. Lasser C, O'Neil SE, Shelke GV, Sihlbom C, Hansson SF, Gho YS, et al. Exosomes in the nose induce immune cell trafficking and harbour an altered protein cargo in chronic airway inflammation. *J Transl Med*. 2016;14(1):181.
247. Rollet-Cohen V, Bourderioux M, Lipecka J, Chhuon C, Jung VA, Mesbahi M, et al. Comparative proteomics of respiratory exosomes in cystic fibrosis, primary ciliary dyskinesia and asthma. *J Proteomics*. 2018;185:1-7.
248. Francisco-Garcia AS, Garrido-Martin EM, Rupani H, Lau LCK, Martinez-Nunez RT, Howarth PH, et al. Small RNA Species and microRNA Profiles are Altered in Severe Asthma Nanovesicles from Broncho Alveolar Lavage and Associate with Impaired Lung Function and Inflammation. *Noncoding RNA*. 2019;5(4).
249. Torregrosa Paredes P, Esser J, Admyre C, Nord M, Rahman QK, Lukic A, et al. Bronchoalveolar lavage fluid exosomes contribute to cytokine and leukotriene production in allergic asthma. *Allergy*. 2012;67(7):911-9.
250. Hough KP, Wilson LS, Trevor JL, Strenkowski JG, Maina N, Kim YI, et al. Unique Lipid Signatures of Extracellular Vesicles from the Airways of Asthmatics. *Sci Rep*. 2018;8(1):10340.
251. Duarte D, Taveira-Gomes T, Sokhatska O, Palmares C, Costa R, Negro R, et al. Increased circulating platelet microparticles as a potential biomarker in asthma. *Allergy*. 2013;68(8):1073-5.
252. Levanen B, Bhakta NR, Torregrosa Paredes P, Barbeau R, Hiltbrunner S, Pollack JL, et al. Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(3):894-903.

253. Zhang XY, Chen ZC, Li N, Wang ZH, Guo YL, Tian CJ, et al. Exosomal transfer of activated neutrophil-derived lncRNA CRNDE promotes proliferation and migration of airway smooth muscle cells in asthma. *Hum Mol Genet.* 2021.
254. Hassan M, Jo T, Risse PA, Tolloczko B, Lemiere C, Olivenstein R, et al. Airway smooth muscle remodeling is a dynamic process in severe long-standing asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(5):1037-45 e3.
255. Lambert RK, Wiggs BR, Kuwano K, Hogg JC, Pare PD. Functional significance of increased airway smooth muscle in asthma and COPD. *J Appl Physiol (1985).* 1993;74(6):2771-81.
256. Ebina M, Takahashi T, Chiba T, Motomiya M. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148(3):720-6.
257. Begueret H, Berger P, Vernejoux JM, Dubuisson L, Marthan R, Tunon-de-Lara JM. Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *Thorax.* 2007;62(1):8-15.
258. Ma X, Cheng Z, Kong H, Wang Y, Unruh H, Stephens NL, et al. Changes in biophysical and biochemical properties of single bronchial smooth muscle cells from asthmatic subjects. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;283(6):L1181-9.
259. Miller W. The musculature of the finer division of the bronchial tree and its relation to certain pathological conditions. *Am Rev Tuberculosis* 1921;5:689-704.
260. James A, Carroll N. Airway smooth muscle in health and disease; methods of measurement and relation to function. *Eur Respir J.* 2000;15(4):782-9.
261. Hossain S, Heard B. Hyperplasia of bronchial muscle in asthma. *J Pathol.* 1973(110):319-31.
262. Hossain S. Quantitative measurement of bronchial muscle in men with asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1973;107(1):99-109.
263. Jones RL, Elliot JG, James AL. Estimating airway smooth muscle cell volume and number in airway sections. Sources of variability. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014;50(2):246-52.
264. Sparrow MP, Lamb JP. Ontogeny of airway smooth muscle: structure, innervation, myogenesis and function in the fetal lung. *Respir Physiol Neurobiol.* 2003;137(2-3):361-72.

265. Mitzner W. Airway smooth muscle: the appendix of the lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169(7):787-90.
266. Schittny JC, Miserocchi G, Sparrow MP. Spontaneous peristaltic airway contractions propel lung liquid through the bronchial tree of intact and fetal lung explants. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23(1):11-8.
267. Kondo T, Kobayashi I, Hayama N, Tazaki G, Bishop B. Effect of the respiratory-related bronchial rhythmic constriction on alveolar ventilation in the dog. *Respir Physiol Neurobiol.* 2003;139(1):63-74.
268. Nadel JA. Aerosol effects on smooth muscle and airway visualization technique. *Arch Intern Med.* 1973;131(1):83-7.
269. Wright DB, Trian T, Siddiqui S, Pascoe CD, Johnson JR, Dekkers BG, et al. Phenotype modulation of airway smooth muscle in asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013;26(1):42-9.
270. Chin LY, Bosse Y, Pascoe C, Hackett TL, Seow CY, Pare PD. Mechanical properties of asthmatic airway smooth muscle. *Eur Respir J.* 2012;40(1):45-54.
271. Trejo Bittar HE, Doberer D, Mehrad M, Strollo DC, Leader JK, Wenzel S, et al. Histologic Findings of Severe/Therapy-Resistant Asthma From Video-assisted Thoracoscopic Surgery Biopsies. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(2):182-8.
272. Cho SH, Seo JY, Choi DC, Yoon HJ, Cho YJ, Min KU, et al. Pathological changes according to the severity of asthma. *Clin Exp Allergy.* 1996;26(10):1210-9.
273. James AL, Elliot JG, Jones RL, Carroll ML, Mauad T, Bai TR, et al. Airway smooth muscle hypertrophy and hyperplasia in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(10):1058-64.
274. Ward JE, Harris T, Bamford T, Mast A, Pain MC, Robertson C, et al. Proliferation is not increased in airway myofibroblasts isolated from asthmatics. *Eur Respir J.* 2008;32(2):362-71.
275. Kuwano K, Bosken CH, Pare PD, Bai TR, Wiggs BR, Hogg JC. Small airways dimensions in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148(5):1220-5.
276. Dunnill MS, Massarella GR, Anderson JA. A comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis, and in emphysema. *Thorax.* 1969;24(2):176-9.

277. Ijpma G, Panariti A, Lauzon AM, Martin JG. Directional preference of airway smooth muscle mass increase in human asthmatic airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017;312(6):L845-L54.
278. van den Bosch WB, James AL, Tiddens H. Structure and function of small airways in asthma patients revisited. *Eur Respir Rev*. 2021;30(159).
279. Woodruff PG, Dolganov GM, Ferrando RE, Donnelly S, Hays SR, Solberg OD, et al. Hyperplasia of smooth muscle in mild to moderate asthma without changes in cell size or gene expression. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(9):1001-6.
280. Elliot JG, Jones RL, Abramson MJ, Green FH, Mauad T, McKay KO, et al. Distribution of airway smooth muscle remodelling in asthma: relation to airway inflammation. *Respirology*. 2015;20(1):66-72.
281. Regamey N, Ochs M, Hilliard TN, Muhlfeld C, Cornish N, Fleming L, et al. Increased airway smooth muscle mass in children with asthma, cystic fibrosis, and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(8):837-43.
282. Johnson PR, Roth M, Tamm M, Hughes M, Ge Q, King G, et al. Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(3):474-7.
283. Burgess JK, Lee JH, Ge Q, Ramsay EE, Poniris MH, Parmentier J, et al. Dual ERK and phosphatidylinositol 3-kinase pathways control airway smooth muscle proliferation: differences in asthma. *J Cell Physiol*. 2008;216(3):673-9.
284. Perry MM, Baker JE, Gibeon DS, Adcock IM, Chung KF. Airway smooth muscle hyperproliferation is regulated by microRNA-221 in severe asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;50(1):7-17.
285. Wang R, Wang Y, Liao G, Chen B, Panettieri RA, Jr., Penn RB, et al. Abi1 mediates airway smooth muscle cell proliferation and airway remodeling via Jak2/STAT3 signaling. *iScience*. 2022;25(2):103833.
286. Wang R, Liao G, Wang Y, Tang DD. Distinctive roles of Abi1 in regulating actin-associated proteins during human smooth muscle cell migration. *Sci Rep*. 2020;10(1):10667.
287. Wang Y, Liao G, Wang R, Tang DD. Acetylation of Abelson interactor 1 at K416 regulates actin cytoskeleton and smooth muscle contraction. *FASEB J*. 2021;35(9):e21811.

288. Gerthoffer WT, Schaafsma D, Sharma P, Ghavami S, Halayko AJ. Motility, survival, and proliferation. *Compr Physiol*. 2012;2(1):255-81.
289. Elliot JG, Noble PB, Mauad T, Bai TR, Abramson MJ, McKay KO, et al. Inflammation-dependent and independent airway remodelling in asthma. *Respirology*. 2018;23(12):1138-45.
290. Salter B, Pray C, Radford K, Martin JG, Nair P. Regulation of human airway smooth muscle cell migration and relevance to asthma. *Respir Res*. 2017;18(1):156.
291. Joubert P, Lajoie-Kadoch S, Labonte I, Gounni AS, Maghni K, Wellemans V, et al. CCR3 expression and function in asthmatic airway smooth muscle cells. *J Immunol*. 2005;175(4):2702-8.
292. Takeda N, Sumi Y, Prefontaine D, Al Abri J, Al Heialy N, Al-Ramli W, et al. Epithelium-derived chemokines induce airway smooth muscle cell migration. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(7):1018-26.
293. Pepe C, Foley S, Shannon J, Lemiere C, Olivenstein R, Ernst P, et al. Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(3):544-9.
294. Michalik M, Wojcik-Pszczola K, Paw M, Wnuk D, Koczurkiewicz P, Sanak M, et al. Fibroblast-to-myofibroblast transition in bronchial asthma. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(21):3943-61.
295. Thomson RJ, Bramley AM, Schellenberg RR. Airway muscle stereology: implications for increased shortening in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154(3 Pt 1):749-57.
296. Bai TR. Abnormalities in airway smooth muscle in fatal asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141(3):552-7.
297. Ijpma G, Kachmar L, Matusovsky OS, Bates JH, Benedetti A, Martin JG, et al. Human trachealis and main bronchi smooth muscle are normoresponsive in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191(8):884-93.
298. Ijpma G, Kachmar L, Panariti A, Matusovsky OS, Torgerson D, Benedetti A, et al. Intrapulmonary airway smooth muscle is hyperreactive with a distinct proteome in asthma. *Eur Respir J*. 2020;56(1).

299. Whicker SD, Armour CL, Black JL. Responsiveness of bronchial smooth muscle from asthmatic patients to relaxant and contractile agonists. *Pulm Pharmacol.* 1988;1(1):25-31.
300. Kan M, Koziol-White C, Shumyatcher M, Johnson M, Jester W, Panettieri RA, Jr., et al. Airway Smooth Muscle-Specific Transcriptomic Signatures of Glucocorticoid Exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2019;61(1):110-20.
301. John M, Au BT, Jose PJ, Lim S, Saunders M, Barnes PJ, et al. Expression and release of interleukin-8 by human airway smooth muscle cells: inhibition by Th-2 cytokines and corticosteroids. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;18(1):84-90.
302. Naveed SU, Clements D, Jackson DJ, Philp C, Billington CK, Soomro I, et al. Matrix Metalloproteinase-1 Activation Contributes to Airway Smooth Muscle Growth and Asthma Severity. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;195(8):1000-9.
303. Rogers NK, Clements D, Dongre A, Harrison TW, Shaw D, Johnson SR. Extra-cellular matrix proteins induce matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) activity and increase airway smooth muscle contraction in asthma. *PLoS One.* 2014;9(2):e90565.
304. Janulaityte I, Januskevicius A, Rimkunas A, Palacionyte J, Vitkauskiene A, Malakauskas K. Asthmatic Eosinophils Alter the Gene Expression of Extracellular Matrix Proteins in Airway Smooth Muscle Cells and Pulmonary Fibroblasts. *Int J Mol Sci.* 2022;23(8).
305. Burgess JK, Johnson PR, Ge Q, Au WW, Poniris MH, McParland BE, et al. Expression of connective tissue growth factor in asthmatic airway smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(1):71-7.
306. Castro-Rodriguez JA, Saglani S, Rodriguez-Martinez CE, Oyarzun MA, Fleming L, Bush A. The relationship between inflammation and remodeling in childhood asthma: A systematic review. *Pediatr Pulmonol.* 2018;53(6):824-35.
307. Joubert P, Lajoie-Kadoch S, Welman M, Dragon S, Letuvee S, Tolloczko B, et al. Expression and regulation of CCR1 by airway smooth muscle cells in asthma. *J Immunol.* 2008;180(2):1268-75.
308. Govindaraju V, Michoud MC, Al-Chalabi M, Ferraro P, Powell WS, Martin JG. Interleukin-8: novel roles in human airway smooth muscle cell contraction and migration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;291(5):C957-65.

309. Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med*. 2002;346(22):1699-705.
310. Kelly MM, O'Connor TM, Leigh R, Otis J, Gwozd C, Gauvreau GM, et al. Effects of budesonide and formoterol on allergen-induced airway responses, inflammation, and airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2):349-56 e13.
311. Inoue H, Ito I, Niimi A, Matsumoto H, Matsuoka H, Jinnai M, et al. CT-assessed large airway involvement and lung function decline in eosinophilic asthma: The association between induced sputum eosinophil differential counts and airway remodeling. *J Asthma*. 2016;53(9):914-21.
312. O'Reilly R, Ullmann N, Irving S, Bossley CJ, Sonnappa S, Zhu J, et al. Increased airway smooth muscle in preschool wheezers who have asthma at school age. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(4):1024-32, 32 e1-16.
313. Saglani S, Malmstrom K, Pelkonen AS, Malmberg LP, Lindahl H, Kajosaari M, et al. Airway remodeling and inflammation in symptomatic infants with reversible airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(7):722-7.
314. Blyth DI, Pedrick MS, Savage TJ, Hessel EM, Fattah D. Lung inflammation and epithelial changes in a murine model of atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996;14(5):425-38.
315. Owens L, Laing IA, Zhang G, Le Souef PN. Infant lung function predicts asthma persistence and remission in young adults. *Respirology*. 2017;22(2):289-94.
316. McEvoy CT, Spindel ER. Pulmonary Effects of Maternal Smoking on the Fetus and Child: Effects on Lung Development, Respiratory Morbidities, and Life Long Lung Health. *Paediatr Respir Rev*. 2017;21:27-33.
317. Grainge CL, Lau LC, Ward JA, Dulay V, Lahiff G, Wilson S, et al. Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma. *N Engl J Med*. 2011;364(21):2006-15.
318. Berair R, Hartley R, Mistry V, Sheshadri A, Gupta S, Singapuri A, et al. Associations in asthma between quantitative computed tomography and bronchial biopsy-derived airway remodelling. *Eur Respir J*. 2017;49(5).
319. Gupta A, Sjoukes A, Richards D, Banya W, Hawrylowicz C, Bush A, et al. Relationship between serum vitamin D, disease severity, and airway remodeling in children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(12):1342-9.

320. d'Hooghe JNS, Goorsenberg AWM, Ten Hacken NHT, Weersink EJM, Roelofs J, Mauad T, et al. Airway smooth muscle reduction after bronchial thermoplasty in severe asthma correlates with FEV1. *Clin Exp Allergy*. 2019;49(4):541-4.
321. Bergeron C, Hauber HP, Gotfried M, Newman K, Dhanda R, Servi RJ, et al. Evidence of remodeling in peripheral airways of patients with mild to moderate asthma: effect of hydrofluoroalkane-flunisolide. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(5):983-9.
322. Niimi A, Matsumoto H, Takemura M, Ueda T, Chin K, Mishima M. Relationship of airway wall thickness to airway sensitivity and airway reactivity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(8):983-8.
323. Boulet LP. Airway remodeling in asthma: update on mechanisms and therapeutic approaches. *Curr Opin Pulm Med*. 2018;24(1):56-62.
324. Knight DA, Holgate ST. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology*. 2003;8(4):432-46.
325. Laprise C, Laviolette M, Boutet M, Boulet LP. Asymptomatic airway hyperresponsiveness: relationships with airway inflammation and remodelling. *Eur Respir J*. 1999;14(1):63-73.
326. Ordonez C, Ferrando R, Hyde DM, Wong HH, Fahy JV. Epithelial desquamation in asthma: artifact or pathology? *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(6):2324-9.
327. Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M, Takishima T. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest*. 1992;101(4):916-21.
328. van den Toorn LM, Overbeek SE, de Jongste JC, Leman K, Hoogsteden HC, Prins JB. Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(11):2107-13.
329. Banno A, Reddy AT, Lakshmi SP, Reddy RC. Bidirectional interaction of airway epithelial remodeling and inflammation in asthma. *Clin Sci (Lond)*. 2020;134(9):1063-79.
330. Hastie AT, Kraft WK, Nyce KB, Zangrilli JG, Musani AI, Fish JE, et al. Asthmatic epithelial cell proliferation and stimulation of collagen production: human asthmatic epithelial cells stimulate collagen type III production by human lung myofibroblasts after segmental allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(2):266-72.

331. Michalik M, Pierzchalska M, Legutko A, Ura M, Ostaszewska A, Soja J, et al. Asthmatic bronchial fibroblasts demonstrate enhanced potential to differentiate into myofibroblasts in culture. *Med Sci Monit.* 2009;15(7):BR194-201.
332. Fehrenbach H, Wagner C, Wegmann M. Airway remodeling in asthma: what really matters. *Cell Tissue Res.* 2017;367(3):551-69.
333. Durrani SR, Viswanathan RK, Busse WW. What effect does asthma treatment have on airway remodeling? Current perspectives. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(3):439-48; quiz 49-50.
334. Chetta A, Foresi A, Del Donno M, Bertorelli G, Pesci A, Olivieri D. Airways remodeling is a distinctive feature of asthma and is related to severity of disease. *Chest.* 1997;111(4):852-7.
335. Chu HW, Halliday JL, Martin RJ, Leung DY, Szeffler SJ, Wenzel SE. Collagen deposition in large airways may not differentiate severe asthma from milder forms of the disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158(6):1936-44.
336. Pohunek P, Warner JO, Turzikova J, Kudrman J, Roche WR. Markers of eosinophilic inflammation and tissue re-modelling in children before clinically diagnosed bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol.* 2005;16(1):43-51.
337. Shimura S, Andoh Y, Haraguchi M, Shirato K. Continuity of airway goblet cells and intraluminal mucus in the airways of patients with bronchial asthma. *Eur Respir J.* 1996;9(7):1395-401.
338. Hamid Q, Song Y, Kotsimbos TC, Minshall E, Bai TR, Hegele RG, et al. Inflammation of small airways in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;100(1):44-51.
339. Balzar S, Wenzel SE, Chu HW. Transbronchial biopsy as a tool to evaluate small airways in asthma. *Eur Respir J.* 2002;20(2):254-9.
340. Carroll NG, Mutavdzic S, James AL. Increased mast cells and neutrophils in submucosal mucous glands and mucus plugging in patients with asthma. *Thorax.* 2002;57(8):677-82.
341. Alagha K, Bourdin A, Vernisse C, Garulli C, Tummino C, Charriot J, et al. Goblet cell hyperplasia as a feature of neutrophilic asthma. *Clin Exp Allergy.* 2019;49(6):781-8.
342. Aun MV, Bonamichi-Santos R, Arantes-Costa FM, Kalil J, Giavina-Bianchi P. Animal models of asthma: utility and limitations. *J Asthma Allergy.* 2017;10:293-301.

343. Rosenberg HF, Druey KM. Modeling asthma: Pitfalls, promises, and the road ahead. *J Leukoc Biol.* 2018;104(1):41-8.
344. Hyde DM, Hamid Q, Irvin CG. Anatomy, pathology, and physiology of the tracheobronchial tree: emphasis on the distal airways. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(6 Suppl):S72-7.
345. Karol MH. Animal models of occupational asthma. *Eur Respir J.* 1994;7(3):555-68.
346. Ramos-Barbon D, Ludwig MS, Martin JG. Airway remodeling: lessons from animal models. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2004;27(1):3-21.
347. Martin JG, Tamaoka M. Rat models of asthma and chronic obstructive lung disease. *Pulm Pharmacol Ther.* 2006;19(6):377-85.
348. Martin JG, Novali M. Small animals models for drug discovery. *Pulm Pharmacol Ther.* 2011;24(5):513-24.
349. Reiner CR. Advances in the understanding of pathogenesis, and diagnostics and therapeutics for feline allergic asthma. *Vet J.* 2011;190(1):28-33.
350. Trzil JE. Feline Asthma: Diagnostic and Treatment Update. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2020;50(2):375-91.
351. Couetil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Leguillette R, Richard EA. Inflammatory Airway Disease of Horses--Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med.* 2016;30(2):503-15.
352. Ivester KM, Couetil LL, Moore GE. An observational study of environmental exposures, airway cytology, and performance in racing thoroughbreds. *J Vet Intern Med.* 2018;32(5):1754-62.
353. Ramseyer A, Gaillard C, Burger D, Straub R, Jost U, Boog C, et al. Effects of genetic and environmental factors on chronic lower airway disease in horses. *J Vet Intern Med.* 2007;21(1):149-56.
354. Hotchkiss JW, Reid SW, Christley RM. 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):301-8.
355. Lavoie-Lamoureux A, Leclere M, Lemos K, Wagner B, Lavoie JP. Markers of systemic inflammation in horses with heaves. *J Vet Intern Med.* 2012;26(6):1419-26.

356. Van Erck E, Votion D, Art T, Lekeux P. Qualitative and quantitative evaluation of equine respiratory mechanics by impulse oscillometry. *Equine Vet J.* 2006;38(1):52-8.
357. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Joubert P, Relave F, Setlakwe EL, Beauchamp G, et al. Corticosteroids and antigen avoidance decrease airway smooth muscle mass in an equine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;47(5):589-96.
358. Morini M, Peli A, Rinnovati R, Magazzu G, Romagnoli N, Spadari A, et al. Immunohistochemical Expression of Neurokinin-A and Interleukin-8 in the Bronchial Epithelium of Horses with Severe Equine Asthma Syndrome during Asymptomatic, Exacerbation, and Remission Phase. *Animals (Basel).* 2021;11(5).
359. Theegarten D, Sachse K, Mentrup B, Fey K, Hotzel H, Anhenn O. *Chlamydophila* spp. infection in horses with recurrent airway obstruction: similarities to human chronic obstructive disease. *Respir Res.* 2008;9:14.
360. Naylor JM, Clark EG, Clayton HM. Chronic obstructive pulmonary disease: Usefulness of clinical signs, bronchoalveolar lavage, and lung biopsy as diagnostic and prognostic aids. *Can Vet J.* 1992;33(9):591-8.
361. Courouce-Malblanc A, Deniau V, Rossignol F, Corde R, Leleu C, Maillard K, et al. Physiological measurements and prevalence of lower airway diseases in Trotters with dorsal displacement of the soft palate. *Equine Vet J Suppl.* 2010(38):246-55.
362. Weinberger M, Abu-Hasan M. Pseudo-asthma: when cough, wheezing, and dyspnea are not asthma. *Pediatrics.* 2007;120(4):855-64.
363. Smith BL, Aguilera-Tejero E, Tyler WS, Jones JH, Hornof WJ, Pascoe JR. Endoscopic anatomy and map of the equine bronchial tree. *Equine Vet J.* 1994;26(4):283-90.
364. Nakakuki S. The bronchial tree and lobular division of the horse lung. *J Vet Med Sci.* 1993;55(3):435-8.
365. Schaeper W. Investigation on the heritability and the nature of heaves in the horse. *Tieraerztl Rundschau.* 1939;31:595-9.
366. Marti E, Gerber H, Essich G, Oulehla J, Lazary S. The genetic basis of equine allergic diseases. 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. *Equine Vet J.* 1991;23(6):457-60.

367. Klukowska-Rotzler J, Swinburne JE, Drogemuller C, Dolf G, Janda J, Leeb T, et al. The interleukin 4 receptor gene and its role in recurrent airway obstruction in Swiss Warmblood horses. *Anim Genet.* 2012;43(4):450-3.
368. Kehrli D, Jandova V, Fey K, Jahn P, Gerber V. Multiple hypersensitivities including recurrent airway obstruction, insect bite hypersensitivity, and urticaria in 2 warmblood horse populations. *J Vet Intern Med.* 2015;29(1):320-6.
369. Couetil LL, Ward MP. Analysis of risk factors for recurrent airway obstruction in North American horses: 1,444 cases (1990-1999). *J Am Vet Med Assoc.* 2003;223(11):1645-50.
370. Simoes J, Sales Luis JP, Tilley P. Owner Compliance to an Environmental Management Protocol for Severe Equine Asthma Syndrome. *J Equine Vet Sci.* 2020;87:102937.
371. Beeler-Marfisi J, Clark ME, Wen X, Sears W, Huber L, Ackerley C, et al. Experimental induction of recurrent airway obstruction with inhaled fungal spores, lipopolysaccharide, and silica microspheres in horses. *Am J Vet Res.* 2010;71(6):682-9.
372. McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE. Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens. *Equine Vet J.* 1993;25(4):261-7.
373. Pirie RS, Collie DD, Dixon PM, McGorum BC. Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma). *Clin Exp Allergy.* 2003;33(5):676-83.
374. Dauvillier J, Ter Woort F, van Erck-Westergren E. Fungi in respiratory samples of horses with inflammatory airway disease. *J Vet Intern Med.* 2019;33(2):968-75.
375. Di Pietro R, Dubuc V, Manguin E, Giroux-Lafond R, Bedard C, Boivin R, et al. Characterization of fungal exposure and dectin-1 expression in healthy horses and horses with severe asthma. *Am J Vet Res.* 2022;83(6).
376. Siegers EW, Anthonisse M, van Eerdenburg F, van den Broek J, Wouters IM, Westermann CM. Effect of ionization, bedding, and feeding on air quality in a horse stable. *J Vet Intern Med.* 2018;32(3):1234-40.
377. Pirie RS. Recurrent airway obstruction: a review. *Equine Vet J.* 2014;46(3):276-88.

378. Arroyo MG, Couetil LL, Nogradi N, Kamarudin MM, Ivester KM. Efficacy of Inhaled Levalbuterol Compared to Albuterol in Horses with Recurrent Airway Obstruction. *J Vet Intern Med.* 2016;30(4):1333-7.
379. Tessier L, Cote O, Clark ME, Viel L, Diaz-Mendez A, Anders S, et al. Impaired response of the bronchial epithelium to inflammation characterizes severe equine asthma. *BMC Genomics.* 2017;18(1):708.
380. Cornelisse CJ, Robinson NE, Berney CE, Kobe CA, Boruta DT, Derksen FJ. Efficacy of oral and intravenous dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction. *Equine Vet J.* 2004;36(5):426-30.
381. Niedzwiedz A, Jaworski Z. Oxidant-antioxidant status in the blood of horses with symptomatic recurrent airway obstruction (RAO). *J Vet Intern Med.* 2014;28(6):1845-52.
382. Jochmans-Lemoine A, Picotte K, Beauchamp G, Vargas A, Lavoie JP. Effects of a propriety oiled mixed hay feeding system on lung function, neutrophilic airway inflammation and oxidative stress in severe asthmatic horses. *Equine Vet J.* 2020;52(4):564-71.
383. Vandenput S, Votion D, Duvivier DH, Van Erck E, Anciaux N, Art T, et al. Effect of a set stabled environmental control on pulmonary function and airway reactivity of COPD affected horses. *Vet J.* 1998;155(2):189-95.
384. Orard M, Hue E, Courouce A, Bizon-Mercier C, Toquet MP, Moore-Colyer M, et al. The influence of hay steaming on clinical signs and airway immune response in severe asthmatic horses. *BMC Vet Res.* 2018;14(1):345.
385. Bullone M, Murcia RY, Lavoie JP. Environmental heat and airborne pollen concentration are associated with increased asthma severity in horses. *Equine Vet J.* 2016;48(4):479-84.
386. Lanz S, Brunner A, Graubner C, Marti E, Gerber V. Insect Bite Hypersensitivity in Horses is Associated with Airway Hyperreactivity. *J Vet Intern Med.* 2017;31(6):1877-83.
387. Klier J, Lindner D, Reese S, Mueller RS, Gehlen H. Comparison of Four Different Allergy Tests in Equine Asthma Affected Horses and Allergen Inhalation Provocation Test. *J Equine Vet Sci.* 2021;102:103433.

388. Verdon M, Lanz S, Rhyner C, Gerber V, Marti E. Allergen-specific immunoglobulin E in sera of horses affected with insect bite hypersensitivity, severe equine asthma or both conditions. *J Vet Intern Med.* 2019;33(1):266-74.
389. White SJ, Moore-Colyer M, Marti E, Hannant D, Gerber V, Couetil L, et al. Antigen array for serological diagnosis and novel allergen identification in severe equine asthma. *Sci Rep.* 2019;9(1):15170.
390. Newton JR, Wood JL, Chanter N. A case control study of factors and infections associated with clinically apparent respiratory disease in UK Thoroughbred racehorses. *Prev Vet Med.* 2003;60(1):107-32.
391. Thomas SJ, de Solis CN, Coleman MC. Case-Control Study of Risk Factors for Equine Asthma in Texas. *J Equine Vet Sci.* 2021;103:103644.
392. Mainguy-Seers S, Diaw M, Lavoie JP. Lung Function Variation during the Estrus Cycle of Mares Affected by Severe Asthma. *Animals (Basel).* 2022;12(4).
393. Couetil L, Ivester K, Barnum S, Pusterla N. Equine respiratory viruses, airway inflammation and performance in thoroughbred racehorses. *Vet Microbiol.* 2021;257:109070.
394. Houtsma A, Bedenice D, Pusterla N, Pugliese B, Mapes S, Hoffman AM, et al. Association between inflammatory airway disease of horses and exposure to respiratory viruses: a case control study. *Multidiscip Respir Med.* 2015;10:33.
395. Murray MJ, Eichorn ES, Dubovi EJ, Ley WB, Cavey DM. Equine herpesvirus type 2: prevalence and seroepidemiology in foals. *Equine Vet J.* 1996;28(6):432-6.
396. Borchers K, Wolfinger U, Goltz M, Broll H, Ludwig H. Distribution and relevance of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) infections. *Arch Virol.* 1997;142(5):917-28.
397. Christley RM, Hodgson DR, Rose RJ, Hodgson JL, Wood JL, Reid SW. Coughing in thoroughbred racehorses: risk factors and tracheal endoscopic and cytological findings. *Vet Rec.* 2001;148(4):99-104.
398. Manguin E, Pepin E, Boivin R, Leclere M. Tracheal microbial populations in horses with moderate asthma. *J Vet Intern Med.* 2020;34(2):986-95.

399. Fillion-Bertrand G, Dickson RP, Boivin R, Lavoie JP, Huffnagle GB, Leclere M. Lung Microbiome Is Influenced by the Environment and Asthmatic Status in an Equine Model of Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2019;60(2):189-97.
400. Giguere S, Viel L, Lee E, MacKay RJ, Hernandez J, Franchini M. Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Vet Immunol Immunopathol*. 2002;85(3-4):147-58.
401. Cordeau ME, Joubert P, Dewachi O, Hamid Q, Lavoie JP. IL-4, IL-5 and IFN-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Vet Immunol Immunopathol*. 2004;97(1-2):87-96.
402. Lavoie JP, Maghni K, Desnoyers M, Taha R, Martin JG, Hamid QA. 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):1410-3.
403. Beekman L, Tohver T, Leguillette R. Comparison of cytokine mRNA expression in the bronchoalveolar lavage fluid of horses with inflammatory airway disease and bronchoalveolar lavage mastocytosis or neutrophilia using REST software analysis. *J Vet Intern Med*. 2012;26(1):153-61.
404. Dewachi O, Joubert P, Hamid Q, Lavoie JP. Expression of interleukin (IL)-5 and IL-9 receptors on neutrophils of horses with heaves. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006;109(1-2):31-6.
405. Horohov DW, Beadle RE, Mouch S, Pourciau SS. Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005;108(1-2):237-45.
406. Lavoie JP, Cesarini C, Lavoie-Lamoureux A, Moran K, Lutz S, Picandet V, et al. Bronchoalveolar lavage fluid cytology and cytokine messenger ribonucleic Acid expression of racehorses with exercise intolerance and lower airway inflammation. *J Vet Intern Med*. 2011;25(2):322-9.
407. Vargas A, Boivin R, Cano P, Murcia Y, Bazin I, Lavoie JP. Neutrophil extracellular traps are downregulated by glucocorticosteroids in lungs in an equine model of asthma. *Respir Res*. 2017;18(1):207.

408. Bond SL, Hundt J, Leguillette R. Effect of injected dexamethasone on relative cytokine mRNA expression in bronchoalveolar lavage fluid in horses with mild asthma. *BMC Vet Res.* 2019;15(1):397.
409. Fairbairn SM, Page CP, Lees P, Cunningham FM. Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure. *Clin Exp Allergy.* 1993;23(10):821-8.
410. Raulo SM, Sorsa T, Tervahartiala T, Pirila E, Maisi P. MMP-9 as a marker of inflammation in tracheal epithelial lining fluid (TELF) and in bronchoalveolar fluid (BALF) of COPD horses. *Equine Vet J.* 2001;33(2):128-36.
411. Herteman N, Grimes C, Lavoie JP. Retrospective investigation of automated hematology analyzer-determined indicators of neutrophil activation in blood samples from horses with asthma. *Am J Vet Res.* 2021;82(9):737-45.
412. Traub-Dargatz JL, McKinnon AO, Thrall MA, Jones RL, Bruyninckx W, Blancquaert AM, et al. Evaluation of clinical signs of disease, bronchoalveolar and tracheal wash analysis, and arterial blood gas tensions in 13 horses with chronic obstructive pulmonary disease treated with prednisone, methyl sulfonmethane, and clenbuterol hydrochloride. *Am J Vet Res.* 1992;53(10):1908-16.
413. Lugo J, Harkema JR, deFeijter-Rupp H, Bartner L, Boruta D, Robinson NE. Airway inflammation is associated with mucous cell metaplasia and increased intraepithelial stored mucosubstances in horses. *Vet J.* 2006;172(2):293-301.
414. Ter Woort F, Caswell JL, Arroyo LG, Viel L. Histologic investigation of airway inflammation in postmortem lung samples from racehorses. *Am J Vet Res.* 2018;79(3):342-7.
415. Bullone M, Joubert P, Gagne A, Lavoie JP, Helie P. Bronchoalveolar lavage fluid neutrophilia is associated with the severity of pulmonary lesions during equine asthma exacerbations. *Equine Vet J.* 2018;50(5):609-15.
416. Vargas A, Roux-Dalvai F, Droit A, Lavoie JP. Neutrophil-Derived Exosomes: A New Mechanism Contributing to Airway Smooth Muscle Remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;55(3):450-61.

417. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Gelinias-Lymburner E, David F, Martin JG, Lavoie JP. 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):181-7.
418. Herszberg B, Ramos-Barbon D, Tamaoka M, Martin JG, Lavoie JP. Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(2):382-8.
419. Ferrari CR, Cooley J, Mujahid N, Costa LR, Wills RW, Johnson ME, et al. Horses With Pasture Asthma Have Airway Remodeling That Is Characteristic of Human Asthma. *Vet Pathol*. 2018;55(1):144-58.
420. Matusovsky OS, Kachmar L, Ijpma G, Bates G, Zitouni N, Benedetti A, et al. Peripheral Airway Smooth Muscle, but Not the Trachealis, Is Hypercontractile in an Equine Model of Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;54(5):718-27.
421. Leguillette R, Laviolette M, Bergeron C, Zitouni N, Kogut P, Solway J, et al. Myosin, transgelin, and myosin light chain kinase: expression and function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179(3):194-204.
422. Boivin R, Vargas A, Lefebvre-Lavoie J, Lauzon AM, Lavoie JP. Inhaled corticosteroids modulate the (+)insert smooth muscle myosin heavy chain in the equine asthmatic airways. *Thorax*. 2014;69(12):1113-9.
423. Bullone M, Chevigny M, Allano M, Martin JG, Lavoie JP. Technical and physiological determinants of airway smooth muscle mass in endobronchial biopsy samples of asthmatic horses. *J Appl Physiol (1985)*. 2014;117(7):806-15.
424. Bessonnat A, Helie P, Grimes C, Lavoie JP. Airway remodeling in horses with mild and moderate asthma. *J Vet Intern Med*. 2022;36(1):285-91.
425. Dupuis-Dowd F, Lavoie JP. Airway smooth muscle remodelling in mild and moderate equine asthma. *Equine Vet J*. 2021.
426. Kaup FJ, Drommer W, Deegen E. Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). I: Alterations of the larger conducting airways. *Equine Vet J*. 1990;22(5):343-8.

427. Nyman G, Lindberg R, Weckner D, Bjork M, Kwart C, Persson SG, et al. Pulmonary gas exchange correlated to clinical signs and lung pathology in horses with chronic bronchiolitis. *Equine Vet J.* 1991;23(4):253-60.
428. Kaup FJ, Drommer W, Damsch S, Deegen E. 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):349-55.
429. Katavolos P, Ackerley CA, Viel L, Clark ME, Wen X, Bienzle D. Clara cell secretory protein is reduced in equine recurrent airway obstruction. *Vet Pathol.* 2009;46(4):604-13.
430. Bullone M, Helie P, Joubert P, Lavoie JP. Development of a Semiquantitative Histological Score for the Diagnosis of Heaves Using Endobronchial Biopsy Specimens in Horses. *J Vet Intern Med.* 2016;30(5):1739-46.
431. Dubuc J, Lavoie JP. Airway wall eosinophilia is not a feature of equine heaves. *Vet J.* 2014;202(2):387-9.
432. Lee GKC, Beeler-Marfisi J, Viel L, Piche E, Kang H, Sears W, et al. Bronchial brush cytology, endobronchial biopsy, and SALSA immunohistochemistry in severe equine asthma. *Vet Pathol.* 2022;59(1):100-11.
433. Furness MC, Bienzle D, Caswell JL, Delay J, Viel L. Immunohistochemical identification of collagen in the equine lung. *Vet Pathol.* 2010;47(5):982-90.
434. Setlakwe EL, Lemos KR, Lavoie-Lamoureux A, Duguay JD, Lavoie JP. Airway collagen and elastic fiber content correlates with lung function in equine heaves. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014;307(3):L252-60.
435. Bullone M, Vargas A, Elce Y, Martin JG, Lavoie JP. Fluticasone/salmeterol reduces remodelling and neutrophilic inflammation in severe equine asthma. *Sci Rep.* 2017;7(1):8843.
436. Millares-Ramirez EM, Lavoie JP. Bronchial angiogenesis in horses with severe asthma and its response to corticosteroids. *J Vet Intern Med.* 2021;35(4):2026-34.
437. Herteman N, Bullone M, Lavoie JP. Endoscopic Evaluation of Angiogenesis in the Large Airways of Horses with Heaves Using Narrow Band Imaging. *J Vet Intern Med.* 2016;30(2):671-4.
438. Ceriotti S, Bullone M, Leclere M, Ferrucci F, Lavoie JP. Severe asthma is associated with a remodeling of the pulmonary arteries in horses. *PLoS One.* 2020;15(10):e0239561.

439. Hinks TSC, Levine SJ, Brusselle GG. Treatment options in type-2 low asthma. *Eur Respir J*. 2021;57(1).
440. Reddel HK, Taylor DR, Bateman ED, Boulet LP, Boushey HA, Busse WW, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: asthma control and exacerbations: standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(1):59-99.
441. Mainguy-Seers S, Lavoie JP. Glucocorticoid treatment in horses with asthma: A narrative review. *J Vet Intern Med*. 2021;35(4):2045-57.
442. Vandewalle J, Luypaert A, De Bosscher K, Libert C. Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29(1):42-54.
443. Barnes PJ. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(3):636-45.
444. Pujols L, Mullol J, Torrego A, Picado C. Glucocorticoid receptors in human airways. *Allergy*. 2004;59(10):1042-52.
445. Panettieri RA, Schaafsma D, Amrani Y, Koziol-White C, Ostrom R, Tliba O. Non-genomic Effects of Glucocorticoids: An Updated View. *Trends Pharmacol Sci*. 2019;40(1):38-49.
446. Alangari AA. Genomic and non-genomic actions of glucocorticoids in asthma. *Ann Thorac Med*. 2010;5(3):133-9.
447. Park HJ, Huh JY, Lee JS, Lee JS, Oh YM, Lee SW. Comparative efficacy of inhalers in mild-to-moderate asthma: systematic review and network meta-analysis. *Sci Rep*. 2022;12(1):5949.
448. Bateman ED, Esser D, Chirila C, Fernandez M, Fowler A, Moroni-Zentgraf P, et al. Magnitude of effect of asthma treatments on Asthma Quality of Life Questionnaire and Asthma Control Questionnaire scores: Systematic review and network meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(4):914-22.
449. Tan DJ, Bui DS, Dai X, Lodge CJ, Lowe AJ, Thomas PS, et al. Does the use of inhaled corticosteroids in asthma benefit lung function in the long-term? A systematic review and meta-analysis. *Eur Respir Rev*. 2021;30(159).

450. Loymans RJ, Gemperli A, Cohen J, Rubinstein SM, Sterk PJ, Reddel HK, et al. Comparative effectiveness of long term drug treatment strategies to prevent asthma exacerbations: network meta-analysis. *BMJ*. 2014;348:g3009.
451. Pavord ID, Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. *Lancet*. 1999;353(9171):2213-4.
452. Mainguy-Seers S. Revue des nouveautés thérapeutiques ciblant l'asthme équin. *Pratique Vétérinaire Équine*. 2021(212):48-53.
453. Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T. A comparative study of the effects of an inhaled corticosteroid, budesonide, and a beta 2-agonist, terbutaline, on airway inflammation in newly diagnosed asthma: a randomized, double-blind, parallel-group controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. 1992;90(1):32-42.
454. Chakir J, Hamid Q, Bosse M, Boulet LP, Laviolette M. Bronchial inflammation in corticosteroid-sensitive and corticosteroid-resistant asthma at baseline and on oral corticosteroid treatment. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(4):578-82.
455. de Kluijver J, Schrupf JA, Evertse CE, Sont JK, Roughley PJ, Rabe KF, et al. Bronchial matrix and inflammation respond to inhaled steroids despite ongoing allergen exposure in asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(10):1361-9.
456. Brooks CR, Van Dalen CJ, Harding E, Hermans IF, Douwes J. Effects of treatment changes on asthma phenotype prevalence and airway neutrophil function. *BMC Pulm Med*. 2017;17(1):169.
457. Baines KJ, Simpson JL, Wood LG, Scott RJ, Fibbens NL, Powell H, et al. Sputum gene expression signature of 6 biomarkers discriminates asthma inflammatory phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(4):997-1007.
458. Berthon BS, Gibson PG, Wood LG, MacDonald-Wicks LK, Baines KJ. A sputum gene expression signature predicts oral corticosteroid response in asthma. *Eur Respir J*. 2017;49(6).
459. Lavoie JP, Leguilette R, Pasloske K, Charette L, Sawyer N, Guay D, et al. Comparison of effects of dexamethasone and the leukotriene D4 receptor antagonist L-708,738 on lung function and airway cytologic findings in horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res*. 2002;63(4):579-85.

460. Lee YM, Park JS, Hwang JH, Park SW, Uh ST, Kim YH, et al. High-resolution CT findings in patients with near-fatal asthma: comparison of patients with mild-to-severe asthma and normal control subjects and changes in airway abnormalities following steroid treatment. *Chest*. 2004;126(6):1840-8.
461. Ward C, Pais M, Bish R, Reid D, Feltis B, Johns D, et al. Airway inflammation, basement membrane thickening and bronchial hyperresponsiveness in asthma. *Thorax*. 2002;57(4):309-16.
462. Lundgren R, Soderberg M, Horstedt P, Stenling R. Morphological studies of bronchial mucosal biopsies from asthmatics before and after ten years of treatment with inhaled steroids. *Eur Respir J*. 1988;1(10):883-9.
463. Christodoulopoulos P, Leung DY, Elliott MW, Hogg JC, Muro S, Toda M, et al. Increased number of glucocorticoid receptor-beta-expressing cells in the airways in fatal asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(3):479-84.
464. Hew M, Chung KF. Corticosteroid insensitivity in severe asthma: significance, mechanisms and aetiology. *Intern Med J*. 2010;40(5):323-34.
465. Mahboub B, Al Heialy S, Hachim MY, Ramakrishnan RK, Alzaabi A, Seliem RM, et al. Vitamin D Regulates the Expression of Glucocorticoid Receptors in Blood of Severe Asthmatic Patients. *J Immunol Res*. 2021;2021:9947370.
466. Goleva E, Jackson LP, Harris JK, Robertson CE, Sutherland ER, Hall CF, et al. The effects of airway microbiome on corticosteroid responsiveness in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(10):1193-201.
467. Elixhauser A, Owens P. Adverse Drug Events in U.S. Hospitals, 2004: Statistical Brief #29. Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs. Rockville (MD)2006.
468. Lefebvre P, Duh MS, Lafeuille MH, Gozalo L, Desai U, Robitaille MN, et al. Acute and chronic systemic corticosteroid-related complications in patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(6):1488-95.
469. Sweeney J, Patterson CC, Menzies-Gow A, Niven RM, Mansur AH, Bucknall C, et al. Comorbidity in severe asthma requiring systemic corticosteroid therapy: cross-sectional data from the Optimum Patient Care Research Database and the British Thoracic Difficult Asthma Registry. *Thorax*. 2016;71(4):339-46.

470. Baptist AP, Reddy RC. Inhaled corticosteroids for asthma: are they all the same? *J Clin Pharm Ther.* 2009;34(1):1-12.
471. van Staa TP, Leufkens HG, Cooper C. The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2002;13(10):777-87.
472. Hoes JN, Jacobs JW, Verstappen SM, Bijlsma JW, Van der Heijden GJ. Adverse events of low- to medium-dose oral glucocorticoids in inflammatory diseases: a meta-analysis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(12):1833-8.
473. O'Byrne PM, Metev H, Puu M, Richter K, Keen C, Uddin M, et al. Efficacy and safety of a CXCR2 antagonist, AZD5069, in patients with uncontrolled persistent asthma: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2016;4(10):797-806.
474. Busse WW, Holgate S, Kerwin E, Chon Y, Feng J, Lin J, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of brodalumab, a human anti-IL-17 receptor monoclonal antibody, in moderate to severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(11):1294-302.
475. Khindri S, Cahn A, Begg M, Montembault M, Leemereise C, Cui Y, et al. A Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Study To Investigate the Efficacy, Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Repeat Doses of Inhaled Nemiralisib in Adults with Persistent, Uncontrolled Asthma. *J Pharmacol Exp Ther.* 2018;367(3):405-13.
476. Jordan VC. The development of tamoxifen for breast cancer therapy: a tribute to the late Arthur L. Walpole. *Breast Cancer Res Treat.* 1988;11(3):197-209.
477. Clemons M, Danson S, Howell A. Tamoxifen ("Nolvadex"): a review. *Cancer Treat Rev.* 2002;28(4):165-80.
478. Radin DP, Patel P. Delineating the molecular mechanisms of tamoxifen's oncolytic actions in estrogen receptor-negative cancers. *Eur J Pharmacol.* 2016;781:173-80.
479. Sereda D, Werth VP. Improvement in dermatomyositis rash associated with the use of antiestrogen medication. *Arch Dermatol.* 2006;142(1):70-2.
480. Few J, Thompson NW, Angelos P, Simeone D, Giordano T, Reeve T. Riedel's thyroiditis: treatment with tamoxifen. *Surgery.* 1996;120(6):993-8; discussion 8-9.
481. Wang CJ, Wu TJ, Lee CT, Huang SM. A misdiagnosed Riedel's thyroiditis successfully treated by thyroidectomy and tamoxifen. *J Formos Med Assoc.* 2012;111(12):719-23.

482. Dabelic N, Jukic T, Labar Z, Novosel SA, Matesa N, Kusic Z. Riedel's thyroiditis treated with tamoxifen. *Croat Med J.* 2003;44(2):239-41.
483. Wei HY, Ma X. Tamoxifen reduces infiltration of inflammatory cells, apoptosis and inhibits IKK/NF- κ B pathway after spinal cord injury in rats. *Neurol Sci.* 2014;35(11):1763-8.
484. Colon JM, Miranda JD. Tamoxifen: an FDA approved drug with neuroprotective effects for spinal cord injury recovery. *Neural Regen Res.* 2016;11(8):1208-11.
485. Morales N, Henriquez C, Sarmiento J, Uberti B, Moran G. Tamoxifen inhibits chemokinesis in equine neutrophils. *Ir Vet J.* 2018;71:22.
486. Sarmiento J, Perez B, Morales N, Henriquez C, Vidal L, Folch H, et al. Apoptotic effects of tamoxifen on leukocytes from horse peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid. *Vet Res Commun.* 2013;37(4):333-8.
487. Albornoz A, Morales N, Uberti B, Henriquez C, Burgos RA, Alarcon P, et al. Tamoxifen and its metabolites induce mitochondrial membrane depolarization and caspase-3 activation in equine neutrophils. *Vet Med Sci.* 2020;6(4):673-8.
488. Olave C, Morales N, Uberti B, Henriquez C, Sarmiento J, Ortloff A, et al. Tamoxifen induces apoptotic neutrophil efferocytosis in horses. *Vet Res Commun.* 2018;42(1):57-63.
489. Corriden R, Hollands A, Olson J, Derieux J, Lopez J, Chang JT, et al. Tamoxifen augments the innate immune function of neutrophils through modulation of intracellular ceramide. *Nat Commun.* 2015;6:8369.
490. Perez B, Henriquez C, Sarmiento J, Morales N, Folch H, Galesio JS, et al. Tamoxifen as a new therapeutic tool for neutrophilic lung inflammation. *Respirology.* 2016;21(1):112-8.
491. Intapad S, Dimitropoulou C, Snead C, Piyachaturawat P, Catravas JD. Regulation of asthmatic airway relaxation by estrogen and heat shock protein 90. *J Cell Physiol.* 2012;227(8):3036-43.
492. Foster PS, Goldie RG, Paterson JW. Effect of steroids on beta-adrenoceptor-mediated relaxation of pig bronchus. *Br J Pharmacol.* 1983;78(2):441-5.
493. Flores-Delgado G, Bringas P, Buckley S, Anderson KD, Warburton D. Nongenomic estrogen action in human lung myofibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;283(3):661-7.

494. Tam A, Wadsworth S, Dorscheid D, Man SF, Sin DD. Estradiol increases mucus synthesis in bronchial epithelial cells. *PLoS One*. 2014;9(6):e100633.
495. Dimitropoulou C, Drakopanagiotakis F, Chatterjee A, Snead C, Catravas JD. Estrogen replacement therapy prevents airway dysfunction in a murine model of allergen-induced asthma. *Lung*. 2009;187(2):116-27.
496. DeBoer MD, Phillips BR, Mauger DT, Zein J, Erzurum SC, Fitzpatrick AM, et al. Effects of endogenous sex hormones on lung function and symptom control in adolescents with asthma. *BMC Pulm Med*. 2018;18(1):58.
497. Mandhane PJ, Hanna SE, Inman MD, Duncan JM, Greene JM, Wang HY, et al. Changes in exhaled nitric oxide related to estrogen and progesterone during the menstrual cycle. *Chest*. 2009;136(5):1301-7.
498. McCleary N, Nwaru BI, Nurmatov UB, Critchley H, Sheikh A. Endogenous and exogenous sex steroid hormones in asthma and allergy in females: A systematic review and meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(4):1510-3 e8.
499. Lieberman D, Kopernik G, Porath A, Lazer S, Heimer D. Sub-clinical worsening of bronchial asthma during estrogen replacement therapy in asthmatic post-menopausal women. *Maturitas*. 1995;21(2):153-7.
500. Ensom MH, Chong G, Zhou D, Beaudin B, Shalansky S, Bai TR. Estradiol in premenstrual asthma: a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study. *Pharmacotherapy*. 2003;23(5):561-71.
501. Hepburn MJ, Dooley DP, Morris MJ. The effects of estrogen replacement therapy on airway function in postmenopausal, asthmatic women. *Archives of Internal Medicine*. 2001;161(22):2717-20.
502. Rubin BK. Immunomodulatory properties of macrolides: overview and historical perspective. *Am J Med*. 2004;117 Suppl 9A:2S-4S.
503. Kudoh S, Keicho N. Diffuse panbronchiolitis. *Clin Chest Med*. 2012;33(2):297-305.
504. Wong EH, Porter JD, Edwards MR, Johnston SL. The role of macrolides in asthma: current evidence and future directions. *Lancet Respir Med*. 2014;2(8):657-70.

505. Donath E, Chaudhry A, Hernandez-Aya LF, Lit L. A meta-analysis on the prophylactic use of macrolide antibiotics for the prevention of disease exacerbations in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Respir Med.* 2013;107(9):1385-92.
506. Stockley JA, Walton GM, Lord JM, Sapey E. Aberrant neutrophil functions in stable chronic obstructive pulmonary disease: the neutrophil as an immunotherapeutic target. *Int Immunopharmacol.* 2013;17(4):1211-7.
507. Southern KW, Barker PM, Solis-Moya A, Patel L. Macrolide antibiotics for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;11:CD002203.
508. Kelly C, Chalmers JD, Crossingham I, Relph N, Felix LM, Evans DJ, et al. Macrolide antibiotics for bronchiectasis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018;3:CD012406.
509. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro M, Sterk PJ, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J.* 2014;43(2):343-73.
510. Hahn DL, Grasmick M, Hetzel S, Yale S, Group AS. Azithromycin for bronchial asthma in adults: an effectiveness trial. *J Am Board Fam Med.* 2012;25(4):442-59.
511. Hahn DL, Plane MB, Mahdi OS, Byrne GI. Secondary outcomes of a pilot randomized trial of azithromycin treatment for asthma. *PLoS Clin Trials.* 2006;1(2):e11.
512. Sutherland ER, King TS, Icitovic N, Ameredes BT, Bleecker E, Boushey HA, et al. A trial of clarithromycin for the treatment of suboptimally controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(4):747-53.
513. Undela K, Goldsmith L, Kew KM, Ferrara G. Macrolides versus placebo for chronic asthma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2021;11:CD002997.
514. Johnston SL, Szigeti M, Cross M, Brightling C, Chaudhuri R, Harrison T, et al. Azithromycin for Acute Exacerbations of Asthma : The AZALEA Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med.* 2016;176(11):1630-7.
515. Sadeghdoust M, Mirsadraee M, Aligolighasemabadi F, Khakzad MR, Hashemi Attar A, Naghibi S. Effect of azithromycin on bronchial wall thickness in severe persistent asthma: A double-blind placebo-controlled randomized clinical trial. *Respir Med.* 2021;185:106494.

516. Pan X, Liu Y, Luo J, Li S, Diao S, Li H, et al. The efficacy and safety of azithromycin in treatment for childhood asthma: A systematic review and meta-analysis. *Pediatr Pulmonol*. 2022;57(3):631-9.
517. Mikailov A, Kane I, Aronoff SC, Luck R, Delvecchio MT. Utility of adjunctive macrolide therapy in treatment of children with asthma: a systematic review and meta-analysis. *J Asthma Allergy*. 2013;6:23-9.
518. Tian BP, Xuan N, Wang Y, Zhang G, Cui W. The efficacy and safety of azithromycin in asthma: A systematic review. *J Cell Mol Med*. 2019.
519. Hiles SA, McDonald VM, Guilhermino M, Brusselle GG, Gibson PG. Does maintenance azithromycin reduce asthma exacerbations? An individual participant data meta-analysis. *Eur Respir J*. 2019;54(5).
520. Wang X, Luo J, Wang D, Liu B, Liu C. The efficacy and safety of long-term add-on treatment of azithromycin in asthma: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(38):e17190.
521. Tong X, Guo T, Liu S, Peng S, Yan Z, Yang X, et al. Macrolide antibiotics for treatment of asthma in adults: a meta-analysis of 18 randomized controlled clinical studies. *Pulm Pharmacol Ther*. 2015;31:99-108.
522. Reiter J, Demirel N, Mendy A, Gasana J, Vieira ER, Colin AA, et al. Macrolides for the long-term management of asthma--a meta-analysis of randomized clinical trials. *Allergy*. 2013;68(8):1040-9.
523. Martin MJ, Lee H, Clayton C, Pointon K, Soomro I, Shaw DE, et al. Idiopathic chronic productive cough and response to open-label macrolide therapy: An observational study. *Respirology*. 2019.
524. Piacentini GL, Peroni DG, Bodini A, Pigozzi R, Costella S, Loiacono A, et al. Azithromycin reduces bronchial hyperresponsiveness and neutrophilic airway inflammation in asthmatic children: a preliminary report. *Allergy Asthma Proc*. 2007;28(2):194-8.
525. Fischer CD, Beatty JK, Zvaigzne CG, Morck DW, Lucas MJ, Buret AG. Anti-Inflammatory benefits of antibiotic-induced neutrophil apoptosis: tulathromycin induces caspase-3-dependent

neutrophil programmed cell death and inhibits NF-kappaB signaling and CXCL8 transcription. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(1):338-48.

526. Inamura K, Ohta N, Fukase S, Kasajima N, Aoyagi M. The effects of erythromycin on human peripheral neutrophil apoptosis. *Rhinology.* 2000;38(3):124-9.

527. Bystrzycka W, Manda-Handzlik A, Sieczkowska S, Moskalik A, Demkow U, Ciepiela O. Azithromycin and Chloramphenicol Diminish Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Release. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12).

528. Anderson R, Theron AJ, Feldman C. Membrane-stabilizing, anti-inflammatory interactions of macrolides with human neutrophils. *Inflammation.* 1996;20(6):693-705.

529. Gibson MP, Walters JD. Inhibition of neutrophil inflammatory mediator expression by azithromycin. *Clin Oral Investig.* 2020;24(12):4493-500.

530. Culic O, Erakovic V, Cepelak I, Barisic K, Brajsa K, Ferencic Z, et al. Azithromycin modulates neutrophil function and circulating inflammatory mediators in healthy human subjects. *Eur J Pharmacol.* 2002;450(3):277-89.

531. Sugihara E. Effect of macrolide antibiotics on neutrophil function in human peripheral blood. *Kansenshogaku Zasshi.* 1997;71(4):329-36.

532. Enomoto F, Andou I, Nagaoka I, Ichikawa G. Effect of new macrolides on the expression of adhesion molecules on neutrophils in chronic sinusitis. *Auris Nasus Larynx.* 2002;29(3):267-9.

533. Wu LQ, Wang RL, Dai YR, Li FQ, Wu HY, Yan SS, et al. Roxithromycin suppresses airway remodeling and modulates the expression of caveolin-1 and phospho-p42/p44MAPK in asthmatic rats. *Int Immunopharmacol.* 2015;24(2):247-55.

534. Kang JY, Jo MR, Kang HH, Kim SK, Kim MS, Kim YH, et al. Long-term azithromycin ameliorates not only airway inflammation but also remodeling in a murine model of chronic asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 2016;36:37-45.

535. Liu Y, Pu Y, Li D, Zhou L, Wan L. Azithromycin ameliorates airway remodeling via inhibiting airway epithelium apoptosis. *Life Sci.* 2017;170:1-8.

536. Pu Y, Liu Y, Liao S, Miao S, Zhou L, Wan L. Azithromycin ameliorates OVA-induced airway remodeling in Balb/c mice via suppression of epithelial-to-mesenchymal transition. *Int Immunopharmacol.* 2018;58:87-93.

537. Chu HW, Kraft M, Rex MD, Martin RJ. Evaluation of blood vessels and edema in the airways of asthma patients: regulation with clarithromycin treatment. *Chest*. 2001;120(2):416-22.
538. Slater M, Torr E, Harrison T, Forrester D, Knox A, Shaw D, et al. The differential effects of azithromycin on the airway epithelium in vitro and in vivo. *Physiol Rep*. 2016;4(18).
539. Huang YJ, Nelson CE, Brodie EL, Desantis TZ, Baek MS, Liu J, et al. Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(2):372-81 e1-3.
540. Taylor SL, Leong LEX, Mobegi FM, Choo JM, Wesselingh S, Yang IA, et al. Long-Term Azithromycin Reduces Haemophilus influenzae and Increases Antibiotic Resistance in Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200(3):309-17.
541. Kraft M, Cassell GH, Pak J, Martin RJ. Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae in asthma: effect of clarithromycin. *Chest*. 2002;121(6):1782-8.
542. Stokholm J, Chawes BL, Vissing NH, Bjarnadottir E, Pedersen TM, Vinding RK, et al. Azithromycin for episodes with asthma-like symptoms in young children aged 1-3 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med*. 2016;4(1):19-26.
543. Hrvacic B, Bosnjak B, Bosnar M, Ferencic Z, Glojnaric I, Erakovic Haber V. Clarithromycin suppresses airway hyperresponsiveness and inflammation in mouse models of asthma. *Eur J Pharmacol*. 2009;616(1-3):236-43.
544. Yamaya M, Nomura K, Arakawa K, Sugawara M, Deng X, Lusamba Kalonji N, et al. Clarithromycin decreases rhinovirus replication and cytokine production in nasal epithelial cells from subjects with bronchial asthma: effects on IL-6, IL-8 and IL-33. *Arch Pharm Res*. 2020;43(5):526-39.
545. Gielen V, Johnston SL, Edwards MR. Azithromycin induces anti-viral responses in bronchial epithelial cells. *Eur Respir J*. 2010;36(3):646-54.
546. Stamatiou R, Boukas K, Paraskeva E, Molyvdas PA, Hatziefthimiou A. Azithromycin reduces the viability of human bronchial smooth muscle cells. *J Antibiot (Tokyo)*. 2010;63(2):71-5.
547. Stamatiou R, Paraskeva E, Boukas K, Gourgoulialis KI, Molyvdas PA, Hatziefthimiou AA. Azithromycin has an antiproliferative and autophagic effect on airway smooth muscle cells. *Eur Respir J*. 2009;34(3):721-30.

548. Daenas C, Hatziefthimiou AA, Gourgoulianis KI, Molyvdas PA. Azithromycin has a direct relaxant effect on precontracted airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol*. 2006;553(1-3):280-7.
549. Wang Q, Yu MF, Zhang WJ, Liu BB, Zhao QY, Luo X, et al. Azithromycin inhibits muscarinic 2 receptor-activated and voltage-activated Ca(2+) permeant ion channels and Ca(2+) sensitization, relaxing airway smooth muscle contraction. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2019.
550. Shimizu T, Shimizu S, Hattori R, Gabazza EC, Majima Y. In vivo and in vitro effects of macrolide antibiotics on mucus secretion in airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(5):581-7.
551. Shimizu T, Shimizu S. Azithromycin Inhibits Mucus Hypersecretion from Airway Epithelial Cells. *Mediat Inflamm*. 2012;2012.
552. Rubin BK, Druce H, Ramirez OE, Palmer R. Effect of clarithromycin on nasal mucus properties in healthy subjects and in patients with purulent rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(6):2018-23.
553. Crooks MG, Faruqi S, Morice AH. How does azithromycin improve asthma exacerbations? *Lancet*. 2018;391(10115):28.
554. Ludden TM. Pharmacokinetic interactions of the macrolide antibiotics. *Clin Pharmacokinet*. 1985;10(1):63-79.
555. Nahata M. Drug interactions with azithromycin and the macrolides: an overview. *J Antimicrob Chemother*. 1996;37 Suppl C:133-42.
556. Mainguy-Seers S, Picotte K, Lavoie JP. Efficacy of tamoxifen for the treatment of severe equine asthma. *J Vet Intern Med*. 2018;32(5):1748-53.
557. Mainguy-Seers S, Vargas A, Labrecque O, Bedard C, Helie P, Lavoie JP. Randomised study of the immunomodulatory effects of azithromycin in severely asthmatic horses. *Vet Rec*. 2019;185(5):143.
558. Mainguy-Seers S, Boivin R, Pourali Dogaheh S, Beaudry F, Helie P, Bonilla AG, et al. Effects of azithromycin on bronchial remodeling in the natural model of severe neutrophilic asthma in horses. *Sci Rep*. 2022;12(1):446.
559. Dekkers BG, Maarsingh H, Meurs H, Gosens R. Airway structural components drive airway smooth muscle remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc*. 2009;6(8):683-92.

560. Ichikawa T, Panariti A, Audusseau S, Mogas AK, Olivenstein R, Chakir J, et al. Effect of bronchial thermoplasty on structural changes and inflammatory mediators in the airways of subjects with severe asthma. *Respir Med*. 2019;150:165-72.
561. Salem IH, Boulet LP, Biardel S, Lampron N, Martel S, Laviolette M, et al. Long-Term Effects of Bronchial Thermoplasty on Airway Smooth Muscle and Reticular Basement Membrane Thickness in Severe Asthma. *Ann Am Thorac Soc*. 2016;13(8):1426-8.
562. Pretolani M, Dombret MC, Thabut G, Knap D, Hamidi F, Debray MP, et al. Reduction of airway smooth muscle mass by bronchial thermoplasty in patients with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(12):1452-4.
563. Denner DR, Doeing DC, Hogarth DK, Dugan K, Naureckas ET, White SR. Airway Inflammation after Bronchial Thermoplasty for Severe Asthma. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12(9):1302-9.
564. Chaudhuri R, Rubin A, Sumino K, Lapa ESJR, Niven R, Siddiqui S, et al. Safety and effectiveness of bronchial thermoplasty after 10 years in patients with persistent asthma (BT10+): a follow-up of three randomised controlled trials. *Lancet Respir Med*. 2021;9(5):457-66.
565. Silvestre-Roig C, Fridlender ZG, Glogauer M, Scapini P. Neutrophil Diversity in Health and Disease. *Trends Immunol*. 2019;40(7):565-83.
566. Mainguy-Seers S, Bessonnat A, Picotte K, Lavoie JP. Nebulisation of dexamethasone sodium phosphate for the treatment of severe asthmatic horses. *Equine Vet J*. 2019;51(5):641-5.
567. Haspel AD, Giguere S, Hart KA, Berghaus LJ, Davis JL. Bioavailability and tolerability of nebulised dexamethasone sodium phosphate in adult horses. *Equine Vet J*. 2018;50(1):85-90.
568. Oostveen E, Boda K, van der Grinten CP, James AL, Young S, Nieland H, et al. Respiratory impedance in healthy subjects: baseline values and bronchodilator response. *Eur Respir J*. 2013;42(6):1513-23.
569. Cottee AM, Seccombe LM, Thamrin C, King GG, Peters MJ, Farah CS. Bronchodilator Response Assessed by the Forced Oscillation Technique Identifies Poor Asthma Control With Greater Sensitivity Than Spirometry. *Chest*. 2020;157(6):1435-41.
570. Gajardo G, Lopez-Munoz R, Plaza A, Uberti B, Sarmiento J, Moran G, et al. Tamoxifen in horses: pharmacokinetics and safety study. *Ir Vet J*. 2019;72:5.

571. Kaczka DW, Ingenito EP, Suki B, Lutchen KR. Partitioning airway and lung tissue resistances in humans: effects of bronchoconstriction. *J Appl Physiol* (1985). 1997;82(5):1531-41.
572. Mollerup S, Jorgensen K, Berge G, Haugen A. Expression of estrogen receptors alpha and beta in human lung tissue and cell lines. *Lung Cancer*. 2002;37(2):153-9.
573. MacNab MW, Tallarida RJ, Joseph R. An evaluation of tamoxifen as a partial agonist by classical receptor theory--an explanation of the dual action of tamoxifen. *Eur J Pharmacol*. 1984;103(3-4):321-6.
574. Fettelschoss-Gabriel A, Fettelschoss V, Thoms F, Giese C, Daniel M, Olomski F, et al. Treating insect-bite hypersensitivity in horses with active vaccination against IL-5. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142(4):1194-205 e3.
575. Yamada T, Sun Q, Zeibecoglou K, Bungre J, North J, Kay AB, et al. IL-3, IL-5, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha-subunit, and common beta-subunit expression by peripheral leukocytes and blood dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;101(5):677-82.
576. Kaps M, Lutzer A, Gautier C, Nagel C, Aurich J, Aurich C. Altrenogest treatment reduces the stress response of three-year-old warmblood mares during their initial equestrian training. *Domest Anim Endocrinol*. 2022;80:106728.

Annexes

Annexe 1 - Lung Function Variation during the Estrus Cycle of Mares Affected by Severe Asthma

Sommaire

Le cycle menstruel peut influencer la symptomatologie de l'asthme chez la femme, mais aucune donnée n'existe concernant ce phénomène dans l'asthme équin. Cette étude préliminaire a évalué la sévérité de l'obstruction respiratoire chez des juments asthmatiques sévères lors des périodes lutéale et folliculaire (œstrus) du cycle œstral. Une amélioration de la résistance inspiratoire a été observée durant la phase lutéale du cycle et les corrélations entre la concentration de progestérone sérique, la taille du follicule dominant et la fonction pulmonaire suggèrent un effet des hormones sexuelles dans l'asthme équin.

Contribution

J'ai participé à la préparation des protocoles et des demandes de déontologie (70%), à la réalisation des procédures expérimentales (mesures de fonction pulmonaire, prise de sang; 100%), aux analyses statistiques (80%), à l'analyse des données et à la rédaction du manuscrit (90%). Les évaluations du système reproducteur (palpation et échographie transrectales) ont été effectuées par un spécialiste en thériogénologie (Mouhamadou Diaw).

Article publié

Animals. 2022;12(4):494. Reproduced without content modification with permission from MDPI (open access, Creative Commons Attribution 4.0 International). Copyright © 2022 MDPI.

<https://doi.org/10.3390/ani12040494>

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Lung Function Variation during the Estrus Cycle of Mares Affected by Severe Asthma

Sophie Mainguy-Seers, Mouhamadou Diaw and Jean-Pierre Lavoie *

Faculty of Veterinary Medicine, Department of Clinical Sciences, Université de Montréal,
Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada; sophie.mainguy-seers@umontreal.ca (S.M.-S.);
mouhamadou.diaw@umontreal.ca (M.D.)

*Correspondence: jean-pierre.lavoie@umontreal.ca

Abstract

Simple Summary: The estrus cycle and sex hormones influence asthma development and severity in humans, but whether the same is occurring in the asthma of horses is unknown. Severe equine asthma (SEA) is characterized by breathing difficulty, even at rest, and although it can be controlled by management and medication, it remains incurable. Stabling and hay feeding are the main contributors to disease exacerbation, but other factors could possibly alter the respiratory compromise. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of the estrus cycle on airway dysfunction in five mares affected by SEA by assessing the lung function during the follicular and luteal phases of the reproductive cycle. The inspiratory obstruction improved during the luteal phase and the variation in progesterone and the dominant follicle size correlated with lung function parameters, suggesting a role for sex hormones in asthma pathophysiology. This first description of the estrus cycle's modulation of airway obstruction in horses supports further studies to uncover the effects of sex hormones in asthma in horses and humans.

Abstract: While the prevalence of asthma is higher in boys than in girls during childhood, this tendency reverses at puberty, suggesting an effect of sex hormones on the disease pathophysiology. Fluctuations of asthma severity concurring with the estrus cycle are reported in women, but this phenomenon has never been investigated in mares to date. The objective of this exploratory study was to determine whether the estrus cycle modulates airway obstruction in severe equine asthma (SEA). Five mares with SEA in an exacerbation of the disease were studied. The whole breath, expiratory and inspiratory resistance, and reactance were compared during the follicular and luteal phases of the estrus cycle. The reproductive tract was evaluated by rectal palpation, ultrasound, and serum progesterone levels. The inspiratory resistance and reactance improved during the luteal phase of the estrus cycle, and variation in progesterone levels and the dominant follicle size correlated with several lung function parameters. The fluctuation of airway dysfunction during the estrus cycle is noteworthy as deterioration of the disease could perhaps be expected and prevented by horse owners and veterinarians. Further studies are required to determine if the equine species could be a suitable model to evaluate the effects of sex hormones on asthma.

Keywords: equine asthma; lung function; estrus cycle; progesterone; sex hormones

Introduction

Studying the sex disparities in asthma pathophysiology is requisite to comprehending the influence of sex hormones to ultimately provide personalized care to asthmatic patients (1). The higher prevalence of asthma in boys reverses at puberty, after which the disease becomes more prevalent in women (2). Importantly, women are over-represented in some corticosteroid-resistant and severe asthma clusters (3, 4), and the sex difference in hospitalization admissions are more pronounced during the reproductive years (5). However, conflicting results obscure the precise influence of sex hormones in asthma. While some studies described a deterioration of respiratory symptoms or lung function during the perimenstrual phase or menses (6-9), when progesterone and estrogen levels are low, others have reported no variation during the estrus cycle (10). Also, increased emergency visits for asthma have been described both in the pre-ovulatory (11, 12) and perimenstrual periods (11).

Severe equine asthma (SEA) is a chronic respiratory disease affecting approximately 14% of adult horses living in a temperate climate (13), and it is mostly influenced by environmental conditions (14) and genetics (15). A predisposition for females has been reported (16), but this is not a consistent finding (13), and whether the disease is altered by the estrus cycle is currently unknown. Therefore, the objective of this exploratory study was to determine if lung function differed during the luteal and follicular phases of the estrus cycle in mares affected by SEA. A significant improvement in the inspiratory obstruction was observed during the luteal phase of the estrus cycle in this study.

Materials and Methods

All experimental procedures were performed in accordance with the Canadian Council for Animal Care guidelines and were approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal on 27 May 2021 (Protocol # 21-Rech-2128). This manuscript follows the recommendations of the ARRIVE guidelines.

Six mares with SEA donated to a research herd were studied during the 2021 reproductive season in the northern hemisphere (between May and August). The mares were mixed breeds, aged 17.7 (16–21) years old and weighed 573 (509–664) kg. One mare had foaled in the past, 3 were never bred and the information was unknown for 2 mares. A priori power analysis was not performed as no data were available for the equine species for calculations. The diagnosis of SEA was based on a history of repeated periods of labored breathing at rest, abnormal lung function (transpulmonary pressure > 15 cm H₂O), and >25% neutrophils on bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology when horses were stabled and fed hay, as previously recommended (17). The mares had been part of the research herd for 2 to 6 years. At the beginning of the study, disease exacerbation was triggered by exposure to environmental antigens by stabling (wood shaving bedding) and dry hay feeding until respiratory efforts were visible at rest (median exposure of 36 days before the study). All mares had access to timed daily turnout on a dirt paddock, and the management remained the same for the duration of the experiment. The mares were conditioned to stand in a stock and to wear a mask. Endpoints included anorexia, decreased manure production, colic, hyperthermia, respiratory distress, or any other medical conditions that would have required treatment.

Pulmonary Function Tests

Lung function was evaluated with the Equine MasterScreen impulse oscillometry system (IOS; Jaeger GmbH, Würzburg, Germany) as previously described (18), in unsedated mares standing in stocks with the head in resting physiological position. Briefly, multi-frequency impulses produced by a loudspeaker were superimposed to the tidal breathing of the horse through an airtight mask. Simultaneously, pressure transducers connected to a pneumotachograph placed in front of the mask acquired the pressure-flow signal response of the respiratory system. The device was calibrated on each test day and accuracy was verified with a resistive test load before experimental measurements. Lung function data were acquired with LabManager (version 4.53, Jaeger, Würzburg, Germany) and analyzed with FAMOS (IMC, Meßsysteme, Berlin, Germany) using the fast Fourier transform method. Three 30 sec recordings were averaged for analyses. Inspiratory (insp), expiratory (exp) and whole breath resistance (R), reactance (X), and coherence of the respiratory system from 2 to 7 Hertz (Hz) were analyzed. Briefly, the impulse of higher

frequencies travels a shorter distance and thus represents changes occurring in central and upper airways, while lower frequency impulses travel deeper into the lungs where it detects peripheral airway dysfunction in diseases such as asthma (19).

Reproductive Tract Evaluation

After assessment of the lung function, the mares were sedated with xylazine (0.3 mg/kg IV) if needed, and the reproductive tract was examined by rectal palpation and ultrasound to determine whether the mares were in the follicular or the luteal phase of the estrus cycle by examining the cervix tonus, uterine edema, and the presence of relevant ovarian structures (major follicles and corpus luteum). The mares were scheduled to be evaluated every 7–10 days until an assessment of the lung function was obtained in the follicular and luteal phases, which was later confirmed by serum progesterone levels.

Serum Progesterone

Blood was collected in glass vacutainer tubes (BD Biosciences, Mississauga, Canada) before any other manipulations. After 20 min sedimentation, serum was obtained after centrifugation at 900× *g* for 10 min at room temperature, then stored at –80 °C until batch analysis. Serum progesterone levels were measured by chemiluminescence (IMMULITE, Siemens, Erlangen, Germany) by the Centre de diagnostic vétérinaire de l'Université de Montréal with a detection limit of 0.2 ng/mL. Results below the limit of detection were attributed the arbitrary value of 0.2 ng/mL for statistical comparisons. The values of ≤ 1 ng/mL and ≥ 5 ng/mL were considered representative of the follicular and luteal phases, respectively (20). In instances where more than two serum progesterone levels were obtained in the same mare (when palpation and ultrasound gave ambiguous results and assessment was repeated at a later date within the same cycle), the lung function values at the time points with the lowest and highest progesterone levels were used for statistical analysis.

Statistical Analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism version 8.4.3 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Normality was assessed with Shapiro–Wilk tests. As lung function data were

normally distributed, two-way ANOVA for repeated measures was used to evaluate the effects of the phase of the estrus cycle (follicular or luteal) and the IOS impulse frequency (from 2 to 7 Hz) on the lung function parameters. When a significant effect was observed with the ANOVA, Bonferroni multiple comparison tests were used to compare the data between the luteal and follicular phases at each frequency. Associations between the variation in lung function data, progesterone levels and the dominant follicle diameter were explored with Pearson or Spearman correlations as appropriate. Results are reported with mean, or with median if not normally distributed, and range for descriptive data and with 95% confidence interval (CI) for statistical results. Ambient conditions (temperature and humidity) were compared with paired t-tests, or Wilcoxon matched-paired signed rank tests, as appropriate.

Results

The temperature and humidity were not different between the evaluations in the luteal and follicular phases (respectively, a mean of 19.6 °C (16.4–22.9) and 19.4 °C (16.4–24.9), and a median of 45% (36–76) and 46% (36–84)).

Mares

Six mares were initially included in this study. In one mare, no reproductive tract was detected by rectal palpation or ultrasound on three occasions, a hymen persistence was present, and two serum progesterone levels taken at a 12-day interval were under the limit of detection. Combined, these findings suggested a congenital developmental anomaly, and data from that mare were excluded. The other five mares had normal reproductive tracts, based on clinical and ultrasonographic examinations.

The mean progesterone level was 9.4 (5.0–13.2) and 0.5 (<0.2–1.4) ng/mL in the luteal and follicular phases, respectively. The mare with the nadir of progesterone of 1.4 ng/mL was still included based on an eight-fold difference with the progesterone value during the luteal phase (21).

Lung Function Variation

The exacerbation of the disease was confirmed at the first lung function assessment (ratio of the resistance at 3 and 7 Hz (R_3/R_7) ≥ 1 and negative reactance from 2–7 Hz). Three mares had their first evaluation during the follicular phase, and two during the luteal phase.

Whole-Breath Analysis

There was no significant effect of the phases of the estrus cycle on the whole-breath R and X (Figures 1a and 2a). The whole-breath R was frequency-dependent ($p = 0.009$), and a similar trend was present for the whole-breath X ($p = 0.06$).

Within-Breath Analysis

There was a significant frequency dependence of R_{exp} ($p = 0.005$) and X_{exp} ($p = 0.047$), but no effect of the estrus cycle during expiration (Figures 1b and 2b). At inspiration, there was a significant effect of the estrus cycle on the pulmonary R_{insp} ($p < 0.0001$; Figure 1c) and X_{insp} ($p = 0.016$; Figure 2c). The R_{insp} at 2 and 3 Hz were improved during the luteal phase (a mean decrease of 0.046 (95% CI; 0.012–0.079) kPa/L/s and 0.037 (95% CI; 0.004–0.07) kPa/L/s, respectively).

Coherence

The coherence represents the causality between the flow input and the resultant pressure signals of the respiratory system and is an indicator of the accuracy of the mathematical model to predict the impedance data. Although it may be used as a quality control in oscillometry, coherence is also influenced by the severity of the disease itself (22). The whole-breath ($p = 0.0006$; Figure 3a) and expiratory ($p = 0.0002$; Figure 3b) coherence were frequency-dependent and were both influenced by the estrus cycle (respectively, $p = 0.002$ and $p = 0.008$). There was a significant decrease of the whole-breath coherence at 2 Hz during the luteal phase (a mean reduction of 0.117 (95% CI; 0.014–0.219)). The inspiratory coherence was influenced by the impulse frequency ($p = 0.0003$; Figure 3c), but not by the estrus cycle.

Correlations

The variation (difference between the luteal and follicular values) of serum progesterone was positively correlated with the variation of whole-breath R ($r = 0.89$, $p = 0.046$; Figure 4a),

expiratory R ($r = 0.94$, $p = 0.017$), and X ($r = 0.98$, $p = 0.004$; Figure 4b) at 7 Hz. These results indicate that increasing progesterone was associated with a worsening of the resistance but an improving reactance. Correlations between the variation in lung function (the difference between the luteal and follicular values) and the diameter of the dominant follicle during the follicular phase were also assessed, as systemic estrogen has been shown to strongly correlate with the size of the dominant follicle in mares (23). The diameter of the dominant follicle was negatively correlated with the variation of the whole-breath X at 3 Hz ($r = -0.90$, $p = 0.036$), 5 Hz ($r = -0.97$, $p = 0.006$), and 7 Hz ($r = -0.92$, $p = 0.027$; Figure 4c), and with the variation of X_{exp} at 3 Hz ($r = -0.90$, $p = 0.04$) and 5 Hz ($r = -0.95$, $p = 0.012$). It was correlated positively with the R_{exp} at 2 Hz ($r = 0.89$, $p = 0.044$). These results show that the size of the dominant follicle was associated with an improvement in the reactance and in the small airway's resistance during the follicular phase.

Discussion

This study shows that the estrus cycle alters the lung function of mares with SEA, with an improvement in the inspiratory resistance and reactance during the luteal phase. These findings, combined with the correlations between variation in progesterone levels and the dominant follicle size with lung function parameters, suggest an influence of sex hormones on asthma pathophysiology in horses.

Estrus Cycle, Sex Hormones, and Lung Function

Asthma in humans and horses is characterized by expiratory flow limitation (24). Expiratory parameters are indicative of intra-thoracic, thus smaller airway function, while inspiratory data represents predominantly extra-thoracic airways. Therefore, the improvement of inspiratory resistance during the luteal phase observed in the current study suggests a change of airway caliber occurring in the upper or most central airways (25). Interestingly, the genioglossus muscle, an important upper airway dilator, has increased activity in women during the luteal phase (21), and synthetic progestins can improve inspiratory dysfunction during sleep apnea in humans, a disorder characterized by upper airway obstruction (26). As the genioglossus muscle is also deemed important for stabilization of the equine pharynx (27), it is possible that modulation of

its activity during the estrus cycle contributed to the inspiratory modifications observed in the current study. Alternatively, variations in lung function might be more easily detected during inspiration as the expiratory phase is much more compromised in asthma. As such, selected inspiratory parameters are better indicators of day-to-day variation in lung function in asthmatic adolescents (28).

The variation in serum progesterone levels between the luteal and follicular phases was strongly positively correlated with the difference in whole-breath and expiratory R and X at 7 Hz, indicating an association between progesterone and worsening resistance but improving reactance. These results could be caused by opposing actions of this hormone on separate airway compartments. Progesterone induces relaxation of the urogenital tract smooth muscle, and a similar effect is expected for airway smooth muscle (ASM) (29), which could explain the improved reactance. However, ASM relaxation would normally also improve pulmonary resistance, at least if it was occurring in the central airways. The tidal volume is higher during the luteal phase in healthy women when progesterone levels are high, compared to the follicular phase (30). If a similar modification of tidal volume was present in mares, it could contribute to the association between improving reactance and progesterone. A decrease in peribronchial collagen deposition, reported after progesterone administration in mice, could also improve reactance (31). These beneficial effects of progesterone could be relevant clinically, as suggested by the stabilization of peak flow rate after its administration in women with life-threatening exacerbation of asthma during the premenstrual phase (32). Other properties of progesterone could explain its association with increasing airflow resistance, such as a decrease in epithelial ciliary beat frequency (33) and central hyperventilation (34). Indeed, hyperventilation has been shown to increase pulmonary resistance as assessed by oscillometry in healthy horses (35). Of note, progesterone receptors exist in two isoforms (A and B) and each mediates different biological activities (36). Determining the proportion and the localization of these receptors in the equine respiratory tract is necessary to uncover the distinctive effects of progesterone on lung function observed in this study.

The size of the dominant follicle was positively correlated with the variation in whole-breath reactance at 5 Hz and the expiratory reactance at 5 and 7 Hz, suggesting positive effects of estrogen during the follicular phase (23). Estrogen relaxes the ASM (37, 38), decreases the

proliferation of lung myofibroblasts (39) and enhances the effects of β 2-adrenergic agonists in vitro (29). In rodent experimental models, estrogen reduces airway hyperresponsiveness (40, 41) and lung inflammation (41) in ovariectomized animals, and the absence of the estrogen receptor- α (knockout mice) is associated with lung dysfunction (42). While estrogen has been shown to increase mucus production in vitro (43), the contrary was observed in a mouse model of allergic asthma (41). Despite these interesting properties in experimental conditions, the clinical effects of estrogen in women are difficult to delineate and often contradictory. Its administration improves asthma symptoms in women in some studies (9), but not in all (44). Its levels are negatively associated with lung function in adolescents (45), and the use of hormonal replacement therapy is related to increased odds of new-onset asthma after menopause (46). Furthermore, single nucleotide polymorphisms of the estrogen receptor α are associated with a decline in lung function in asthmatics, particularly in women (47). Taken together, these results suggest both beneficial and deleterious impacts of estrogen, and its actions might vary depending on the physiological status of the patients. In mares, the biological effects of estrogen on airway cells, the distribution and proportion of each receptor subtypes (α and β) along the respiratory tract, and the influence of endogenous or exogenous estrogen in SEA have not been studied to date. However, tamoxifen, a synthetic selective estrogen receptor modulator, induces a mild reduction of airway resistance in horses with SEA, suggesting a possible effect of this sex hormone (48).

Estrogen and progesterone could act synergistically to modulate lung function. The isometric contraction of mouse tracheal rings is more strongly attenuated by a combination of estrogen and progesterone, in concentrations representative of levels observed during human pregnancy, compared to the sole effect of each hormone (38). Furthermore, both estrogen and progesterone levels correlated positively with the peak expiratory flow in a woman with perimenstrual asthma (49). These findings would fit well with the data from the current study, which suggests that both hormones are associated with an improvement in reactance. This would also be consistent with anecdotal reports of improvement of respiratory signs during the gestation of mares with SEA (personal communication) and during pregnancy in some women (50).

Limitations and Areas of Future Research

The main limitation of this study was the assessment of a low number of mares during only one estrus cycle. Ideally, future investigations should follow larger cohorts during multiple cycles to obtain a more precise understanding of the phenomenon. The mares included in this study were aged from 16 to 21 years old, which is expected as aging is associated with an increased risk of SEA (13, 16). However, the estrus cycle is also influenced by aging in mares (51, 52), with hormonal modifications and subfertility starting in the teens and culminating in the cessation of ovarian activity around 25 years old (52). Therefore, future studies should ideally include mares within a wider age range. Additionally, as the effects of the estrus cycle on the lung function in healthy mares are unknown, a control group of healthy mares and of males with SEA should be included in future studies.

The effects of other hormones that could influence asthma physiology, such as testosterone (53, 54) and sex hormone-binding globulin (55), were not investigated in this study, and estrogen levels were not directly measured. Interestingly, endogenous cortisol was shown to vary during the estrus cycle, with a higher value during the mid-late luteal phase in pony mares (56); however, this was not observed by others (57). Perhaps a variation of endogenous glucocorticoids could have contributed to the modulation of lung function in the current study, and this should be explored in future experiments. Furthermore, other factors that mediate sex differences in asthma, such as the smaller airway caliber in women (2), have never been investigated in horses to our knowledge.

Finally, the data from 2–7 Hz were reported in this study because the variation between recordings was low at these frequencies (mostly < 15% (22)), lower frequencies better described the dysfunction in SEA (58), and coherence values were acceptable. The frequency dependence of the expiratory resistance and reactance is typical of small airway disease and has been previously reported by a forced oscillometry technique in SEA (58). Additionally, the frequency-dependence of the coherence was not surprising as more severe lung dysfunction in smaller airways is expected during exacerbation. However, the cause of the poorer coherence at lower frequencies during the luteal phase for whole-breath and expiratory parameters in the current

study is unknown. It might be related to increased heterogeneity of the respiratory system, perhaps suggesting a worsening of expiratory lung dysfunction during the luteal phase. Artifacts during measurements, such as leaks, swallowing, and coughing, could also result in lower coherence, but care was taken to repeat recording when such an event occurred. As measurements were performed concurrently for luteal and follicular assessment in different mares, the difference in coherence related to the estrus cycle is unlikely to be caused by a technical variation. Importantly, the differences in R and X during the estrus cycle occurred during the inspiratory phase, which had high coherence values that were not influenced by the phase of the estrus cycle and removing the few data with low coherence values (0.6–0.7) did not modify the results. Confirming the variation of lung function through the estrus cycle with standard lung function would be relevant, but given the current results showing differences only with within-breath analysis, it is unlikely that pleural pressure measurements would have the sensitivity required to detect these changes.

Conclusions

This study describes for the first time the influence of the estrus cycle on the natural course of SEA and supports further investigations to determine if horses could be a relevant model to explore the roles of sex hormones in asthma. Indeed, the reproductive physiology of mares and women is similar in many aspects, including the prolonged follicular phase and the monovolution (52). The ease of reproductive tract evaluation and the long life span of horses, compared to rodent models, are additional valuable features (52). Even the seasonality of reproduction in mares represents an opportunity to assess the effects of exogenous sex hormones when estrus activity is null. To further delineate the significance of the current results, future investigations should examine the localization and proportion of progesterone and estrogen receptors in the equine respiratory tract and the effects of these sex hormones on the biology of airway cells.

Author Contributions: Conceptualization, S.M.-S. and J.-P.L.; methodology, S.M.-S., M.D., and J.-P.L.; formal analysis, S.M.-S. and J.-P.L.; investigation, S.M.-S. and M.D.; resources, J.-P.L.; data curation, S.M.-S.; writing—original draft preparation, S.M.-S.; writing—review and editing, S.M.-S., M.D., and J.-P.L.; visualization, S.M.-S.; funding acquisition, J.-P.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Canadian Institutes of Health Research (grant #PJT-148807) and a doctoral grant from the Fonds de Recherche du Québec en Santé (grant # 272483). The APC were waved for the publication in this special issue.

Institutional Review Board Statement: All experimental procedures were performed in accordance with the Canadian Council for Animal Care guidelines and were approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal on 27 May 2021 (Protocol # 21-Rech-2128).

Data Availability Statement: The datasets generated in the current study are available in the Dataverse UdeM repository, [<https://doi.org/10.5683/SP3/XGYUKU>].

Acknowledgments: none.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Shah R, Newcomb DC. Sex Bias in Asthma Prevalence and Pathogenesis. *Front Immunol.* 2018;9:2997.
2. de Marco R, Locatelli F, Sunyer J, Burney P. Differences in incidence of reported asthma related to age in men and women. A retrospective analysis of the data of the European Respiratory Health Survey. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(1):68-74.
3. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181(4):315-23.
4. Wu W, Bang S, Bleecker ER, Castro M, Denlinger L, Erzurum SC, et al. Multiview Cluster Analysis Identifies Variable Corticosteroid Response Phenotypes in Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;199(11):1358-67.
5. Chen Y, Stewart P, Johansen H, McRae L, Taylor G. Sex difference in hospitalization due to asthma in relation to age. *J Clin Epidemiol.* 2003;56(2):180-7.
6. Juniper EF, Kline PA, Roberts RS, Hargreave FE, Daniel EE. Airway responsiveness to methacholine during the natural menstrual cycle and the effect of oral contraceptives. *Am Rev Respir Dis.* 1987;135(5):1039-42.
7. Gibbs CJ, Coutts, II, Lock R, Finnegan OC, White RJ. Premenstrual exacerbation of asthma. *Thorax.* 1984;39(11):833-6.
8. Hanley SP. Asthma variation with menstruation. *Br J Dis Chest.* 1981;75(3):306-8.
9. Chandler MH, Schuldheisz S, Phillips BA, Muse KN. Premenstrual asthma: the effect of estrogen on symptoms, pulmonary function, and beta 2-receptors. *Pharmacotherapy.* 1997;17(2):224-34.
10. Weinmann GG, Zacur H, Fish JE. Absence of changes in airway responsiveness during the menstrual cycle. *J Allergy Clin Immunol.* 1987;79(4):634-8.

11. Brenner BE, Holmes TM, Mazal B, Camargo CA, Jr. Relation between phase of the menstrual cycle and asthma presentations in the emergency department. *Thorax*. 2005;60(10):806-9.
12. Zimmerman JL, Woodruff PG, Clark S, Camargo CA. Relation between phase of menstrual cycle and emergency department visits for acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(2 Pt 1):512-5.
13. Hotchkiss JW, Reid SW, Christley RM. 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):301-8.
14. Bullone M, Murcia RY, Lavoie JP. Environmental heat and airborne pollen concentration are associated with increased asthma severity in horses. *Equine Vet J*. 2016;48(4):479-84.
15. Gerber V, Baleri D, Klukowska-Rotzler J, Swinburne JE, Dolf G. Mixed inheritance of equine recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med*. 2009;23(3):626-30.
16. Couetil LL, Ward MP. Analysis of risk factors for recurrent airway obstruction in North American horses: 1,444 cases (1990-1999). *J Am Vet Med Assoc*. 2003;223(11):1645-50.
17. Couetil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Leguillette R, Richard EA. Inflammatory Airway Disease of Horses--Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med*. 2016;30(2):503-15.
18. van Erck E, Votion D, Art T, Lekeux P. Measurement of respiratory function by impulse oscillometry in horses. *Equine Vet J*. 2004;36(1):21-8.
19. Desai U, Joshi JM. Impulse oscillometry. *Adv Respir Med*. 2019;87(4):235-8.
20. Noden PA, Oxender WD, Hafs HD. The cycle of oestrus, ovulation and plasma levels of hormones in the mare. *J Reprod Fertil Suppl*. 1975(23):189-92.
21. Popovic RM, White DP. Upper airway muscle activity in normal women: influence of hormonal status. *J Appl Physiol* (1985). 1998;84(3):1055-62.

22. King GG, Bates J, Berger KI, Calverley P, de Melo PL, Dellaca RL, et al. Technical standards for respiratory oscillometry. *Eur Respir J*. 2020;55(2).
23. Satue K, Fazio E, Ferlazzo A, Medica P. Intrafollicular and systemic serotonin, oestradiol and progesterone concentrations in cycling mares. *Reprod Domest Anim*. 2019;54(10):1411-8.
24. Bond S, Leguillette R, Richard EA, Couetil L, Lavoie JP, Martin JG, et al. Equine asthma: Integrative biologic relevance of a recently proposed nomenclature. *J Vet Intern Med*. 2018;32(6):2088-98.
25. Klein C, Smith HJ, Reinhold P. The use of impulse oscillometry for separate analysis of inspiratory and expiratory impedance parameters in horses: effects of sedation with xylazine. *Res Vet Sci*. 2006;80(2):201-8.
26. Saaresranta T, Aittokallio T, Polo-Kantola P, Helenius H, Polo O. Effect of medroxyprogesterone on inspiratory flow shapes during sleep in postmenopausal women. *Respir Physiol Neurobiol*. 2003;134(2):131-43.
27. Morello SL, Ducharme NG, Hackett RP, Warnick LD, Mitchell LM, Soderholm LV. Activity of selected rostral and caudal hyoid muscles in clinically normal horses during strenuous exercise. *Am J Vet Res*. 2008;69(5):682-9.
28. Goldman MD, Carter R, Klein R, Fritz G, Carter B, Pachucki P. Within- and between-day variability of respiratory impedance, using impulse oscillometry in adolescent asthmatics. *Pediatr Pulmonol*. 2002;34(4):312-9.
29. Foster PS, Goldie RG, Paterson JW. Effect of steroids on beta-adrenoceptor-mediated relaxation of pig bronchus. *Br J Pharmacol*. 1983;78(2):441-5.
30. White DP, Douglas NJ, Pickett CK, Weil JV, Zwillich CW. Sexual influence on the control of breathing. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1983;54(4):874-9.
31. Zhang X, Bao W, Fei X, Zhang Y, Zhang G, Zhou X, et al. Progesterone attenuates airway remodeling and glucocorticoid resistance in a murine model of exposing to ozone. *Mol Immunol*. 2018;96:69-77.

32. Beynon HL, Garbett ND, Barnes PJ. Severe premenstrual exacerbations of asthma: effect of intramuscular progesterone. *Lancet*. 1988;2(8607):370-2.
33. Jain R, Ray JM, Pan JH, Brody SL. Sex hormone-dependent regulation of cilia beat frequency in airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;46(4):446-53.
34. Bayliss DA, Millhorn DE. Central neural mechanisms of progesterone action: application to the respiratory system. *J Appl Physiol* (1985). 1992;73(2):393-404.
35. Van Erck E, Votion D, Kirschvink N, Genicot B, Lindsey J, Art T, et al. Influence of breathing pattern and lung inflation on impulse oscillometry measurements in horses. *Vet J*. 2004;168(3):259-69.
36. Asavasupreechar T, Saito R, Miki Y, Edwards DP, Boonyaratanakornkit V, Sasano H. Systemic distribution of progesterone receptor subtypes in human tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2020;199:105599.
37. Intapad S, Dimitropoulou C, Snead C, Piyachaturawat P, Catravas JD. Regulation of asthmatic airway relaxation by estrogen and heat shock protein 90. *J Cell Physiol*. 2012;227(8):3036-43.
38. Dimitropoulou C, White RE, Ownby DR, Catravas JD. Estrogen reduces carbachol-induced constriction of asthmatic airways by stimulating large-conductance voltage and calcium-dependent potassium channels. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;32(3):239-47.
39. Flores-Delgado G, Bringas P, Buckley S, Anderson KD, Warburton D. Nongenomic Estrogen Action in Human Lung Myofibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001;283(3):661-7.
40. Degano B, Mourlanette P, Valmary S, Pontier S, Prevost MC, Escamilla R. Differential effects of low and high-dose estradiol on airway reactivity in ovariectomized rats. *Respir Physiol Neurobiol*. 2003;138(2-3):265-74.

41. Dimitropoulou C, Drakopanagiotakis F, Chatterjee A, Snead C, Catravas JD. Estrogen replacement therapy prevents airway dysfunction in a murine model of allergen-induced asthma. *Lung*. 2009;187(2):116-27.
42. Carey MA, Card JW, Bradbury JA, Moorman MP, Haykal-Coates N, Gavett SH, et al. Spontaneous airway hyperresponsiveness in estrogen receptor-alpha-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(2):126-35.
43. Tam A, Wadsworth S, Dorscheid D, Man SF, Sin DD. Estradiol increases mucus synthesis in bronchial epithelial cells. *PLoS One*. 2014;9(6):e100633.
44. Ensom MH, Chong G, Zhou D, Beaudin B, Shalansky S, Bai TR. Estradiol in premenstrual asthma: a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study. *Pharmacotherapy*. 2003;23(5):561-71.
45. DeBoer MD, Phillips BR, Mauger DT, Zein J, Erzurum SC, Fitzpatrick AM, et al. Effects of endogenous sex hormones on lung function and symptom control in adolescents with asthma. *BMC Pulm Med*. 2018;18(1):58.
46. McCleary N, Nwaru BI, Nurmatov UB, Critchley H, Sheikh A. Endogenous and exogenous sex steroid hormones in asthma and allergy in females: A systematic review and meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(4):1510-3 e8.
47. Dijkstra A, Howard TD, Vonk JM, Ampleford EJ, Lange LA, Bleecker ER, et al. Estrogen receptor 1 polymorphisms are associated with airway hyperresponsiveness and lung function decline, particularly in female subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(3):604-11.
48. Mainguy-Seers S, Picotte K, Lavoie JP. Efficacy of tamoxifen for the treatment of severe equine asthma. *J Vet Intern Med*. 2018;32(5):1748-53.
49. Lam SM, Huang SC. Premenstrual asthma: report of a case with hormonal studies. *J Microbiol Immunol Infect*. 1998;31(3):197-9.

50. Schatz M, Harden K, Forsythe A, Chilingar L, Hoffman C, Sperling W, et al. The course of asthma during pregnancy, post partum, and with successive pregnancies: a prospective analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 1988;81(3):509-17.
51. Claes A, Ball BA, Scoggin KE, Roser JF, Woodward EM, Davolli GM, et al. The influence of age, antral follicle count and diestrus ovulations on estrous cycle characteristics of mares. *Theriogenology*. 2017;97:34-40.
52. Carnevale EM. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. *Theriogenology*. 2008;69(1):23-30.
53. Matteis M, Polverino F, Spaziano G, Roviezzo F, Santoriello C, Sullo N, et al. Effects of sex hormones on bronchial reactivity during the menstrual cycle. *BMC Pulm Med*. 2014;14:108.
54. Scott HA, Gibson PG, Garg ML, Upham JW, Wood LG. Sex hormones and systemic inflammation are modulators of the obese-asthma phenotype. *Allergy*. 2016;71(7):1037-47.
55. Arathimos R, Granell R, Haycock P, Richmond RC, Yarmolinsky J, Relton CL, et al. Genetic and observational evidence supports a causal role of sex hormones on the development of asthma. *Thorax*. 2019;74(7):633-42.
56. Asa CS, Robinson JA, Ginther OJ. Changes in plasma cortisol concentrations during the ovulatory cycle of the mare. *J Endocrinol*. 1983;99(2):329-34.
57. Satue K, Montesinos P, Munoz A. Modulation of the renin-angiotensin-aldosterone system by steroid hormones during the oestrous cycle in mares. *Acta Vet Hung*. 2020;68(1):79-84.
58. Young SS, Tesarowski D, Viel L. Frequency dependence of forced oscillatory respiratory mechanics in horses with heaves. *J Appl Physiol* (1985). 1997;82(3):983-7.

Figures

Figure 1. Pulmonary resistance (means \pm SEM) during whole-breath (a), expiration (b), and inspiration (c). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ between the estrus phases with Bonferroni's multiple comparison tests.

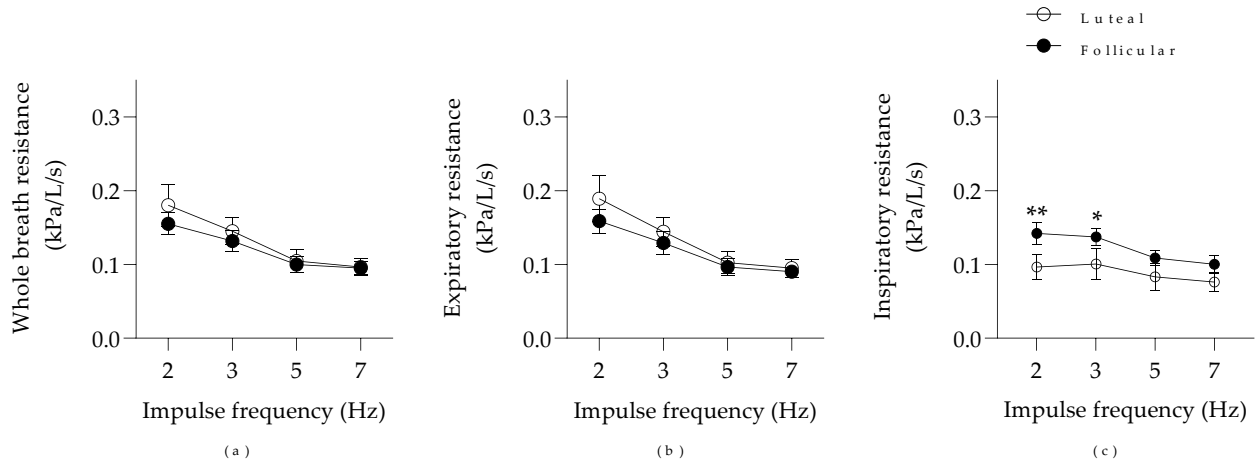


Figure 2. Pulmonary reactance (means \pm SEM) during whole-breath (a), expiration (b), and inspiration (c).

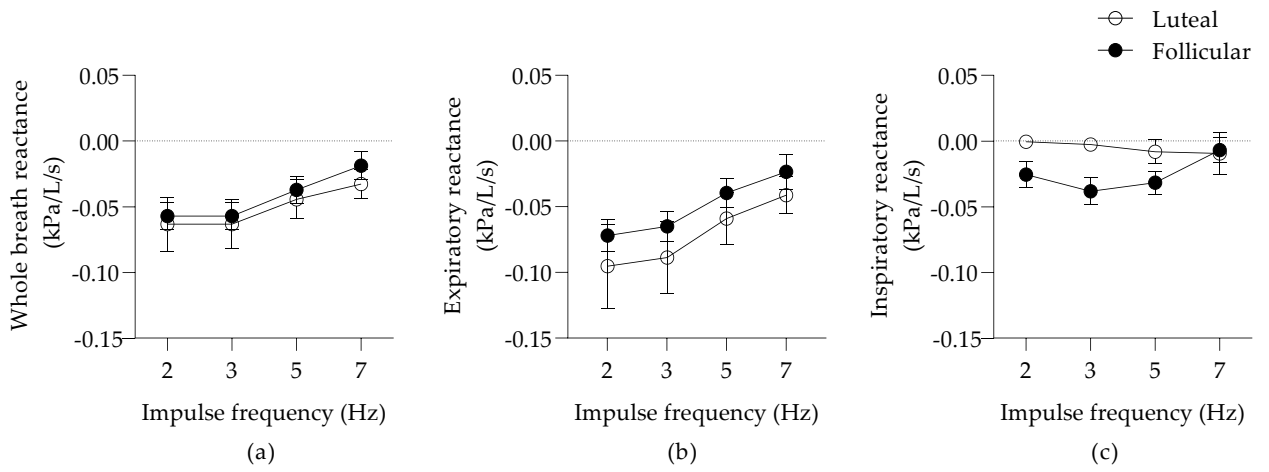


Figure 3. Coherence (means \pm SEM) during whole-breath (a), expiration (b), and inspiration (c). * $p < 0.05$ between the estrus phases with Bonferroni's multiple comparison tests.

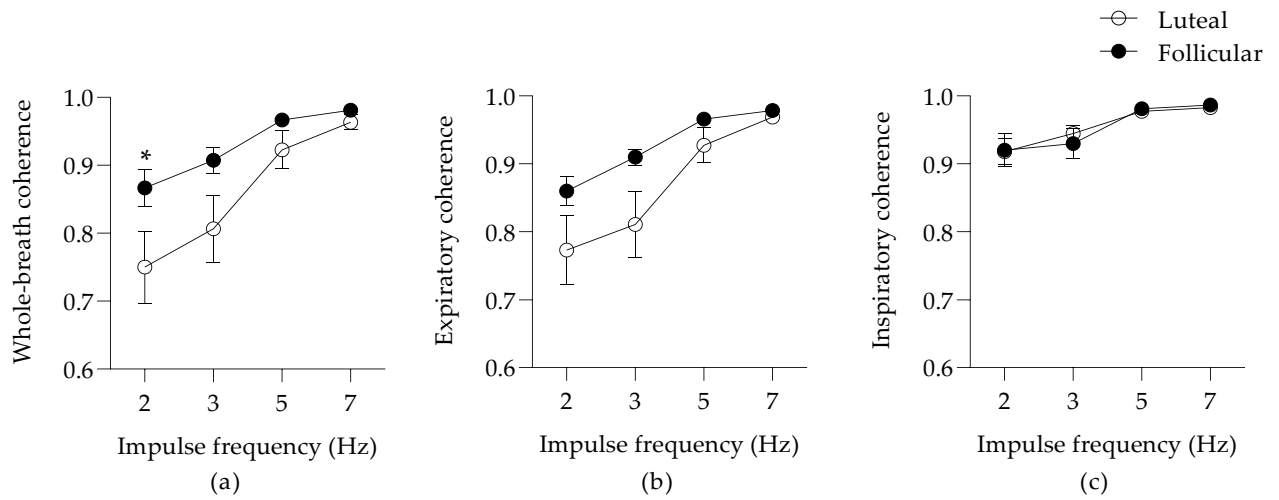
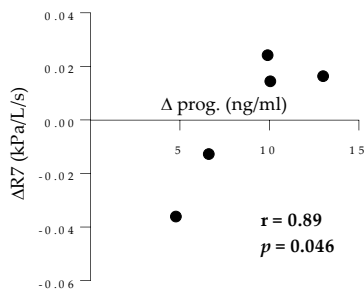
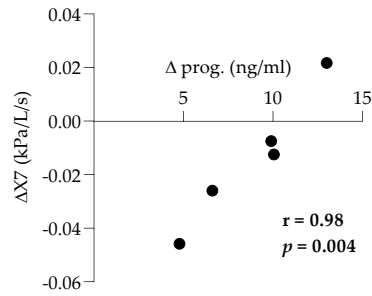


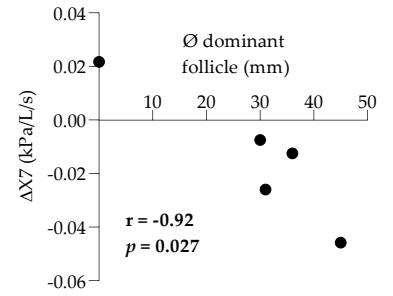
Figure 4. Correlations between the variation in progesterone (prog.) and the variation in pulmonary resistance (R) at 7 Hz (a), the variation of pulmonary reactance (X) at 7 Hz (b). Correlation between the diameter (\varnothing) of the dominant follicle in the follicular phase and variation in pulmonary X at 7 Hz (c).



(a)



(b)



(c)

Annexe 2 - Nebulisation of dexamethasone sodium phosphate for the treatment of severe asthmatic horses

Sommaire

Les glucocorticoïdes inhalés sont recommandés pour accélérer l'amélioration de la fonction pulmonaire lors d'exacerbation de l'asthme équin sévère, mais ils sont toutefois très onéreux lorsque leur utilisation doit être prolongée. La nébulisation de la dexaméthasone injectable, un médicament peu coûteux, a été suggérée comme alternative thérapeutique dans l'asthme équin. Malheureusement, ce traitement n'a pas amélioré la fonction pulmonaire et a causé une suppression de l'axe hypothalamo-pituitaire-surrénalien, indiquant une absorption systémique. Combinés, ces résultats ne supportent pas la nébulisation de dexaméthasone injectable pour le traitement des chevaux asthmatiques.

Contribution

J'ai participé à la préparation des protocoles (70%), à la réalisation des procédures expérimentales (mesures de fonction pulmonaire, prise de sang; 80%), aux analyses statistiques (80%), à l'analyse des données et à la rédaction du manuscrit (90%). J'étais à l'aveugle dans cette étude, je n'ai donc pas participé à l'administration des médicaments aux animaux.

Article publié

Equine Vet J. 2019;51(5):641. Reproduced with permission from John Wiley & Sons. Copyright © 2019 John Wiley & Sons.

<https://doi.org/10.1111/evj.13091>

Nebulisation of dexamethasone sodium phosphate for the treatment of severe asthmatic horses

Sophie Mainguy-Seers^a, Amandine Bessonnat^a, Khristine Picotte^a, Jean-Pierre Lavoie^a

^aUniversité de Montréal, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Clinical Sciences, 3200 Sicotte street, St-Hyacinthe, J2S 2M2, QC, Canada.

Corresponding author: Jean-Pierre Lavoie, Faculty of veterinary medicine, Department of clinical sciences, 3200 Sicotte Street, St-Hyacinthe, J2S 2M2, QC, Canada, jean-pierre.lavoie@umontreal.ca

Keywords: horse, corticosteroid, inhalation, hypothalamic-pituitary-adrenal axis suppression, cortisol, heaves, recurrent airway obstruction

Competing interests: The authors have declared no competing interests.

Ethical considerations: This study was performed at the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal. All experimental procedures were performed in accordance with the Canadian Council for Animal Care guidelines and were approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal (Protocol # Rech-1935).

Sources of Funding: This study was funded by the Canadian Institutes of Health Research (grant # 148807).

Acknowledgements: The authors would like to thank Roxane Boivin for technical support through this study.

Authorship: Sophie Mainguy-Seers contributed to study design, study execution, data analysis and interpretation, preparation of the manuscript and final approval of the manuscript. Amandine Bessonnat contributed to study design, study execution, preparation of the manuscript and final approval of the manuscript. Khristine Picotte contributed to study execution, preparation of the manuscript and final approval of the manuscript. Jean-Pierre Lavoie contributed to study design, data analysis and interpretation, preparation of the manuscript and final approval of the manuscript.

Abstract

Background: Inhaled corticosteroids are effective in the treatment of equine asthma. A recent study reported that nebulisation of injectable dexamethasone had low systemic bioavailability in healthy horses and could represent a cost-effective therapy for equine inflammatory lung diseases.

Objectives: To determine the effects of dexamethasone nebulisation on lung function in severe asthmatic horses. It was hypothesised that dexamethasone administered by nebulisation would be more effective than the same dose administered orally.

Study design: Randomised blinded experimental study in severe asthmatic horses.

Methods: Twelve severe asthmatic horses in clinical exacerbation were randomly assigned to treatment with 5 mg of dexamethasone sodium phosphate by nebulisation (n = 6) or by oral administration (n = 6), once daily for 7 days. Lung function was evaluated at baseline, after four treatment days (D4) and 24 h after the last dose (D8). The presence of residual bronchospasm was assessed on D8 with N-butylscopolammonium bromide administration (0.3 mg/kg i.v.). A respiratory clinical score was performed daily. Serum cortisol concentration was measured at baseline, D4 and D8.

Results: The pulmonary elastance was unchanged in both groups while pulmonary resistance was significantly improved in the oral group on D8 (mean reduction in 1 cm H₂O/L/s [CI: 0.34–1.65, P = 0.003]). All horses had residual bronchospasm at the end of the study. There was a group difference in the respiratory clinical score as it was significantly reduced in the oral group, from D5 to D8. Serum cortisol concentration decreased in all subjects.

Main limitations: Low number of horses and lack of placebo group.

Conclusions: Considering the lack of improvement of lung function and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis suppression, the results of this study do not support aerosolisation of an injectable form of dexamethasone for the treatment of severe equine asthma at the dose and with the nebuliser evaluated.

Introduction

Severe asthma is a frequent and debilitating condition affecting horses worldwide. As asthma exacerbations are triggered by antigenic exposure, reducing environmental airborne dusts and moulds, mainly through ceasing dry hay feeding, is the preferred approach for the management of affected horses (1). Many owners are unable or reluctant to comply with veterinary recommended environmental management strategies for horses affected with severe asthma and instead rely on medication to control clinical signs. Treatment with corticosteroids and bronchodilators, either administered by inhalation or systemically, improves the lung function during exacerbations (2). However, long-term administration of systemic corticosteroids is avoided due to possible adverse effects such as immunosuppression, impaired wound healing, electrolytic imbalances and the risk of laminitis. Corticosteroids administered with metered-dose inhalers (MDI), such as fluticasone, are safer when given for a prolonged period as they do not impair innate and adaptive immune functions (3), but they contribute significantly to the expense of treatment. Monotherapy with inhaled bronchodilators is more affordable but is also avoided because it does not control the underlying inflammatory processes contributing to airway obstruction and most bronchodilators only improve lung function for short periods due to tachyphylaxis.

Earlier studies in humans have shown that inhaled dexamethasone sodium phosphate was more effective than dry powder inhalers or MDI containing budesonide or fluticasone for cough control (4) and helped reduce the dose of systemic corticosteroids in severe asthmatics (5, 6). Improvement in the clinical status of asthmatic children was also noted following the administration of dexamethasone phosphate disodium via MDI (7, 8). Additionally, nebulised dexamethasone was as effective as oral prednisone in the emergency treatment of moderately asthmatic children (9). Interestingly, a recent study reported a low systemic bioavailability (4.3%), and a lack of suppression of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis (10) after nebulisation of dexamethasone to healthy horses. It was therefore hypothesized that nebulised dexamethasone would be more effective than the same dose administered orally at controlling the lung function of asthmatic horses.

Materials and methods

Ethics statement

All experimental procedures were performed in accordance with the Canadian Council for Animal Care guidelines and were approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal (Protocol # 18-Rech-1935).

Animals

Twelve severe asthmatic horses (6 mares and 6 geldings) from a research herd were studied. Horses were from different breeds, aged 16 ± 5.5 years and weighed 492 ± 52 kg. The diagnosis of severe asthma was based on history, prior lung function measurements and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology performed at the arrival in the research herd and during previous projects. These horses had been shown to have a difference in transpulmonary pressure > 15 cm of H₂O and $> 25\%$ neutrophils on BALF cytology while in clinical exacerbation of the disease.

To induce chronic asthma exacerbation, the animals were stabled on wood shavings and fed dry hay of good quality 7 weeks prior to the study. Some horses also received mouldy hay as needed to induce and maintain clinical signs. The horses were turned out in small groups on dirt paddocks for a predetermined duration based on the severity of their disease. The management was unchanged during the treatment period. No medication was given starting at least 6 weeks prior to the study. Horses had been accustomed to the nebulisation procedure and to respiratory mechanics testing. To reach clinical remission after the trial, all animals were fed haylage and were kept outside in groups.

Study protocol

Group formation was based on lung resistance (R_L) ranking values, where the horse with the highest R_L was placed in group "A", the second highest R_L in group "B", the third highest R_L in group "A" and so on. This allocation technique was used to reduce the variability in the severity of airway obstruction between groups as the number of horses was low. Then, coin tossing was used to allocate groups to treatment with either nebulised dexamethasone sodium phosphate (Vetoquinol)^a (nebulised group; 5 mg q24h in the morning, n = 6) or with the same

dexamethasone^a formulation administered orally (oral group; 5 mg q24h in the morning, n = 6) for seven doses. Enteral administration was chosen as a control, considering that some of the nebulised drug is expected to reach the gastrointestinal (GI) tract (11) with a mean dexamethasone oral bioavailability of 31% in fed horses (12). The dexamethasone was diluted 1:1 with sterile saline in order to perform the nebulisation with a commercial device (SaHoMaTM-II)^b. The same dilution was kept for the oral group. Care was taken to avoid leaks when nebulisation was performed with a tight-fitting mask. The device took approximately 3-4 min to complete the administration, but the mask was left on the horses for 5 min to standardize the procedure. Feed was not withheld but drug administration was performed prior to morning feeding.

At the end of the study, lung function was measured after the administration of an anticholinergic bronchodilator (N-butylscopolammonium bromide (NBB)) to determine the presence of residual bronchospasm (13).

Clinical follow-ups

Rectal temperature, heart rate and respiratory rates were recorded at baseline and 24 h after the last dexamethasone dose (D8). A respiratory clinical score (14, 15) was performed by a blinded investigator every morning prior to the treatments. As previously reported, this score attributes a value from 1 to 4 to nasal flaring (1: none, 2: slight and occasional, 3: moderate, 4: continuous) and a value from 1 to 4 to the abdominal movement during breathing (1: none, 2: slight, 3: moderate, 4: marked). The total score therefore ranges from 2 to 8. Cough was recorded if occurring during the assessment of the respiratory clinical score over a 10-minute period. Cough and change in the breathing pattern were also recorded during the treatment administration.

Pulmonary function tests

Lung function measurements were performed at baseline, on D4, D8 and 10 min after injection of NBB (Buscopan; 0.3 mg/kg IV)^c on D8. Esophageal pressure was measured as an index of transpulmonary pressure (P_L) via a balloon sealed over the end of a polyethylene catheter in unsedated horses. A heated pneumotachograph and a differential pressure transducer fitted to a mask placed over the horse's nose was used to obtain airflow. The system (Flexiware 7.6)^d

provided values of pulmonary resistance (R_L) and elastance (E_L) by applying the measured data to the multiple regression equation for the single compartment model of the lung ($P_L = E_L V + R_L \dot{V} + K$) where V is the volume, \dot{V} the airflow and K the transpulmonary end-expiratory pressure. The validity of each breath was determined visually by inspecting the variation of flow and pressure during the recording and with the use of the coefficient of determination. All the valid breaths were used for analysis.

Serum cortisol measurements

Blood was collected between 07.00 and 08.00 at baseline and D4 before drug administration, and on D8. After centrifugation at 900 g for 10 min at room temperature, serum was obtained and stored at -80°C within 90 min of blood collection. A chemiluminescent assay (Immulite, Siemens)^e was used for serum cortisol measurement. The detection limit was 10 nmol/L and results below this threshold were attributed this arbitrary value for statistical calculations.

Statistical analyses

The data sets were normally distributed, with few exceptions, when examined with Shapiro-Wilk tests. Considering the robustness of ANOVA to normality deviation, the lung function, respiratory clinical score and serum cortisol data were analyzed with two-way ANOVA. The two independent variables were the group (nebulised or oral) and time (days of treatment). Within groups, the results were compared with the baseline values with Dunnett's multiple comparison tests. Sidak's multiple comparison tests were used to evaluate the effects of NBB on lung function parameters. Associations between the magnitude of cortisol suppression and the lung function response were assessed with Pearson's correlations. GraphPad Prism 7.0b^f was used for statistical calculations. $P \leq 0.05$ was considered statistically significant. Mean differences and 95% confidence intervals (CI) are provided.

Results

Clinical follow-ups

Rectal temperature, heart rate and respiratory rates were unchanged throughout the treatment period. During the overall assessment of the respiratory clinical score, cough was recorded on seven occasions from four different horses in the group receiving nebulisation, and four times from four different horses in the oral group. For the periods of treatment administration, cough was recorded on 20 occasions during the nebulisations from five horses. Coughing was absent during the nebulisation procedure only in the horse with the lowest severity of airway obstruction. Cough was not noted during treatment of the oral group, however the duration of drug administration was shorter. During the nebulisation procedure, increased inspiratory effort was subjectively observed on 6 occasions, involving 2 horses.

The respiratory clinical scores were significantly affected by the group in which the horses were ($P = 0.048$) and by the factor time ($P = 0.003$), with multiple comparisons showing significant improvement from D5 to D8 compared to D1 in the oral group only (mean difference on D5; 1.33/8 (CI: 0.02-2.65), D6; 1.83/8 (CI: 0.52-3.15), D7; 1.33/8 (CI: 0.02-2.65) and D8; 1.33/8 (CI: 0.02-2.65), $P < 0.05$; Fig 1). The respiratory clinical scores were unchanged in the nebulised group (mean difference on D8; 0.67/8 (CI: -0.65-1.98, $p = 0.61$).

Pulmonary function tests

All horses were in clinical exacerbation of the disease at baseline (R_L and E_L respectively over 1 cm $H_2O/L/s$ and 1 cm H_2O/L). E_L values were not affected by the variable group ($P = 0.2$) nor by the variable time ($P = 0.4$). There was a time effect ($P = 0.03$), but no group effect on R_L ($P = 0.4$). The multiple comparisons showed a significant R_L reduction on D8 compared to baseline in the oral group (mean reduction of 1 cm $H_2O/L/s$ (CI; 0.34-1.65), $P = 0.003$; Fig 2).

Administration of NBB was associated with a significant reduction of R_L ($P < 0.0001$) and E_L ($P = 0.002$) without a group effect (respectively, $P = 0.1$ and $P = 0.2$). The R_L was decreased in both groups (mean reduction after NBB of 0.86 cm $H_2O/L/s$ (CI: 0.31-1.41, $P = 0.004$) in the oral group and 1.1 cm $H_2O/L/s$ (CI: 0.55-1.64, $P = 0.0008$) in the nebulised group). The E_L was significantly

decreased by NBB in the nebulised group (mean reduction after NBB of 1.44 H₂O/L (CI: 0.41-2.46, P = 0.009; Fig 3)), but not in the oral group (P = 0.1).

Serum cortisol measurements

There was a time effect (P<0.0001) and an interaction between time and groups (P = 0.05), but no group effect (P = 0.2), with a significant reduction of serum cortisol on D8 in the oral group (mean reduction of 78.2 nmol/L (CI: 47.7-108.7; p = 0.0001)) and in the nebulised group (mean reduction of 44.7 nmol/L (CI: 14.2-75.2, P = 0.005; Fig 4)). On D4, serum cortisol was also significantly reduced compared to baseline in the oral group (mean reduction of 66.3 nmol/L (CI: 35.8-96.8, P = 0.0001)), but not in the nebulised group (P = 0.3). In the nebulised group only, there was a significant correlation (r = 0.87, P = 0.02) between the change in serum cortisol (cortisol concentration D8/cortisol concentration at baseline) and the change in R_L (R_L on D8/R_L at baseline). Similarly, there was a significant correlation (r = 0.97, P = 0.002) between the change in serum cortisol and the change in E_L (E_L on D8/E_L at baseline) only in the nebulised group (Fig 5).

Discussion

Results from this study indicate that a low dose of oral, but not inhaled dexamethasone, improves the lung function in severe equine asthma. Furthermore, the HPA axis was suppressed in all horses from both treatment groups. The correlations between the variation in serum cortisol and the lung function after inhalation of dexamethasone suggest that the beneficial effects of the drug, when observed, were due to a systemic effect. Combined, these results do not support the use of nebulised dexamethasone, as performed in this study, for the treatment of severe asthmatic horses. In both groups, the low dexamethasone dose was not sufficient to obtain optimal bronchodilation as the administration of NBB resulted in a significant improvement of lung function at the end of the study.

Inhaled medications are preferred over systemic administration as the local delivery into the airways limits the quantity of drugs required to obtain the desired improvement in lung function. However, only a small fraction of the inhaled drugs will reach the lower airways, and

some will be swallowed (11), ending up in the GI tract. For this reason, corticosteroids commercialized for inhaled administration desirably have a low GI absorption, a short systemic half-life (16), a prolonged pulmonary residence time and high affinity with the glucocorticoid receptors. Injectable dexamethasone, to the contrary, is bioavailable when administered orally and causes a prolonged systemic effect (12) and its pulmonary pharmacokinetic is not well established. The physical properties of dexamethasone sodium phosphate and the presence of preservatives (2% benzyl alcohol) also are not specifically adapted to inhaled use. However, a recent study reported that nebulisation of dexamethasone sodium phosphate at a dose of 5 mg had low bioavailability, did not suppress the serum cortisol concentration, and did not induce side effects in healthy horses via this route (10). Therefore, it was postulated that a low dose of dexamethasone delivered to the airways would be an effective treatment for asthmatic horses. However, nebulised dexamethasone failed to improve the lung function while suppressing endogenous serum cortisol at the dose studied. This lack of efficacy might have been caused by the pathological status of the horses, or differences in nebulisation devices. It has been suggested that abnormal breathing patterns, bronchospasm and mucus accumulation might alter pulmonary drug deposition during inhalation (17) and consequently increase the amount of drug available for GI absorption. Indeed, the penetration of particles in the lower airways is already low ($\approx 10\%$) when nebulisation is performed in healthy horses (18). The frequent coughing noted in this study could also have impeded drug penetration of the lower airways. Of note, however, these respiratory anomalies inherent to equine asthma do not impede successful treatments with higher doses of corticosteroids administered with MDI (19-21). It is unclear in the current study if the increased respiratory effort and the cough observed during nebulisation were related to a discomfort due to the dexamethasone formulation, or simply to the presence of the facemask.

The increased systemic absorption compared to healthy horses could have been caused by the diseased airway epithelium in asthma. Indeed, nebulised budesonide resulted in higher systemic concentration in severe asthmatic horses than in controls, possibly indicating that the abnormal epithelium might absorb more medication (22). The use of different inhalation devices (SaHoMaTM-II and Flexineb-1) could also have contributed to the discrepancy between the two studies. Theoretically, a particle size between 1- 5 μm is considered optimal to reach the alveoli

(17). While the device used produces 67.9% of particles <5 µm with saline according to the manufacturer, it was not specifically studied with dexamethasone sodium phosphate to the best of the authors' knowledge. Nevertheless, this device has been successfully used for the delivery of bronchodilators in asthmatic horses (20, 23). Finally, some uncontrolled factors, such as the ambient temperature and humidity, might modify the rheology of inhalable medication and consequently influence the efficacy of nebulised treatment.

It is also possible that the formulation of dexamethasone used in the present study did not have a satisfactory topical effect. The authors only found one study in humans that reported on the administration of an injectable form of dexamethasone phosphate sodium (24). Moreover, although several studies showed improvement of lung function or clinical signs with aerosolized dexamethasone, none determined whether the improvement was due to a topical or a systemic effect, or both (9, 25). Using glucocorticoids with a high local efficacy and a low systemic effect from either a poor oral bioavailability, an extensive first-pass metabolism, a high protein-binding effect or an inefficacy of drug metabolites, would be ideal. Those glucocorticoids with a better ratio of topical to systemic activity, such as fluticasone (16), budesonide (26) or ciclesonide (27) could therefore have been more effective. Increasing the dose, or using a different dexamethasone formulation might also have been more efficient. However, the safety of those options are not yet reported and whether it would be of benefit over an oral use remains to be determined.

The suppression of the HPA axis in both groups of horses in this study is in agreement with other reports of aerosolized dexamethasone in humans (7, 8, 28). Values of serum cortisol under the detection limit were attributed the arbitrary value of 10 nmol/L for statistical calculations. This could have contributed to the lack of difference between groups for the suppression of the HPA axis as four horses in the oral group and only one horse in the nebulisation group had a serum cortisol value below 10 nmol/L after the treatment period. The lack of correlation between the lung function response and the magnitude of cortisol suppression in the oral group could also have been caused by the fact that 4/6 horses had a serum cortisol value below the detection limit at the end of the study. It is also possible that no correlation was detected in the oral group as

the cortisol suppression could have been maximal at the dose used, without an equivalent improvement in lung function.

In conclusion, taken together, the lack of improvement of lung function, the presence of HPA axis suppression and the subjective impression of cough induction and discomfort in some horses, do not support the administration of nebulised dexamethasone sodium phosphate for the treatment of severe equine asthma at the dose and with the device used in this study.

Manufacturers' details

^a Dexamethasone sodium phosphate, Vétoquinol N.-A. Inc., Lavaltrie, QC, Canada.

^b SaHoMaTM-II mobile ultrasonic nebulizer, NEBU-TEC International, Elsenfeld, Germany.

^c Buscopan, Boehringer Ingelheim Ltd., Burlington, Ontario, Canada.

^d Flexiware 7.6, SCIREQ, Montreal, Québec, Canada.

^e Immulite, Siemens, Erlangen, Germany.

^f GraphPad Prism 7, GraphPad Software, Inc, La Jolla, California, USA.

References

1. Pirie RS. Recurrent airway obstruction: a review. *Equine Vet J.* 2014;46(3):276-88.
2. Calzetta L, Roncada P, di Cave D, Bonizzi L, Urbani A, Pistocchini E, et al. Pharmacological treatments in asthma-affected horses: A pair-wise and network meta-analysis. *Equine Vet J.* 2017;49(6):710-7.
3. Dauvillier J, Felipe MJ, Lunn DP, Lavoie-Lamoureux A, Leclere M, Beauchamp G, et al. Effect of long-term fluticasone treatment on immune function in horses with heaves. *J Vet Intern Med.* 2011;25(3):549-57.
4. Kamimura M, Izumi S, Hamamoto Y, Morita A, Toyota E, Kobayashi N, et al. Superiority of nebulized corticosteroids over dry powder inhalers in certain patients with cough variant asthma or cough-predominant asthma. *Allergol Int.* 2012;61(3):411-7.
5. Dennis M, Itkin IH. Effectiveness and Complications of Aerosol Dexamethasone Phosphate in Severe Asthma. *J Allergy.* 1964;35:70-6.
6. Fisch BR, Grater WC. Dexamethasone Aerosol In Respiratory Tract Disease. *The Journal of New Drugs.* 1962;2(5):298-306.
7. Siegel SC, Heimlich EM, Richards W, Kelley VC. Adrenal Function in Allergy. Iv. Effect of Dexamethasone Aerosols in Asthmatic Children. *Pediatrics.* 1964;33:245-50.
8. Crepea SB. Inhalation corticosteroid (dexamethasone PO₄) management of chronically asthmatic children. *J Allergy.* 1963;34:119-26.
9. Scarfone RJ, Loiselle JM, Wiley JF, 2nd, Decker JM, Henretig FM, Joffe MD. Nebulized dexamethasone versus oral prednisone in the emergency treatment of asthmatic children. *Ann Emerg Med.* 1995;26(4):480-6.
10. Haspel AD, Giguere S, Hart KA, Berghaus LJ, Davis JL. Bioavailability and tolerability of nebulised dexamethasone sodium phosphate in adult horses. *Equine Vet J.* 2018;50(1):85-90.
11. Hoffman AM. Inhaled medications and bronchodilator usage in the horse. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1997;13(3):519-30.

12. Grady JA, Davis EG, Kukanich B, Sherck AB. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dexamethasone after oral administration in apparently healthy horses. *Am J Vet Res.* 2010;71(7):831-9.
13. de Lagarde M, Rodrigues N, Chevigny M, Beauchamp G, Albrecht B, Lavoie JP. N-butylscopolammonium bromide causes fewer side effects than atropine when assessing bronchoconstriction reversibility in horses with heaves. *Equine Vet J.* 2014;46(4):474-8.
14. Robinson NE, Olszewski MA, Boehler D, Berney C, Hakala J, Matson C, et al. Relationship between clinical signs and lung function in horses with recurrent airway obstruction (heaves) during a bronchodilator trial. *Equine Vet J.* 2000;32(5):393-400.
15. Rush BR, Raub ES, Rhoads WS, Flaminio MJ, Matson CJ, Hakala JE, et al. Pulmonary function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *Am J Vet Res.* 1998;59(8):1039-43.
16. Derendorf H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of inhaled corticosteroids in relation to efficacy and safety. *Respir Med.* 1997;91 Suppl A:22-8.
17. Cha ML, Costa LR. Inhalation Therapy in Horses. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2017;33(1):29-46.
18. Votion D, Ghafir Y, Munsters K, Duvivier DH, Art T, Lekeux P. Aerosol deposition in equine lungs following ultrasonic nebulisation versus jet aerosol delivery system. *Equine Vet J.* 1997;29(5):388-93.
19. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Joubert P, Relave F, Setlakwe EL, Beauchamp G, et al. Corticosteroids and antigen avoidance decrease airway smooth muscle mass in an equine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;47(5):589-96.
20. Bullone M, Vargas A, Elce Y, Martin JG, Lavoie JP. Fluticasone/salmeterol reduces remodelling and neutrophilic inflammation in severe equine asthma. *Sci Rep.* 2017;7(1):8843.

21. Couetil LL, Art T, de Moffarts B, Becker M, Melotte D, Jaspar F, et al. Effect of beclomethasone dipropionate and dexamethasone isonicotinate on lung function, bronchoalveolar lavage fluid cytology, and transcription factor expression in airways of horses with recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med.* 2006;20(2):399-406.
22. Barton AK, Heinemann H, Schenk I, Machnik M, Gehlen H. Influence of respiratory tract disease and mode of inhalation on detectability of budesonide in equine urine and plasma. *Am J Vet Res.* 2017;78(2):244-50.
23. Arroyo MG, Couetil LL, Nogradi N, Kamarudin MM, Ivester KM. Efficacy of Inhaled Levalbuterol Compared to Albuterol in Horses with Recurrent Airway Obstruction. *J Vet Intern Med.* 2016;30(4):1333-7.
24. Hoffman NB, Laucka PV. Dexamethasone aerosol use in an asthmatic nursing-home patient with Parkinson's disease and dementia. *DICP.* 1990;24(7-8):707-8.
25. Arbesman CE, Bonstein HS, Reisman RE. Dexamethasone Aerosol Therapy for Bronchial Asthma. *J Allergy.* 1963;34:354-61.
26. Szeffler SJ, Eigen H. Budesonide inhalation suspension: A nebulized corticosteroid for persistent asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2002;109(4):729-42.
27. Singas E, Karpel JP. Profile of ciclesonide for the maintenance treatment of asthma. *Ther Clin Risk Manag.* 2011;7:351-8.
28. Linder WR. Adrenal Suppression by Aerosol Steroid Inhalation. *Arch Intern Med.* 1964;113:655-6.

Figures

Figure 1. Respiratory clinical score values (mean \pm s.d.) from day 1 (before the treatment) to day 8 (24 h after the last administration) in horses with severe asthma treated with nebulised (black bars) or oral (white bars) dexamethasone. *indicates a difference from baseline, $P \leq 0.05$.

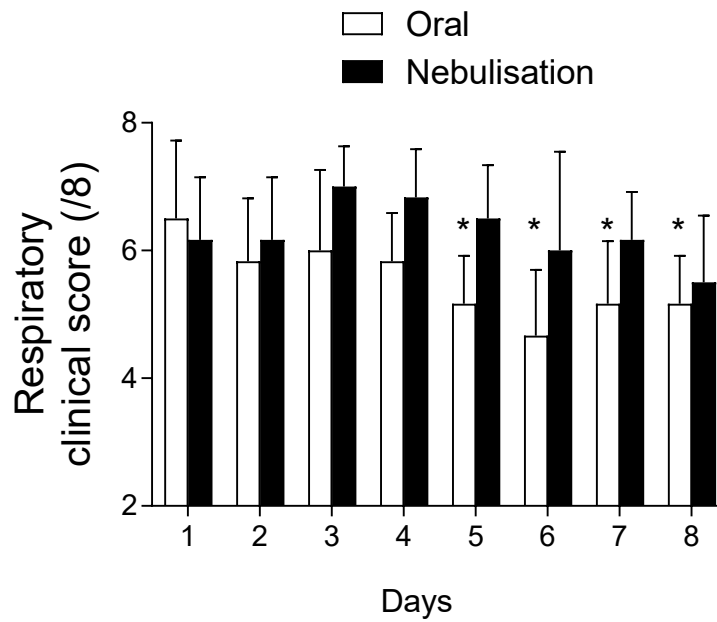


Figure 2. Values of pulmonary resistance (R_L ; A) and elastance (E_L ; B) (mean \pm s.d.) at baseline and on day 4 and day 8 in horses with severe asthma treated with nebulised (black bars) or oral (white bars) dexamethasone.

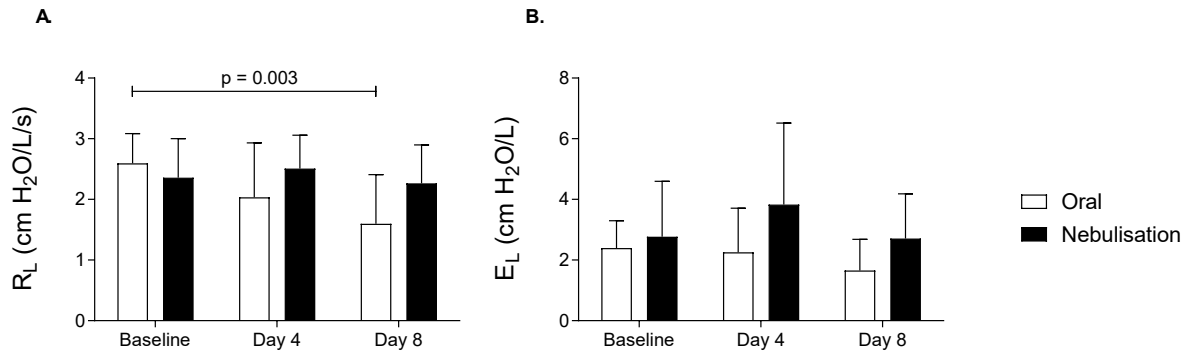


Figure 3. Values of pulmonary resistance (R_L ; A) and elastance (E_L ; B) (mean \pm s.d.) before and after intravenous administration of 0.03 mg/kg of N-butylscopolammonium bromide (NBB) on day 8 in horses with severe asthma treated with nebulised (black bars) or oral (white bars) dexamethasone.

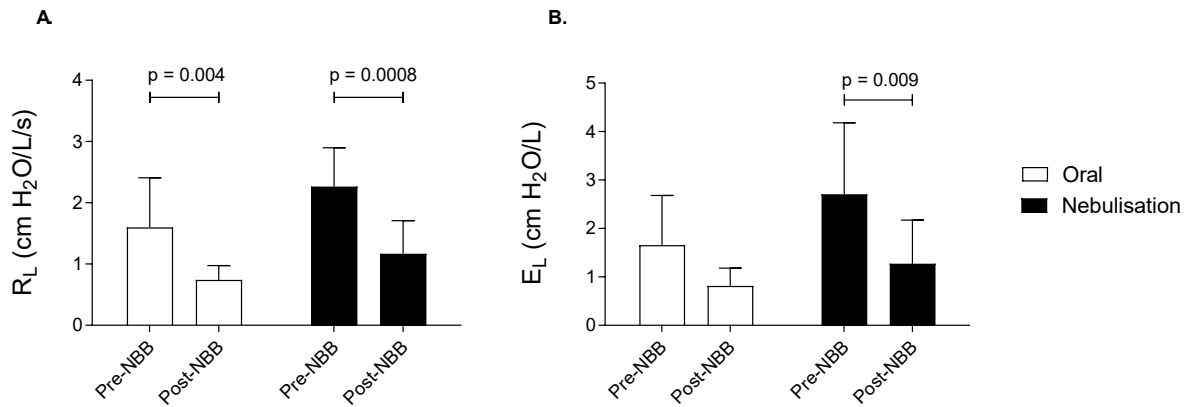


Figure 4. Serum cortisol at baseline, on day 4 and day 8 (mean \pm s.d.) in horses with severe asthma treated with nebulised (black bars) or oral (white bars) dexamethasone.

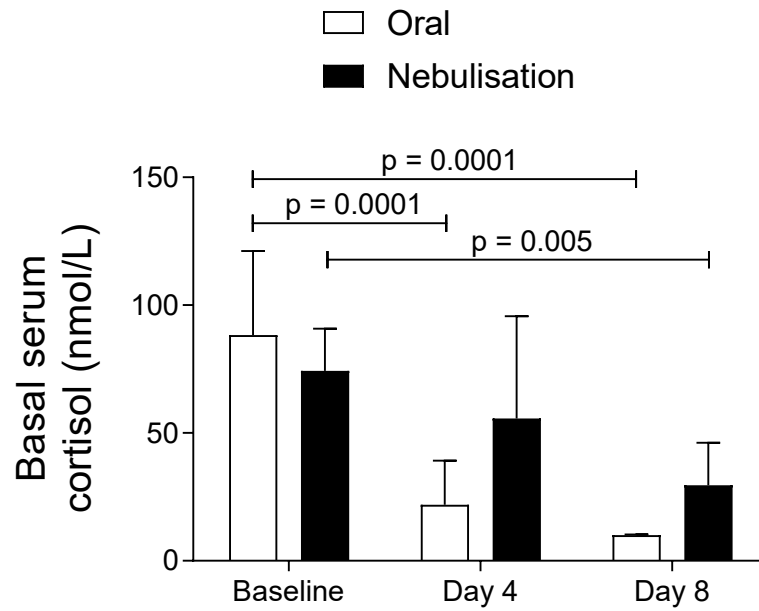


Figure 5. Correlations between the changes (value on day 8 (D8)/value on baseline) in serum cortisol and in pulmonary resistance (R_L ; A) and elastance (E_L ; B) in horses with severe asthma treated with nebulised (black circles) or oral (white circles) dexamethasone.

