

Université de Montréal

**L'EFFET DE L'INTERLEUKINE-17 SUR LA SURVIE
ET LA GLUCOCORTICORESISTANCE DU
NEUTROPHILE ÉQUIN**

par

RUBY YOANA MURCIA ROBAYO

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

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

en sciences vétérinaires option sciences cliniques

Avril, 2015

© Ruby Yoana Murcia Robayo

Résumé

Les glucocorticoïdes sont les médicaments les plus efficaces pour le contrôle de l'obstruction respiratoire chez les chevaux atteints du souffle, et de l'asthme humain. Toutefois, les neutrophiles persistent dans les voies respiratoires suite à ce traitement. Nous avons précédemment rapporté que les neutrophiles sanguins humains et équins sont sensibles à l'action des glucocorticoïdes. Comme elle contribue à l'insensibilité des cellules épithéliales pulmonaires humaines aux glucocorticoïdes, nous avons émis l'hypothèse que l'IL-17 a un effet similaire sur les neutrophiles et qu'elle contribue à leur persistance dans les voies respiratoires asthmatiques.

Objectifs : Évaluer **1.** L'expression des deux sous-unités du récepteur de l'IL-17 (l'IL-17RA/IL-17RC) chez les neutrophiles équins hautement purifiés. **2.** Si l'IL-17 active directement les neutrophiles et si cette réponse est sensible à l'action des glucocorticoïdes. **3.** L'effet de l'IL-17 sur la viabilité et l'apoptose des neutrophiles.

Résultats: **1.** Les neutrophiles expriment l'IL-17RA/IL-17RC aux niveaux translationnel et protéique. **2.** L'IL-17 induit une activation sélective des neutrophiles (surrégulation de l'IL-8), qui n'est pas atténuée par dexaméthasone et **3.** l'IL-17 augmente la viabilité des neutrophiles stimulés (LPS) par une diminution de l'apoptose.

Nos résultats indiquent que l'IL-17 active directement le neutrophile équin, et que l'augmentation de l'IL-8 (puissant chimioattractant des neutrophiles) qui en résulte n'est pas contrôlée par la dexaméthasone. L'IL-17 pourrait aussi contribuer à la persistance de neutrophiles dans les voies respiratoires chez les chevaux atteints du souffle, en diminuant l'apoptose.

Mots-clés : Neutrophiles, cheval, glucocorticorésistance, interleukine-17, récepteur de l'Interleukine-17, cytokines pro-inflammatoires, survie, apoptose.

Abstract

Glucocorticoids are the most potent drugs for the control of the airway obstruction present in heaves and asthma, although the airway neutrophilia persists with these agents. It was previously reported that human and equine's peripheral blood neutrophils are sensitive to glucocorticoid. Interleukin-17 (IL-17) is a cytokine contributing to glucocorticoid insensitivity airway epithelial cells in human. We therefore hypothesized that IL-17 has a similar effect on neutrophils and contributes to the persistence of these cells in the airways in response to glucocorticoid therapy.

In this study, we evaluated: **1.** The expression of both subunits of IL-17 receptor (IL-17RA/ IL-17RC) in highly purified neutrophils. **2.** The gene expression of proinflammatory cytokines in neutrophils to assess their activation by IL-17 and their effect in these cells treated with glucocorticoids. **3.** The effects of IL-17 on the viability and apoptosis in neutrophils were performed.

Results showed that **1.** Equine neutrophils express IL-17RA and IL-17RC at transcriptional and protein level. **2.** IL-17 induces a selective activation in neutrophils, which results in an upregulation of IL-8, not attenuated by dexamethasone and finally, **3.** IL-17 increases the viability of neutrophils stimulated with LPS by a decrease in apoptosis.

Our results indicate that IL-17 directly activates neutrophils to upregulate IL-8, a potent neutrophils chemoattractant, and that this response is not prevented by glucocorticoids. They also suggest a possible role of IL-17 in the persistence of neutrophils in the asthmatic airways by decreasing apoptosis.

Keywords: Neutrophils, horse, glucocorticoid resistance, interleukin-17, interleukin-17 subunits of receptor, proinflammatory cytokines, survival, apoptosis.

Table de matières

Résumé	ii
Abstract	iii
Table de matières	iv
Liste des tableaux	vii
Liste de figures	viii
Liste des symboles & abréviations	xi
Dédicace	xiii
Remerciements	xiv
Introduction	16
Chapitre 1 : Recension de la littérature	17
1.1 Les neutrophiles	17
1.1.1 Définition	17
1.1.2 Production des neutrophiles	17
1.1.3 Structure des neutrophiles	18
1.1.4 Réservoirs des neutrophiles	18
1.1.5 Demi-vie, recrutement et amorçage du neutrophile.....	19
1.1.6 Mécanismes d'action des neutrophiles	21
1.1.7 Principales cytokines produites par les neutrophiles humains et équins	23
1.1.8 Apoptose des neutrophiles	25
1.1.9 Méthodes d'isolation des neutrophiles.....	28
1.1.10 Détection des cytokines/gènes dans les neutrophiles : Méthodes et mises en garde.....	28
1.1.11 L'inflammation neutrophilique dans les voies respiratoires	29
1.2 Les corticostéroïdes	30
1.2.1 Définition et classification	30
1.2.2. Les Glucocorticoïdes	30
1.2.2.1 Effets anti-inflammatoires des glucocorticoïdes.....	32
1.2.2.2 Mécanismes d'action moléculaire des glucocorticoïdes.....	33
Voie classique génomique	34

Voie non génomique	38
Interaction entre les voies d'action génique et non-génique.....	39
1.2.3 Effets des glucocorticoïdes sur le neutrophile	41
1.2.4 Résistance aux glucocorticoïdes.....	42
1.3 L'interleukine-17	44
1.3.1 Définition de l'interleukine-17	44
1.3.2 Cellules productrices de l'interleukine-17	45
1.3.3 Membres de la famille de l'IL-17 et leurs récepteurs	46
1.3.3.1 La famille de l'Interleukine-17 :	46
1.3.3.2 La famille des récepteurs IL-17R :	47
1.3.4 Différentiation et régulation des cellules Th17.....	48
1.3.5 Voies de signalisations activées par l'interleukine-17.....	49
1.3.6 L'interleukine-17 dans l'inflammation neutrophilique pulmonaire	52
1.3.7 L'Interleukine-17 dans la résistance aux glucocorticoïdes.....	52
1.3.8 L'Interleukine-17 : possible cible thérapeutique	53
Hypothèse et objectifs :.....	55
Chapitre 2 : Article	56
2.1 Abstract	58
2.2 Introduction.....	60
2.3 Methods.....	61
2.3.1 Neutrophil and neutrophil-depleted leukocyte isolation.....	61
2.3.2 Cell culture.....	62
2.3.3 Gene expression study	63
2.3.4 Western blots analysis.....	63
2.3.5 Flow cytometry and morphological evaluation of apoptosis.....	64
2.3.6 Statistical analysis.....	65
2.4 Results.....	65
2.4.1 Neutrophils express both subunits of IL-17 receptor.....	65
2.4.2 The reIL-17 does not activates neutrophils and dexamethasone does not attenuated the response of IL-8 and IL-6 induced by LPS after 5 h.....	65
2.4.2 The reIL-17 induced neutrophil activation and potentiation of LPS-induced IL-8 and IL-6 responses are not inhibited by glucocorticoids at 24 h	66
2.4.3 The reIL-17 increases viability and decrease apoptosis of neutrophils	66

2.5 Discussion	67
2.6 Conclusion	70
2.7 Acknowledgements.....	70
2.8 References.....	79
Chapitre 3 : Résultats complémentaires	82
3.1 Détermination par un essai de type «Time course» des doses adéquates pour notre étude.....	82
Chapitre 4 : Discussion générale	86
4.1 Expression des sous-unités du récepteur à l'IL-17 du neutrophile équin	87
4.2 Effet de l'IL-17 sur l'activation, la glucocorticorésistance, la viabilité et l'apoptose du neutrophile équin	89
4.3 Choix des agonistes.....	90
4.4 Limites rencontrées.....	91
4.5 L'Interleukine-17 : l'héroïne ou la méchante ?.....	93
Chapitre 5 : Conclusion & perspectives.....	94
Bibliographie	96
Annexe A.....	xvi
Annexe B.....	xvii

Liste des tableaux

Tableau I. Gènes exprimés par le neutrophile humain et équin	24
Tableau II. Membres famille de l'interleukine-17 : récepteurs, fonctions et expression	47
Table III. Sequences of primers used for qPCR assays	78

Liste de figures

Chapitre 1

Figure 1.1

Étapes séquentielles de recrutement des neutrophiles depuis la vascularisation jusqu'aux tissus20

Figure 1.2

Différents mécanismes d'élimination des pathogènes par les neutrophiles.....22

Figure 1.3

Étapes dans la libération de NETs par les neutrophiles23

Figure 1.4

Neutrophiles non stimulés après 24h de culture.....25

Figure 1.5

Les voies intrinsèque et extrinsèque par lesquelles l'apoptose peut être activée.....27

Figure 1.6

L'axe hypothalamus-hypophyse-surrénalien (HPA Axis) et les effets immunosuppresseurs du cortisol.....32

Figure 1.7

Le gène du glucorécepteur (GR) génère de multiples isoformes.....35

Figure 1.8

Voie génique : différentes voies de régulation de l'inflammation par les glucocorticoïdes (GCs).....37

Figure 1.9

Effets génomiques et non-génomiques des glucocorticoïdes.....40

Figure 1.10

Effets pro-inflammatoires de l'IL-17 dans l'asthme.....45

Figure 1.11

La famille IL-17R et leurs ligands46

Figure 1.12

Régulation des cytokines dans la différenciation du lignage des cellules Th17.....49

Figure 1.13

Voie de signalisation intracellulaire de l'Inteleukine-1751

Chapitre 2**Figure 2.1**

IL-17 receptor subunits expression in neutrophils and mononuclear cells71

Figure 2.2

IL-17 receptor subunits protein expression in neutrophils72

Figure 2.3

IL-17 does not directly activate neutrophils at 5h73

Figure 2.4

Pro-inflammatory cytokines expression in neutrophils at 5h74

Figure 2.5

Pro-inflammatory cytokines expression in neutrophils at 24h 75

Figure 2.6

Assessment of neutrophil viability and apoptosis.....76

Figure 2.7

Morphological changes in cultured neutrophils (24h)77

Chapitre 3**Figure 3.1**

« Time course » de viabilité chez le neutrophile équin.....83

Figure 3.2

Test d'activation des neutrophiles – CD13.....84

Figure 3.3

Test d'activation des neutrophiles – CD11b..... 84

Chapitre 4**Figure 4.1**

Comparaison 3 gènes de référence chez les neutrophiles équins.....92

Figure 4.2

Comparaison des 2 gènes de référence UBQ-GAPDH chez les neutrophiles équins 93

Liste des symboles & abréviations

ARNm	acide ribonucléique messenger
BAL	<i>bronchoalveolar lavage</i> , lavage bronchoalvéolaire
C	degré Celsius
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> , acide désoxyribonucléique
DEX	dexaméthasone
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
EDTA	<i>ethylene diamine tetra acetate</i> , acide éthylène-diamine-tétra-acétique
H ₂ O	eau
IL17RA	<i>interleukin-17 receptor A</i> , récepteur A de l'interleukine 17
IL17RC	<i>interleukin-17 receptor C</i> , récepteur A de l'interleukine 17
IL-17	<i>interleukin-17</i> , interleukine 17
IL-1 β	<i>interleukin-1β</i> , interleukine 1 β
IL-6	<i>interleukin-6</i> , interleukine 6
IL-8	<i>interleukin-8</i> , interleukine 8
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i> , facteur de nécrose tumorale α
kDA	kilodalton(s)
Kg	kilogramme(s)
L	litre
mM	millimole(s) par litre
m	mètre(s)
Mg ²⁺	ion magnésium
mg	milligramme(s)
mL	millilitre(s)
nm	nanomètre(s)
pb	paire de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , amplification en chaîne par polymérase
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , acide ribonucléique
SEM	<i>standard error of the mean</i> , l'erreur type de la valeur moyenne
SD	<i>standard deviation</i> , déviation standard
sec	seconde(s)

Th2	<i>Type 2 helper T cells</i> , lymphocyte auxiliaire de type 2
Th17	<i>Type 17 helper T cells</i> , lymphocyte auxiliaire de type 17
U	unité(s)
µg	microgramme(s)
µl	microlitre(s)
V	volt(s)

Pour vous et grâce à vous

Remerciements

Je n'aurai jamais pu réaliser ce travail de recherche sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont les connaissances et l'intérêt manifestés à l'égard de mon projet de recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de mes études.

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Jean-Pierre Lavoie, pour la confiance qu'il m'a accordée en m'acceptant dans son équipe de travail et pour ses multiples conseils. J'aimerais lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité et tous ses enseignements dans la recherche et pour ses efforts pour essayer d'améliorer ma prononciation en français ! J'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines, d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail. Vous êtes réellement une source d'inspiration et un modèle à suivre. Je vous remercie du fond du cœur pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci infiniment !

Mes remerciements très sincères aux Drs Mariela A. Segura et Daniel Jean pour avoir participé à la révision de ce mémoire. Vos commentaires et suggestions vont enrichir ce travail, merci.

Également aux Drs Sheyla Laverty, Mariela A. Segura et Daniel Jean. Merci d'avoir accepté de faire partie de mon comité-conseil.

Au personnel administratif, merci de m'avoir guidée dans toutes les démarches officielles, spécialement : Annie Lavertu, Christine Blondin, David Champigny, Diane Rodier, Geneviève Michon, Huguette Mallet, merci de votre constante disponibilité et précieuse aide.

À mon agente de recherche Amandine Vargas, merci pour ta disponibilité, ta patience, ton aide précieuse, ta gentillesse, ta douceur et principalement, tes enseignements. Il n'existe pas des mots pour te remercier.

À Roxane Boivin pour le temps que tu as consacré à m’enseigner les techniques de laboratoire et pour les corrections de mes textes en français, merci infiniment.

À Patricia Cano et Mohamed Issouf, qui m’ont beaucoup aidé avec les corrections de mes textes en français, merci de votre précieuse aide.

À tous les amis et partenaires actuels et passés du laboratoire et de la salle d’étudiants : Michela Bullone, Juan Carlos Arango Sabogal, Catheryna Ouimet, Alexandra Walling, Pamela Germin, Isabelle Bazin, Emilie Gélinas-Lymburner, Marion Allano, Maud de Lagarde, Ludovic Tanquerel, Mathilde Leclère, Mireille Godbout, Aude Peltier, Mylène Chevigny et tous les stagiaires, merci de votre aide et soutien.

Aux animaliers de la ferme Frontenac et de l’étable d’enseignement, spécialement Roger F. Normand L. et Denis, merci de votre aide.

À toute ma famille en Colombie, spécialement : mami, papi, tía Julia, Fany, Lili, Freddy, Brigitte, Juanchis, Chechis, Anita, Isabelita, Oscar, Julio, Padre Jairito, Sra. Lilia, Don Arturo, Vivi, Belisario... los quiero mucho. Muchas gracias por su apoyo, por “encomendarme” siempre a Diosito y por sentirse orgullosos de mí siempre.

Et finalement à ma petite famille. Mes enfants : David Arturo et Julietta, ainsi qu’à mon meilleur ami et mari Arturo, merci de votre soutien, de votre patience, de votre amour, c’est grâce à vous que je fais tout ce que je fais.

Yoana ☺

Introduction

Les glucocorticoïdes (GCs) sont les médicaments les plus efficaces pour le traitement de nombreuses maladies inflammatoires et immunitaires telles que l'asthme humain, la polyarthrite rhumatoïde et les maladies auto-immunes. Ces molécules réduisent l'expression de plusieurs cytokines, chimiokines et molécules d'adhésion impliquées dans le recrutement des cellules inflammatoires sur les sites d'inflammation. Toutefois, une résistance à l'action des glucocorticoïdes a été observée chez certains groupes de patients atteints d'asthme neutrophilique. De la même manière, la persistance des neutrophiles après traitement par les GCs a été décrite chez les chevaux atteints du souffle, une maladie utilisée comme modèle naturel de l'asthme. Cette persistance des neutrophiles pourrait maintenir le processus inflammatoire qui conduit à une hypersécrétion de mucus et de remodelage des voies respiratoires. De manière intéressante, la stimulation des cellules épithéliales bronchiques humaines par l'interleukine-17 (IL-17) induit une diminution de la sensibilité de ces cellules aux GCs. Les cytokines de la famille IL-17 sont principalement produites par les lymphocytes T « helper » 17 (Th17) et d'autres cellules comme les cellules T gamma delta (T $\gamma\delta$), les cellules «natural killer» (cellules NK), les cellules inductrices du tissu lymphoïde (LTi), les macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles. L'IL-17 est capable d'induire indirectement l'activation et le recrutement des neutrophiles dans les voies respiratoires par l'induction de la production de chimiokines telles qu'IL-8, CXCL1 et G-CSF par les cellules épithéliales et endothéliales. Des études réalisées chez les humains et chez les chevaux ont montré une augmentation de l'expression du gène codant pour l'IL-17 dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (BALF) après un défi antigénique. Ces résultats suggèrent une possible implication de l'IL-17 dans la diminution de la sensibilité des neutrophiles aux GCs dans les voies respiratoires des chevaux atteints du souffle. Notre étude vise à démontrer la présence des deux sous-unités du récepteur de l'IL-17 (IL-17RA et IL-17RC) chez les neutrophiles équins. Par la suite, à étudier l'implication de l'IL-17 dans l'activation des neutrophiles ainsi que la sensibilité de ces cellules ainsi stimulées aux GCs, et finalement, à déterminer si l'IL-17 module la viabilité et l'apoptose des neutrophiles.

Chapitre 1 : Recension de la littérature

1.1 Les neutrophiles

1.1.1 Définition

Les neutrophiles sont les granulocytes polymorphonucléaires (PMNs) les plus nombreux dans le sang, et ce, chez plusieurs mammifères [1]. Ce sont les composants cellulaires les plus nombreuses du système immunitaire et les premiers médiateurs de la réponse immune innée aux microorganismes envahissants [2]. Près des deux tiers de l'activité de la moelle osseuse sont dédiés à la myélopoïèse, c'est-à-dire la production de monocytes et granulocytes [3]. Ils représentent de 60 à 75% des leucocytes circulants chez la majorité des carnivores, environ 50% chez les équins et, entre 20 et 30% chez les bovins, les moutons et les animaux de laboratoire. Il a été estimé que le 49% des neutrophiles se retrouvent en circulation, le 51% restant se trouve marginé dans les vaisseaux sanguins [4]. Toutefois, lors d'une infection bactérienne aiguë, le nombre de neutrophiles circulant peut augmenter jusqu'à dix fois [5].

1.1.2 Production des neutrophiles

Les neutrophiles sont générés en continu dans les cordons hématopoïétiques entrecoupés dans des sinus veineux de la moelle osseuse à partir de précurseurs myéloïdes [6]. La différenciation en granulocytes est régulée par l'expression coordonnée de facteurs de transcription myéloïde (ex : STAT3, HoxB7 et Egr1), de protéines (ex : S100A8, S100A9 et l'élastase du neutrophile), de récepteurs (ex : N-formyl methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)) et le facteur stimulant des colonies des macrophages et granulocytes (GM-CSF) [7]. Au cours de sa maturation, le neutrophile passe à travers plusieurs étapes de maturation, à savoir myéloblaste, promyélocyte, myélocyte, métamyélocyte, cellules en bandes et PMNs [8, 9]. Les granules des neutrophiles sont formés dans l'étape de promyélocyte [5]. La production des neutrophiles peut atteindre jusqu'à 2×10^{11} cellules par jour [3] et leur principal régulateur est le facteur de stimulation

des colonies de granulocytes (G-CSF), produite en réponse à l'interleukin-17 (IL-17), une cytokine synthétisée principalement par les lymphocytes T [10]. La libération de l'IL-17 est contrôlée par l'interleukin-23, provenant de macrophages et des cellules dendritiques [1]. Au cours de l'inflammation, les neutrophiles infiltrent les tissus, puis éventuellement deviennent apoptotiques et phagocytés par les macrophages et les cellules dendritiques [3]. Cette phagocytose se traduit en une régulation négative de l'IL-23 de la part des macrophages qui se manifeste par la réduction de G-CSF également [1, 3].

1.1.3 Structure des neutrophiles

Les neutrophiles sanguins ont de 10 à 20 μm de diamètre, et possèdent un cytoplasme finement granulaire au centre duquel se trouve un noyau segmenté irrégulier, et dont la morphologie est particulière [5]. En effet, le noyau peut se présenter sous de nombreuses formes, avec de trois à cinq lobes reliés entre eux par des brins de chromatine [11]. Les neutrophiles immatures montrent une légère « lobulation » nucléaire, tandis que les cellules plus âgées ont plusieurs lobes de couleur foncée. Chez quelques mammifères, les neutrophiles des femelles ont souvent un petit lobe en forme de pilon nommé corpuscule de Barr [11]. La microscopie électronique montre trois grands types de granules riches en enzymes dans le cytosol [5]. D'abord les granules primaires (azurophiles), qui sont des lysosomes primaires contenant des enzymes comme la myéloperoxidase, le lysozyme, l'élastase, la β -glucuronidase et la cathepsine B. Puis, les granules secondaires (spécifiques) qui contiennent le lysozyme, la collagénase et la lactoferrine. Finalement, les granules tertiaires contiennent la métalloprotéinase matricielle 9 (MMP₉), aussi connue sous le nom de gélatinase B [1], laquelle permet aux neutrophiles de traverser la membrane basale de l'endothélium [12]. Le cytosol contient aussi, un petit appareil de Golgi, des mitochondries un peu dispersées, et certains dépôts de glycogène sont également présents dans le cytoplasme [11].

1.1.4 Réservoirs des neutrophiles

Dans des conditions physiologiques, les neutrophiles peuvent être trouvées dans la moelle osseuse, la rate, le foie et les poumons [5]. Les raisons de la concentration des neutrophiles dans ces organes restent toutefois non élucidées [1]. Il est possible que ces organes soient des réservoirs de neutrophiles matures, qui peuvent être déployés

rapidement vers les sites d'inflammation ou d'infection. Une autre hypothèse est que ces granulocytes patrouillent constamment les organes susmentionnés à la recherche de lésions tissulaires ou d'invasion microbienne [1].

1.1.5 Demi-vie, recrutement et amorçage du neutrophile

Les neutrophiles ont longtemps été considérés comme des cellules de courte durée, avec une demi-vie en circulation de 1^{1/2} heures chez la souris et 8 heures chez l'humain [13]. Une étude a changé ce concept en proposant que sous des conditions normales, la demi-vie moyenne du neutrophile murin serait de 12.5 heures et jusqu'à 5.4 jours chez l'humain [14]. Néanmoins, la méthodologie dans cette dernière étude a été critiquée, puisque le marqueur utilisé s'accrocherait aussi aux neutrophiles de la moelle osseuse, menant à une surestimation de la demi-vie de ces cellules [15].

Le recrutement rapide de neutrophiles dans les tissus est d'une importance fondamentale pour le système immunitaire inné [5]. Ce processus multi-étapes consiste en la mobilisation des PMNs de réserve de la moelle osseuse, l'accélération de l'hématopoïèse et le recrutement de pools marginés en réponse à des stimuli chimiotactiques provenant des pathogènes et/ou de l'hôte [2]. Dans la plupart des tissus, la cascade de recrutement des leucocytes implique les étapes suivantes : attachement, roulement lent « rolling », adhérence, reptation « crawling » intraluminale et enfin transmigration (**Figure 1.1**). Le recrutement de neutrophiles est dépendant du contact de celui-ci avec l'endothélium des veinules et des signaux reçus par l'intermédiaire de médiateurs inflammatoires solubles (incluant histamine, cystéinyl, leucotriènes et cytokines), libérés par des leucocytes tissulaires quand ils entrent en contact avec des agents pathogènes [1, 2]. Les granulocytes marginés roulent lentement tout au long de la surface de l'endothélium grâce à l'interaction d'une famille de glycoprotéines, les sélectines [16]. Une fois dans les tissus conjonctifs, leur durée de vie peut être de 4 jours, durant lesquels ils vont phagocyter des bactéries, débris cellulaires, et corps étrangers [11]. Il existe une population des neutrophiles ayant un profil de récepteurs de surface spécifiques (CD54^{high}, CXCR1^{low}) qui ont la capacité de réaliser une transmigration inversée « reverse transmigration » (RT). Ces neutrophiles qui représentent de 1-2% de la population totale de neutrophiles lors d'inflammation systémique, ont la capacité de

traverser une monocouche endothéliale *in vitro* et d'émerger ensuite par RT en conservant leur capacité d'être activés [17].

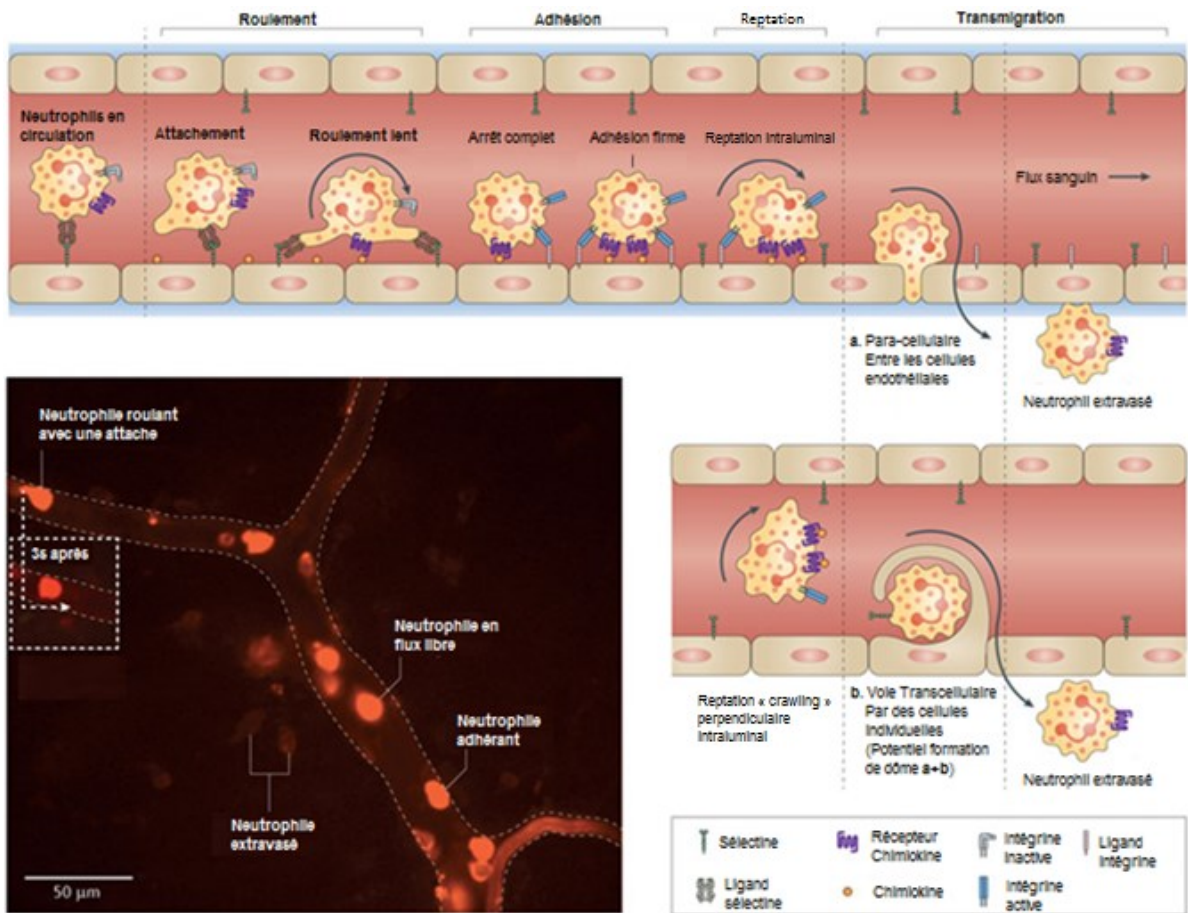


Figure 1.1 Étapes séquentielles de recrutement des neutrophiles depuis la vascularisation jusqu'aux tissus.

Deux méthodes possibles de transmigration sont reconnues : **a.** Para-cellulaire (entre les cellules endothéliales) et **b.** Trans-cellulaire (à travers les cellules endothéliales). Le roulement est principalement dépendant des sélectines, tandis que l'adhésion, la reptation « crawling » et la transmigration dépendent des interactions avec les intégrines. Les chimiokines qui bordent la partie luminale de l'endothélium activent le roulement des neutrophiles, induisant ainsi des changements conformationnels des intégrines de surface des neutrophiles et permettant les événements subséquents. Les neutrophiles rampants suivent le gradient de chimiokines tout au long de l'endothélium, qui les guide vers les sites préférentiels de la transmigration. L'image de microscopie à fluorescence *in vivo* montre une veinule de la peau d'une souris avec des neutrophiles (LY6G⁺) marqués en rouge (phycoérythrine conjuguée aux anticorps). Le sujet a été infecté par le *Staphylocoque aureus* et l'image a été prise deux heures plus tard. On y voit les neutrophiles dans différentes étapes de la migration: cellules circulant librement, cellules roulant en étendant des attaches, neutrophiles adhérents et extravasés. *Tiré avec permission* [1].

La capacité des neutrophiles à se localiser aux sites de l'infection est un élément clé de la réponse inflammatoire aiguë. La migration des neutrophiles à travers les tissus est influencée par les substances chimioattractantes produites par l'hôte au cours de l'inflammation et par les facteurs dérivés des agents pathogènes [2]. L'un des facteurs chimiotactiques les plus puissants pour le neutrophile est IL-8 [18]. Cette chimiokine est produite en réponse à des stimuli pro-inflammatoires par une panoplie de cellules, dont des phagocytes mononucléaires, les neutrophiles, les mastocytes, les cellules épithéliales, les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Les neutrophiles sont aussi recrutés efficacement par les leucotriènes et les prostaglandines produites de manière exogène dans les sites d'infection et par le composant du complément C5a [19]. De nombreux composants de bactéries, telles que la fMLP ou les peptidoglycans sont des chimioattractants et contribuent directement au recrutement, à la migration et à la potentialisation de la fonction des neutrophiles [20].

1.1.6 Mécanismes d'action des neutrophiles

L'élimination des organismes envahisseurs exige l'orchestration des événements de transduction de signaux complexes [2]. Pour accomplir leur rôle, les neutrophiles possèdent une impressionnante gamme de mécanismes qui peuvent être activés, de manière intra- et extracellulaires (**Figure 1.2**). Lorsque les neutrophiles phagocytent les microorganismes, ils sont encapsulés dans les phagosomes, où les agents pathogènes sont éliminés en utilisant des mécanismes dépendants de la NADPH oxygénase ou de protéines antibactériennes (cathepsine, défensine, lactoferrine et lysozyme) qui sont libérées à partir leurs granules, soit dans les phagosomes ou dans le milieu extracellulaire [3].

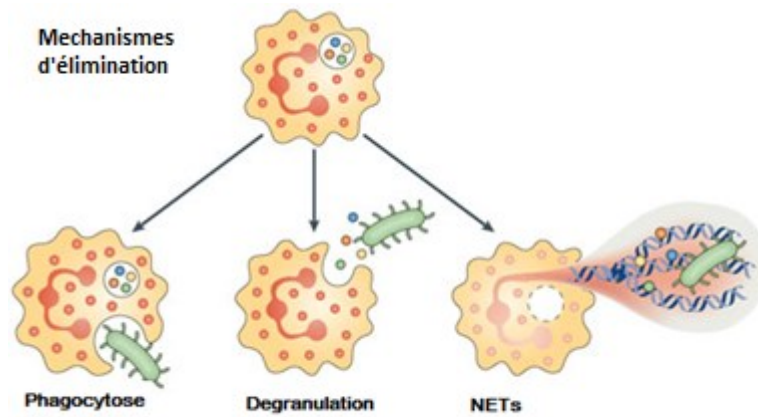


Figure 1.2. Différents mécanismes d'élimination des pathogènes par les neutrophiles

La phagocytose directe, la dégranulation et la libération de NETs. *Tiré avec permission* [1].

Les neutrophiles activés peuvent éliminer des microorganismes extracellulaires en libérant aussi des pièges extracellulaires (NETs) [21]. Il s'agit d'un réseau constitué d'ADN auquel sont amalgamés des histones, des protéines (ex : la lactoferrine et de la cathepsine S) et des enzymes (ex : MPO et élastase) provenant des granules. Les NETs agissent comme des filets en immobilisant les agents pathogènes, les empêchant ainsi de se propager (**Figure 1.3**), mais aussi en facilitant la phagocytose des microorganismes piégés. Ils sont également responsables de l'élimination d'agents pathogènes grâce aux histones et aux protéases antimicrobiennes. Deux modèles décrivant la libération de NETs ont été proposés: un mécanisme de mort cellulaire et un mécanisme d'extrusion d'ADN des cellules intactes [22]. En effet, il a été démontré que les neutrophiles libèrent leurs NETs assez rapidement (en quelques minutes), ce qui leur permet de garder la capacité de réaliser certaines fonctions immunes, comme le rampement directionnel et/ou la chimiotaxie [1].

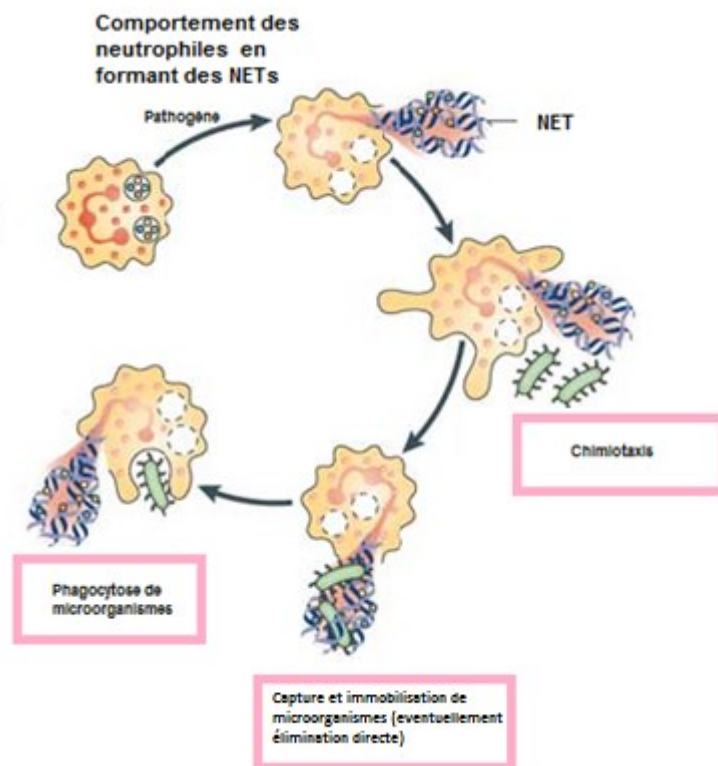


Figure 1.3. Étapes dans la libération de NETs par les neutrophiles

Tiré avec permission [1]

1.1.7 Principales cytokines produites par les neutrophiles humains et équins

Les neutrophiles expriment et produisent des cytokines soit de manière constitutive ou lors de l'activation par des stimuli environnementaux [23]. Ces cytokines appartiennent à différentes familles (**Tableau I**), y compris des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, des chimiokines, des cytokines immunorégulatrices, des membres de la superfamille du facteur de nécrose tumoral et des facteurs angiogéniques et fibrogéniques. Les neutrophiles, en produisant une telle variété de cytokines, auraient la capacité d'influencer de façon significative non seulement les multiples aspects des réponses immunitaires et inflammatoires, mais aussi la défense antivirale, l'hématopoïèse, l'angiogenèse et la fibrogenèse [23]. Chez les équins, l'expression de plusieurs de ces cytokines a été confirmée dans le contexte du souffle, une maladie respiratoire fréquente chez cette espèce, et un modèle d'asthme humain (**Tableau I**) [24, 25].

Tableau I. Gènes exprimés par le neutrophile humain et équin

Gènes exprimés par le neutrophile humain	
CC Chimiokines CCL2, CCL3, CCL4, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22	Cytokines proinflammatoires IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-9, IL-16, IL-17, IL-18, MIF
CXC Chimiokines CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13	Cytokines immunorégulatrices INF α , IFN- β , IFN γ , IL-12, IL-21, IL-23, IL-27, TSLP
Facteurs stimulants des colonies G-CSF, GM-CSF, IL-3, SCF	Cytokines anti-inflammatoires IL-1ra, IL-4, TGF β 1, TGF β 2
Facteurs angiogéniques et fibrogéniques VEGF, BV8, HBEGF, FGF2, TGF α , HGF, Angiopoietine 1	Membres de la superfamille TNF TNF α , FasL, CD30L, TRAIL, LIGHT, Lymphotoxine β , APRIL, BAFF, CD40L, RANKL
D'autres cytokines NGF, BDNF, NT4, PBEF, Amphiréguline, Midkine, oncostatine M, Activine A, endothéline	
Gènes exprimés par le neutrophile du cheval	
CXC Chimiokines CXCL8, CXCL2 (MIP-2)	Cytokines proinflammatoires IL-1 β , IL-6
Membres de la superfamille TNF TNF α	Cytokines anti-inflammatoires IL-10

Tableau I. Cytokines produites par le neutrophile humain. (A) *Modifié de Tecchio et al. 2014 (en voie de permission)*. (B) Gènes exprimés par les neutrophiles équins. D'après Joubert, P (2001), Joubert, P (2008), Hirsch, G (2012) [24, 25]

1.1.8 Apoptose des neutrophiles

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée [5]. Il s'agit d'un processus utilisé par tous les types cellulaires et il permet le renouvellement des cellules [26]. L'apoptose des neutrophiles est un processus ayant pour but de maintenir l'homéostasie du système immunitaire [27]. Cependant, l'apoptose retardée des neutrophiles est une composante importante de maladies inflammatoires et auto-immunes [28]. Les neutrophiles apoptotiques sont ensuite ingérés et dégradés par les macrophages, permettant ainsi de résoudre l'inflammation sans relâchement de substances cytotoxiques qui pourraient endommager les tissus de l'hôte [26].

De façon importante, l'apoptose est accompagnée d'une diminution générale de la fonction pro-inflammatoire des PMNs [26] et est caractérisée par une perte des granules cytoplasmiques, l'arrondissement du noyau et la condensation de l'hétérochromatine nucléaire (**Figure 1.4**).

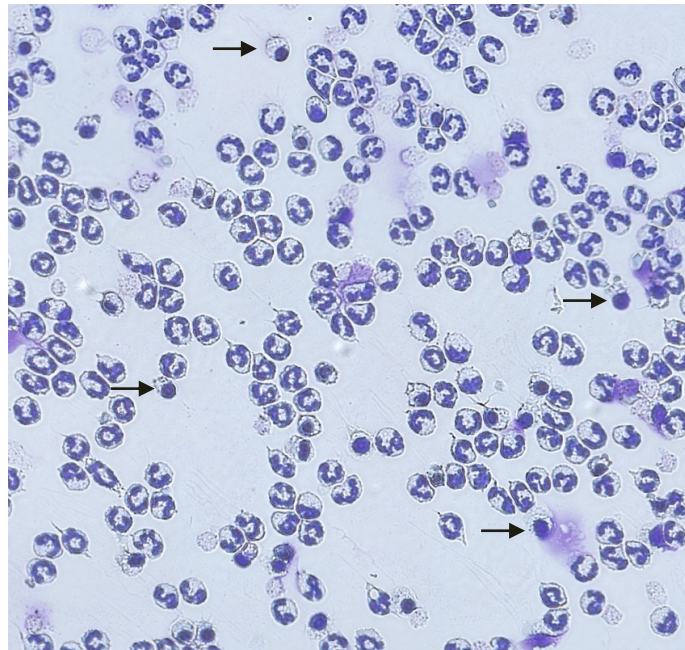


Figure 1.4. Neutrophiles non stimulés après 24h de culture

Les flèches montrent les cellules apoptotiques, caractérisées par l'arrondissement du noyau, la perte de granules cytoplasmiques et la condensation de la chromatine nucléaire. *Laboratoire de Biologie moléculaire respiratoire équine, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.*

Deux voies principales apoptotiques ont été décrites dans presque toutes les cellules, y compris les neutrophiles : la voie extrinsèque laquelle implique des récepteurs de mort cellulaire et, la voie intrinsèque ou mitochondriale [5]. La voie extrinsèque est initiée par des cytokines extracellulaires comme le facteur de nécrose tumorale (TNF- α), le ligand Fas, ou TRAIL « TNF-related apoptosis-inducing ligand », en agissant à travers des récepteurs spécifiques comme le CD95 (Fas) [5, 28]. Les récepteurs de mort cellulaire font partie de la famille de récepteurs de surface de type 1. Ils possèdent une séquence cytoplasmique de 80 acides aminés qu'on nomme domaine de la mort. Ces récepteurs sont activés par des ligands exprimés sur les cellules cytotoxiques. Les ligands se lient à ces récepteurs de mort permettant l'assemblage de plusieurs protéines adaptatrices dans un complexe de signalisation. Une fois assemblé, ce complexe active les caspases 8 et 10 [5]. La voie intrinsèque ou mitochondriale, en revanche, est initiée par la rupture de la membrane mitochondriale externe suite à un dommage (ex : oxydation et radiation). Ce stimulus active la protéine pro-apoptotique bcl-2, laquelle libère le cytochrome C et d'autres facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol. Le cytochrome C active la formation d'un complexe protéique appelé apoptosome. Celui-ci activera à son tour la caspase-9. Une fois les caspases 8, 9 ou 10 déclenchés par l'une ou l'autre des voies, la cascade des « caspases effectrices » (caspase-3, 6 et 7) est initié, permettant la dégradation des protéines cellulaires et la décomposition des organelles, résultant en morte cellulaire (**Figure 1.5**) [5].

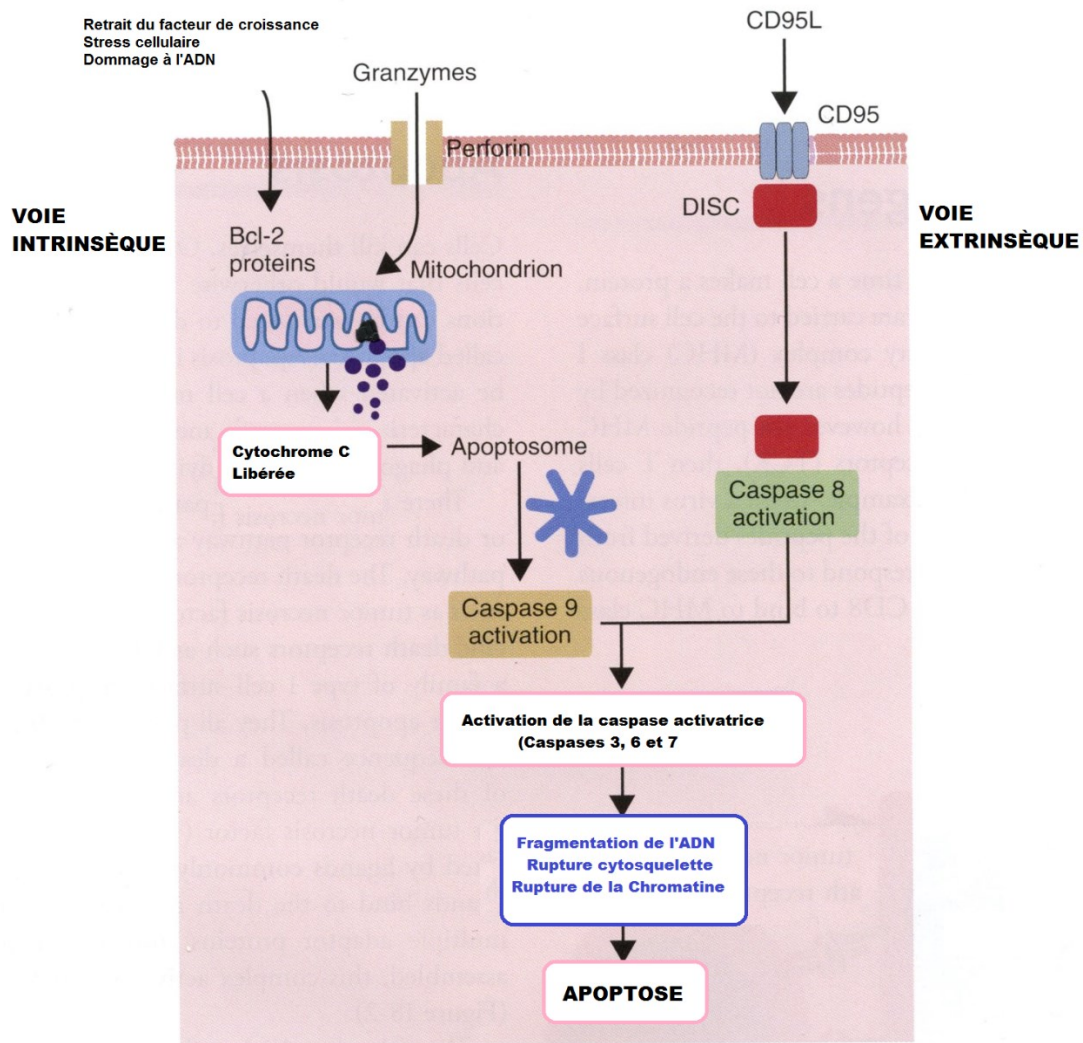


Figure 1.5. Les voies intrinsèque et extrinsèque par lesquelles l'apoptose peut être activée

Les deux voies mènent à l'activation des caspases effectrices (3, 6 et 7), la fragmentation de l'ADN et la mort cellulaire. La voie extrinsèque est activée par l'union des récepteurs de mort comme le CD95 et la formation des complexes de signalisation qui induisent la mort (DISC). La voie intrinsèque est initiée par des dommages cellulaires, incluant l'injection de granzymes, en provoquant la libération du cytochrome C depuis la mitochondrie, la formation d'un apoptosome et l'activation de la caspase 9. Tiré avec permission de *Veterinary immunology*, Tizard, I., Page 192, Copyright Elsevier, 2013 [5].

1.1.9 Méthodes d'isolation des neutrophiles

Les neutrophiles équins et humains sont isolés à partir de sang périphérique, contrairement aux souris où les neutrophiles sont traditionnellement isolés à partir de la moelle osseuse ou de la cavité péritonéale [23]. Dans la littérature, plusieurs méthodes d'isolation sont rapportées. On note entre autres la procédure classique de séparation sur un gradient de densité à partir de sang entier en utilisant des milieux comme le métrizoate de sodium et le dextran 500 [29]. D'autres techniques utilisant différents milieux tels que le Ficoll-sodium métrizoate (Ficoll-paque plus) et des particules de silice colloïdale enrobées de polyvinylpyrrolidone (Percoll) [30] sont également couramment utilisées. Basée sur la séparation en fonction de la densité, cette méthode consiste à superposer le sang entier sur milieu de gradient, puis de faire une centrifugation, ce qui permet une séparation de la couche des neutrophiles. Ensuite, la lyse des érythrocytes résiduels est réalisée. Finalement, les neutrophiles sont lavés, comptés et resuspendus dans un tampon à la concentration désirée. Avec ces méthodes, il est possible d'atteindre une pureté >95%.

Il existe également de nouvelles techniques de purification basées sur une immunosélection négative ou positive avec des billes magnétiques, comme EasySep (EasySep neutrophil enrichment kit, Stemcell Technologies) et MACS (MACS® Cell Separation, Miltenyl Biotec), lesquelles permettent d'atteindre des puretés supérieures à 99.5% en minimisant le risque de contamination avec les autres cellules.

1.1.10 Détection des cytokines/gènes dans les neutrophiles : Méthodes et mises en garde

De manière similaire à ce qui est observé dans d'autres types cellulaires, la production de cytokines par les neutrophiles est généralement précédée par une accumulation accrue des ARN messagers (ARNm). Ceux-ci peuvent être détectés et/ou quantifiés par plusieurs techniques telles que la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), le northern blot et l'hybridation *in situ* [31]. Un des facteurs limitants dans la quantification de l'expression des gènes dans les neutrophiles humains et équins est leur faible contenu d'ARNm [31]. Le nombre de cellules nécessaires à l'obtention d'une quantité suffisante d'ARN est très important (en moyenne 10^7 cellules pour 1 μ g d'ARN) pour certaines de ces techniques, ce qui représente un réel défi lorsque plusieurs expérimentations différentes doivent être réalisées. Le développement de la PCR a

révolutionné la quantification de l'expression des gènes, car cette technique procure un haut degré de sensibilité, permettant l'utilisation d'une quantité moindre d'ARN, tout en procurant une excellente appréciation de l'expression génique. Par contre, cela signifie qu'une faible contamination d'ARNm par exemple 1% des autres cellules comme des monocytes, lymphocytes ou des éosinophiles, peut résulter en une contamination de 20% au niveau d'ARNm, car les cellules mononucléaires possèdent entre 10 à 20 fois plus d'ARNm que les neutrophiles [31], c'est pour cette raison que l'haute pureté des neutrophiles est vitale pour avoir des résultats adéquats.

1.1.11 L'inflammation neutrophilique dans les voies respiratoires

L'accumulation de neutrophiles est une caractéristique de l'inflammation des voies respiratoires chez les patients atteints de la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) et aussi chez certains patients souffrant d'asthme, particulièrement les patients plus sévères, lors d'exacerbations et suite à une exposition à la cigarette [32-34]. Ce sont aussi les cellules prédominantes dans la lumière des voies respiratoires et chez les chevaux atteints du souffle en exacerbation de la maladie [35]. Les neutrophiles en libérant leurs produits bioactifs pourraient ainsi contribuer à la pathogenèse de la maladie dans les voies respiratoires [36]. Les neutrophiles peuvent notamment libérer des cytokines qui vont entretenir leur recrutement, comme le TNF- α et IL-8, cette dernière étant un puissant agent chimiotactique pour les neutrophiles. Les neutrophiles libèrent aussi la leucotriène B₄ et radicaux libres qui augmentent la production de l'IL-8, ce qui contribue au recrutement des neutrophiles et indirectement à l'hyperréactivité bronchique [37].

Les neutrophiles pourraient causer des dommages tissulaires par la libération de plusieurs composants qui dégradent les protéines ou par des composants cytotoxiques [38]. Entre autres l'élastase qui détruit l'élastine, un composant structurel important du poumon qui prévient le collapse des voies respiratoires périphériques. Cette destruction mène à l'emphysème pulmonaire et possiblement au remodelage du tissu respiratoire [39-41]. De même, l'élastase semble contribuer à l'hypersécrétion de glandes muqueuses dans les voies respiratoires chez l'humain et chez d'autres mammifères [42, 43]. Les MMPs comme le MMP-8 et MMP-9, libérées aussi par les neutrophiles et qui ont la capacité de dégrader le tissu, pourraient contribuer à la pathogenèse de l'asthme [44, 45].

1.2 Les corticostéroïdes

1.2.1 Définition et classification

Les corticostéroïdes ou corticoïdes sont des hormones stéroïdiennes naturelles sécrétées chez les animaux par le cortex de la glande surrénale, à partir du cholestérol, qui ont un rôle clé dans l'homéostasie de l'organisme. En effet, ces hormones permettent à l'organisme de s'adapter aux changements environnementaux internes [46]. La partie superficielle de la glande surrénale sécrète :

- **Les glucocorticoïdes (GCs)** (particulièrement le cortisol), produits dans la zone fasciculaire et la zone réticulée, ont des propriétés anti-inflammatoires et une action sur le métabolisme protéique et glucidique.
- **Les minéralocorticoïdes** (principalement l'aldostérone), produits dans la zone glomérulaire, agissent sur la régulation de l'eau et du sel dans le corps (rétention d'eau et de sodium, élimination de potassium).
- Les androgènes et estrogènes, qui ont un rôle dans le développement des caractères sexuels [46, 47].

Dans le paragraphe suivant, une description plus approfondie des glucocorticoïdes, molécules utilisées dans notre projet, est présentée.

1.2.2. Les Glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont d'importants médiateurs du métabolisme intermédiaire [47]. Ils sont impliqués dans les réponses cataboliques au stress, dans le métabolisme des hydrates de carbone et des triglycérides, dans la fonction cardiovasculaire et dans l'immunité [48]. Au moins 95% de l'activité des glucocorticoïdes résulte de la sécrétion du cortisol, connue aussi comme *hydrocortisone*. Le reste de l'activité des glucocorticoïdes est dû à la *corticostérone*.

Parmi les principaux effets des glucocorticoïdes, on retrouve :

- **Métabolisme des hydrates de carbone:** Stimulation de la gluconéogenèse, la diminution de l'utilisation de glucose par les cellules et l'augmentation de la concentration sanguine de glucose en opposition à l'action de l'insuline [49].

- **Métabolisme des protéines** : Réduction des protéines cellulaires, augmentation des protéines dans le plasma et du foie et, des acides aminés sanguins, diminution du transport des acides aminés dans les cellules extra-hépatiques et transport renforcé dans les cellules hépatiques.
- **Métabolisme de graisses** : Mobilisation des acides gras et prise de poids causée par un excès de cortisol.
- **Stress et inflammation** : Le stress physique ou le stress neurogénique causent une augmentation immédiate et marquée de la sécrétion d'adrénocorticotrophine (ACTH) ou adrénocorticotropine, qui est sécrétée par hypophyse antérieure [50] de la glande pituitaire, ce qui a pour conséquence une augmentation de la sécrétion surrénale corticale de cortisol. Dans un contexte inflammatoire, les GCs endogènes et exogènes ont la capacité de supprimer l'expression de médiateurs pro-inflammatoires comme des cytokines, des chimiokines et des molécules d'adhésion [51].

Comme mentionné précédemment, la sécrétion des glucocorticoïdes est régulée par l'hormone ACTH dont la sécrétion est à son tour contrôlée par l'hormone de libération de la corticotropine (CRF), aussi connue comme facteur de libération de la corticotropine (CRH) qui est sécrétée par l'hypothalamus (**Figure 1.6**) [50].

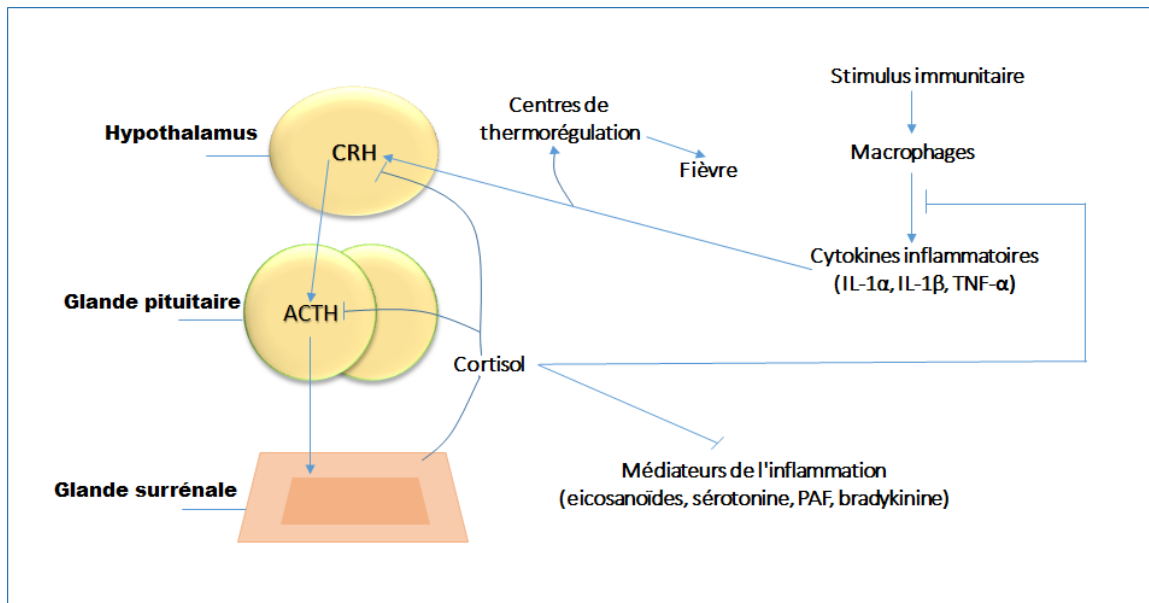


Figure 1.6. L'axe hypothalamus-hypophyse-surrénalien (HPA Axis) et les effets immunosuppresseurs du cortisol

Inhibition de plusieurs médiateurs de l'inflammation, des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages, c'est ainsi qu'il y a une limitation de l'étendue de la réponse inflammatoire *en voie de permission* [52, 53].

1.2.2.1 Effets anti-inflammatoires des glucocorticoïdes

Grâce à leurs multiples effets, les GCs sont les médicaments anti-inflammatoires les plus puissants actuellement disponibles pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques comme l'asthme et l'arthrite rhumatoïde [53, 54]. Lorsque de grandes quantités de cortisol sont sécrétées ou injectées dans l'organisme, les premières étapes du processus inflammatoire sont bloquées par la stabilisation membranaire du lysosome, la diminution de la perméabilité des capillaires, la diminution de la migration des leucocytes, la diminution de la phagocytose des cellules endommagées et la diminution de la fièvre par une réduction de la libération de l'IL-1 par les leucocytes [47, 50]. Les effets anti-inflammatoires peuvent se réaliser dans les heures ou les jours suivants le blocage de la majorité des facteurs qui favorisent l'inflammation [50].

Les GCs sont capables de diminuer le nombre de monocytes en circulation, la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et de prostaglandines par les cellules inflammatoires en inhibant le facteur nucléaire κB (NF- κB) [52] ainsi que l'expression de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de type II et les récepteurs Fc [49]. De la même façon, le nombre de cellules T circulantes sont diminuées ou inhibées par action des GCs. Chez les PMNs, une diminution des basophiles et éosinophiles se produit par les GCs, tandis que les neutrophiles circulants augmentent [49]. De plus, les GCs réduisent l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales et la prolifération des fibroblastes, ce qui engendre en une diminution de la perméabilité des vaisseaux [49].

La sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, lors de l'activation des macrophages et des lymphocytes, induit non seulement la mise en place de la réponse inflammatoire, mais aussi l'expression et la libération de l'hormone de libération de la corticotropine (CRH). La CRH, à son tour, fait augmenter la production d'ACTH, laquelle stimule les cellules du cortex surrénal à synthétiser et sécréter les GCs. Le cortisol inhibe l'action de plusieurs médiateurs de l'inflammation (eicosanoïdes, sérotonine, facteur d'activation des plaquettes (PAF), bradykinine). Le cortisol inhibe aussi la libération des cytokines par les macrophages, incluant IL-1 α , IL-1 β et TNF- α . Étant donné que ces cytokines induisent la libération de CRH, mais aussi l'augmentation du cortisol dans le sérum, la sécrétion de cortisol induite par le stress pourrait limiter l'étendue de la réponse inflammatoire (**Figure 1.6**) [52, 55].

1.2.2.2 Mécanismes d'action moléculaire des glucocorticoïdes

Les effets biologiques des GCs sont médiés par deux mécanismes différents qui mènent à la suppression des gènes inflammatoires. 1. La voie génomique classique médiée par l'activation des récepteurs des glucocorticoïdes dans le cytosol (cGR), et 2. Les mécanismes non génomiques.

Voie classique génomique

Le récepteur des glucocorticoïdes :

Le récepteur de glucocorticoïdes (GR) fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires régulés par leurs ligands tout comme les récepteurs aux minéralocorticoïdes, à la vitamine D, à l'acide rétinoïque et les hormones thyroïdiennes et sexuelles [54, 56]. Le gène du GR humain est localisé sur le chromosome 5 (région 5q31p) [57] et contient 9 exons, dont le premier et dernier sont susceptibles à l'épissage alternatif (**Figure 1.7**). Chez le cheval, le gène du GR, aussi nommé NR3C1, est situé sur le chromosome 14.

Des épissages alternatifs du GR génèrent plusieurs variantes, deux d'entre elles le GR α et GR β ont été la cible de nombreuses études à cause de leur abondance relative. Ces deux variantes sont identiques à l'exception de 50 acides aminés additionnels présents chez le GR α et, le GR β contient 15 acides aminés non homologues au GR α . D'autres variants comme le GR δ et le GR γ ont également été décrits et pourraient jouer un rôle dans le développement de la résistance aux GCs dans certains cancers [58]. Il existe des variantes additionnelles du GR α ; GR α -A, -B, -C1, -C2, -C3, -D1, -D3, qui sont générés par des mécanismes post-translationnelles comme la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation (**Figure 1.7**). L'expression de ces isoformes dans différents types cellulaires pourrait expliquer la variété de réponses de celles-ci aux GCs [58, 59]. Le GR α classique est exprimé de manière ubiquitaire dans les cytoplasmes des cellules cibles [60] et est fonctionnel lors de son activation par les GCs.

Contrairement au GR α , le GR β est incapable de se lier aux GCs comme conséquence des différences de séquence qui entraînent une modification dans la région de liaison du ligand [61, 62]. De plus, le GR β diminue l'activité de transactivation du GR α et réprime les promoteurs de réponse NF- κ B et AP-1 médié par le GR α [63]. De plus, la formation de l'hétérodimère GR α /GR β , empêche la formation de l'homodimère actif du GR α [64]. La présence du GR β a été associée comme étant un facteur important de la glucocorticorésistance, dans plusieurs conditions pathologiques dont l'asthme [65, 66].

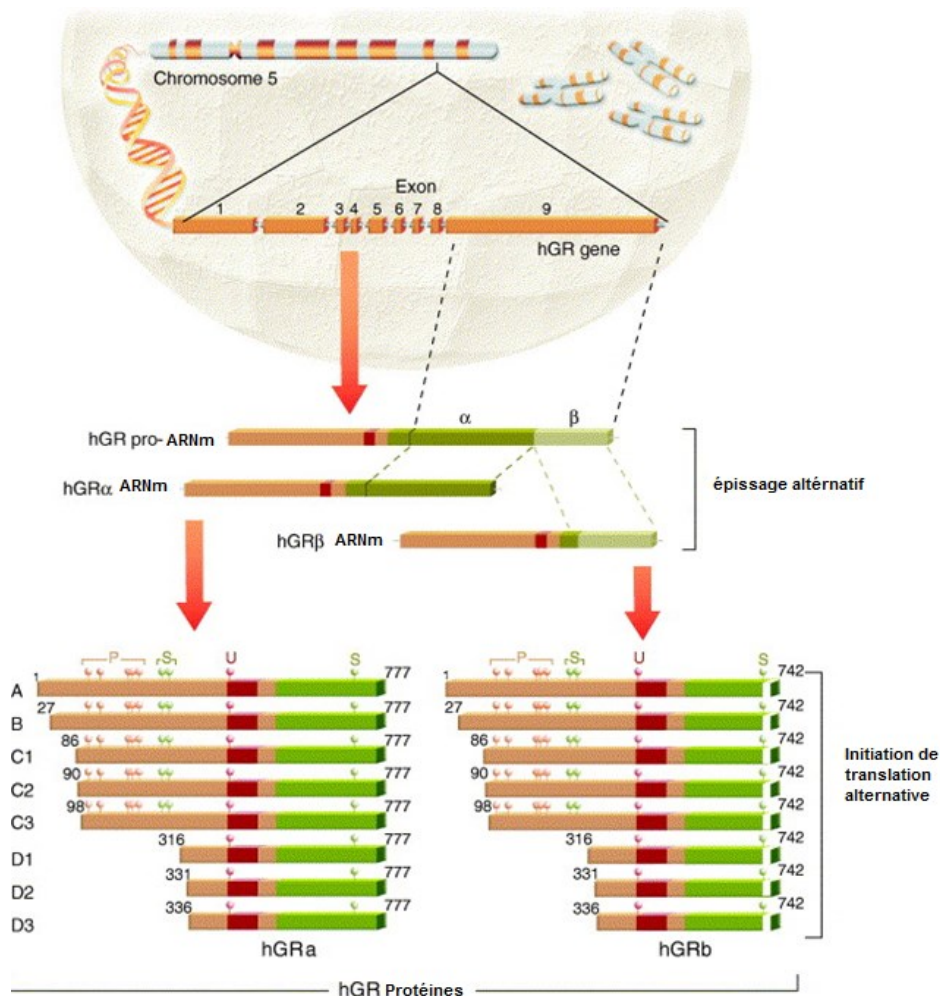


Figure 1.7. Le gène du glucorécepteur (GR) génère de multiples isoformes.

L'épissage alternatif de l'exon 9 produit le GR α (vert foncé) et le GR β (vert clair). L'ARNm du GR α et du GR β produit des isoformes additionnels par une initiation de la traduction alternative. Les numéros indiquent le premier et dernier résidu de chaque isoforme du GR. Chaque séquence protéique du GR peut être modifiée par phosphorylation (P) sur les résidus S113, S141, S211, et S226; par ubiquitination (U) sur le résidu K417 et/ou par sumoylation (S) sur les résidus K277, K293 et K703 Tiré avec permission [58].

Effets génomiques de glucocorticoïdes :

Dans la voie génomique classique, le GC lipophile passe à travers la membrane cellulaire de manière passive ou par diffusion à travers des transporteurs membranaires pour rejoindre le cytosol. L'hormone se fixe ensuite au GR intracellulaire (**Figure 1.9**), localisé dans le cytosol ou le noyau pour former un complexe GC-GR [60]. Par la suite, le GR du complexe GC-GR est activé et ainsi libéré à partir des protéines chaperonnes,

comme la HSP90 de l'anglais « heat shock protein 90 » [67]. Ensuite, le complexe GC-GR réalise une translocation vers le noyau où il exerce ses effets moléculaires à travers plusieurs mécanismes et avec la participation de cofacteurs sélectifs pour enfin réguler la transcription des gènes spécifiques [68, 69]. Par la suite, le complexe GC-GR peut se fixer aux éléments de réponse au GC (GREs) localisés dans les régions promotrices des gènes cibles. La *trans-activation* qui en résulte, et qui active la transcription des gènes anti-inflammatoires, comme l'Annexin-1 (lipocortine-1), la protéine inhibitrice de sécrétion leucocytaire (SLPI), l'IL-10, la protéine kinase activée par un mitogène – phosphatase 1 (MKP-1) et aussi le I κ B- α , inhibiteur du NF- κ B [70, 71]. D'autre part, l'interaction du GR avec des éléments négatifs de réponse au GC, mécanisme nommé *la cis-répression*, supprime la transcription de certains gènes. La cis-répression joue un rôle important dans la médiation des effets secondaires des corticostéroïdes comme par exemple, l'inhibition de l'expression d'ostéocalcine qui est impliquée dans la synthèse osseuse [70]. La *trans-répression* a par ailleurs une action anti-inflammatoire médiée par l'interaction du GR avec des molécules coactivatrices comme les protéines de liaison CREB (CBP), lesquelles sont activées par des facteurs de transcription pro-inflammatoires comme le facteur NF- κ B, produisant une diminution dans l'expression des cytokines, chimiokines et molécules d'adhésion, enzymes, récepteurs et protéines inflammatoires (**Figure 1.8**) [69, 70, 72].

D'autre part, le complexe GC-GR intranucléaire inhibe la transcription des gènes pro-inflammatoires par le recrutement d'histones désacétylases (HDACs), en particulier la HDAC2. La HDAC2 est capable d'induire la désacétylation de gènes pro-inflammatoires, réduisant l'accès de ces gènes à la machinerie transcriptionnelle [73].

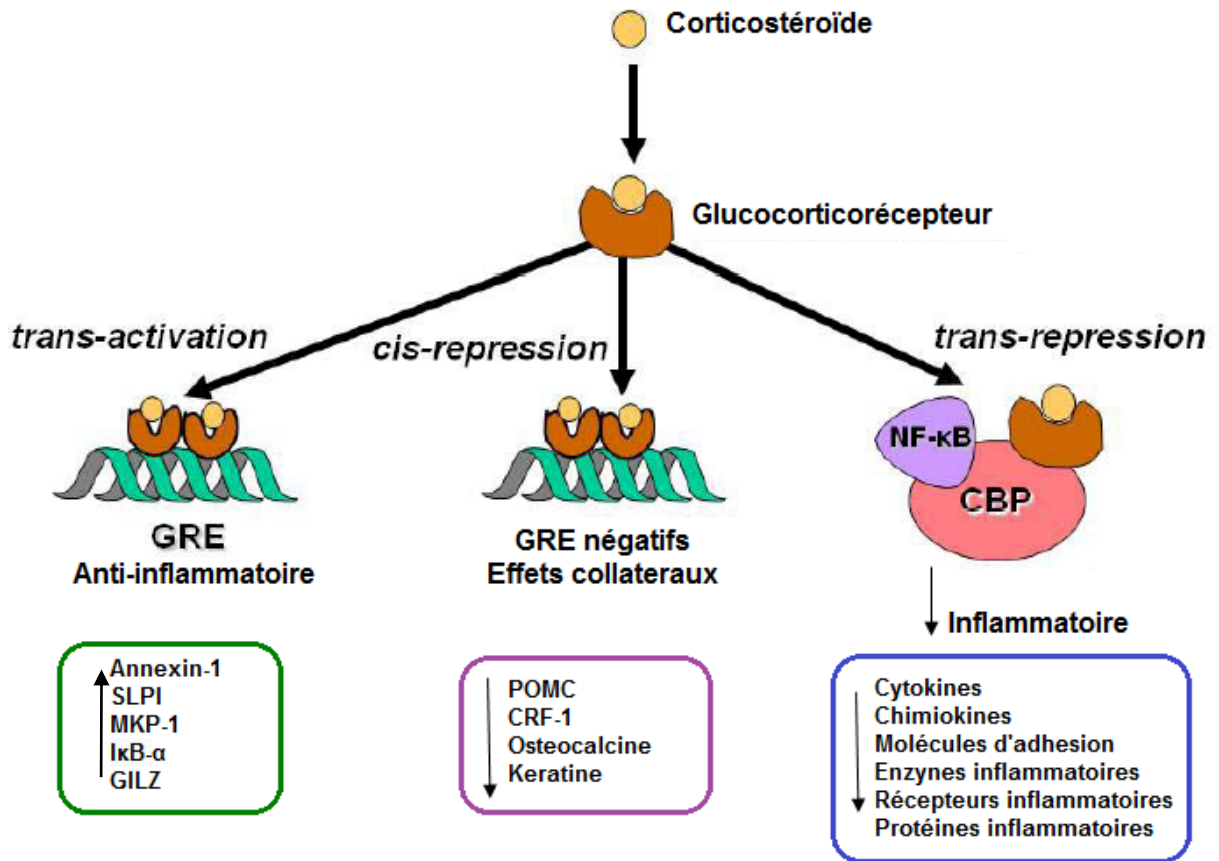


Figure 1.8. Voie génique: différentes voies de régulation de l'inflammation par les glucocorticoïdes (GCs)

Les GCs entrent dans la cellule et lient le récepteur de glucocorticoïdes (GR) dans le cytoplasme pour transloquer vers le noyau. Le GR se lie aux éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) dans la région promotrice des gènes sensibles aux stéroïdes, qui peuvent coder pour des protéines anti-inflammatoires. Moins fréquemment, le GR interagit avec des GREs négatifs afin de réprimer des gènes. Le GR nucléaire interagit également avec des molécules de coactivation telles que CREB-binding protein (CBP), qui sont activées par des facteurs de transcription pro-inflammatoires, tels que le facteur- κ B nucléaire (NF- κ B), important pour la transcription des gènes inflammatoires. SLPI: inhibiteur de leukoprotéase sécrétoire; MKP-1: mitogen-activated kinase phosphatase-1; I κ B- α : inhibiteur de NF- κ B; GILZ: protéine leucine zipper induite par les glucocorticoïdes; POMC: proopiomélanocortine; CRH: facteur de libération de corticotropine. *Tiré avec permission [70].*

Le temps nécessaire pour l'activation de la voie génomique est cliniquement long : les effets pouvant être perçus des heures ou même des jours suivant l'administration [60].

Voie non génomique

Les GCs peuvent aussi agir par un mécanisme non génomique (**Figure 1.9**) qui est caractérisé par des effets observés dans un délai de temps très court, de l'ordre de quelques secondes [74]. Également, la voie non génomique est responsable des effets des GCs sur les cellules anucléées telles que les plaquettes, les érythrocytes et les spermatozoïdes, qui en l'absence d'un noyau fonctionnel, exclut l'action génomique [60]. De plus, les effets sont principalement caractérisés par leur insensibilité aux inhibiteurs de la transcription comme l'actinomycine D et de la synthèse protéique comme la cycloheximidine [60, 75].

Les mécanismes d'action non génomiques des glucocorticoïdes possibles sont décrits à continuation :

- Interactions spécifiques avec un GR membranaire (mGR) :

Il existe un variant du GR lié à la membrane (mGR) qui régule des effets spécifiques rapides non génomiques dans la cellule, dans laquelle il induit la génération d'une variété de systèmes de messagers secondaires, de changements dans les flux d'ions, ainsi que l'activation de différentes voies de kinases [76]. L'expression des mGCR a été observée dans de mononucléaires de patients humains avec arthrite rhumatoïde, ainsi qu'il a eu évidence d'une surrégulation lors de ces cellules stimulées avec LPS *in vitro* [77].

- Interactions non spécifiques des GCs avec des membranes cellulaires :

Étant donné que les GCs sont des molécules lipophiles qui vont avoir tendance à rester dans les membranes lipidiques, spécialement à de fortes concentrations utilisées *in vitro*, ils pourraient interférer avec la fonction et l'activité des protéines associées à la membrane, ainsi qu'aux canaux d'ions comme le calcium, potassium et sodium ou bien les récepteurs des protéines [60, 78, 79]. Néanmoins et puisque les doses utilisées dans la majorité des études démontrant ces effets se situent dans l'intervalle supérieur à celles physiologiques et thérapeutiques (>10µM), l'importance de ce concept reste controversée [78].

- *Effets non génomiques médiés par le GR classique :*

Tel que mentionné, certains effets des GCs sont caractérisés par une insensibilité aux inhibiteurs transcriptionnels, ce qui témoigne sa nature non génomique. Toutefois, ces effets peuvent aussi être modifiés par l'antagoniste du GR nucléaire (RU486) [74]. Citons par exemple, l'effet des GCs sur l'activation de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS), un important médiateur de la protection cardiovasculaire. En effet, l'activité du eNOS est stimulé par la dexaméthasone (DEX) de manière dose dépendent dans les cellules endothéliales humaines, et cette activité est augmenté de manière significative après 10 minutes de stimulation. Cette augmentation a été complètement bloquée avec le RU486, ce qui indique l'implication d'un mécanisme médié par ce dernier [80].

Interaction entre les voies d'action génique et non-génique

Les effets rapides non génomiques des corticostéroïdes pourraient avoir une influence sur le génome à travers plusieurs mécanismes, comme par exemple un effet sur l'AMPc, le PKC ou PKA, et sur la MAP Kinase (**Figure 1.9**) [60, 75].

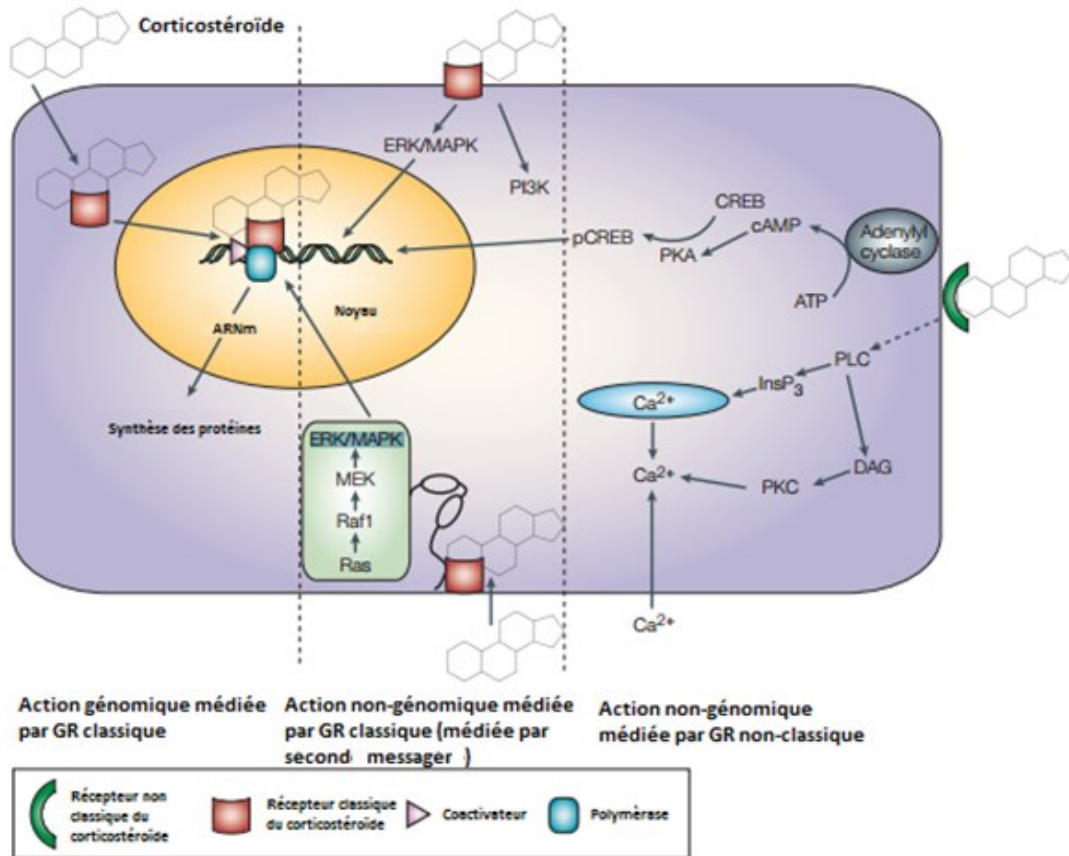


Figure 1.9. Effets génomiques et non-génomiques des glucocorticoïdes

Interaction entre les voies génomiques et non-génomiques d'actions des corticostéroïdes. Les voies d'actions incluent l'activation transcriptionnelle directe via le récepteur classique (à gauche), l'activation des voies kinases entraînées par des récepteurs classiques (centre), de même que les voies de l'AMP cyclique, la lipase et la kinase en incluant les flux des ions, lesquels sont médiés par les récepteurs non classiques (droite). Quelques voies de signalisation permettent de manière indirecte la modulation dans l'expression des gènes à travers la modification des facteurs de transcription. CREB : « C-AMP reponse element-binding » c'est une protéine ubiquitaire qui agisse comme un facteur de transcription liant l'AMPc. DAG : Diacyl-glycérol, un activateur de la protéine kinase C. ERK/MAPK : « extracellular-signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase », InsP₃ : Inositol trisphosphate, MEK, MAPK et ERK kinase, pCREB : CREB phosphorylé, PI3K : « phosphatidylinositol 3-kinase », PKA : protéine kinase A, PKC : Protéine kinase C, PLC : phospholipase C. *Tiré avec permission [60]*.

1.2.3 Effets des glucocorticoïdes sur le neutrophile

Les glucocorticoïdes diminuent l'activité fonctionnelle des neutrophiles, y compris la phagocytose, la chimiotaxie, la dégranulation, l'adhérence, la génération de super oxyde et la cytotoxicité [81-83]. Il existe un rapport chez les chevaux dans lequel l'administration de DEX semble être associée à une stimulation des neutrophiles dans les voies respiratoires, néanmoins, les valeurs dans l'augmentation des neutrophiles sont discutables [84].

Contrairement à leurs effets sur les lymphocytes, les monocytes et les éosinophiles périphériques, les GCs administrés *in vivo* induisent une neutrophilie dose-dépendante. Cette réponse a été attribuée à l'augmentation de la libération des neutrophiles par la moelle osseuse et à la migration retardée de l'espace intravasculaire vers les tissus. De plus, les GCs augmentent la survie des neutrophiles humains [85] et équins [25] en inhibant leur apoptose, ce qui se traduit par une persistance des neutrophiles en circulation.

Il existe plusieurs mécanismes proposés à travers lesquels les GCs inhibent l'apoptose cellulaire [86]:

- a. La surrégulation des membres de la famille anti-apoptotique Bcl-2 [87].
- b. L'induction d'un inhibiteur d'apoptose (IAP-1) [88, 89].
- c. L'activation de NF- κ B [90].
- d. La suppression des composants de la voie extrinsèque de l'apoptose [91, 92].
- e. L'induction des molécules de signalisation comme la phosphatase-1 MAPK (MKP-1) et la kinase-1 activée de sérum et GC (SGK-1) [93, 94]

Dans le neutrophile humain, ces mécanismes ont été associés avec l'augmentation des niveaux de Mcl-1, un membre appartenant à la famille Bcl-2. Cette surrégulation corrèle avec la suppression de plusieurs voies de l'apoptose [86] .

1.2.4 Résistance aux glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont hautement efficaces dans le contrôle de l'asthme et d'autres maladies inflammatoires chroniques et immunitaires [95]. Toutefois, chez certains patients asthmatiques sévères, de même que chez des patients atteints de MPOC, la glucocorticothérapie par voie orale et par inhalation a une faible efficacité [68, 96]. Cette glucocorticorésistance est définie chez l'humain atteint d'asthme, comme étant un échec dans l'amélioration de plus de 15% de la fonction pulmonaire après un traitement avec des doses élevées de prednisone pendant une période de deux semaines [95]. Par ailleurs, seule une faible proportion des asthmatiques démontre une complète résistance [97].

Chez les chevaux, il n'existe pas des publications qui démontrent un glucocorticorésistance comme tel. Par contre, il existe des données non publiées décrivant un cas de résistance à la dexaméthasone, chez un cheval atteint du souffle (Stamper, A.J. *et al.*, 2002). Dans ces données, l'administration de DEX a démontré une résistance traduite dans la non-amélioration de la fonction pulmonaire du cheval corticorésistant en comparaison avec deux autres chevaux. Ils ont aussi observé que l'administration des GCs occasionne une suppression dans la production du cortisol endogène, tel que déjà rapporté pour notre laboratoire [98]. Dans la même étude, en mesurant l'expression du GR α chez les chevaux atteints du souffle, ils observent une sous-régulation de cette dernière en comparaison avec le cheval sain. De manière différente, pour le GR β , il n'y avait pas un changement significatif. Ces observations diffèrent de celles observées chez l'homme [99].

Il existe plusieurs mécanismes proposés pour la glucocorticorésistance dans l'asthme :

Augmentation de l'expression de GR β : Un mécanisme proposé pour la résistance aux GCs dans l'asthme est la surrégulation de l'isoforme β du récepteur (GR β) [95]. Il a été démontré que celui-ci agit comme un inhibiteur négatif dominant sur le GR α [56]. Cependant, la raison physiologique de l'abondance relative du GR β comparée à celle du GR α n'est pas définie [100-103]. La surexpression du GR β dans des cellules primaires épithéliales pulmonaires chez l'humain asthmatique, suite à une stimulation à l'IL-17, suggère un possible rôle de cette cytokine dans l'atténuation de la réponse normalement induite par les GCs [99].

Cytokines inflammatoires : La combinaison de l'IL-2 et l'IL-4 induit une résistance aux stéroïdes *in vitro* par la surrégulation de l'expression du GR β dans les lymphocytes T périphériques [102] et par l'activation de la protéine kinase mitogène activée (MAPK p38), laquelle phosphoryle le GR α et réduit son affinité de liaison au GCs inhibant ainsi sa translocation nucléaire [97].

Anomalies dans l'acétylation et désacétylation des histones :

Un autre mécanisme de résistance aux glucocorticoïdes est la réduction de l'activité de la HDAC. Le recrutement de HDAC2 par les gènes anti-inflammatoires activés est un important mécanisme de répression génique par les GCs. L'activité et l'expression de la HDACs sont réduites chez patients présentant une diminution de la réponse aux GCs [104].

1.3 L'interleukine-17

1.3.1 Définition de l'interleukine-17

L'interleukine-17 (IL-17, anciennement nommée IL-17A) est une cytokine qui joue un rôle important dans l'immunité en induisant la libération d'une variété de cytokines pro-inflammatoires ainsi que de chimiokines qui peuvent, entre autres, médier le recrutement rapide des neutrophiles (**Figure 1.10**) [105]. Cette cytokine est produite principalement par certains lymphocytes T auxiliaires, les lymphocytes Th17 [106], qui secrètent aussi d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-17F et l'IL-22 [107]. Les cellules Th17 dont l'existence fut postulée pour la première fois par Coffman *et al.* en 1986 ont changé le paradigme de la réponse inflammatoire en expliquant la présence de cytokines différentes de celles sécrétées dans les réponses de type Th1 et Th2, modèle qui prédominait en immunologie, et ce depuis presque deux décennies [108].

L'IL-17 humaine a été clonée en 1996 et a été identifiée par hybridation suppressive soustractive chez les rongeurs [109]. Le gène codant pour cette cytokine est localisé chez l'humain sur le chromosome 6 et, chez le cheval, sur le chromosome 20. L'IL-17 a été identifiée chez l'humain comme une glycoprotéine de 15 kDa contenant 155 acides aminés, avec une affinité de 63% avec l'homologue murin CTLA-8 [110]. Dès sa découverte, l'IL-17 a fait l'objet d'une attention particulière dû à son rôle important dans la défense contre les bactéries et les moisissures, spécialement dans les muqueuses et les barrières physiologiques de l'organisme [111] et ce ciblant des signaux inflammatoires promouvant la mobilisation des neutrophiles et l'expression de facteurs antimicrobiens [112, 113]. De plus, il a été démontré que les cellules Th17 de par leur production d'IL-17 jouent un rôle clé dans la pathogenèse de certaines maladies auto-immunes incluant l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis et l'encéphalomyélite, ainsi que le cancer [114, 115].

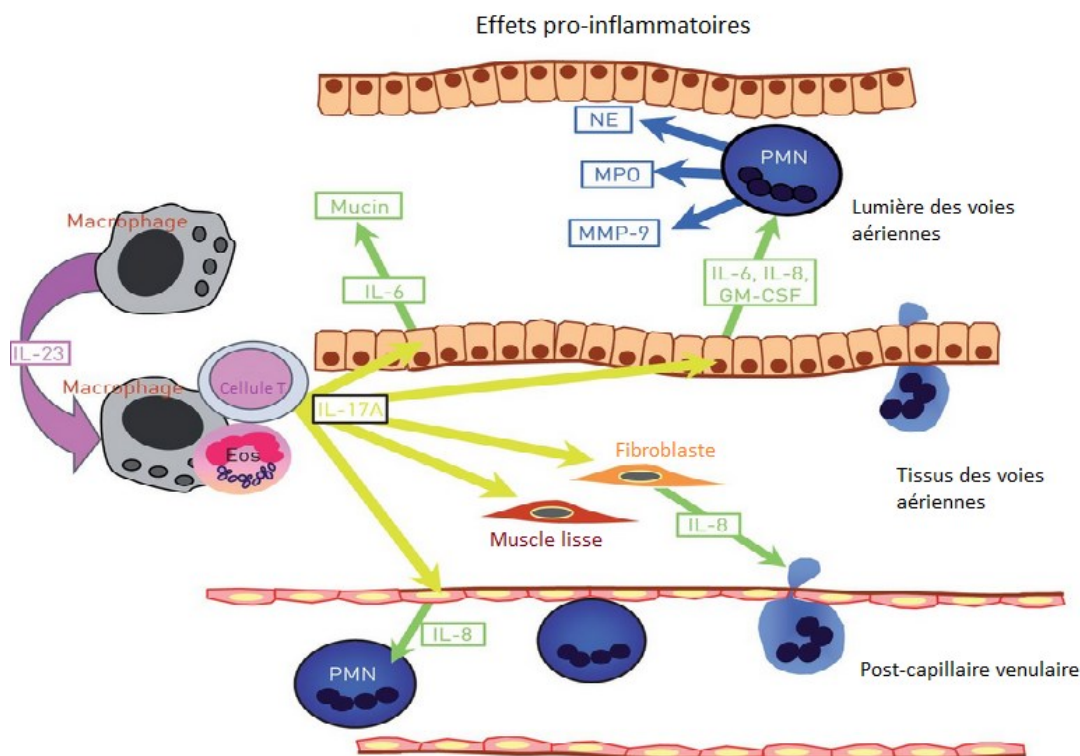


Figure 1.10. Effets pro-inflammatoires de l'IL-17 dans l'asthme

Recrutement des neutrophiles dans les voies respiratoires par action indirecte de l'IL-17 sur les macrophages, éosinophiles (Eos), cellules T, qui vont stimuler des cellules structurales comme les cellules endothéliales et épithéliales qui vont sécréter des molécules telles que les métalloprotéines de matrice (MMP)-9, la myéloperoxidase (MPO), l'élastase des neutrophiles (NE) et les mucines. GM-CSF : Facteur stimulateur des colonies des granulocytes et macrophages *Tiré avec permission [116]*

1.3.2 Cellules productrices de l'interleukine-17

En plus des cellules Th17, il existe une variété de cellules productrices de l'IL-17, telles que les cellules T gamma delta ($\gamma\delta$ T) [117], les cellules T alpha beta ($\alpha\beta$ T), les cellules inductrices de tissus lymphoïdes (LTi), les cellules « Natural Killer », les macrophages [118]. D'autres sources de l'IL-17 comme les cellules de Paneth dans l'intestin [119], les neutrophiles [120, 121], les éosinophiles, les mastocytes dans l'arthrite humaine [122] (Révisé en [123]) ont été rapportées.

1.3.3 Membres de la famille de l'IL-17 et leurs récepteurs

1.3.3.1 La famille de l'Interleukine-17 :

La famille des cytokines de l'interleukine-17 consiste en six membres (**Figure 1.11**) avec différentes fonctions: l'IL-17, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (aussi dénommée IL-25) et IL-17F (**Table II**) [112], dont l'IL-17 et l'IL-17F sont les mieux caractérisées. L'IL-17 est un homodimère covalent qui peut former un hétérodimère avec l'IL-17F (IL-17/IL-17F) [124, 125] agissent à travers les mêmes sous-unités des récepteurs A et C de l'IL-17 (IL-17RA et IL-17RC) [126]. L'IL-17 joue un rôle plus important que l'IL-17F dans l'auto-immunité possiblement en conséquence de sa force de signalisation accrue [127]. Plusieurs de ces cytokines : l'IL-17, l'IL-17D, l'IL-17E et l'IL-17F sont produits par les lymphocytes T et possèdent de puissantes propriétés pro-inflammatoires [107]. Leur taille oscille entre 20-30 kDA.

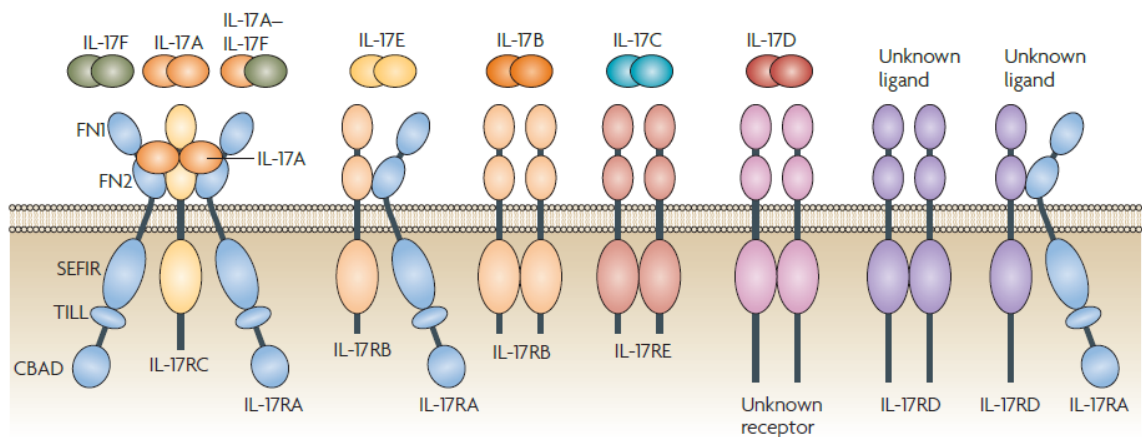


Figure 1.11. La famille IL-17R et leurs ligands

Principales caractéristiques structurales. Six IL-17 (IL-17A à IL-17F) et cinq récepteurs (IL-17RA à IL-17RE) ont été identifiés. Le récepteur pour IL-17D est inconnu, de même que le ligand pour IL-17RD et pour IL-17RA-IL-17D [112]. CBAD : C/EBP β activation domain ; FN : domaine comme fibronectine III; SEFIR : SEF/IL-17R; TILL, « TIR-like loop ». *Tiré avec permission* [112].

1.3.3.2 La famille des récepteurs IL-17R :

La famille des IL-17R comprend cinq sous-unités de récepteurs : IL-17RA, IL-17RC, IL-17RD, IL-17RE et IL-17RF (**Figure 1.11**) [128]. Toutes ces sous-unités sont transmembranaires et contiennent des protéines allant de 499 à 866 acides aminés [112]. Ils incluent un domaine extracellulaire similaire à la fibronectine III et un domaine cytoplasmique SEF/IL-17R (SEFIR) [112]. Le **tableau II** indique aussi les fonctions connues du lignage des récepteurs de la famille des cytokines de l'IL-17.

Tableau II. Membres famille de l'interleukine-17 : récepteurs, fonctions et expression

Membre De La Famille	Autres Noms	Récepteurs	Fonction Principale	Expression
IL-17	IL-17A et CTLA8	IL-17RA et IL-17RC	Pathologie auto-immune, recrutement des neutrophiles et immunité aux pathogènes extracellulaires	Cellules T $\alpha\beta$, Cellules T $\gamma\delta$, Cellules T "natural killer" et Lymphocytes TI macrophages, cellules de Paneth, neutrophiles, éosinophiles, mastocytes
IL-17B	-	IL-17RB	Inconnu	Cellules du tract gastro-intestinale, pancréas et neurones
IL-17C	-	IL-17RE	Inconnu	Cellules de la prostate, du rein foetal, du thymus et du foie
IL-17D	-	Inconnu	Inconnu	Cellules T, de muscle lisse, cellules épithéliales et cellules de cerveaux.
IL-17E	IL-25	IL-17RA et IL-17RB	Induit réponses type Th2 et supprime réponses Th17	Lymphocytes intra-épithéliales, cellules épithéliales pulmonaires, macrophages, éosinophiles, basophiles, NFT cellules, Th2 cellules, Mastocytes, cellules du tract gastro-intestinale et l'utérus.
IL-17F	-	IL-17RA et IL-17RC	Recrutement des neutrophiles en haut concentrations et immunité aux pathogènes extracellulaires	Th17 cellules, Lymphocytes T CD8+, Lymphocytes T $\gamma\delta$, Lymphocytes T NK et Lymphocytes TI
IL-17A-IL-17F	-	IL-17RA et IL-17RC	Pathologie auto-immune (préssumé) recrutement des neutrophiles et immunité aux pathogènes extracellulaires	Th17 cellules, Lymphocytes T CD8+, Lymphocytes T $\gamma\delta$, Lymphocytes T NK et Lymphocytes TI
vIL-17	ORF13	IL-17RA (et IL-17RC)	Inconnu	Herpesvirus saimiri

CTLA8: Lymphocyte T cytotoxique 8, IL-17R: récepteur de l'Interleukine-17, LTi: inducteur du tissu lymphoïde, NKT, Cellule T « Natural killer », ORF13: « open reading frame 13 », Th: Cellule T « helper ».

[112, 129]

1.3.4 Différenciation et régulation des cellules Th17

La différenciation des cellules Th17 à partir des cellules T CD4⁺ naïves est médiée par plusieurs cytokines et facteurs de transcription [130]. Ce processus a tout d'abord été caractérisé chez des cellules murines, où la présence du facteur de croissance transformant bêta (TFG-β) et de l'IL-6 active le facteur de transcription RORγt (récepteur orphelin apparenté au récepteur des rétinoïdes). Le RORγt est considéré comme le régulateur principal de la différenciation des cellules Th17 [131]. Il a été démontré que chez l'humain, l'IL-1β est aussi nécessaire pour l'induction de RORc (équivalent de RORγt chez les modèles murins) [132, 133]. L'activation de RORγt entraîne la différenciation des Th17 en induisant l'expression du récepteur de l'IL-23 (IL-23R), pour qu'elles deviennent réceptives à l'IL-23 (**Figure 1.12**) [134]. L'IL-23 stimule la différenciation complète des Th17 [115] et la production d'IL-17, ainsi que la sécrétion d'autres cytokines y compris IL-17F, IL-21 et IL-22 [135]. Les cellules Th17 humaines produisent aussi l'IL-26 et la CCL20 (chimiokine ligand 20), cette dernière est un important agent chimioattractant pour les lymphocytes [136] et expriment leur récepteur, CCR6 [137]. Pourtant les cellules Th17 peuvent avoir le potentiel de promouvoir la migration d'autres lymphocytes Th17 sur le site inflammatoire [135].

Les cellules T régulatrices CD4⁺ (Treg) semblent jouer un rôle dans la régulation des cellules Th17. Plus précisément, l'induction des Treg est associée à l'expression du facteur de transcription « forkhead box P3» (FoxP3) et la suppression des RORγt [138] en présence de cytokines pro-inflammatoires. Cependant, les Treg peuvent être amenées à se différencier en cellules Th17, qui pourraient aider à perpétuer l'état inflammatoire chronique [139, 140].

D'autres facteurs de transcription tels que STAT3 et STAT5 sont impliqués dans la différenciation des cellules Th17 [141]. STAT3 est activé par des cytokines inductrices des cellules Th17 comme l'IL-6, l'IL-21, l'IL-23 [142]. Ainsi, chez l'humain, une mutation du gène codant pour STAT3, démontre une diminution dans la production de l'IL-17 et une augmentation de la sensibilité aux infections normalement contrôlées par les cellules Th17 [143].

Aussi, le facteur de transcription BATF (*Basic Leucine Zipper Transcription Factor*) est impliqué dans la régulation de l'IL-17 et la différenciation des cellules Th17 en se liant à la fois aux régions proximales et régulatrices intergéniques [144].

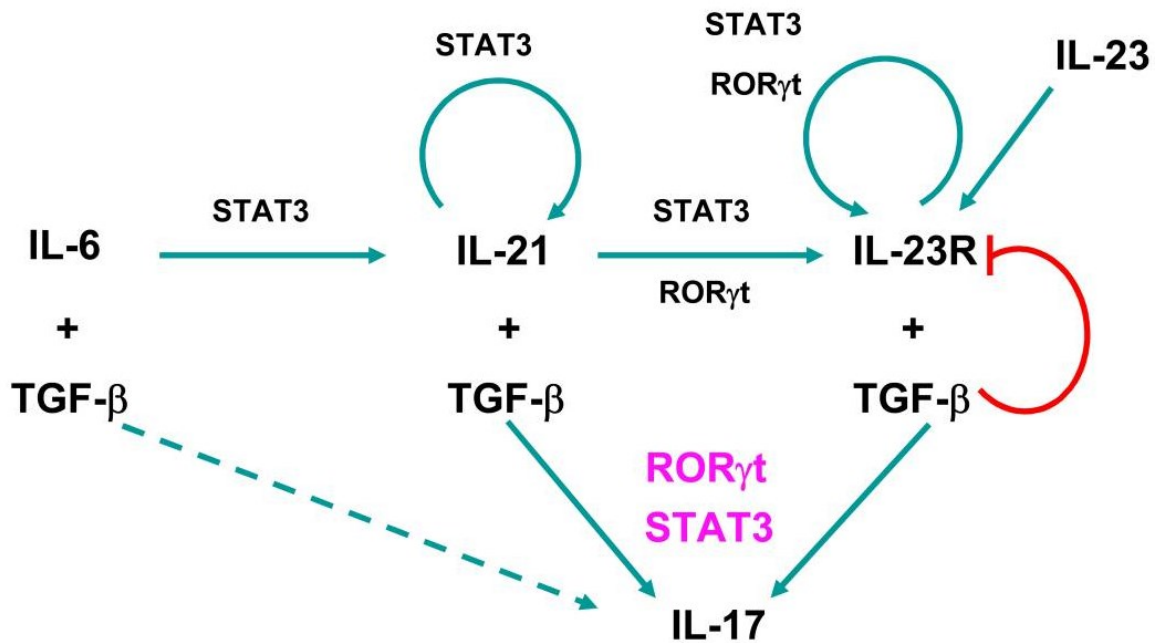


Figure 1.12. Régulation des cytokines dans la différenciation du lignage des cellules Th17

L'IL-6 stimule l'IL-21, qui à son tour induit sa propre transcription d'une manière dépendante de STAT3. L'expression de l'IL-23R induite par l'IL-21 (et l'IL-23) dépend de ROR γ t et de STAT3. Le signal de l'IL-21R et IL-23R en association avec TGF- β , programme les cellules T naïves vers le lignage Th17 de manière indépendante de l'IL-6. La différenciation des cellules Th17 nécessite l'action coopérative des ROR γ t et STAT3. L'induction de l'IL-17 par l'IL-6, en l'absence de la signalisation de l'IL-21 /IL-21R, est présentée avec les flèches pointillées. *Tiré avec permission [131]*

1.3.5 Voies de signalisations activées par l'interleukine-17

La liaison de l'IL-17 à ses récepteurs (l'IL-17RA et l'IL-17RC), stimule plusieurs cascades de signalisation, dont l'activation de la protéine adaptateur Act-1 « nuclear factor- κ B (NF- κ B) activator 1 » (**Figure 1.13**) [145]. Ensuite, l'IL-17RA et l'Act-1 peuvent former un complexe [146] qui est dépendant de SEFIR (SEF/IL-17R). La SEFIR est un segment de protéine cytoplasmique présente dans toutes les membres de la famille de récepteurs transmembranaires de l'IL-17 [145, 147]. Par la suite, la présence des molécules de signalisation intracellulaire telles que le récepteur associé au facteur de nécrose tumorale (TRAF)6, (TRAF)3 et (TAK)1 (*transforming growth factor activated kinase*) vont moduler l'activation des facteurs de transcription comme NF- κ B et CCAAT de (*enhancer binding protein*) (C/EBP)- β [145]. Il a aussi été démontré que les membres de la famille des MAP Kinases, tels que c-JNK (*Jun N-terminal kinase*), ERK

(*Extracellular Signal-Regulated Kinase*) et p38 sont impliqués dans la production des cytokines induites par l'IL-17 [115]. Une autre voie de signalisation activée par l'IL-17 (décrit dans les cellules épithéliales des voies respiratoires), est indépendante d'Act-1. Celle-ci implique la présence de JAK-1 (*Janus kinase 1*) et PtdIns3K de (*phosphatidylinositol 3-kinase*), suivi d'une inactivation de (GSK)-3 β (*glycogen synthase kinase*) et l'activation génique [148].

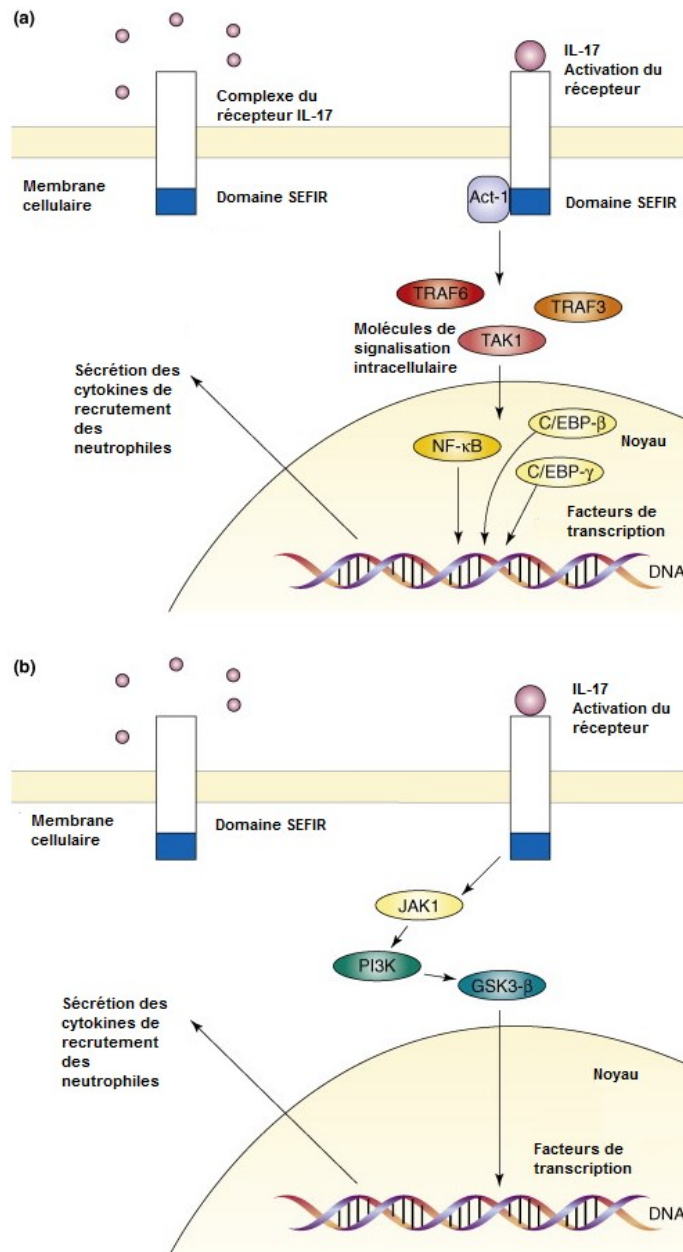


Figure 1.13. Voie de signalisation intracellulaire de l'Inteleukine-17

(a) Dépendent de l'Act-1 : après l'activation du ligand avec leur complexe du récepteur (IL-17RA et IL-17RC), l'Act-1 « adaptor protein nuclear factor-kB activator 1 » forme un complexe avec le domaine SEFIR du récepteur. Par la suite, des molécules de signalisation intracellulaire (TRAF3, TRAF6 et TAK1) sont activées permettant l'implication de facteurs de transcription tel que NFκB, C/EBP-β et C/EBP-γ. Par conséquent, la sécrétion des cytokines de recrutement des neutrophiles est induite. (b) Indépendant de l'Act-1 : Ceci implique le JAK1 (Janus Kinase 1) et PIK3 (phosphatidylinositol3-kinase) suivis par l'inactivation du « glycogen synthase kinase (GSK)-3β, activation génique et sécrétion des cytokines. *Demande de permission en cours [149].*

1.3.6 L'interleukine-17 dans l'inflammation neutrophilique pulmonaire

L'accumulation exagérée de neutrophiles dans le poumon est une composante aux maladies obstructives des voies respiratoires, comme l'asthme sévère et le COPD chez l'humain [32, 34, 150-153] et le souffle chez le cheval. Le recrutement des neutrophiles dans les tissus est favorisé par une variété de médiateurs inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF- α , le IL-8, le GM-CSF et le G-CSF libérés par les cellules épithéliales, endothéliales et d'autres cellules structurelles [154, 155]. Plus spécifiquement, chez les neutrophiles équin, l'expression des cytokines l'IL-1 β , TNF- α et IL-8 [24, 25] liés à l'inflammation pulmonaire ont été rapportés, ainsi que la surexpression de l'ARNm de l'IL-17 dans les LBA de chevaux atteints du souffle en exacerbation [156, 157].

Il existe une forte évidence que l'accumulation exagérée des neutrophiles (producteurs des enzymes elastase et myéloperoxydase) dans les voies respiratoires est en lien avec l'augmentation de l'IL-17 [155, 158, 159]. Chez l'humain, des cellules positives pour l'IL-17 ont été détectées chez les patients asthmatiques sévères [160], ainsi que le recrutement de neutrophiles dans les voies respiratoires, qui coïncide avec la présence des niveaux protéiques de l'IL-17, suite à l'exposition dans un milieu de porcherie [161]. Chez la souris, l'augmentation de l'élastase et de la myéloperoxydase [162], suite à l'administration d'IL-17 dans les voies respiratoires a été observée [163].

1.3.7 L'Interleukine-17 dans la résistance aux glucocorticoïdes

Une réduction de la sensibilité aux GCs chez l'humain a été cliniquement associée avec l'inflammation neutrophilique des voies respiratoires [164, 165]. Mais les mécanismes cellulaires et moléculaires qui contribueraient à cette résistance n'ont pas encore été élucidés [73].

Il existe des évidences sur le rôle de l'IL-17 comme médiatrice dans la corticorésistance. Par exemple, chez la souris des cellules Th17 polarisées à partir de cellules T CD4+ *in vitro*, dans lesquelles l'expression protéique des cytokines proinflammatoires a été évaluée, ont montré une diminution dans la sensibilité à la dexaméthasone, en parallèle avec une surrégulation de l'IL-17 dans le poumon [166].

Chez l'humain, une forte expression de l'ARNm de l'IL-17 dans des biopsies bronchiques de patients asthmatiques légers comparés avec des patients contrôles a été

observée [99]. De plus, une étude récente a montré que la présence de l'IL-17 permet d'atténuer l'effet de la budésonide sur l'augmentation de l'IL-8 induit par le TNF- α sur les cellules épithéliales bronchiques [73]. D'après les auteurs, la diminution de la sensibilité aux GCs serait dû à l'activation de la voie PI3K et à la réduction de l'activité de HDAC2 [73]. Chez le cheval, il n'existe aucune étude concernant l'effet de l'IL-17 dans la glucocorticorésistance des neutrophiles chez les chevaux atteints de souffle.

1.3.8 L'Interleukine-17 : possible cible thérapeutique

Des stratégies thérapeutiques qui visent la réduction de la production des cytokines contribuant au recrutement des neutrophiles tel que l'IL-6, IL-8, IL-17 et le GM-CSF [115, 154, 167-169], ont déjà été proposées.

Récemment, des anticorps spécifiques dirigés contre l'IL-17 et les sous-unités de leur récepteur ont fait l'objet d'études cliniques, principalement dans les maladies comme l'asthme, le psoriasis et l'arthrose rhumatoïde, montrant des résultats préliminaires variables [170-172].

Trois agents ciblant l'IL-17 sont en cours de développement :

1. Le *Brodalumab*, cet agent ciblant la sous-unité IL-17RA du récepteur de l'IL-17 a aussi été testé chez des patients atteints d'asthme modéré ou sévère, dans une étude contrôlée randomisée, sans évidence d'un effet supérieur au placebo en termes de contrôle de la maladie, sauf pour une population de patients présentant une forte réversibilité au bronchodilatateur [172]. Le *Brodalumab* a été testé chez des patients atteints de psoriasis modéré ou sévère [173] et son administration a démontré une amélioration significative des signes cliniques après 12 semaines.
2. Le *Secukinumab* (AIN457), qui lui a été évalué chez des patients atteints de psoriasis en plaque, d'arthrites rhumatoïdes et d'uvéites non infectieuses. Notons que dans ces trois pathologies, une amélioration apparente des signes cliniques en comparaison avec les patients recevant un placebo a été observée [170].
3. L'*Ixekizumab*, qui a été testé chez des patients atteints de psoriasis en plaque, a démontré une forte efficacité dans l'amélioration des signes cliniques en comparaison avec le placebo [174].

Chez l'équin, il n'existe aucune étude qui évalue l'effet des inhibiteurs de l'IL-17 dans la persistance des neutrophiles dans les voies respiratoires. De telles études permettraient d'évaluer l'effet réel de l'IL-17 sur le recrutement des neutrophiles notamment dans les voies respiratoires de chevaux atteints du souffle.

Hypothèse et objectifs :

Hypothèse :

L'interleukine-17 active de manière directe les neutrophiles équins et induit une diminution de la sensibilité aux glucocorticoïdes chez les neutrophiles.

Objectifs :

- Évaluer l'expression des sous-unités du récepteur (IL-17RA et IL-17RC) sur les neutrophiles sanguins hautement purifiés.
- Déterminer si l'IL-17 active directement les neutrophiles sanguins équins.
- Déterminer si la réponse des neutrophiles sanguins aux glucocorticoïdes est atténuée avec l'IL-17.
- Évaluer les effets de l'IL-17 sur la survie et apoptose des neutrophiles équins.

Chapitre 2 : Article

Présentation sous forme d'article

Article en préparation pour soumission à *Clinical & Experimental Allergy*

The interleukin-17 induced activation and increased survival of neutrophils is insensitive to glucocorticoids

Condensed title: IL-17 activates neutrophils and induce their survival

Ruby Yoana Murcia, Amandine Vargas and Jean-Pierre Lavoie

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

Corresponding author

Dr Jean-Pierre Lavoie, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, CP 5000, Saint-Hyacinthe, Quebec, J2S 7C6, Canada, telephone number (514) 345-8521 ext 8292.

Keywords: Interleukin-17, neutrophils, glucocorticoids, Interleukine-17 subunit receptor, proinflammatory cytokine expression, survival, and apoptosis.

2.1 Abstract

Background: Glucocorticoids (GCs) are the most effective drugs for the treatment of human asthma. However, a subgroup of asthmatic patients with neutrophilic airway inflammation is insensitive to GCs. Interleukin-17 (IL-17), a cytokine upregulated in the airways of a subset of human asthmatic patients, contributes to the recruitment of neutrophils and induces a glucocorticoid resistance in human airway epithelial cells. We hypothesized that IL-17 similarly activates neutrophils and contributes to their persistence in the asthmatic airways in spite of glucocorticoid therapy.

Objective: To determine whether IL-17 directly activates neutrophils and whether this response is attenuated by GCs.

Methods: Neutrophils were isolated from blood of horses, and incubated in presence of recombinant equine IL-17, LPS and dexamethasone. mRNA and protein expression of IL-17 receptors (IL-17RA/IL-17RC) was assessed by qPCR and western-blot, respectively. Pro-inflammatory cytokine expression, cell viability and apoptosis were determined by qPCR, Trypan Blue exclusion test, and flow cytometry, respectively.

Results: Equine neutrophils express both IL-17RA and IL-17RC at the mRNA and protein levels. Neutrophils stimulation with IL-17 increases the mRNA expression of IL-8, which is not attenuated by dexamethasone ($p=0.4$). Also, neutrophils viability is significantly increased ($p=0.002$) by IL-17 in the presence of LPS when compared to LPS alone. Flow cytometry and light microscopy revealed that LPS-induced apoptosis is decreased by IL-17 ($p=0.02$ and $p=0.006$ respectively).

Conclusion & Clinical Relevance: These results indicate that IL-17 directly activates equine neutrophils, and that the expression of IL-8 thus induced, is not attenuated by GCs. Additionally, IL-17 increases neutrophil viability and decreases apoptosis. These findings

suggest an important role of IL-17 in pulmonary persistence of neutrophils in the asthmatic airways.

2.2 Introduction

Glucocorticoids (GCs) are the most effective drugs for the treatment of many inflammatory and immune human diseases such as asthma, rheumatoid arthritis, and autoimmune diseases (1). Their effects are induced primarily through a reduction in the expression of cytokines, chemokines, and adhesion molecules implicated in the recruitment and activation of inflammatory cells to the site of inflammation (2). Cohorts of patients with neutrophilic asthma has been linked to a relative resistance to the action of GCs (3). The persistence of neutrophils in the bronchial lumen could maintain the inflammatory process that leads to mucus hypersecretion and airway remodeling (4).

Interleukin-17 (IL-17) is produced by CD4 + T helper 17 and other cell types such as gamma delta T cells ($\gamma\delta$ T), natural killer cells (NK) cells of the lymphoid tissue inducer (LTi), macrophages, eosinophils, and neutrophils (5, 6). IL-17 is capable of promoting indirectly the activation and recruitment of neutrophils into the airways by inducing the production of chemokines such as IL-8, CXCL1, and G-CSF in endothelial and epithelial cells (7). It has been demonstrated that IL-17 signals through a heterodimeric complex receptor composed of IL-17RA and IL-17RC receptor (8, 9). Studies reported that IL-17RA subunit of IL-17 receptor is constitutively present in human neutrophils, and that these cells may express IL-17RC when stimulated (10). As IL-17 is upregulated in the airways of human asthmatics, and stimulation of human bronchial epithelial and mononuclear cells with IL-17 resulted in hypo-responsiveness to GCs (11, 12), we hypothesized that IL-17 contributes to the insensitivity of neutrophils to GCs in asthmatics airways. This study aimed at evaluating the contribution of IL-17 in neutrophil pro-inflammatory gene expression, their response to GCs, and whether IL-17 modulates neutrophil viability and apoptosis. We studied equine neutrophils, as the cytokine response and neutrophil biology in this species has marked similarities with human, and

the large amount of cells required for these studies can easily be obtained from the same animal. Indeed, horses spontaneously develop heaves, a neutrophilic asthma-like disease (13) associated with an upregulation of IL-17 (14), and the airway neutrophilia is unaffected by the administration of GCs (15).

2.3 Methods

Ethics statement

Eight mixed breed healthy mares were studied (mean age 11.1 years (range 6-20); mean weight 512 kg (range 490-550). Mares were part of the research herd at the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal. All animal experimental procedures were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal (Rech-1716).

2.3.1 Neutrophil and neutrophil-depleted leukocyte isolation

Venous blood was collected from a jugular vein. Blood was placed into sterile heparinized blood collection tubes (Tyco healthcare, Pointe-Claire, QC, CA). The plasma rich layer was recovered after 30 minutes of sedimentation using a density gradient method of separation Ficoll-PaqueTM Premium 1084 (Fisher Scientific, Ottawa, ON, CA).

The leucocyte polymorphonuclear-depleted and polymorphonuclear-rich cell layers were both harvested, and the remaining erythrocytes were lysed by water distilled ultrapure hypotonic treatment (Life technologies, Burlington, ON, CA). Cells were washed and suspended in a buffer solution containing PBS 1X, EDTA 0.5mM (Life technologies, Burlington, ON, CA), and BSA 0.2% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Counting and viability were realized by Trypan blue 0.4% exclusion method (Life

technologies, Burlington, ON, CA) in a hemocytometer chamber. Purity was evaluated in cytopsin stained slide for differential counting as reported before (16).

Thereafter, positive immunomagnetic selection was performed as described previously (16). Briefly, neutrophils were obtained from the polymorphonuclear-rich suspension by incubation with a monoclonal mouse anti-CD90 DH24A Monoclonal (VMRD, Pullman, WA, USA) and a secondary anti-mouse IgM antibody conjugated to paramagnetic microbeads MACS® (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, GER) at 25 μ l/ 10^6 cells. Suspension was passed through a LS column (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, GER) and the positive fraction (neutrophils) was recovered with a mean purity of 99.5% and viability of 99% for proinflammatory cytokine studies. Purity of 100% and viability of 99% was obtained for protein evaluation and genic expression of the IL-17 receptors.

2.3.2 Cell culture

Freshly isolated peripheral blood neutrophils and polymorphonuclear-depleted cells were suspended at 5×10^6 /ml and cultured in 12- or 24-well plates (Corning Incorporated, Corning NY, USA) in RPMI medium supplemented with L-glutamine 200 mM, 100 U/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin, and 10% of low endotoxin, heat-inactivated fetal bovine serum (Life Technologies, Burlington, ON, CA). Cells were incubated at 37°C in 5% CO₂ in the presence or absence of recombinant equine IL-17 (reIL-17) (Cederlane, Burlington, ON, CA) at 1, 10 and/or 100 ng/ml, and in the presence or absence of LPS at 100 ng/ml (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and incubated for 5h (subunits receptor and IL-17 direct activation studies).

For expression of pro-inflammatory cytokine at 5h (n=5) and 24h (n=6), cells were cultured in presence or absence of dexamethasone (DEX) at 10^{-6} M (Sigma-Aldrich), LPS

and/or reIL-17 at 100 ng/ml. Recovered cells (neutrophils and mononuclear cells) were lysed in Isol-RNA lysis reagent (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) or RIPA buffer (Sigma Aldrich) for mRNA or proteins analysis, respectively.

2.3.3 Gene expression study

mRNA expression of the two subunits of IL-17 receptor (IL-17RA and IL-17RC) and pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8 and TNF- α for 5 h, more IL-1 β for 24 h) were measured with qPCR. mRNA was extracted from Isol-RNA according to manufacturer's instructions. Purity and concentration were assessed using a spectrophotometer Nanodrop ND1000 (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). One microgram of total mRNA was reversed transcribed as described previously (17).

Quantitative PCR (qPCR) reactions were performed using QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions with the Rotor-Gene RG3000 (Corbett Research, Sydney, AS) as described before (18) . Briefly, 1 μ l of cDNA was used in 20 μ l of final volume PCR reaction, containing 0.5 μ M each sense and antisense primers and 2.75 mM MgCl₂. Primers were designed to span exon–intron boundaries to prevent amplification of genomic DNA (Table 1). Samples were run in duplicate with an appropriate negative control.

2.3.4 Western blots analysis

Neutrophils and mononuclear cells were lysed in 150 μ l RIPA buffer, according to the manufacturer's instructions. Proteinase and phosphatase inhibitors cocktail were added (Life technologies, Burlington, ON, CA) and samples were sonicated (Cole Palmer Ultrasonic Processor, CPX 750). Protein quantification was achieved using the PierceTM

BCA Protein Assay Kit (Life technologies, Burlington, ON, CA). Protein suspensions were frozen at -80°C for further protein assays. Equal amounts of protein (30 µg per lane) were separated by size on 12% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, CA) and transferred to a solid PVDF membrane (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). Immunodetection was performed using anti-IL-17RA ARP47009_P050 (Cederlane, Burlington, ON, CA) and anti-IL-17RC (L-12): sc-99936 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Anti-rabbit IgG HRP-Linked secondary antibody was used as secondary antibody (New England Biolabs, Whitby, ON, CA). Signal was enhanced by SuperSignal West Dura (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). Protein bands were scanned using a chemiluminescence with a Fusion Fx Vilber Lourmat (Montreal Biotech Inc., Dorval, QC, Canada).

2.3.5 Flow cytometry and morphological evaluation of apoptosis

APC Annexin V staining was performed as described previously (16). Briefly, one hundred microliters of the cell suspension were incubated with 5 µl of APC Annexin V, an apoptosis cell marker, and 5 µl of 7-Aminoactinomycin D (7-AAD), a necrosis cell marker (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Cells were analyzed using CellQuest Pro software on a FACScalibur instrument (BD Biosciences, Mississauga, ON, CA). Data were collected from 10,000 events gated on granulocytes; analyzed unstained cells as well as single marker-stained cells were used to set photomultipliers voltage and compensation parameters for fluorescence detection in FL-3 and FL-4 channels. APC Annexin V-negative and 7-AAD-negative cells were considered viable.

Morphologic evaluation of apoptosis was performed on cytopreparations (5×10^4 cells) stained with Protocol Hema 3 (Fisher Scientific, Ottawa, ON, CA) by one blinded

investigator. The percentage of apoptotic cells was evaluated on 500 cells by light microscopy (19).

2.3.6 Statistical analysis

Repeated measures ANOVA and *a priori* comparison with Fisher method was used to evaluate cytokine mRNA expression and apoptosis of neutrophils. For the detection of IL-17 receptor subunits in neutrophils and mononuclear cells, data were analyzed with paired student t-tests. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. The software GraphPad Prism 6 was used for the analysis and $p < 0.05$ was considered significant.

2.4 Results

2.4.1 Neutrophils express both subunits of IL-17 receptor

Equine neutrophils expressed IL-17RA and IL-17RC at mRNA (Fig. 2.1A and C, $n=4$) and protein levels (Fig. 2.2, $n=1$), both in the presence or absence of LPS (5 h). LPS-stimulation significantly increased IL-17RC mRNA expression in both neutrophils ($p=0.02$, Fig. 2.1C) and mononuclear cells ($p=0.002$, Fig. 2.1D), while the expression of IL-17RA remained unchanged (neutrophils, $p=0.116$, Fig. 2.1A; mononuclear cells, $p=0.521$, Fig 2.1B).

2.4.2 The reIL-17 does not activates neutrophils and dexamethasone does not attenuated the response of IL-8 and IL-6 induced by LPS after 5 h

LPS induced a significant increase in the mRNA expression of IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α after 5 h of stimulation compared to unstimulated neutrophils (Fig.2.3 and

2.4). Expression of these cytokines was unaffected by a pretreatment with reIL-17. Expression of IL-6 and IL-8 was not attenuated by DEX ($p=0.889$ and 0.239 respectively) (Fig. 2.4A, 2.4B). DEX down-regulate LPS-induced TNF- α ($p=0.02$) mRNA expression (Fig. 2.4C).

2.4.2 The reIL-17 induced neutrophil activation and potentiation of LPS-induced IL-8 and IL-6 responses are not inhibited by glucocorticoids at 24 h

Expression of IL-8 mRNA was significantly upregulated by reIL-17 (Fig. 2.5C, $p=0.02$). This IL-8 mRNA expression was not attenuated by DEX ($p=0.409$) (Fig. 2.5C). LPS induced also a significant increase in the mRNA expression of IL-1 β , IL-6, and TNF- α after 24 h of stimulation compared to unstimulated neutrophils (Fig. 2.5). Expression of these cytokines was unaffected by a pretreatment with reIL-17 at 24 h. The LPS-induced IL-1 β and TNF- α expression was downregulated by DEX ($p=0.003$ and $p=0.0267$ respectively) (Fig. 2.5A, 2.5D), but not the IL-6 mRNA expression ($p=0.704$) (Fig. 2.5B).

2.4.3 The reIL-17 increases viability and decrease apoptosis of neutrophils

LPS induced a decreased viability of neutrophils at 24 h (Fig. 2.6A), which was restored by both reIL-17 ($p<0.0001$) and DEX ($p<0.0001$). Importantly, adding reIL-17 further increased the DEX effect ($p=0.04$) on the viability of LPS-stimulated neutrophils. Flow cytometry analysis (Fig. 2.6C) and light microscopy (Fig 2.6B and 2.7) results indicated that both reIL-17 and DEX significantly decreased the apoptosis induced by LPS.

2.5 Discussion

Previous studies have indicated that IL-17 is implicated in the indirect recruitment of neutrophils into the airways. In this study, we sought to determine whether IL-17 directly activates and induces a relative insensitivity of glucocorticoids to neutrophils, by investigating its ability to regulate pro-inflammatory gene transcription, cell viability, and apoptosis. We first demonstrated the presence of both subunits of the IL-17 receptor in unstimulated highly purified equine neutrophils. We then observed that reIL-17 directly activates the IL-8 mRNA expression of neutrophils, and this activation is not attenuated by DEX. Furthermore, reIL-17 increased the neutrophil viability and potentiated the dexamethasone-induced increase viability of equine neutrophils by decreasing apoptosis. Taken together, these findings, suggest the possible contribution of IL-17 to the persistence of neutrophils in the airways of glucocorticosteroids-treated patients.

Insensitivity of glucocorticoids

Severe neutrophilic asthma is poorly responsive to GCs and neutrophils persist in the airways with this treatment (3, 20). Considering that IL-17 expression is increased in sputum and bronchial biopsies (21, 22) of cohorts of asthmatics patients, and that this cytokine cause an insensitivity of bronchial epithelial cell to GCs (23), we sought to elucidate whether IL-17 exert a similar role on neutrophils. We studied horses as these animals develop a severe neutrophilic asthma-like condition associated with an upregulation of IL-17 within the airways (14, 24), in which the neutrophilic inflammation is poorly responsive to GCs (15, 25), as seen in humans (26, 27).

Similarly to the response of human airway epithelial cells (11), IL-17-induced an upregulation of IL-8 mRNA, a potent neutrophil chemokine (28), in neutrophils

stimulated for 24h. Interestingly, the IL-17-induced (24h) and LPS-induced (5 h and 24 h) IL-8 mRNA upregulation was not attenuated by dexamethasone. This finding suggests that IL-17 can contribute to continued neutrophil recruitment to the enflamed site, and therefore, to the persistence of neutrophils within the airways of GCs treated patients. The neutrophil response to IL-17 may also possibly contribute to the asthmatic airway remodeling, as IL-8 has been shown to promote airway smooth muscle (ASM) proliferation by enhancing the number and survival of ASM cell *in vitro* (29). Likewise, the stimulation with IL-8 increases the cell number and DNA synthesis of vascular smooth muscle cells (30). Importantly, this is the first report to our knowledge demonstrating the direct effect of IL-17 on unstimulated neutrophils.

The lack of an upregulation by IL-17 of the pro-inflammatory cytokines we studied at 5 h suggests that the effect of IL-17 in neutrophils is not immediately. These results are in agreement with the increased IL-7 induced neutrophil recruitment observed in mice after 24 h, in comparison with 6 h (31), and that the administration of neutralizing anti-IL-17 antibodies inhibits neutrophils recruitment at 24 h, but not at 6 h in mice (32).

Viability and apoptosis

IL-17 significantly increased the viability of LPS-stimulated equine neutrophils by decreasing apoptosis at 24 h. This result is in agreement with the delayed apoptosis rate in IL-17-stimulated human neutrophils of tuberculosis-affected patients and healthy individuals (33). This neutrophil response in human and horses appears to be species specific, as conversely, IL-17 rather induces neutrophils apoptosis in a mouse model of pneumococcal infection (34), and in peripheral blood murine neutrophils at 48h (35). We also observed that IL-17 potentiated the dexamethasone-induced increase viability of equine neutrophils. Considering that IL-17 expression in peripheral blood from human

patients with asthma and others diseases is unaltered by GCs (36, 37), IL-17 may hence contribute to the persistent airway neutrophilia by promoting continuous neutrophil recruitment and increasing their viability. The IL-17-induced decrease in neutrophil apoptosis could influence the clearance of these cells from inflammatory sites, and be detrimental to the resolution of inflammation.

Receptors

We first examined whether highly purified equine neutrophils express IL-17RA and IL-17RC at mRNA and protein levels, as both subunits of the receptor are required for allowing IL-17 biological activity. To our knowledge, this is the first report demonstrating the presence of both subunits of the IL-17 receptor at mRNA and protein level on unstimulated peripheral blood neutrophils in any species. Previous studies reported the presence of IL-17RA in human neutrophils (38, 39), but IL-17RC was not observed in unstimulated or LPS-stimulated neutrophils (39). However, IL-17RC was recently reported to be present in human neutrophils isolated from bone marrow after stimulation with IL-6 and IL-23 alone, or in combination with *Aspergillus fumigatus* hyphal extracts, but not in unstimulated cells (10). The absence of IL-17RC expression in unstimulated neutrophils may be due to the short incubation time (only 3 hours) used in this study (10). The sources of neutrophils (peripheral versus bone marrow neutrophils), method of isolation, and species differences could also contribute to the constitutive expression of IL-17RC we observed. Nevertheless, depending of the source, and the microenvironment (presence of stimuli), human neutrophils can also express both subunits of the IL-17 receptor, making these cells reactive to IL-17. Further study should address the presence of these receptors in airway neutrophils of asthmatics and other patients lung diseases associated with an upregulation of IL-17.

2.6 Conclusion

Previous studies have shown that IL-17 contributes to neutrophilic inflammation by inducing IL-8 mRNA expression by structural (smooth muscle cells, fibroblast, endothelial and epithelial cells) and inflammatory cells (macrophages), suggesting an indirect role of this cytokine to neutrophilic inflammation. Results of the present study indicate that IL-17 may also directly activate and possibly recruit neutrophils in the airways and that this response is not attenuated by DEX. Moreover, IL-17 increases the viability of blood neutrophils by decreasing apoptosis of these cells. We therefore speculate that the poor response to corticosteroids observed in patients with severe asthma, could be explained by the effect of IL-17 in the lung microenvironment. Further investigations are required to identify the signaling pathways involved in these biological activities. These results suggest that therapeutic strategies targeting or blocking IL-17 or its receptor subunits may be of benefit in neutrophilic asthma.

2.7 Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-2014-06-198).

Conflict of interest: None of the authors have any competing financial interests related to this work to disclose.

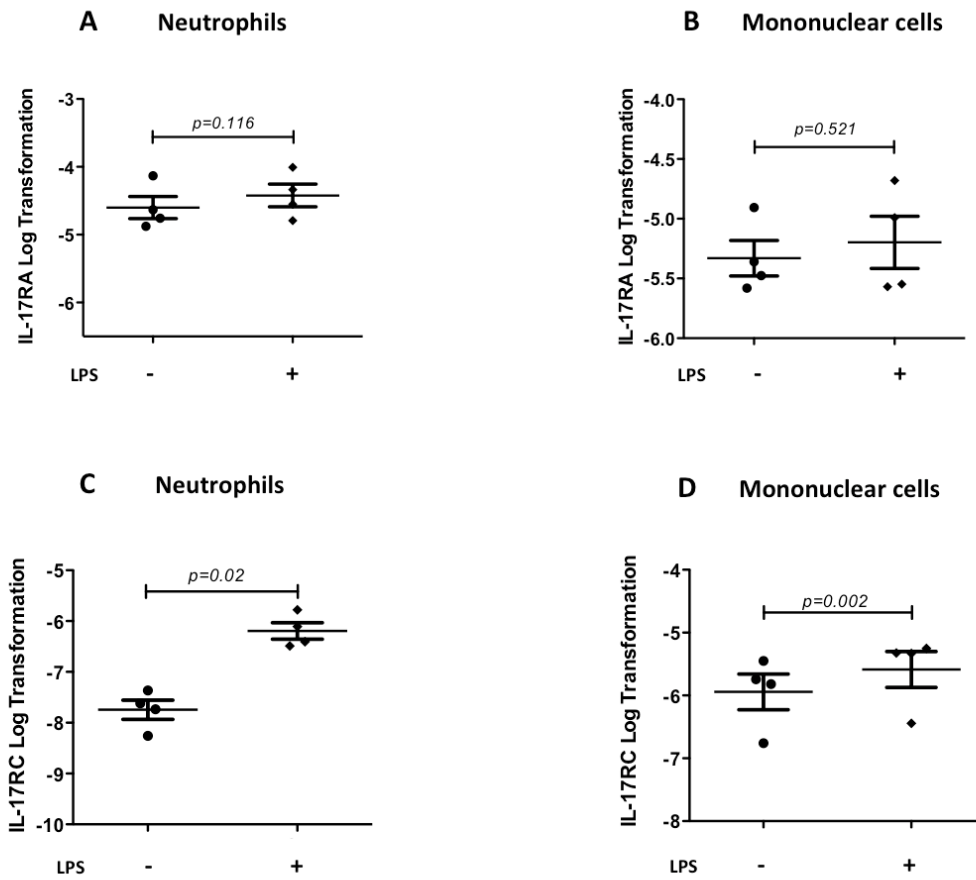


Figure 2.1. mRNA expression of IL-17 receptor subunits in neutrophils and mononuclear cells. Equine neutrophils and mononuclear cells were isolated from peripheral blood and cultured (5 h) in presence or absence of LPS. IL-17RA (A and B) and IL-17RC (C and D) mRNA expression were evaluated by qPCR.

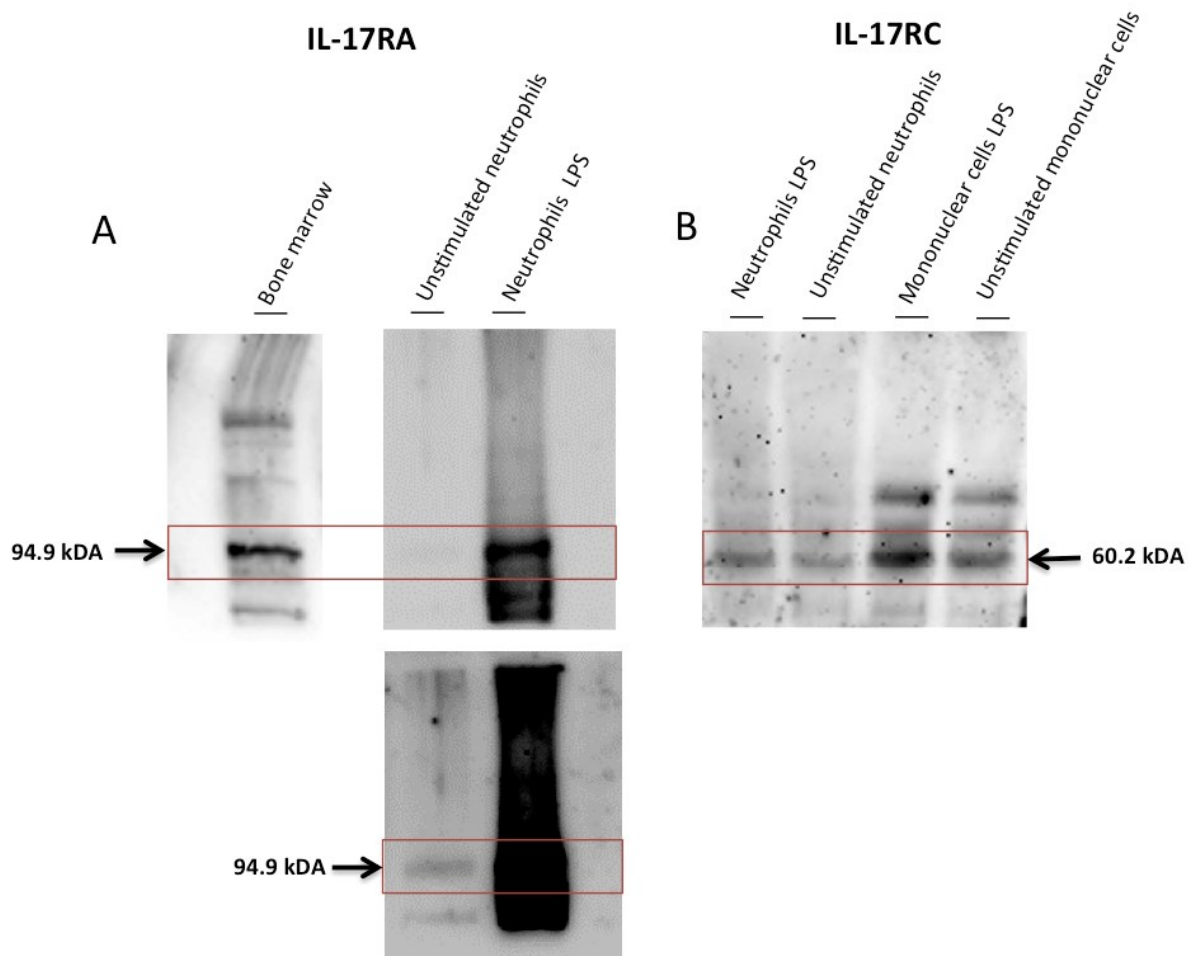


Figure 2.2. Protein expression of IL-17 receptor subunits in neutrophils. Equine neutrophils were isolated from peripheral blood and cultured (5 h) in presence or absence of LPS. **A.** IL-17RA and **B.** IL-17RC proteins were detected by Western Blot. Mononuclear cells (IL-17RC) and bone marrow (IL-17RA) were used as positive controls. **Lower panel.** The membrane was overexposed to improve the visibility of IL-17RA in unstimulated neutrophils.

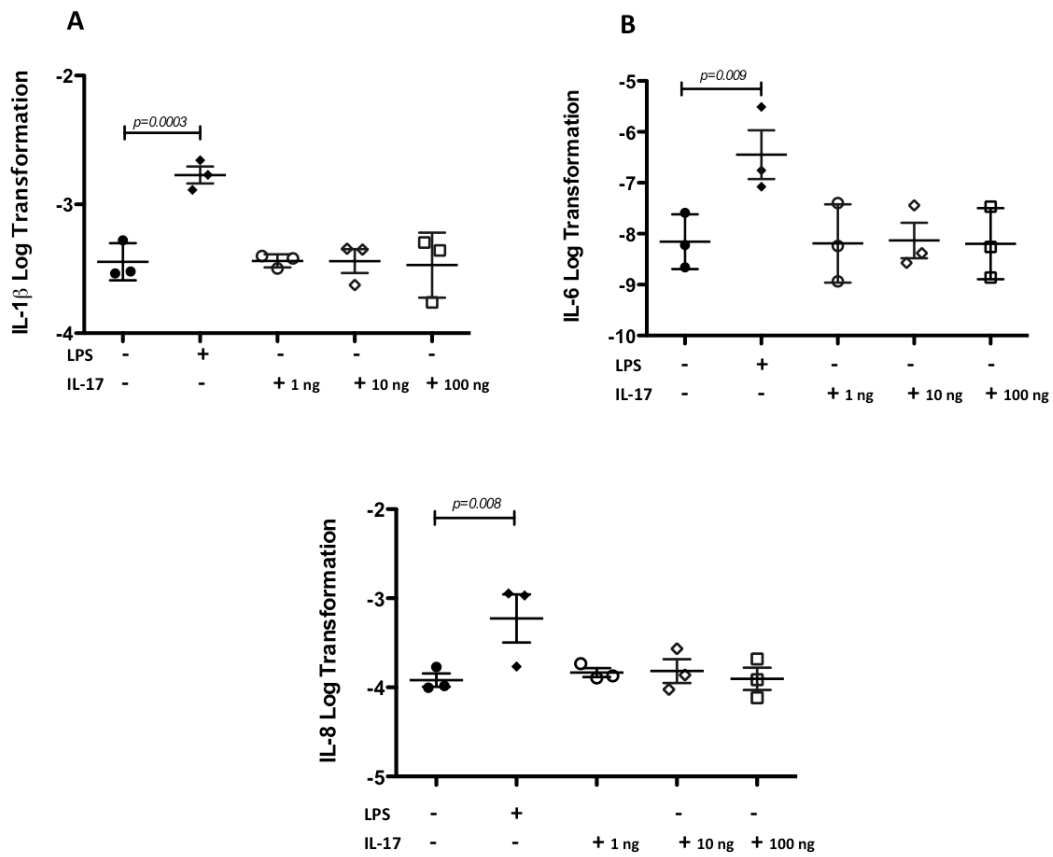


Figure 2.3. IL-17 does not directly activate neutrophils at 5 h. Equine neutrophils were isolated from blood and cultured (5 h) in presence or absence of IL-17 at different concentrations ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$). **A.** IL-1 β , **B.** IL-6 and **C.** IL-8 mRNA expression was evaluated by qPCR. Upregulation of all cytokines was observed in LPS-stimulated but not in IL-17-pretreated neutrophils.

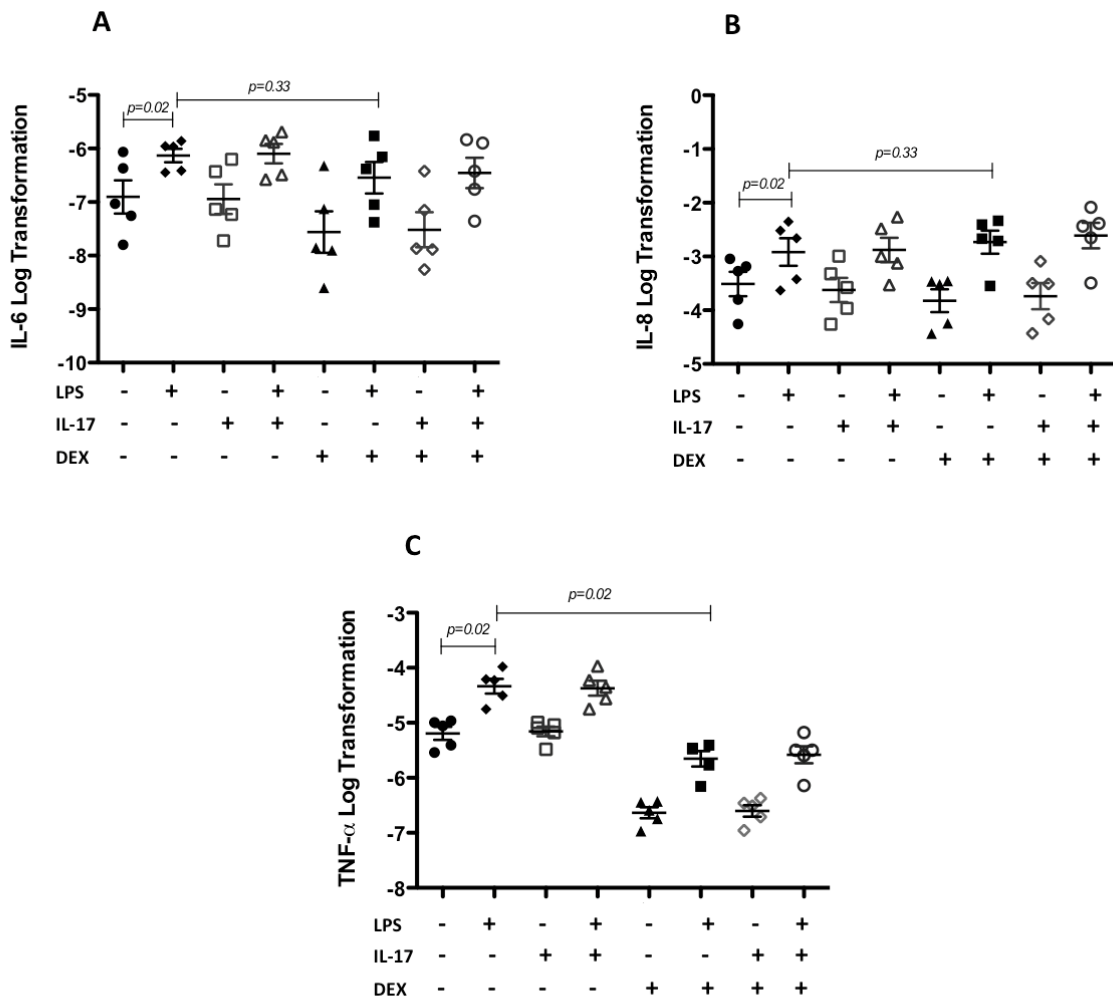


Figure 2.4. Pro-inflammatory cytokines expression in neutrophils at 5 h. Equine neutrophils (n=5) were cultured (5 h) in presence or absence of IL-17, LPS and dexamethasone (DEX). **A.** IL-6 **B.** IL-8 and **C.** TNF- α mRNA expression were evaluated by qPCR.

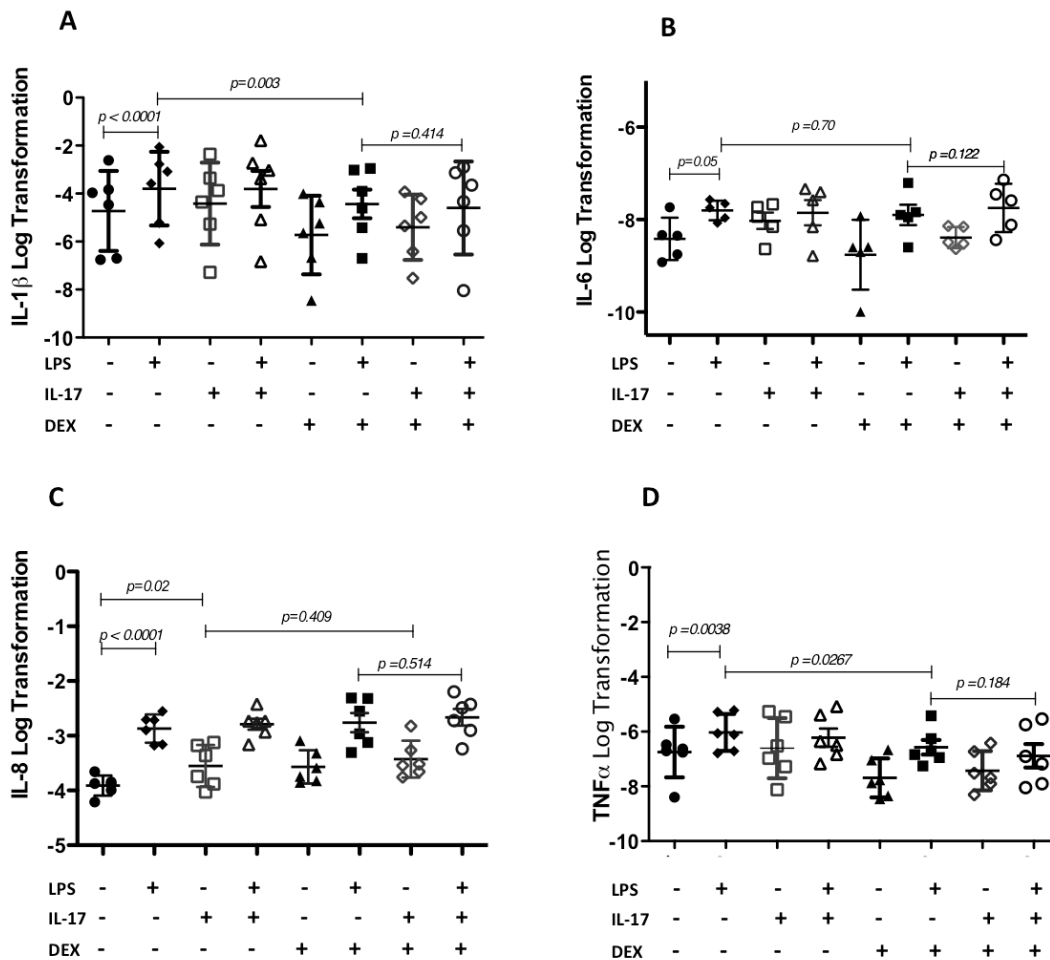
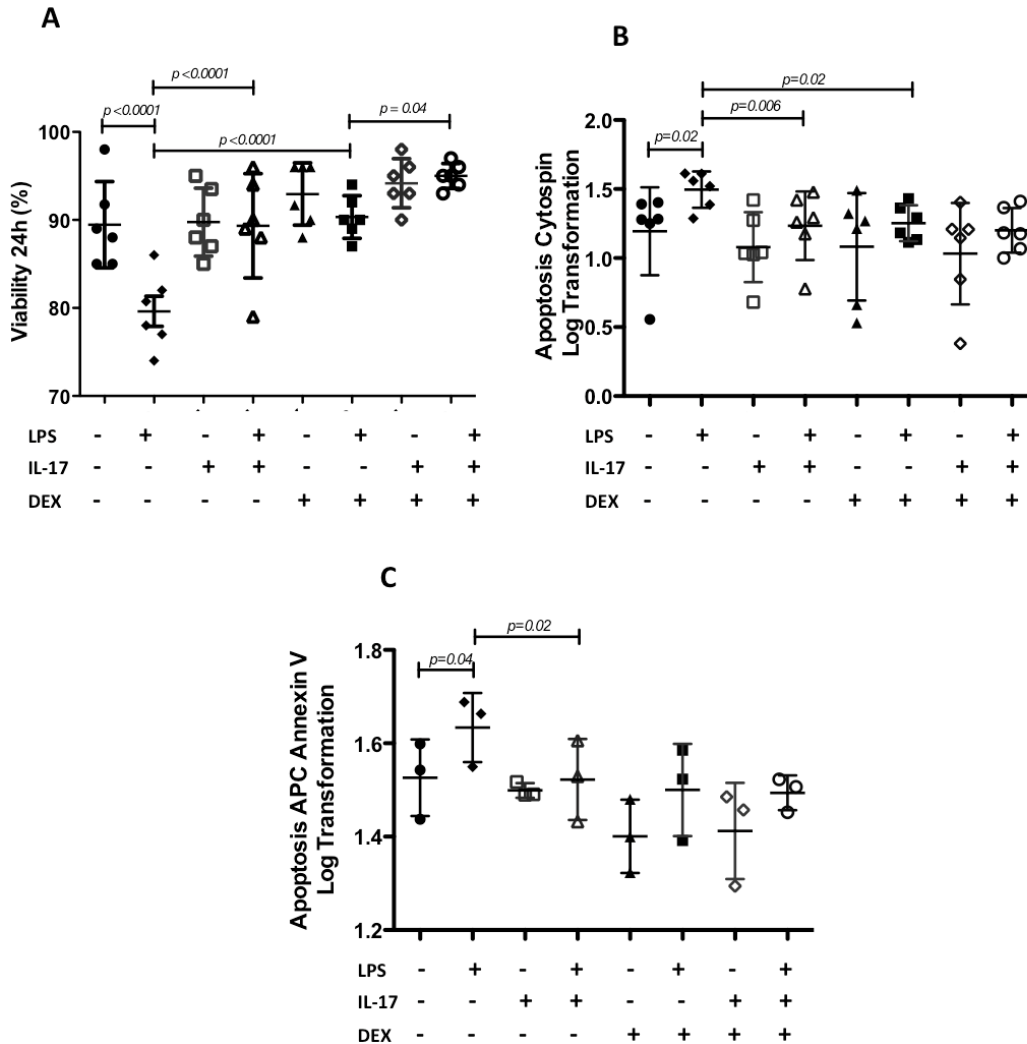


Figure 2.5. Pro-inflammatory cytokines expression in neutrophils at 24h. Equine neutrophils (n=6) were cultured (24 h) in presence or absence of IL-17, LPS and dexamethasone (DEX). **A.** IL-1 β , **B.** IL-6, **C.** IL-8, and **D.** TNF- α mRNA expression were evaluated by qPCR.



2.6 Assessment of neutrophil viability and apoptosis. Equine neutrophils were cultured (24 h) in presence or absence of LPS, IL-17 and DEX. **A.** Viability was evaluated by the trypan blue method. **B.** Percentage of apoptotic cells was evaluated blindly by morphological evaluation on cytopreparations. **C.** Percentage of apoptosis was evaluated by flow cytometry (Annexin V).

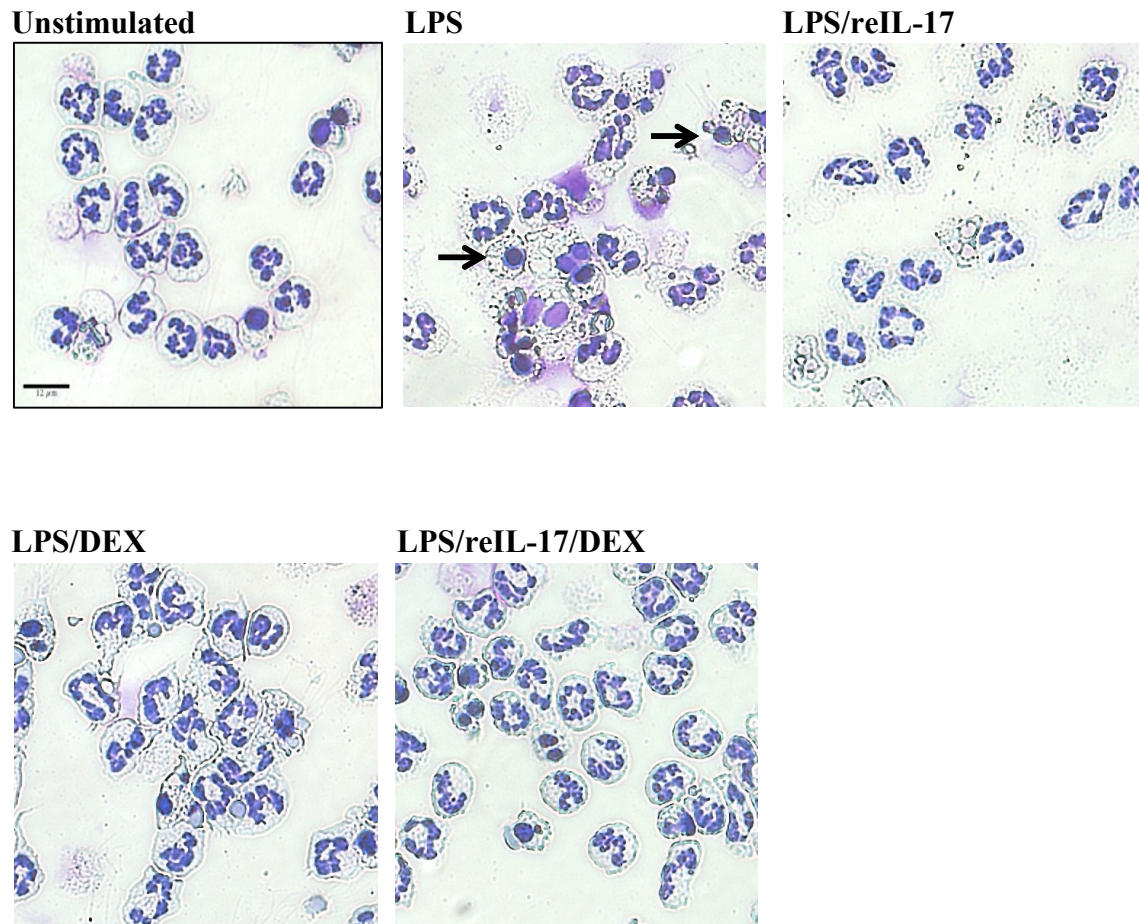


Figure 2.7. Morphological changes in cultured blood neutrophils (24 h)

Neutrophils were isolated and cultured 24 h in presence or absence of LPS, dexamethasone (DEX) and IL-17. Morphological features of apoptosis were evaluated with light microscope 40X (Protocol Hema 3 Stain). Arrows indicate apoptotic neutrophils, characterized by nuclear pyknosis and condensation of nuclear chromatin. (*Scale bar = 12 μ m*).

Table III. Sequences of primers used for qPCR assays

Gene Id	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
Subunits of IL-17 receptor		
IL-17RA	ACTCAAGCACACACCAGAGG	TGTGTCTGAGGCAGTCGTTC
IL-17RC	TGGCCCTTGAATTCCCATTGCT	CTGGGTTCCAAGGCACAGAATGAT
Pro-inflammatory cytokines		
IL-1β	AGACAACAGTGAAGTGCAGCCT	GACTGACAAGATACCTGTGGCCT
IL-6	TCACTCCAGTTGCCTTCTCC	CCAGATTGGAAGCATCCGTC
IL-8	GCAGACCTCAGCTCCGTTGAC	CTTTCTGCAGCTCTGTGTGAAG
TNF-α	ATCCGAGATGTGGAGCTGGC	GACTGGAAGGCATTCGGTAACT

2.8 References

1. Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet*. 2009;373(9678):1905-17.
2. Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical science (London, England : 1979)*. 1998;94(6):557-72.
3. 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.
4. Ciepiela O, Ostafin M, Demkow U. Neutrophils in asthma--a review. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2015;209:13-6.
5. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(8):556-67.
6. Ramirez-Velazquez C, Castillo EC, Guido-Bayardo L, Ortiz-Navarrete V. IL-17-producing peripheral blood CD177+ neutrophils increase in allergic asthmatic subjects. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*. 2013;9(1):23.
7. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*. 2008;28(4):454-67.
8. Gu C, Wu L, Li X. IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling. *Cytokine*. 2013;64(2):477-85.
9. Toy D, Kugler D, Wolfson M, Vanden Bos T, Gurgel J, Derry J, et al. Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;177(1):36-9.
10. Taylor PR, Roy S, Leal SM, Jr., Sun Y, Howell SJ, Cobb BA, et al. Activation of neutrophils by autocrine IL-17A-IL-17RC interactions during fungal infection is regulated by IL-6, IL-23, RORgammat and dectin-2. *Nature immunology*. 2014;15(2):143-51.
11. Vazquez-Tello A, Semlali A, Chakir J, Martin JG, Leung DY, Eidelman DH, et al. Induction of glucocorticoid receptor-beta expression in epithelial cells of asthmatic airways by T-helper type 17 cytokines. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2010;40(9):1312-22.
12. Vazquez-Tello A, Halwani R, Hamid Q, Al-Muhsen S. Glucocorticoid receptor-beta up-regulation and steroid resistance induction by IL-17 and IL-23 cytokine stimulation in peripheral mononuclear cells. *Journal of clinical immunology*. 2013;33(2):466-78.
13. Bullone M, Lavoie JP. Asthma "of horses and men"-How can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences? *Molecular immunology*. 2015;66(1):97-105.
14. Debrue M, Hamilton E, Joubert P, Lajoie-Kadoch S, Lavoie JP. Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2005;105(1-2):25-31.
15. 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. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2012;47(5):589-96.
16. 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.
 17. 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.
 18. 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. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2010;299(4):L472-82.
 19. Fialkow L, Fochesatto Filho L, Bozzetti MC, Milani AR, Rodrigues Filho EM, Ladniuk RM, et al. Neutrophil apoptosis: a marker of disease severity in sepsis and sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *Critical care (London, England)*. 2006;10(6):R155.
 20. 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.
 21. 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. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;123(5):1185-7.
 22. Barczyk A, Pierzchala W, Sozanska E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respiratory medicine*. 2003;97(6):726-33.
 23. Zijlstra GJ, Ten Hacken NH, Hoffmann RF, van Oosterhout AJ, Heijink IH. Interleukin-17A induces glucocorticoid insensitivity in human bronchial epithelial cells. *The European respiratory journal*. 2012;39(2):439-45.
 24. Ainsworth DM, Wagner B, Erb HN, Young JC, Retallick DE. Effects of in vitro exposure to hay dust on expression of interleukin-17, -23, -8, and -1beta and chemokine (C-X-C motif) ligand 2 by pulmonary mononuclear cells isolated from horses chronically affected with recurrent airway disease. *American journal of veterinary research*. 2007;68(12):1361-9.
 25. Lavoie JP, Leguillette 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. *American journal of veterinary research*. 2002;63(4):579-85.
 26. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions. American Thoracic Society. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;162(6):2341-51.
 27. Wenzel SE, Szeftler SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;156(3 Pt 1):737-43.
 28. Jones CE, Chan K. Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway

- epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2002;26(6):748-53.
29. 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;186(7):4156-63.
 30. Yue TL, Wang X, Sung CP, Olson B, McKenna PJ, Gu JL, et al. Interleukin-8. A mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *Circulation research*. 1994;75(1):1-7.
 31. Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, Trifilieff A. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2003;170(4):2106-12.
 32. Miyamoto M, Prause O, Sjostrand M, Laan M, Lotvall J, Linden A. Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2003;170(9):4665-72.
 33. Jiang L, Yao C, Jin Q, Li B. [Effect of interleukin-17 on neutrophil apoptosis in patients with tuberculosis]. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology*. 2014;30(8):833-6.
 34. Wang W, Zhou A, Zhang X, Xiang Y, Huang Y, Wang L, et al. Interleukin 17A promotes pneumococcal clearance by recruiting neutrophils and inducing apoptosis through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism in acute otitis media. *Infection and immunity*. 2014;82(6):2368-77.
 35. Silverpil E, Glader P, Hansson M, Linden A. Impact of Interleukin-17 on Macrophage Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils and Particles. *Inflammation*. 2011;34(1):1-9.
 36. Saadoun D, Garrido M, Comarmond C, Desbois AC, Domont F, Savey L, et al. Th1 and Th17 cytokines drive Takayasu Arteritis inflammation. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2015.
 37. Nanzer AM, Chambers ES, Ryanna K, Richards DF, Black C, Timms PM, et al. Enhanced production of IL-17A in patients with severe asthma is inhibited by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in a glucocorticoid-independent fashion. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;132(2):297-304.e3.
 38. Dragon S, Saffar AS, Shan L, Gounni AS. IL-17 attenuates the anti-apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils. *Molecular immunology*. 2008;45(1):160-8.
 39. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*. 2010;115(2):335-43.

Chapitre 3 : Résultats complémentaires

3.1 Détermination par un essai de type «Time course» des doses adéquates pour notre étude

Après avoir identifié la présence des deux sous-unités du récepteur de l'IL-17, nous avons déterminé grâce à un essai de type « time course » le temps et la dose optimaux pour l'activation des neutrophiles équins par l'IL-17. Pour ce faire, nous avons stimulé les cellules avec différentes doses d'IL-17, en présence ou absence de LPS. Nous avons ensuite évalué la viabilité des neutrophiles à différents temps (0 h, 5 h, 12 h, 18 h et 24 h; **Figure 3.1**). Lorsque les cellules sont stimulées à l'IL-17, la viabilité, normalement diminuée par la stimulation au LPS, est rétablie à 24 h. À la vue de ces résultats, nous avons confirmé que l'action de l'IL-17 n'est donc pas immédiate. Pour cette raison, et pour nos études subséquentes, nous avons fixé notre temps d'incubation à 24 h.

Par la suite, nous avons étudié l'expression du CD11b et du CD13, deux protéines étant communément utilisées comme marqueurs non-spécifiques d'activation des neutrophiles (équins et d'autres espèces) [175, 176]. Le CD11b est une β -intégrine [177] qui est constitutivement exprimé à la surface des neutrophiles non stimulés. Il est principalement stocké dans les granules à l'intérieur de la cellule [178]. Son expression augmente à la surface des neutrophiles après 5 minutes d'exposition à des produits bactérienne comme le LPS *in vitro*, et est maximale dans les 30 minutes qui suivent [179, 180]. Le CD11b est aussi augmenté chez les neutrophiles *in vivo*, après une infection et peut être un prédicteur post-chirurgical de sepsis chez l'humain [181]. Le CD13 quant à lui est une endopeptidase transmembranaire qui est stockée dans les granules des neutrophiles pouvant être augmentée à la surface de ces cellules lors de leur dégranulation [182]. Chez les chevaux, le CD13 est

considéré comme un indicateur d'activation des neutrophiles *in vivo* et *in vitro* [183]. Une augmentation du CD13 a été observée lors de la stimulation avec du LPS et de l'IL-8 recombinante équine [175].

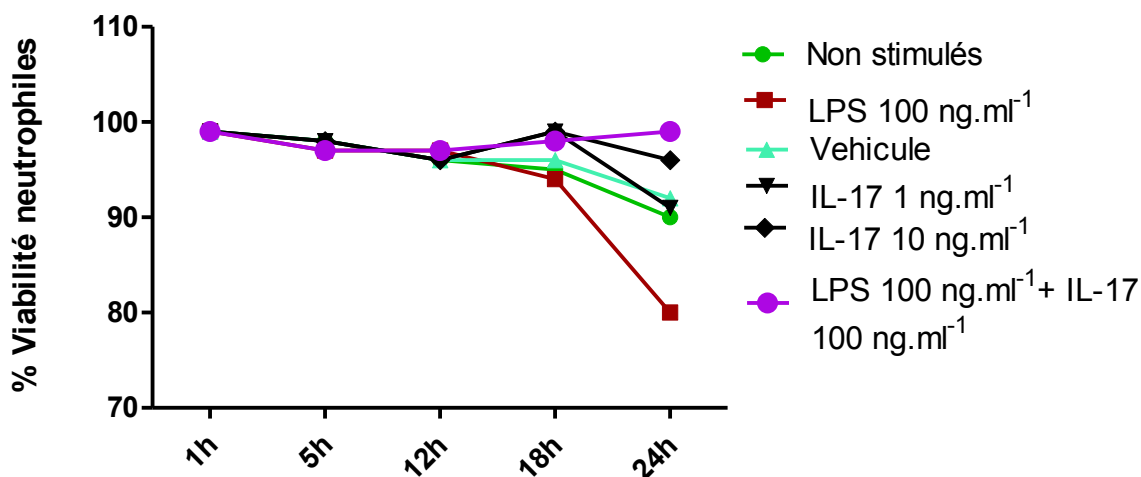


Figure 3.1. « Time course » de viabilité chez le neutrophile équin.

Les neutrophiles ont été mis en culture en présence ou absence de LPS, d'IL-17 ou de son véhicule. La viabilité a été mesurée à l'aide de la méthode de Trypan blue.

Un marquage des neutrophiles (n=1) avec l'anticorps dirigé contre CD13 (**Figure 3.2**) a été réalisé (Mouse anti-horse CD13, # MCA1084GA AbD Serotec®). De la même manière, les cellules (n=1) ont été marquées avec un anticorps dirigé contre le CD11b couplé à une molécule de phycoérythrine PE (**Figure 3.3**) (CD11b-PE # 130-091-240, Miltenyi Biotec). La fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux.

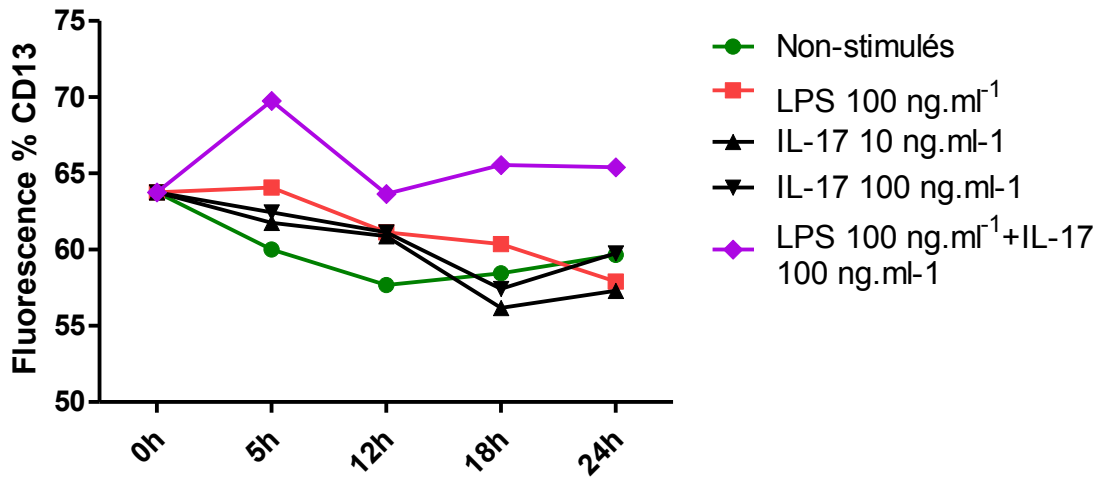


Figure 3.2. Test d'activation des neutrophiles - CD13.

Les neutrophiles ont été marqués avec un anticorps dirigé contre le CD13. La fluorescence a été mesurée par cryométrie en flux.

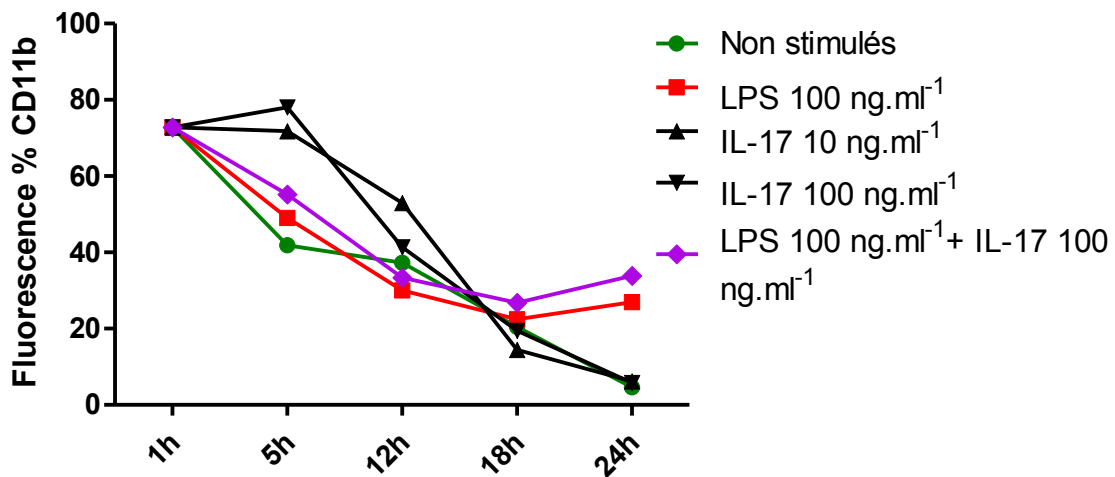


Figure 3.3. Test d'activation des neutrophiles - CD11b.

Les neutrophiles ont été marqués avec un anticorps dirigé contre le CD11b et la fluorescence mesurée par cytométrie en flux.

Nous avons observé qu'à 5 h de culture, les neutrophiles stimulés avec LPS et/ou reIL-17, montraient une activation maximale représentée par une augmentation de la moyenne de fluorescence de CD11b et CD13, en comparaison avec les autres temps évalués. Par contre, l'augmentation de CD11b et CD13 n'est pas corrélée avec une augmentation significative de l'expression des cytokines pro-inflammatoires à 5 h. (**Figure 2.3**).

Après 24 h, nous avons observé que les neutrophiles stimulés au LPS (100 ng.ml⁻¹) et à reIL-17 (100 ng.ml⁻¹) montraient une augmentation du niveau d'activation (CD11b et CD13) et ce, en comparaison avec les cellules non stimulées. Aussi, nous avons observé au niveau génique une surrégulation de l'IL-8 à 24 h, comme précédemment mentionné. Ces résultats nous ont ainsi permis de fixer la dose de l'IL-17 à 100 ng.ml⁻¹ pour les expériences suivantes.

Chapitre 4 : Discussion générale

La glucocorticorésistance constitue un problème clinique majeur dans de nombreuses pathologies inflammatoires, notamment dans les maladies respiratoires neutrophiliques. La résistance à l'action des GCs, définie ici comme la persistance des neutrophiles dans les voies respiratoires suite à ces traitements, a été observée chez les chevaux atteints de souffle, et chez les patients asthmatiques sévères. Il est important de noter que les GCs sont les médicaments les plus utilisés pour contrôler les signes cliniques chez ces patients [184]. L'objectif de cette étude était d'étudier les mécanismes entraînant la persistance des neutrophiles dans les voies respiratoires des chevaux atteints du souffle et d'asthmatiques, malgré un traitement aux GCs. En considérant qu'une diminution de la sensibilité aux GCs a été observée chez des cellules épithéliales bronchiques humaines suivant une stimulation par l'IL-17, et, puisque l'IL-17 est surexprimée dans les voies respiratoires des chevaux atteints du souffle et de certains patients asthmatiques [185], nous avons émis l'hypothèse **du possible rôle de l'IL-17 dans la persistance des neutrophiles pulmonaires dans les maladies asthmatiques humaines et équinnes.**

Il est important de mentionner ici que le souffle est une maladie chronique des voies respiratoires des chevaux d'âge adulte, qui partage de nombreuses similitudes avec l'asthme chez l'humain. Il se caractérise par une obstruction variable et récurrente des voies respiratoires, une neutrophilie pulmonaire (**Annexe A**), et le remodelage des voies respiratoires, notamment du muscle lisse bronchique [186, 187]. Les recherches de notre laboratoire sont axées sur l'identification des mécanismes biologiques impliqués dans cette pathologie surtout à cause de son importance pour la santé des chevaux, mais aussi en raison de l'intérêt de l'utilisation du souffle comme modèle de recherche unique pour l'étude de l'asthme de type neutrophilique humain [188]. Afin de répondre à notre hypothèse de départ, nous avons étudié l'effet *in vitro* de l'IL-17 sur les neutrophiles équins en termes de l'expression de cytokines pro-inflammatoires mais aussi de la viabilité et l'apoptose de ces cellules.

4.1 Expression des sous-unités du récepteur à l'IL-17 du neutrophile équin

Le rôle de l'IL-17 dans l'inflammation est considéré qui passe à travers l'activation des récepteurs l'IL-17RA et l'IL-17RC, ceux-ci exprimés dans les fibroblastes et les cellules épithéliales qui produisent chemokines CXC et cytokines pro-inflammatoires qui vont médier le recrutement de neutrophiles et la libération de médiateurs cytotoxiques comme les espèces réactives de l'oxygène.

Nous avons vérifié la présence des deux sous-unités du récepteur de l'IL-17 dans les neutrophiles périphérique équins au niveau d'ARNm et protéique. À notre connaissance ceci est le premier rapport qui démontré les deux sous unités dans des cellules non-stimulés dans toutes les espèces. Des études ont démontré la présence de l'IL-17RA dans les neutrophiles humains [158, 189]. L'IL-17RC a été reporté présente dans les neutrophiles de la moelle osseuse après une stimulation avec IL-6 et IL-23 seule ou en combinaison avec *Aspergillus fumigatus*, mais pas présente dans les neutrophiles non-stimulés [121, 158].

Chez l'équin il n'existe aucune étude sur le sujet, même s'il existait des évidences de la surrégulation de cette cytokine dans les voies respiratoires des chevaux atteints du souffle en exacerbation de la maladie [156, 157]. De plus, à ce jour, aucune étude n'a démontré que l'IL-17 peut influencer de manière directe l'activité transcriptionnelle des neutrophiles équins. Un des objectifs de notre étude était donc d'identifier la capacité des neutrophiles à répondre de manière directe à l'IL-17. Pour y parvenir, nous devons mettre en évidence la présence des deux sous-unités du récepteur à l'IL-17 chez les neutrophile équins, étant donné que la présence du complexe IL-17RA/IL-17RC est requise pour l'activité biologique de cette cytokine [190].

Pour nos études transcriptionnelles, nous avons conçu des amorces spécifiques ciblant les 2 sous-unités du récepteur à l'IL-17. Les amorces ont été générées de façon à chevaucher 2 exons, évitant ainsi des résultats faussement positifs liés à l'amplification de l'ADN génomique contaminant [191]. D'autre part, la présence des deux sous-unités du récepteur de l'IL-17 a été confirmée au niveau protéomique par immunobuvardage de type western, une technique faisant appel à une immunodétection post-électrophorèse des protéines [192]. Dans cette expérience, nous avons utilisé des anticorps dirigés contre la protéine de l'IL-17RA et de l'IL-17RC humaine, qui partagent 76% et 80% d'homologie

avec la séquence protéique équine, respectivement. La taille de la bande révélée correspondait à celle attendue soit 94,9kDa pour IL-17RA et 60,2kDa pour l'IL-17RC.

Avec nos résultats, nous avons confirmé que les neutrophiles équins sont capables de répondre directement à l'IL-17.

4.2 Effet de l'IL-17 sur l'activation, la glucocorticorésistance, la viabilité et l'apoptose du neutrophile équin

Nous nous sommes par la suite intéressés à déterminer si l'IL-17 avait un effet sur la réponse des neutrophiles aux GCs. Pour ce faire, nous avons évalué l'expression génique de certaines cytokines pro-inflammatoires rapportées comme étant exprimées par le neutrophile équin [193] et humain [23]. Nous avons observé, pour la première fois, que l'expression de l'IL-8 par les neutrophiles est surrégulée directement par l'IL-17, et n'est pas inhibée par la DEX. La présence de l'IL-17 dans les voies respiratoires de chevaux atteints du souffle pourrait donc promouvoir la neutrophilie pulmonaire à travers l'IL-8. Cette chimiokine est d'ailleurs connue comme étant l'agent chimiotactique le plus puissant des neutrophiles [194]. De plus, ces résultats pourraient avoir une implication plus large, car l'angiogenèse et le remodelage tissulaire observés dans l'asthme sont corrélés avec l'expression de l'IL-8, considérée comme modulatrice dans ces processus [195, 196].

Par ailleurs, rappelons que le contrôle de la neutrophilie pulmonaire n'est que partiel ou est même absent lorsque le traitement aux GCs n'est pas combiné à un retrait antigénique [197-199]. L'absence d'une inhibition de l'activité transcriptionnelle de l'IL-8 chez les neutrophiles en présence de GCs et d'IL-17, comme nous l'avons observé, suggère que cette cytokine pourrait contribuer à la résistance aux GCs. Nous avons choisi la DEX pour les stimulations cellulaires, étant donné que son efficacité *in vivo* [200] et *in vitro* [25] est supérieure à celle d'autres GCs, comme la prednisolone. La concentration de DEX de 10^{-6} M utilisée correspond à la concentration systémique atteinte, lorsqu'administrée par voie orale dans les traitements courants du souffle [201]. Aussi, une étude précédente menée dans notre laboratoire a rapporté les effets suppresseurs de la DEX utilisée à cette même concentration sur les niveaux d'expression des cytokines proinflammatoires IL-1 β , IL-8, et TNF- α après 5 h de culture en présence de LPS [25]. Dans notre étude, nous avons observé que la DEX a des effets inhibiteurs similaires à 24 h pour IL-1 β et TNF- α , mais pas pour l'IL-8, ni pour l'IL-6. Nous pensons que les différences entre les résultats obtenus suite aux stimulations de 5 et 24 heures pourraient s'expliquer par un effet temps-dépendant de la DEX sur l'expression de l'ARNm de l'IL-8, tel que mis en évidence par une rapide diminution de

l'ARNm de l'IL-8 après presque dix heures de culture cellulaire chez les cellules humaines épithéliales bronchiques (HBE1) [202].

Nos résultats divergent toutefois des effets inhibiteurs de la DEX sur la production d'IL-8 observée après 24 h chez les neutrophiles humains [203]. Des différences entre les méthodes d'isolation utilisées, les puretés cellulaires obtenues, les concentrations de DEX utilisées et des variations inter-espèces pourraient contribuer aux différences observées dans les deux études. Néanmoins, nous avons observé que les 4 cytokines pro-inflammatoires évaluées à 5 h sont sur-régulées par le LPS (control positif), ce qui est en accord avec les résultats observés par notre laboratoire précédemment, et ce qui valide nos expériences actuelles.

Finalement, nos résultats ont mis en évidence une implication de l'IL-17 dans l'augmentation de la viabilité du neutrophile, causée par une diminution de l'apoptose de ces cellules. Ces résultats pourraient expliquer l'augmentation des niveaux de l'IL-17 accompagnée d'une diminution de l'apoptose de neutrophiles précédemment observée chez des patients asthmatiques [204]. Cependant, les mécanismes par lesquels cette cytokine produit ces effets anti-apoptotiques restent à être élucidés. Nous présumons que cette diminution de l'apoptose pourrait avoir comme origine un mécanisme similaire à celui observé dans les cellules T, chez qui l'IL-17 produit une altération de la voie d'apoptose perforine/granzyme, via l'inhibition de la caspase 10 [205]. Étant donné que le mécanisme apoptotique perforine/granzyme est plus typique des lymphocytes que des neutrophiles [206], notre hypothèse est que l'IL-17 inhibe la voie d'apoptose intrinsèque, ce qui aurait pour conséquence un effet protecteur sur la membrane mitochondriale externe des neutrophiles. De cette manière, l'IL-17 pourrait aussi contribuer à la persistance des neutrophiles dans les voies respiratoires des chevaux atteints du souffle.

4.3 Choix des agonistes

Dans notre étude, nous avons choisi le *lipopolysaccharide* (LPS), composant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, comme agoniste pour stimuler les neutrophiles étant donné que les humains et les chevaux sont des espèces qui sont fréquemment exposées à ce genre d'antigènes et qui y sont très sensibles [207]. Le lipide A, un des composants du LPS, est reconnu par les Toll-Like receptors 4 (TLR4) exprimés à la

surface des cellules immunitaires, comme les neutrophiles, ce qui entraîne la libération de cytokines pro-inflammatoires par l'activation de la voie de signalisation NF- κ B et AP-1 [208, 209]. Lorsqu'inhalé, le LPS induit l'inflammation des voies respiratoires. Les hauts niveaux d'endotoxines observés dans les écuries [210, 211] pourraient contribuer à l'obstruction respiratoire et l'inflammation neutrophilique observées dans le souffle [212, 213]. Chez l'humain, de fortes concentrations de LPS produisent également un phénotype asthmatique caractérisé par une hyperréactivité bronchique et une inflammation de type neutrophilique [214].

Nos résultats confirment que les neutrophiles tout comme les cellules mononucléaires équines, ont une grande sensibilité au LPS, ce qui se traduit par une surexpression de cytokines pro-inflammatoires à 24 heures (IL-1 β p<0.0001, IL-6 p=0.05, IL-8 p<0.0001 and TNF- α p=0.0038). Nous avons prêté une attention particulière à ces 4 cytokines, mais un plus large panel de cytokines pourrait également être surrégulé par le LPS [215].

4.4 Limites rencontrées

Tel que mentionné précédemment, nous nous sommes intéressés à l'expression génique de certaines cytokines pro-inflammatoires chez les neutrophiles équins. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique d'amplification en chaîne par polymérase en temps réel (qPCR). Cette méthode est reconnue pour sa grande sensibilité et spécificité pour la détection de faibles quantités d'ARNm [191]. Afin de minimiser les erreurs dans la quantification des transcrits [191], les résultats de quantification génique ont été exprimés par rapport à un, ou préférablement, plusieurs gènes de référence ou «housekeeping genes». L'expression de ces gènes de référence doit être stable dans les conditions de stimulation étudiées [216]. Cependant, de nombreuses études ont montré que ces gènes sont sujets à une variabilité selon les contextes biologiques ou encore les conditions de culture (ex. : stimulations à un agoniste) [217-220]. Nous avons ainsi évalué l'expression de différents gènes de référence dans notre système (**Annexe B**), mais aucun ne remplissait les conditions de stabilité et de constance requises. En effet, 3 gènes de référence *e18S* « 18S ribosomal RNA », *GAPDH* « glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase », *UBQ* « ubiquitin » ont été testés dans les extraits d'ARNm de neutrophiles stimulés ou non au LPS. (**Figure 4.1**), et nous avons ainsi

observé que ces gènes pouvaient potentiellement nous servir de référence. Cependant, ces gènes sont surrégulés en présence de dexaméthasone et de reIL-17 (**Figure 4.2**). Nous avons aussi évalué la stabilité du HPRT1 «hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1» (données non présentées), mais sa détection s’est avérée dépendante de la stimulation au LPS. Pour toutes ces raisons, nous avons conclu que l’instabilité de ces gènes de référence pourrait dissimuler les changements réels d’expression des gènes mesurés dans nos études et, ainsi, nous avons décidé de rapporter nos valeurs sans appliquer de normalisation.

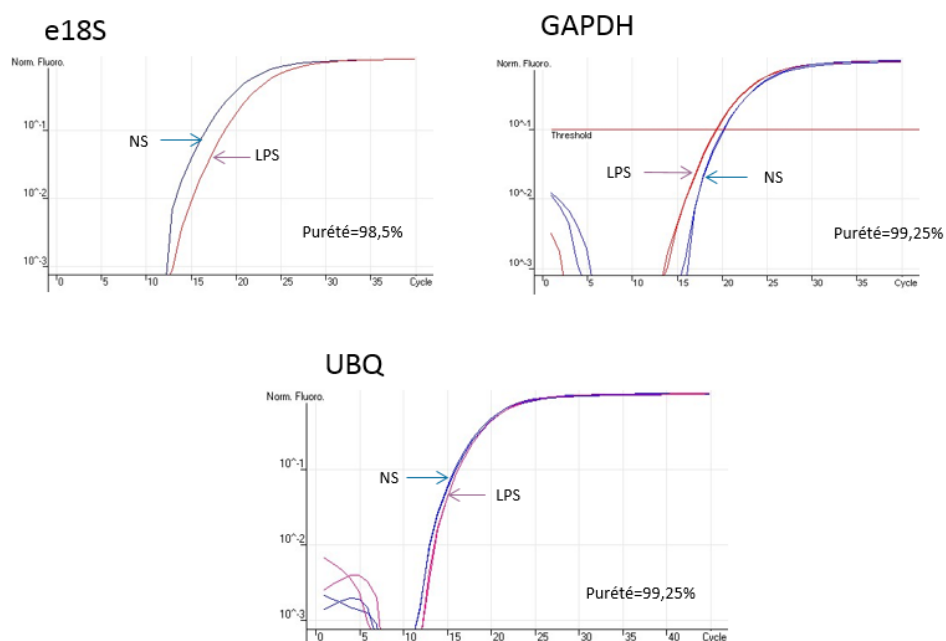


Figure 4.1. Comparaison 3 gènes de référence chez les neutrophiles équins

L’expression de l’ARNm de trois gènes de référence a été évaluée par qPCR

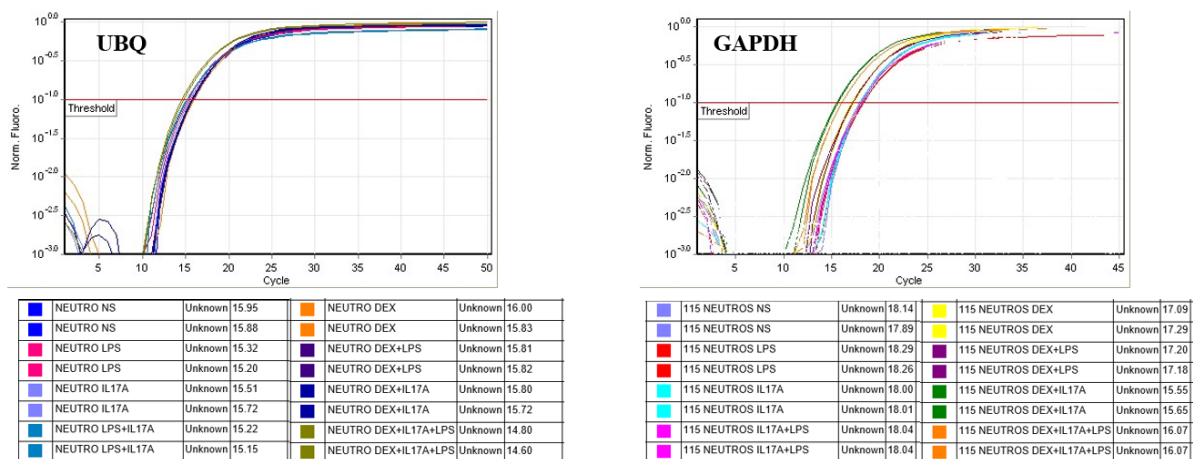


Figure 4.2. Comparaison des 2 gènes de référence UBQ et GAPDH chez les neutrophiles équins

L'expression de l'ARNm de trois gènes de référence a été évaluée par qPCR.

4.5 L'Interleukine-17 : l'héroïne ou la méchante ?

Il est bien établi que l'IL-17 joue un rôle important dans la pathogenèse de l'asthme humain et le souffle chez le cheval. L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire nécessaire pour la chimiotaxis des neutrophiles dans le site d'inflammation, pourtant impliqué dans la défense contre pathogènes et la réponse inflammatoire. L'action de l'IL-17 devient un problème au moment où elle produit une excessive cumulation des neutrophiles dans les voies respiratoires de patients humain asthmatiques et chevaux atteints du souffle. Par contre, un déficit dans la production de l'IL-17 est traduit par un retard significatif dans le recrutement de neutrophiles dans les voies respiratoires en un modèle d'infection pulmonaire chez la souris. Alors et bien que l'augmentation de l'IL-17 cytokine produise des effets nocifs au niveau pulmonaire, il est évident que dans le cas de sécrétion normale, cette cytokine a un rôle très important dans la défense contre pathogènes.

Chapitre 5 : Conclusion & perspectives

Cette thèse introduit dans la littérature scientifique de nouvelles données concernant le rôle de la cytokine IL-17 dans la glucocorticorésistance, la survie et l'apoptose des neutrophiles équins.

La glucocorticorésistance constitue une problématique dans la gestion clinique de certaines maladies de l'homme et des chevaux. À ce jour, la contribution de l'IL-17 dans la persistance de neutrophiles au niveau des voies respiratoires des chevaux ou de l'homme n'a pas été étudiée. Nous avons donc vérifié l'effet possible de l'IL-17 sur la réponse des neutrophiles sanguins. Nous avons démontré que cette cytokine induit une augmentation de l'expression de l'IL-8 qui n'est pas atténuée par les GCs. Nos résultats mettent aussi en évidence, pour la première fois, le rôle de l'IL-17 dans l'augmentation de la survie du neutrophile *in vitro*, et suggèrent ainsi un possible mécanisme par lequel les neutrophiles persisteraient dans les voies respiratoires des chevaux atteints du souffle, et possiblement de patients asthmatiques, même sous glucocorticothérapie.

Ces résultats soulèvent d'autres questions et nous amènent à envisager de nouvelles études. Tel que mentionné précédemment, nous savons que, chez l'humain, il existe un sous-groupe de patients asthmatiques qui ne répondent pas aux traitements classiques aux GCs inhalés [185]. Chez l'humain, la présence de la sous-unité IL-17RA du récepteur a été démontrée [158, 189]. Par contre, la présence de la sous-unité IL-17RC n'a pas été détectée en absence stimulation, mais semble induite après une stimulation de l'IL-6 et l'IL-23 dans des neutrophiles isolés de la moelle osseuse chez l'humain [121, 158]. Il serait donc pertinent de vérifier si le neutrophile humain exprime également les deux sous-unités du récepteur de l'IL-17 dans des conditions que nous avons utilisées pour étudier le neutrophile équin, ainsi que la réponse des neutrophiles pulmonaires humains à l'IL-17 en mesurant leur profil pro-inflammatoire.

D'autre part, il serait pertinent d'évaluer l'effet de l'IL-17 sur la survie et l'apoptose des neutrophiles humains, étant donné les résultats controversés existant sur le sujet chez

l'humain et chez la souris [221, 222]. Nous serions intéressés de déterminer si l'effet de l'IL-17 sur la viabilité des neutrophiles équins et humains est comparable, les mécanismes biologiques ainsi mis en jeu devront être élucidés (voies de signalisations, acteurs cellulaires tels que des facteurs ou cofacteur de transcription). Ainsi, nos connaissances dans le domaine nous permettraient de mieux comprendre les processus impliqués dans le souffle chez le cheval et l'asthme chez l'humain.

Enfin, il serait intéressant d'évaluer, chez le cheval, l'effet *in vivo* de l'IL-17 dans la neutrophilie des voies respiratoires. Cela nous permettrait de valider les résultats que nous avons obtenus dans notre étude et possiblement d'explorer de nouvelles voies thérapeutiques permettant de contrôler l'inflammation persistante chez les chevaux atteints du souffle. À cette fin, il est important d'élucider l'impact et les mécanismes biologiques de l'IL-17 au niveau tissulaire. Des molécules ciblant l'IL-17 semblent particulièrement prometteuses chez l'humain [135]. De telles études permettraient d'évaluer l'effet réel de l'IL-17 sur le recrutement des neutrophiles dans les voies respiratoires de chevaux atteints du souffle et pourraient même potentiellement, être extrapolées aux patients atteints d'asthme sévère.

Bibliographie

1. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(3):159-75.
2. Kobayashi SD, DeLeo FR. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2009;1(3):309-33.
3. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010;33(5):657-70.
4. Athens JW, Haab OP, Raab SO, Mauer AM, Ashenbrucker H, Cartwright GE, et al. Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. *J Clin Invest*. 1961;40:989-95.
5. Tizard IR. *Veterinary immunology*. St. Louis, Mo.: Elsevier/Saunders; 2013.
6. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*. 2010;31(8):318-24.
7. Sasmono RT, Ehrnsperger A, Cronau SL, Ravasi T, Kandane R, Hickey MJ, et al. Mouse neutrophilic granulocytes express mRNA encoding the macrophage colony-stimulating factor receptor (CSF-1R) as well as many other macrophage-specific transcripts and can transdifferentiate into macrophages in vitro in response to CSF-1. *J Leukoc Biol*. 2007;82(1):111-23.
8. Brederoo P, van der Meulen J, Mommaas-Kienhuis AM. Development of the granule population in neutrophil granulocytes from human bone marrow. *Cell Tissue Res*. 1983;234(3):469-96.
9. Bainton DF, Ulliyot JL, Farquhar MG. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med*. 1971;134(4):907-34.
10. Ley K, Smith E, Stark MA. IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunol Res*. 2006;34(3):229-42.
11. Ovalle WK, Nahirney PC, Netter FH. *Netter's essential histology*. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2013; Available from: <http://site.ebrary.com/id/10668676>.
12. Murav'ev RA, Fomina VA, Rogovin VV. [Gelatinase granules of the neutrophil granulocytes]. *Izv Akad Nauk Ser Biol*. 2003(4):389-94.
13. Dancy JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA. Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest*. 1976;58(3):705-15.
14. 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.
15. Tofts PS, Chevassut T, Cutajar M, Dowell NG, Peters AM. Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*. 2011;117(22):6050-2; author reply 3-4.
16. Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*. 1991;65(5):859-73.
17. Buckley CD, Ross EA, McGettrick HM, Osborne CE, Haworth O, Schmutz C, et al. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J Leukoc Biol*. 2006;79(2):303-11.

18. Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, et al. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(24):9233-7.
19. Karsten CM, Laumonnier Y, Kohl J. Functional analysis of C5a effector responses in vitro and in vivo. *Methods Mol Biol*. 2014;1100:291-304.
20. Showell HJ, Freer RJ, Zigmond SH, Schiffmann E, Aswanikumar S, Corcoran B, et al. The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal secretion for neutrophils. *J Exp Med*. 1976;143(5):1154-69.
21. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5.
22. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol*. 2009;30(11):513-21.
23. Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front Immunol*. 2014;5:508.
24. Joubert P, Cordeau ME, Boyer A, Silversides DW, Lavoie JP. Cytokine expression by peripheral blood neutrophils from heaves-affected horses before and after allergen challenge. *Vet J*. 2008;178(2):227-32.
25. 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.
26. Kennedy AD, DeLeo FR. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res*. 2009;43(1-3):25-61.
27. Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest*. 1989;83(3):865-75.
28. McCracken JM, Allen LA. Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease. *J Cell Death*. 2014;7:15-23.
29. Oh H, Siano B, Diamond S. Neutrophil isolation protocol. *J Vis Exp*. 2008(17).
30. Pertoft H, Laurent TC, Laas T, Kagedal L. Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). *Anal Biochem*. 1978;88(1):271-82.
31. Tamassia N, Cassatella MA, Bazzoni F. Fast and accurate quantitative analysis of cytokine gene expression in human neutrophils. *Methods Mol Biol*. 2014;1124:451-67.
32. 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.
33. Barnes PJ. New molecular targets for the treatment of neutrophilic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(5):1055-62; quiz 63-4.
34. 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.
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. Linden A, Hoshino H, Laan M. Airway neutrophils and interleukin-17. *Eur Respir J*. 2000;15(5):973-7.
37. Xiu Q, Fujimura M, Nomura M, Saito M, Matsuda T, Akao N, et al. Bronchial hyperresponsiveness and airway neutrophil accumulation induced by interleukin-8 and the effect of the thromboxane A2 antagonist S-1452 in guinea-pigs. *Clin Exp Allergy*. 1995;25(1):51-9.
38. Linden A, Laan M, Anderson GP. Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. *Eur Respir J*. 2005;25(1):159-72.
39. Matsumoto K, Aizawa H, Inoue H, Koto H, Nakano H, Hara N. Role of neutrophil elastase in ozone-induced airway responses in guinea-pigs. *Eur Respir J*. 1999;14(5):1088-94.
40. Suzuki T, Wang W, Lin JT, Shirato K, Mitsuhashi H, Inoue H. Aerosolized human neutrophil elastase induces airway constriction and hyperresponsiveness with protection by intravenous pretreatment with half-length secretory leukoprotease inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153(4 Pt 1):1405-11.
41. Janoff A, Sloan B, Weinbaum G, Damiano V, Sandhaus RA, Elias J, et al. Experimental emphysema induced with purified human neutrophil elastase: tissue localization of the instilled protease. *Am Rev Respir Dis*. 1977;115(3):461-78.
42. Sommerhoff CP, Nadel JA, Basbaum CB, Caughey GH. Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. *J Clin Invest*. 1990;85(3):682-9.
43. Cardell LO, Agusti C, Takeyama K, Stjarne P, Nadel JA. LTB(4)-induced nasal gland serous cell secretion mediated by neutrophil elastase. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(2):411-4.
44. Takafuji S, Ishida A, Miyakuni Y, Nakagawa T. Matrix metalloproteinase-9 release from human leukocytes. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2003;13(1):50-5.
45. Cataldo DD, Bettioli J, Noel A, Bartsch P, Foidart JM, Louis R. Matrix metalloproteinase-9, but not tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, increases in the sputum from allergic asthmatic patients after allergen challenge. *Chest*. 2002;122(5):1553-9.
46. McKay LI, Cidlowski, John A. Physiologic and Pharmacologic effects of corticosteroids *Holland-Frei Cancer Medicine 6th edition ed2003*.
47. Klein BG. *Veterinary Physiology*. Fifth edition ed: Elsevier Saunders 2013. 608 p.
48. Rashid S, Lewis GF. The mechanisms of differential glucocorticoid and mineralocorticoid action in the brain and peripheral tissues. *Clin Biochem*. 2005;38(5):401-9.
49. Strehl C, Buttgerit F. Optimized glucocorticoid therapy: teaching old drugs new tricks. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;380(1-2):32-40.
50. Hall JE. *Medical Physiology*. Twelfth Edition ed2011 2011.
51. Barnes PJ. Pathophysiology of asthma. *Br J Clin Pharmacol*. 1996;42(1):3-10.
52. Golan DE, Tashjian, Armen H., Armstrong, Ehrin J., Armstrong, April W. *Principles of Pharmacology*. Third Edition ed2012 2012. 954 p.
53. Newton R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax*. 2000;55(7):603-13.
54. Ito K, Chung KF, Adcock IM. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(3):522-43.
55. Smoak KA, Cidlowski JA. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2004;125(10-11):697-706.

56. Pujols L, Mullol J, Torrego A, Picado C. Glucocorticoid receptors in human airways. *Allergy*. 2004;59(10):1042-52.
57. Encio IJ, Detera-Wadleigh SD. The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*. 1991;266(11):7182-8.
58. Lu NZ, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol*. 2006;16(6):301-7.
59. Yudit MR, Cidlowski JA. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol*. 2002;16(8):1719-26.
60. Losel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K, et al. Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev*. 2003;83(3):965-1016.
61. Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. *J Biol Chem*. 1996;271(16):9550-9.
62. Bamberger CM, Bamberger AM, de Castro M, Chrousos GP. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest*. 1995;95(6):2435-41.
63. Lu NZ, Cidlowski JA. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1024:102-23.
64. Oakley RH, Jewell CM, Yudit MR, Bofetiado DM, Cidlowski JA. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem*. 1999;274(39):27857-66.
65. Hamid QA, Wenzel SE, Hauk PJ, Tsiopoulos A, Wallaert B, Lafitte JJ, et al. Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(5 Pt 1):1600-4.
66. Honda M, Orii F, Ayabe T, Imai S, Ashida T, Obara T, et al. Expression of glucocorticoid receptor beta in lymphocytes of patients with glucocorticoid-resistant ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2000;118(5):859-66.
67. Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet*. 2009;373(9678):1905-17.
68. Barnes PJ. Glucocorticosteroids: current and future directions. *Br J Pharmacol*. 2011;163(1):29-43.
69. Pujols L, Mullol J, Picado C. Alpha and beta glucocorticoid receptors: relevance in airway diseases. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2007;7(2):93-9.
70. Barnes PJ. Inhaled Corticosteroids. *Pharmaceuticals*. 2010;3(3):514-40.
71. Barnes PJ. Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur Respir J*. 2006;27(2):413-26.
72. Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)*. 1998;94(6):557-72.
73. Zijlstra GJ, Ten Hacken NH, Hoffmann RF, van Oosterhout AJ, Heijink IH. Interleukin-17A induces glucocorticoid insensitivity in human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J*. 2012;39(2):439-45.
74. Stellato C. Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1(3):255-63.
75. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev*. 2000;52(4):513-56.

76. Schulz M, Schneider S, Lottspeich F, Renkawitz R, Eggert M. Identification of nucleolin as a glucocorticoid receptor interacting protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280(2):476-80.
77. Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, et al. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *Faseb j.* 2004;18(1):70-80.
78. Buttgereit F, Scheffold A. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids.* 2002;67(6):529-34.
79. Buttgereit F, Straub RH, Wehling M, Burmester GR. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum.* 2004;50(11):3408-17.
80. Hafezi-Moghadam A, Simoncini T, Yang Z, Limbourg FP, Plumier JC, Rebsamen MC, et al. Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med.* 2002;8(5):473-9.
81. Coates TD, Wolach B, Tzeng DY, Higgins C, Baehner RL, Boxer LA. The mechanism of action of the antiinflammatory agents dexamethasone and Auranofin in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood.* 1983;62(5):1070-7.
82. Schleimer RP, Freeland HS, Peters SP, Brown KE, Derse CP. An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotriene B4 by purified human neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989;250(2):598-605.
83. Clark RA, Gallin JI, Fauci AS. Effects of in vivo prednisone on in vitro eosinophil and neutrophil adherence and chemotaxis. *Blood.* 1979;53(4):633-41.
84. Richard EA, Pitel PH, Lemaitre L, Jas D, Lekeux P, Pronost S, et al. Stimulation of airway neutrophils following dexamethasone administration and equid herpesvirus-2 challenge in horses. *Vet J.* 2014;199(1):181-3.
85. Liles WC, Dale DC, Klebanoff SJ. Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. *Blood.* 1995;86(8):3181-8.
86. Saffar AS, Ashdown H, Gounni AS. The molecular mechanisms of glucocorticoids-mediated neutrophil survival. *Curr Drug Targets.* 2011;12(4):556-62.
87. Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ.* 2004;11 Suppl 1:S45-55.
88. Wen LP, Madani K, Fahrni JA, Duncan SR, Rosen GD. Dexamethasone inhibits lung epithelial cell apoptosis induced by IFN-gamma and Fas. *Am J Physiol.* 1997;273(5 Pt 1):L921-9.
89. Messmer UK, Pereda-Fernandez C, Manderscheid M, Pfeilschifter J. Dexamethasone inhibits TNF-alpha-induced apoptosis and IAP protein downregulation in MCF-7 cells. *Br J Pharmacol.* 2001;133(4):467-76.
90. Mendoza-Milla C, Machuca Rodriguez C, Cordova Alarcon E, Estrada Bernal A, Toledo-Cuevas EM, Martinez Martinez E, et al. NF-kappaB activation but not PI3K/Akt is required for dexamethasone dependent protection against TNF-alpha cytotoxicity in L929 cells. *FEBS Lett.* 2005;579(18):3947-52.
91. Baumann S, Dostert A, Novac N, Bauer A, Schmid W, Fas SC, et al. Glucocorticoids inhibit activation-induced cell death (AICD) via direct DNA-dependent repression

- of the CD95 ligand gene by a glucocorticoid receptor dimer. *Blood*. 2005;106(2):617-25.
92. Chang LC, Madsen SA, Toelboell T, Weber PS, Burton JL. Effects of glucocorticoids on Fas gene expression in bovine blood neutrophils. *J Endocrinol*. 2004;183(3):569-83.
 93. Mikosz CA, Brickley DR, Sharkey MS, Moran TW, Conzen SD. Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, *sgk-1*. *J Biol Chem*. 2001;276(20):16649-54.
 94. Wu W, Pew T, Zou M, Pang D, Conzen SD. Glucocorticoid receptor-induced MAPK phosphatase-1 (MPK-1) expression inhibits paclitaxel-associated MAPK activation and contributes to breast cancer cell survival. *J Biol Chem*. 2005;280(6):4117-24.
 95. Barnes PJ. Corticosteroid resistance in airway disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1(3):264-8.
 96. Szeffler SJ, Leung DY. Glucocorticoid-resistant asthma: pathogenesis and clinical implications for management. *Eur Respir J*. 1997;10(7):1640-7.
 97. Irusen E, Matthews JG, Takahashi A, Barnes PJ, Chung KF, Adcock IM. p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: Role in steroid-insensitive asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2002;109(4):649-57.
 98. 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.
 99. Vazquez-Tello A, Semlali A, Chakir J, Martin JG, Leung DY, Eidelman DH, et al. Induction of glucocorticoid receptor-beta expression in epithelial cells of asthmatic airways by T-helper type 17 cytokines. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(9):1312-22.
 100. Torrego A, Pujols L, Roca-Ferrer J, Mullol J, Xaubet A, Picado C. Glucocorticoid receptor isoforms alpha and beta in in vitro cytokine-induced glucocorticoid insensitivity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(4):420-5.
 101. Goecke A, Guerrero J. Glucocorticoid receptor beta in acute and chronic inflammatory conditions: clinical implications. *Immunobiology*. 2006;211(1-2):85-96.
 102. Leung DY, Hamid Q, Vottero A, Szeffler SJ, Surs W, Minshall E, et al. Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta. *J Exp Med*. 1997;186(9):1567-74.
 103. Bergeron C, Fukakusa M, Olivenstein R, Lemiere C, Shannon J, Ernst P, et al. Increased glucocorticoid receptor- β expression, but not decreased histone deacetylase 2, in severe asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006;117(3):703-5.
 104. Hew M, Bhavsar P, Torrego A, Meah S, Khorasani N, Barnes PJ, et al. Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(2):134-41.
 105. Price AE, Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM. Marking and quantifying IL-17A-producing cells in vivo. *PLoS One*. 2012;7(6):e39750.
 106. Fossiez F, Djossou O, Chomar P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*. 1996;183(6):2593-603.

107. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:821-52.
108. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986;136(7):2348-57.
109. Rouvier E, Luciani MF, Mattei MG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol.* 1993;150(12):5445-56.
110. Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, et al. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol.* 1995;155(12):5483-6.
111. Gaffen SL. Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Curr Opin Immunol.* 2011;23(5):613-9.
112. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(8):556-67.
113. Kim J, Jordan M. Diversity of IL-17-producing T lymphocytes. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2013;70(13):2271-90.
114. Steinman L. Mixed results with modulation of TH-17 cells in human autoimmune diseases. *Nat Immunol.* 2010;11(1):41-4.
115. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004;21(4):467-76.
116. Linden A, Dahlen B. Interleukin-17 cytokine signalling in patients with asthma. *Eur Respir J.* 2014;44(5):1319-31.
117. Flierl MA, Rittirsch D, Gao H, Hoesel LM, Nadeau BA, Day DE, et al. Adverse functions of IL-17A in experimental sepsis. *Faseb j.* 2008;22(7):2198-205.
118. Bosmann M, Sarma JV, Atefi G, Zetoune FS, Ward PA. Evidence for anti-inflammatory effects of C5a on the innate IL-17A/IL-23 axis. *Faseb j.* 2012;26(4):1640-51.
119. Takahashi N, Vanlaere I, de Rycke R, Cauwels A, Joosten LA, Lubberts E, et al. IL-17 produced by Paneth cells drives TNF-induced shock. *J Exp Med.* 2008;205(8):1755-61.
120. Karthikeyan RS, Vareechon C, Prajna NV, Dharmalingam K, Pearlman E, Lalitha P. Interleukin 17 expression in peripheral blood neutrophils from fungal keratitis patients and healthy cohorts in southern India. *J Infect Dis.* 2015;211(1):130-4.
121. Taylor PR, Roy S, Leal SM, Jr., Sun Y, Howell SJ, Cobb BA, et al. Activation of neutrophils by autocrine IL-17A-IL-17RC interactions during fungal infection is regulated by IL-6, IL-23, RORgammat and dectin-2. *Nat Immunol.* 2014;15(2):143-51.
122. Hueber AJ, Asquith DL, Miller AM, Reilly J, Kerr S, Leipe J, et al. Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol.* 2010;184(7):3336-40.
123. Reynolds JM, Angkasekwinai P, Dong C. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21(6):413-23.
124. Wright JF, Guo Y, Quazi A, Luxenberg DP, Bennett F, Ross JF, et al. Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells. *J Biol Chem.* 2007;282(18):13447-55.
125. Chang SH, Dong C. A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. *Cell Res.* 2007;17(5):435-40.

126. Wright JF, Bennett F, Li B, Brooks J, Luxenberg DP, Whitters MJ, et al. The human IL-17F/IL-17A heterodimeric cytokine signals through the IL-17RA/IL-17RC receptor complex. *J Immunol*. 2008;181(4):2799-805.
127. Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, et al. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucosal bacterial infection and allergic responses. *Immunity*. 2009;30(1):108-19.
128. Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol*. 2002;71(1):1-8.
129. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):479-89.
130. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485-517.
131. Ivanov, II, Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol*. 2007;19(6):409-17.
132. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*. 2007;8(9):942-9.
133. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*. 2007;8(9):950-7.
134. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006;126(6):1121-33.
135. Kellner H. Targeting interleukin-17 in patients with active rheumatoid arthritis: rationale and clinical potential. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2013;5(3):141-52.
136. Hieshima K, Imai T, Opdenakker G, Van Damme J, Kusuda J, Tei H, et al. Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J Biol Chem*. 1997;272(9):5846-53.
137. Baba M, Imai T, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Hieshima K, et al. Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J Biol Chem*. 1997;272(23):14893-8.
138. Ichiyama K, Yoshida H, Wakabayashi Y, Chinen T, Saeki K, Nakaya M, et al. Foxp3 inhibits RORgamma-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with RORgamma. *J Biol Chem*. 2008;283(25):17003-8.
139. Bovenschen HJ, van de Kerkhof PC, van Erp PE, Woestenenk R, Joosten I, Koenen HJ. Foxp3+ regulatory T cells of psoriasis patients easily differentiate into IL-17A-producing cells and are found in lesional skin. *J Invest Dermatol*. 2011;131(9):1853-60.
140. Koenen HJ, Smeets RL, Vink PM, van Rijssen E, Boots AM, Joosten I. Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood*. 2008;112(6):2340-52.
141. Yang XP, Ghoreschi K, Steward-Tharp SM, Rodriguez-Canales J, Zhu J, Grainger JR, et al. Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. *Nat Immunol*. 2011;12(3):247-54.
142. Chen Z, Laurence A, Kanno Y, Pacher-Zavisin M, Zhu BM, Tato C, et al. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(21):8137-42.

143. Minegishi Y, Karasuyama H. Genetic origins of hyper-IgE syndrome. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2008;8(5):386-91.
144. Schraml BU, Hildner K, Ise W, Lee W-L, Smith WAE, Solomon B, et al. The AP-1 transcription factor Batf controls TH17 differentiation. *Nature.* 2009;460(7253):405-9.
145. Linden A. A role for the cytoplasmic adaptor protein Act1 in mediating IL-17 signaling. *Sci STKE.* 2007;2007(398):re4.
146. Chang SH, Park H, Dong C. Act1 adaptor protein is an immediate and essential signaling component of interleukin-17 receptor. *J Biol Chem.* 2006;281(47):35603-7.
147. Novatchkova M, Leibbrandt A, Werzowa J, Neubuser A, Eisenhaber F. The STIR-domain superfamily in signal transduction, development and immunity. *Trends Biochem Sci.* 2003;28(5):226-9.
148. Huang F, Kao CY, Wachi S, Thai P, Ryu J, Wu R. Requirement for both JAK-mediated PI3K signaling and ACT1/TRAF6/TAK1-dependent NF-kappaB activation by IL-17A in enhancing cytokine expression in human airway epithelial cells. *J Immunol.* 2007;179(10):6504-13.
149. Ivanov S, Linden A. Interleukin-17 as a drug target in human disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(2):95-103.
150. 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.
151. 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.
152. Aaron SD, Angel JB, Lunau M, Wright K, Fex C, Le Saux N, et al. Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(2):349-55.
153. Noguera A, Batle S, Miralles C, Iglesias J, Busquets X, MacNee W, et al. Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2001;56(6):432-7.
154. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity.* 2008;28(4):454-67.
155. Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lotvall J, Sjostrand M, Gruenert DC, et al. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol.* 1999;162(4):2347-52.
156. Debrue M, Hamilton E, Joubert P, Lajoie-Kadoch S, Lavoie JP. Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005;105(1-2):25-31.
157. Ainsworth DM, Wagner B, Erb HN, Young JC, Retallick DE. Effects of in vitro exposure to hay dust on expression of interleukin-17, -23, -8, and -1beta and chemokine (C-X-C motif) ligand 2 by pulmonary mononuclear cells isolated from horses chronically affected with recurrent airway disease. *Am J Vet Res.* 2007;68(12):1361-9.
158. Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, Lazzeri E, Tamassia N, Costantini C, et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood.* 2010;115(2):335-43.

159. 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.
160. 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.
161. Laan M, Palmberg L, Larsson K, Linden A. Free, soluble interleukin-17 protein during severe inflammation in human airways. *Eur Respir J.* 2002;19(3):534-7.
162. Zhu YK, Liu XD, Skold CM, Umino T, Wang HJ, Spurzem JR, et al. Synergistic neutrophil elastase-cytokine interaction degrades collagen in three-dimensional culture. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;281(4):L868-78.
163. Hoshino H, Laan M, Sjostrand M, Lotvall J, Skoogh BE, Linden A. Increased elastase and myeloperoxidase activity associated with neutrophil recruitment by IL-17 in airways in vivo. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105(1 Pt 1):143-9.
164. 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.
165. Little SA, Chalmers GW, MacLeod KJ, McSharry C, Thomson NC. Non-invasive markers of airway inflammation as predictors of oral steroid responsiveness in asthma. *Thorax.* 2000;55(3):232-4.
166. McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, Dupont RB, Kapadia S, Logar A, et al. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol.* 2008;181(6):4089-97.
167. Matsuzaki G, Umemura M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunol.* 2007;51(12):1139-47.
168. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(5):337-48.
169. Ivanov S, Palmberg L, Venge P, Larsson K, Linden A. Interleukin-17A mRNA and protein expression within cells from the human bronchoalveolar space after exposure to organic dust. *Respir Res.* 2005;6:44.
170. Hueber W, Patel DD, Dryja T, Wright AM, Koroleva I, Bruin G, et al. Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Sci Transl Med.* 2010;2(52):52ra72.
171. Genovese MC, Van den Bosch F, Roberson SA, Bojin S, Biagini IM, Ryan P, et al. LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: A phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *Arthritis Rheum.* 2010;62(4):929-39.
172. 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.
173. Papp KA, Leonardi C, Menter A, Ortonne JP, Krueger JG, Kricorian G, et al. Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. *N Engl J Med.* 2012;366(13):1181-9.
174. Leonardi C, Matheson R, Zachariae C, Cameron G, Li L, Edson-Heredia E, et al. Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med.* 2012;366(13):1190-9.
175. Loftus JP, Williams JM, Belknap JK, Black SJ. In vivo priming and ex vivo activation of equine neutrophils in black walnut extract-induced equine laminitis is

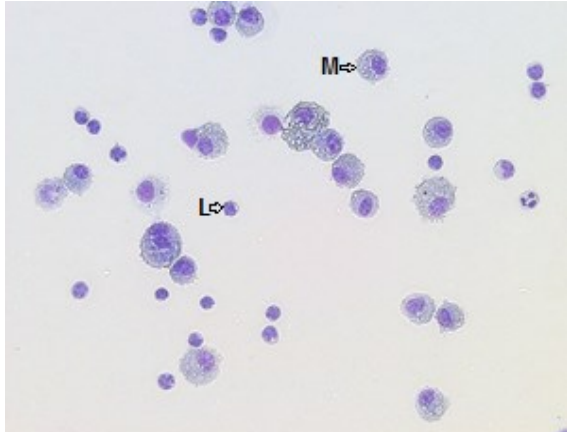
- not attenuated by systemic lidocaine administration. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010;138(1-2):60-9.
176. Kuijpers TW, Tool AT, van der Schoot CE, Ginsel LA, Onderwater JJ, Roos D, et al. Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation. *Blood.* 1991;78(4):1105-11.
 177. Corbi AL, Kishimoto TK, Miller LJ, Springer TA. The human leukocyte adhesion glycoprotein Mac-1 (complement receptor type 3, CD11b) alpha subunit. Cloning, primary structure, and relation to the integrins, von Willebrand factor and factor B. *J Biol Chem.* 1988;263(25):12403-11.
 178. Miller LJ, Bainton DF, Borregaard N, Springer TA. Stimulated mobilization of monocyte Mac-1 and p150,95 adhesion proteins from an intracellular vesicular compartment to the cell surface. *J Clin Invest.* 1987;80(2):535-44.
 179. Simms HH, D'Amico R. Lipopolysaccharide induces intracytoplasmic migration of the polymorphonuclear leukocyte CD11b/CD18 receptor. *Shock.* 1995;3(3):196-203.
 180. Lehr HA, Krombach F, Munzing S, Bodlaj R, Glaubitt SI, Seiffge D, et al. In vitro effects of oxidized low density lipoprotein on CD11b/CD18 and L-selectin presentation on neutrophils and monocytes with relevance for the in vivo situation. *Am J Pathol.* 1995;146(1):218-27.
 181. Wakefield CH, Carey PD, Foulds S, Monson JR, Guillou PJ. Polymorphonuclear leukocyte activation. An early marker of the postsurgical sepsis response. *Arch Surg.* 1993;128(4):390-5.
 182. Olsen J, Kokholm K, Noren O, Sjostrom H. Structure and expression of aminopeptidase N. *Adv Exp Med Biol.* 1997;421:47-57.
 183. 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.
 184. Leguillette R. Recurrent airway obstruction--heaves. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2003;19(1):63-86, vi.
 185. 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.
 186. Lowell FC. Observations on heaves. An asthma-like syndrome in the horse. 1964. *Allergy Proc.* 1990;11(3):149-50; discussion 7-8.
 187. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology.* 2011;16(7):1027-46.
 188. 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.
 189. Dragon S, Saffar AS, Shan L, Gounni AS. IL-17 attenuates the anti-apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils. *Mol Immunol.* 2008;45(1):160-8.
 190. Ho AW, Shen F, Conti HR, Patel N, Childs EE, Peterson AC, et al. IL-17RC is required for immune signaling via an extended SEF/IL-17R signaling domain in the cytoplasmic tail. *J Immunol.* 2010;185(2):1063-70.
 191. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000;25(2):169-93.

192. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods*. 2006;38(4):283-93.
193. Joubert P, Silversides DW, Lavoie JP. Equine neutrophils express mRNA for tumour necrosis factor-alpha, interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, macrophage-inflammatory-protein-2 but not for IL-4, IL-5 and interferon-gamma. *Equine Vet J*. 2001;33(7):730-3.
194. Jones CE, Chan K. Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;26(6):748-53.
195. Alagappan VK, de Boer WI, Misra VK, Mooi WJ, Sharma HS. Angiogenesis and vascular remodeling in chronic airway diseases. *Cell Biochem Biophys*. 2013;67(2):219-34.
196. 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.
197. 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.
198. 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.
199. Lavoie JP, Leguillette 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.
200. 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.
201. 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.
202. Chang MM, Juarez M, Hyde DM, Wu R. Mechanism of dexamethasone-mediated interleukin-8 gene suppression in cultured airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280(1):L107-15.
203. Plumb J, Gaffey K, Kane B, Malia-Milanes B, Shah R, Bentley A, et al. Reduced glucocorticoid receptor expression and function in airway neutrophils. *Int Immunopharmacol*. 2012;12(1):26-33.
204. Bajoriuniene I, Malakauskas K, Lavinskiene S, Jeroch J, Gasiuniene E, Vitkauskiene A, et al. Peripheral blood Th17 cells and neutrophils in *Dermatophagoides pteronyssinus*-induced early- and late-phase asthmatic response. *Medicina (Kaunas)*. 2012;48(9):442-51.
205. Boggio E, Clemente N, Mondino A, Cappellano G, Orilieri E, Gigliotti CL, et al. IL-17 protects T cells from apoptosis and contributes to development of ALPS-like phenotypes. *Blood*. 2014;123(8):1178-86.
206. Ohara T, Morishita T, Suzuki H, Masaoka T, Ishii H. Perforin and granzyme B of cytotoxic T lymphocyte mediate apoptosis irrespective of *Helicobacter pylori* infection: possible act as a trigger of peptic ulcer formation. *Hepatogastroenterology*. 2003;50(54):1774-9.

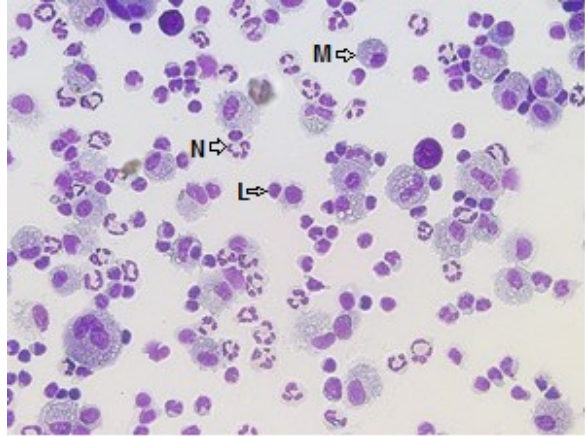
207. Burrows GE. Dose-response of ponies to parenteral *Escherichia coli* endotoxin. *Can J Comp Med.* 1981;45(2):207-10.
208. Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:635-700.
209. Ngkelo A, Meja K, Yeadon M, Adcock I, Kirkham PA. LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and Gialpha dependent PI-3kinase signalling. *J Inflamm (Lond).* 2012;9(1):1.
210. Dutkiewicz J, Pomorski ZJH, Sitkowska J, Krysinska-Traczyk E, Skorska C, Prazmo Z, et al. Airborne microorganisms and endotoxin in animal houses. *Grana.* 1994;33(2):85-90.
211. Olenchock SA, Murphy SA, Mull JC, Lewis DM. Endotoxin and complement activation in an analysis of environmental dusts from a horse barn. *Scand J Work Environ Health.* 1992;18 Suppl 2:58-9.
212. Robinson NE. International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University 16-18 June 2000. *Equine Vet J.* 2001;33(1):5-19.
213. 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.
214. Kim YK, Oh SY, Jeon SG, Park HW, Lee SY, Chun EY, et al. Airway exposure levels of lipopolysaccharide determine type 1 versus type 2 experimental asthma. *J Immunol.* 2007;178(8):5375-82.
215. Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, et al. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol.* 2011;31(5):379-446.
216. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol.* 1999;75(2-3):291-5.
217. Bhatia P, Taylor WR, Greenberg AH, Wright JA. Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Anal Biochem.* 1994;216(1):223-6.
218. Bereta J, Bereta M. Stimulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA levels by endogenous nitric oxide in cytokine-activated endothelium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;217(1):363-9.
219. Chang TJ, Juan CC, Yin PH, Chi CW, Tsay HJ. Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma. *Oncol Rep.* 1998;5(2):469-71.
220. Glare EM, Divjak M, Bailey MJ, Walters EH. beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax.* 2002;57(9):765-70.
221. Jiang L, Yao C, Jin Q, Li B. [Effect of interleukin-17 on neutrophil apoptosis in patients with tuberculosis]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2014;30(8):833-6.
222. Wang W, Zhou A, Zhang X, Xiang Y, Huang Y, Wang L, et al. Interleukin 17A promotes pneumococcal clearance by recruiting neutrophils and inducing apoptosis through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism in acute otitis media. *Infect Immun.* 2014;82(6):2368-77.

Annexe A

Control



Souffle



Annexe A. Cytologies représentatives du LBA d'un cheval contrôlé et d'un cheval atteint du souffle. Les macrophages et les lymphocytes prédominent dans l'échantillon alors que chez les chevaux atteints de souffle en crise, on observe une prévalence de neutrophiles. (*N* : neutrophiles, *L* : Lymphocytes. *M* : macrophages). (Courtoisie Laboratoire de biologie respiratoire moléculaire – Université de Montréal).

Annexe B

Liste d'amorces des gènes de référence testés dans notre projet

Gène de ménage	Sens 5'-3'	Anti-sens 3'-5'
GAPDH	CACCCAGAAGACCGTGGATG	TGCCAGTGAGCTTCCCATTC
UBIQUITIN	TAGCAGTTTCTTCGTGTCCGT	TGTAATCGGAAAGAGTGCGG
e18S	GCAATTATTCCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCAA
HPRT1	TTATGGACAGGACTGAACGGCTTG	GCTACTGTAATGACCAGTCAACAGG

