

Université de Montréal

**RÔLE DES NEUTROPHILES DANS L'INFLAMMATION ALLERGIQUE ASSOCIÉE AU SOUFFLE  
CHEZ LE CHEVAL, UN MODÈLE NATUREL D'ASTHME**

par

ANOUK LAVOIE-LAMOUREUX

Département des sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

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

Avril, 2011

© Anouk Lavoie-Lamoureux, 2011

Université de Montréal  
Faculté de médecine vétérinaire

Cette thèse intitulée

**RÔLE DES NEUTROPHILES DANS L'INFLAMMATION ALLERGIQUE ASSOCIÉE AU SOUFFLE CHEZ  
LE CHEVAL, UN MODÈLE NATUREL D'ASTHME**

présentée par

Anouk Lavoie-Lamoureux

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Marcelo Gottschalck, président-rapporteur

Jean-Pierre Lavoie, directeur de recherche

James G Martin, codirecteur

Mariela A. Segura, membre du jury

Élyse Bissonnette, examinatrice externe

Daniel Jean, représentant du doyen de la FES

## Résumé

L'asthme chez l'homme et le souffle chez le cheval sont des maladies inflammatoires chroniques des voies respiratoires partageant plusieurs caractéristiques physiopathologiques dont la bronchoconstriction réversible, l'inflammation des voies respiratoires inférieures, l'hyperréactivité bronchique et le remodelage tissulaire. Les phénotypes cliniques d'asthme se caractérisent en partie selon le type d'inflammation affectant les voies respiratoires et la présence ou non d'allergie. Le souffle chez le cheval s'avère être un modèle adapté pour l'étude des mécanismes impliqués dans l'asthme neutrophilique, lesquels demeurent particulièrement mal compris, en contraste avec ceux associés avec l'asthme éosinophilique. La réponse immunologique sous-jacente au souffle implique entre autres l'expression de cytokines de type Th2, suggestives d'une réponse allergique (immunité acquise). La poussière environnementale qui provoque les symptômes du souffle contient également des agents non-spécifiques dérivés de bactéries, champignons et moisissures, susceptibles d'activer des mécanismes immunitaires innés chez les chevaux atteints du souffle.

Nous avons étudié le rôle des neutrophiles dans l'inflammation associée à la réponse innée et acquise chez le cheval atteint du souffle. Dans un premier temps, l'effet de produits dérivés de bactéries sur l'activation des neutrophiles sanguins provenant de chevaux normaux et atteints de souffle a été étudié dans le but d'évaluer la contribution de la réponse innée dans la physiopathologie du souffle. Nous avons évalué l'effet de l'IL-4, une cytokine de type Th2, sur les neutrophiles des deux groupes de chevaux afin d'évaluer de quelle manière le neutrophile peut participer à la réponse acquise associée à la réponse allergique. Finalement, nous avons étudié l'expression des isoformes de l'arginase par les neutrophiles équins car cette enzyme métabolise la L-arginine et est potentiellement impliquée dans le bronchospasme et le remodelage tissulaire associés à l'asthme.

Nos résultats suggèrent que les neutrophiles et les mononucléaires sanguins isolés des chevaux atteints du souffle possèdent une réponse inflammatoire exagérée en réponse aux lipopolysaccharides et peptides formylés et surexpriment les cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , TNF et IL-8. Cette réponse innée aberrante est associée à une inflammation systémique caractérisée par des concentrations sériques élevées de TNF chez les chevaux atteints du souffle en période de rémission clinique. De plus, nos résultats montrent que l'IL-4 active le neutrophile équin et favorise son chimiotactisme de manière autocrine. L'IL-4 induit un

phénotype d'activation typique dans le neutrophile équin, caractérisé par l'expression accrue de cytokines pro-inflammatoires (IL-8 et TNF) ainsi que de récepteurs potentiellement impliqués dans la réponse allergique (IL-4R $\alpha$  et CD23). Enfin, nous montrons que que l'arginase 1 n'est pas un marqueur de l'activation des neutrophiles équins par l'IL-4, mais que ces cellules expriment constitutivement l'isoforme 2 fonctionnelle de l'arginase. La surrégulation des deux isoformes au niveau des poumons périphériques semble être associée à la pathologie du souffle, ce qui est en accord avec les modèles d'asthme chez la souris, le rat et le cobaye. L'ensemble de ces travaux suggère que les neutrophiles puissent agir comme cellules effectrices importantes de la réponse innée et acquise dans la pathophysiologie du souffle, un modèle naturel d'asthme neutrophilique.

**Mots-clés** : neutrophiles, souffle, asthme, réponse immunitaire innée, réponse allergique, cytokines de type Th2, arginase, cytokines pro-inflammatoires, inflammation systémique, phénotype cellulaire



## Abstract

Human asthma and equine heaves are chronic pulmonary diseases sharing several pathophysiological properties including lower airway inflammation, reversible bronchoconstriction, bronchial hyperresponsiveness, and tissue remodeling. Clinical phenotypes of asthma are characterized in part by the inflammatory cell populations infiltrating the airways, and the presence or absence of allergy. Heaves is a suitable animal model for the study of the poorly defined pathophysiological processes leading to airway neutrophilia. The immune response in heaves involves Th2 cytokine expression, which is, among other features, associated to allergic inflammation (acquired immunity). Environmental dust exposure leading to clinical exacerbation of heaves contains non-specific agents derived from bacteria, molds or fungi which could also activate innate immune responses in heaves affected horses.

We studied the role of neutrophils in innate and acquired immune responses in heaves affected-horses. First, innate immune responses of neutrophils isolated from normal and heaves-affected horses to bacterial-derived products were studied. We also assessed the effect of IL-4, a Th2 cytokine, on equine neutrophils isolated from both groups of horses. Finally, we evaluated the arginase isoforms expressed by equine neutrophils as this enzyme that takes part to the L-arginine metabolism and is thought to contribute to bronchospasm and tissue remodeling associated with asthma.

Our results suggest that both neutrophils and mononuclear cells from heaves-affected horses, when compared to healthy horses, have an excessive inflammatory response to lipopolysaccharides and formylated peptides, characterized by increased IL-1 $\beta$ , IL-8 and TNF expression. This altered innate response was associated with systemic inflammation in asymptomatic susceptible horses as high serum TNF concentrations were detected. Furthermore, we found that equine neutrophils are activated by IL-4 and release neutrophil chemotactic factors in response to this cytokine. IL-4 also induces a distinctive activation phenotype in neutrophils that is characterized by increased expression of pro-inflammatory cytokines (IL-8 and TNF) and receptors (IL-4R $\alpha$  and CD23), potentially involved in the allergic response. Finally, we showed that arginase 1 is not a marker of IL-4-activated equine neutrophils although they constitutively express the functionally active isoform 2 of the enzyme. The up-regulation of arginase isoforms in the peripheral lungs of horses with heaves suggests a role for arginase in this model, as it is described in the mouse, rat and guinea pig

models. Taken together, this work suggest that neutrophils could play an important role in both innate and acquired immune responses associated with heaves pathophysiology, a natural model of neutrophilic asthma.

**Keywords** : neutrophils, heaves, asthma, innate immunity, allergic response, Th2-type cytokines, arginase, pro-inflammatory cytokines, systemic inflammation, cellular phenotype

## Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	v
Table des matières .....	vii
Liste des tableaux .....	xi
Liste des figures .....	xii
Liste des abréviations .....	xv
Remerciements .....	xix
Introduction.....	1
<b>Recension des écrits</b> .....	5
Maladies inflammatoires chroniques des voies respiratoires : mécanismes impliqués.....	6
Caractéristiques anatomiques et physiologiques du poumon .....	7
Chez l'homme.....	7
Particularités chez le cheval .....	9
Système de défense pulmonaire .....	12
Mécanismes de défense immunitaire innés .....	12
Mécanismes physico-chimiques .....	12
Mécanismes immunologiques .....	13
La réponse inflammatoire.....	13
Les cytokines pro-inflammatoires .....	15
Toll-like Receptors (TLRs) .....	19
Récepteur des peptides formylés (FPR).....	20
Cellules épithéliales.....	22
Macrophages.....	24
Cellules métachromatiques : mastocytes et basophiles.....	26
Neutrophiles .....	29
Granulopoïèse, granules et processus de dégranulation .....	29
Recrutement.....	33
Roulement, adhésion ferme, transmigration et molécules impliquées.....	33
Mécanismes de migration du neutrophile : changements morphologiques, chimiokines et autres agonistes .....	37

Expression par les neutrophiles de récepteurs associés à la réponse immunitaire innée .....	40
Les neutrophiles tissulaires .....	42
Production de cytokines et chimiokines par les neutrophiles.....	43
TNF .....	44
IL-1 $\beta$ .....	45
IL-8 (CXCL8).....	45
Particularités du neutrophile équin .....	46
Apoptose.....	47
Mécanismes de l'apoptose spontanée chez le neutrophile.....	47
La réponse immunitaire acquise: .....	52
Cellules dendritiques.....	52
Différents types de cellules dendritiques.....	52
Activation des cellules dendritiques : tolérance versus activation de la réponse immunitaire .....	53
Lymphocytes .....	55
Lymphocytes B.....	55
Particularités du cheval .....	56
Lymphocytes T .....	56
Th1 et réponse à médiation cellulaire.....	56
Th2, réponse humorale et allergie .....	57
Th17.....	58
Treg.....	59
Résolution de l'inflammation .....	60
Égression des leucocytes.....	60
Processus de cicatrisation normale .....	60
Effet de l'inflammation chronique sur la fonction respiratoire .....	62
Remodelage tissulaire .....	62
Asthme : définition par phénotypes cliniques.....	64
L'asthme extrinsèque: hypersensibilité de type I et atopie .....	66
L'asthme intrinsèque et mécanismes impliqués .....	67
Autres spécifications et terminologies par rapport à l'asthme sévère .....	69

Phénotypes cliniques basés sur le type d'inflammation .....	69
Le rôle de l'immunité innée dans l'asthme allergique et "l'hypothèse de l'hygiène" .....	71
Génétique de l'asthme .....	74
Le métabolisme de la L-arginine dans l'asthme .....	76
Les neutrophiles et le métabolisme de la L-arginine chez l'homme .....	79
Production d'oxyde nitrique (NO) par les neutrophiles .....	80
Particularités du neutrophile équin .....	81
Inflammation systémique associée à l'asthme .....	81
Les neutrophiles dans l'asthme : effecteurs de la réponse allergique ou de la réponse innée? .....	81
Le Souffle comme modèle d'asthme neutrophilique .....	85
Définition : historique et caractéristiques cliniques .....	85
Histopathologie et remodelage tissulaire .....	87
Principaux traitements .....	88
Les causes du souffle .....	88
Allergènes .....	89
Agents non-spécifiques .....	91
Génétique et facteurs de risque .....	93
Les neutrophiles, potentielles cellules effectrices de la réponse inflammatoire associée au souffle .....	94
Neutrophiles périphériques .....	95
Neutrophiles pulmonaires .....	95
Retour sur les objectifs de la thèse .....	97
<b>Méthodologie et Résultats</b> .....	98
<b>Article #1</b> <i>Systemic inflammation and priming of peripheral blood leukocytes persist during clinical remission in horses with heaves</i> .....	99
<b>Article #2</b> <i>Optimization of a procedure to accurately detect equine TNF<math>\alpha</math> in serum samples</i> ....	131
<b>Article #3</b> <i>IL-4 activates equine neutrophils and induces a mixed inflammatory cytokine expression profile with enhanced neutrophil-chemotactic mediator release ex vivo</i> .....	150
<b>Article #4</b> <i>Neutrophilic inflammation and airway obstruction in equine asthma is associated with elevated expression of arginase isoforms 1 and 2.</i> .....	186
<b>Discussion générale</b> .....	214

Conclusions générales et Perspectives.....	238
Bibliographie.....	241
Lexique .....	I
Annexe 1 Table de nomenclature des chimiokines et de leurs récepteurs .....	II
Annexe 2 Mesure de la fonction respiratoire chez le cheval .....	IV
Annexe 3 Articles rédigés à titre de co-auteur.....	VII
Article #5 <i>Heaves, an asthma-like disease of horses</i> .....	VIII
Article #6 <i>Effect of Long-Term Fluticasone Treatment on Immune Function in Horses with Heaves</i> .....	XXIX
Article #7 <i>Effect of Antigen Exposure on Airway Smooth Muscle Remodeling in an Equine Model of Chronic Asthma</i> .....	XXXIX
Article #8 <i>Genomic and non-genomic effects of dexamethasone on equine peripheral blood neutrophils</i> .....	XLVII
Article #9 <i>IL-4 stimulates the expression of CXCL-8, E-selectin, VEGF, and inducible nitric oxide synthase mRNA by equine pulmonary artery endothelial cells</i> .....	LIV
Curriculum vitae .....	LXIV

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.</b> Comparatif des volumes pulmonaires (en L) chez le cheval et chez l'homme de taille moyenne. ....	11
<b>Tableau II.</b> Protéines membranaires et solubles des granules du neutrophile .....	31
<b>Tableau III.</b> Cytokines et chimiokines produites par le neutrophile humain. ....	43
<b>Tableau IV.</b> Phénotypes cliniques d'asthme. ....	65
<b>Tableau V.</b> Similarités et différences entre l'asthme et le souffle. ....	94
<i>Article #1</i>	
<b>Table 1.</b> Differential cell counts in neutrophil-depleted isolation fraction.....	124
<i>Article #2</i>	
<b>Table 1</b> Quantification of serum TNF $\alpha$ in 20 samples from 14 horses with different clinical conditions using manufacturer's instructions.....	147
<b>Table 2.</b> Specificity of native TNF $\alpha$ detection in serum samples using the optimized ELISA protocol.....	149
<i>Article #3</i>	
<b>Table 1.</b> P values corresponding to the effect of treatment with reqIL-4, antigenic challenge and disease on relative gene expression by PBN.....	183
<b>Tableau VI.</b> Phénotype et caractéristiques des macrophages activés.....	230
<b>Tableau VII.</b> Comparaison inter-espèce de l'expression des isoformes de l'arginase par les neutrophiles.....	231

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Anatomie comparée des poumons de l’homme (A), du cheval (B) et de la souris (C). .....	8
<b>Figure 2.</b> Anatomie comparée des voies supérieures chez l’homme et le cheval. ....	10
<b>Figure 3.</b> Respiration biphasique chez le cheval, comparaison avec l’homme. ....	12
<b>Figure 4.</b> Superfamille du récepteur au TNF .....	16
<b>Figure 5.</b> Inflammasome et sécrétion d’IL-1 $\beta$ . ....	18
<b>Figure 6.</b> Récepteurs Toll-like (TLRs). ....	20
<b>Figure 7.</b> Récepteur du fMLP (FPR) .....	22
<b>Figure 8.</b> Activation et recrutement des cellules dendritiques par les cellules épithéliales. ....	24
<b>Figure 9.</b> Différents types d’activation des macrophages. ....	26
<b>Figure 10.</b> Localisation des mastocytes pulmonaires : comparaisons inter-espèces. ....	27
<b>Figure 11.</b> Granulopoïèse chez le neutrophile. ....	30
<b>Figure 12.</b> Molécules d’adhésion et transmigration. ....	34
<b>Figure 13.</b> Morphologie polarisée du neutrophile activé. ....	35
<b>Figure 14.</b> Récepteurs couplés aux protéines G. ....	38
<b>Figure 15.</b> Les quatre sous-familles de chimiokines et leurs récepteurs. ....	39
<b>Figure 16.</b> Les différents processus de mort cellulaire chez le neutrophile. ....	48
<b>Figure 17.</b> Sécrétion de cytokines et fonctions effectrices des lymphocytes polarisés. ....	54
<b>Figure 18.</b> Étapes de la cicatrisation normale et pathologique de l’épithélium. ....	62
<b>Figure 19.</b> Processus du remodelage tissulaire .....	63
<b>Figure 20.</b> Relations complexes entre les différentes maladies inflammatoires chroniques des voies respiratoires .....	64
<b>Figure 21.</b> Le paradigme Th2 associé aux maladies atopiques. ....	67
<b>Figure 22.</b> Phénotype inflammatoire dans l’expectoration chez des patients atteints d’asthme stable. ....	71
<b>Figure 23.</b> Métabolisme de la L-arginine. ....	77
<b>Figure 24.</b> Images représentatives d’une coupe histologique des bronchioles (A) et d’une cytologie du LBA (B) chez un cheval atteint du souffle en crise. ....	87
<b>Figure 25.</b> Expression de cytokines de type Th2 associée à l’obstruction respiratoire et à la neutrophilie pulmonaire chez les chevaux atteints du souffle. ....	90



<b>Figure 1.</b> Study time line.....	125
<b>Figure 2.</b> Gene expression in neutrophils from control and heaves-affected horses after stimulation with microbial products.....	126
<b>Figure 3.</b> Gene expression in mononuclear cells from control and heaves-affected horses after stimulation with microbial products.....	127
<b>Figure 4.</b> Correlations between TLR4 and pro-inflammatory cytokines mRNA expression in neutrophils and mononuclear cells.....	128
<b>Figure 5.</b> TNF $\alpha$ concentrations in culture supernatants measured by ELISA.....	129
<b>Figure 6.</b> The enhanced survival of peripheral blood neutrophils (PBN) from asymptomatic heaves-affected horses cultured with microbial products is strongly associated with their expression of TNF- $\alpha$ .....	129
<b>Figure 7.</b> Serum TNF $\alpha$ concentrations in controls (n = 4) and heaves-affected horses (n = 5) during clinical remission.....	130
<i>Article #2</i>	
<b>Figure 1.</b> Standard curves obtained from serial dilution of rTNF $\alpha$ in 4 different reagent diluents.....	148
<b>Figure 2.</b> TNF $\alpha$ concentration in serum samples from healthy control (n = 3) and heaves-affected horses (n = 6) during antigen challenge.....	149
<i>Article #3</i>	
<b>Figure 1.</b> <i>IL-4 induces morphologic changes in equine neutrophils.....</i>	179
<b>Figure 2.</b> <i>IL-4 induces concentration and time-dependent expression of IL-8 mRNA in equine neutrophils.....</i>	179
<b>Figure 3.</b> <i>IL-4 induces the release of CXC chemokines receptor (CXCR)-2-ligands by equine neutrophils in culture supernatants.....</i>	180
<b>Figure 4.</b> <i>Asthmatic horses but not healthy control horses develop airway obstruction following antigenic challenge.....</i>	181
<b>Figure 5.</b> <i>Differential mRNA expression in peripheral blood neutrophils from asthmatic and control horses following culture with reqIL-4 for 5 hours.....</i>	182
<b>Figure 6.</b> <i>Detection of TNF<math>\alpha</math> and IL-1<math>\beta</math> in equine neutrophil using immunocytochemistry.....</i>	183
<b>Figure 7.</b> <i>Intracellular detection of IL-1<math>\beta</math> in IL-4 stimulated neutrophils using flow cytometry.....</i>	184

<b>Figure 8.</b> <i>STAT-6, PI3-K and p38 MAPK are involved in IL-4 signalling pathway in equine neutrophils</i> .....	185
<i>Article #4</i>	
<b>Figure 1-</b> Arginase isoforms expression by equine neutrophils and control tissues using qPCR.....	209
<b>Figure 2 -</b> Detection of arginase 1 and 2 in equine peripheral blood neutrophils (PBNs) and control tissues using Western blotting.....	210
<b>Figure 3-</b> Expression of ornithine decarboxylase (ODC) and ornithine aminotransferase (OAT) by equine neutrophils.....	211
<b>Figure 4 -</b> Arginase activity in equine neutrophils.....	211
<b>Figure 5-</b> Characterization of arginase isoforms expression in heaves and relationship with respiratory mechanics. ....	212
<b>Figure 6-</b> Arginase 1 and 2 protein expression and enzymatic activity in peripheral lung biopsies from heaves-affected and control horses following antigenic challenge.....	213
<b>Figure 26.</b> Origine et différenciation des cellules suppressives d'origine myéloïde associées aux tumeurs.....	227
<b>Figure 27.</b> Diagramme représentant l'importance inattendue de l'immunité innée et de la réponse Th2 indépendante des cellules T comme mécanismes impliqués dans l'asthme. ...	235
<b>Figure 28.</b> Le souffle comme modèle naturel d'asthme neutrophilique : une maladie « <i>inflammallergique</i> ». ....	237
<b>Figure 29.</b> Mesure de la fonction respiratoire chez le cheval. ....	V

## Liste des abréviations

AAMφ	Alternatively activated macrophage
ALI	Acute lung injury
AMPC	Adenosine monophosphate cyclique
BPI	Bactericidal/ermeability-increasing rotein
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein
CAMφ	Classically activated macrophage
CD	Cluster of differentiation
CPA	Cellule présentatrice de l'antigène
CR1	Complement receptor 1
CRP	C reactive protein
CS	Corticostéroïde
CysLT	Cystéine leucotriène
DC	Cellule dendritique
ECP	Eosinophil cationic protein
EGF	Epidermal growth factor
ELAM-1	Endothelial leukocyte adhesion molecule-1
ELR+	motif Glutamine-Leucine-Arginine
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FGF	Fibroblast growth factor
FPR	Formyl peptide receptor
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
hCAP-18	Human cathelicidin antimicrobial protein
HLA	Human leukocyte antigen system
HRB	Hyperréactivité bronchique
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
ICOSL	Inducible costimulator-ligand
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
Ig	Immunoglobuline

IGF	Insulin growth factor
IKK	I $\kappa$ B kinase
IL	Interleukine
IL-1Ra	Récepteur antagoniste de l'IL-1
iNANC	Innervation inhibitrice non-adrénérique-non-cholinergique
INF	Interféron
IP-10	Interféron gamma-induced protein 10 kDa
I-TAC	Interferon-inducible T cell $\alpha$ -chemoattractant
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LECAM-1	Lymphocyte peripheral lymph node homing receptor-1
LEF-1	Lymphoid enhancer-binding factor 1
LT	Leucotriène
Mac-1	Macrophage adhesion molecule-1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MD-2	Myeloid differentiation protein-2
MIG	Monokine induced by IFN-gamma
MIP-1 $\alpha$	Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$
MMAP	Motifs moléculaires associés aux agents pathogènes
MMP	Matrix metalloproteinase
MPO	Myéloperoxydase
MPOC	Maladie pulmonaire obstructive chronique
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NK	Natural Killer
NO	Oxide nitrique
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
NOS	Synthase d'oxyde nitrique
Nramp1	Natural resistance-associated macrophage protein 1
PAMPS	Pathogen-associated molecular patterns
PAR	Proteinase activated receptor
PGD	Prostaglandine

PGSL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
PMN	Polymorphonucléaire neutrophile
PPA	Protéine de phase aiguë
PRR	PAMPS-related receptor
PTX	Pertussis toxin
RAO	Recurrent airway obstruction
RCPG	Récepteurs hétérotrimériques couplés aux protéines G
RSV	Respiratory syncytial virus
RUNX	Runt-related transcription factor
SAA	Serum amyloid A protein
SNPs	Single nucleotide polymorphisms
TGF	Transforming growth factor
Th	Lymphocyte T helper
TIMP	Tissue inhibitors of metalloprotease
TLRs	Toll-like receptors
Treg	Lymphocytes T régulateurs
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin

*À tous ceux que j'aime*

## Remerciements

J'aimerais, en tout premier lieu, remercier profondément le Dr Jean-Pierre Lavoie de m'avoir fait confiance tout au long de ces sept années, du début de ma maîtrise jusqu'à aujourd'hui. Je respecte énormément votre engagement professionnel, c'est-à-dire votre ultime disponibilité, vos connaissances et votre curiosité éternellement renouvelées, sans parler de vos compétences reconnues en médecine vétérinaire et en sciences fondamentales. Vous m'êtes définitivement très inspirant. Le bonus est sans contredit votre humanité, empreinte de justice et de respect, qui a permis des échanges personnels essentiels à la réussite de ce projet. Merci infiniment pour m'avoir offert autant d'opportunités et de conseils afin que je puisse mener une formation professionnelle *idéale* et un avenir couronné de succès! Vous représenterez pour moi un modèle à suivre et j'espère conserver avec vous des liens solides.

Mes remerciements très sincères au Dr James G. Martin, un homme extraordinaire. Je pourrais m'arrêter là, mais j'ajouterai que je suis reconnaissante envers votre disponibilité et votre écoute. Vous m'avez donné des conseils qui ont, sans exception, toujours été utiles et d'une grande sagesse. Votre expérience en recherche, vos connaissances approfondies en science et votre perspective de médecin pour les humains (!) m'ont aussi beaucoup apporté. Enfin, merci pour l'accueil que vous m'avez offert au sein de votre laboratoire et pour la confiance que vous m'avez accordée dans la réalisation de projets de recherche. J'en profite pour remercier tous les membres de votre laboratoire qui ont été tout aussi accueillants à mon égard.

J'aimerais remercier le Dr Daniel Jean pour avoir participé depuis le tout début à l'avancement de mes travaux sous forme d'interventions aux *labmeetings* et d'encouragements perpétuels, également à titre d'évaluateur lors de mon examen pré-doctoral. Merci pour votre confiance et votre patience lors de ma collaboration au projet de Johanne Vanderstock et pour votre aide dans le projet « Arginase ».

Mes remerciements au Dr Karim Maghni qui a participé à mon évaluation comme membre externe du jury lors de mon examen pré-doctorale et sans qui l'expérience et le souvenir n'auraient pu être aussi positifs et satisfaisants. J'ai appris beaucoup durant les mois que j'ai passés dans votre laboratoire. Vous m'avez enseigné et transmis la rigueur scientifique en recherche et celle-ci me sera bénéfique tout au long de ma carrière. Ce projet collaboratif est

pour moi un exemple de persévérance bien méritée et partagée, merci pour cela. Un sincère merci aux membres de votre laboratoire, en particulier à Mme. Lucero Castellanos et au Dr. Mélanie Welman, qui ont elles aussi agrémenté mon expérience au Laboratoire de Neuroimmunologie de l'asthme de l'hôpital Sacré-Coeur.

J'aimerais remercier le Dr Christine Théoret pour sa participation au sein de mon comité-conseil et, avec le Dr Derek Boerboom, pour m'avoir concédé l'accès aux appareils de son laboratoire. J'aimerais remercier le Dr Qutayba Hamid, ses assistantes de recherche Elsa Schotman et Fazila Chouiali, ainsi que les Drs Simon Rousseau et William Powell des Meakins-Christie Laboratories pour m'avoir permis de découvrir et d'appliquer de nouvelles techniques de laboratoire, ainsi que pour leurs conseils. Remerciements aux membres de leur laboratoire respectif pour leur aide.

J'aimerais remercier le Dr Elyse Bissonnette d'avoir accepté d'évaluer de manière assidue cette thèse. Votre contribution aura permis d'améliorer son contenu et de dessiner des perspectives très intéressantes à ce projet.

Mes remerciements sincères aux Drs Marcello Gottschalk et Mariela A. Segura pour avoir participé à la révision de cette thèse, et pour leur confiance dans la collaboration sur le projet de Johanne. Merci au Dr Claude Lachance pour son temps et son expertise. Enfin un merci spécial au Dr Gottschalk pour avoir accepté de présider mon comité d'évaluation à l'examen pré-doctoral et mon jury de thèse, votre implication fût à chaque fois très appréciée.

Merci au Dr Sheila Laverty pour son intérêt, sa considération et sa confiance lors des quelques projets que nous avons eu en collaboration. Merci à Hélène Richard pour son aide technique depuis le tout début.

J'ai bénéficié de financement provenant des organismes CRSNG, IRSC et de la Faculté de médecine vétérinaire depuis le début de mon doctorat. Je tiens donc à remercier ces organismes et le Réseau Allergen-NCE, pour m'avoir donné l'opportunité de voyager à travers le Canada afin d'assister à des conférences formatrices qui ont facilité des rencontres humaines intéressantes dans un contexte agréable.

Un merci très profond au personnel administratif avec qui il a toujours été agréable d'interagir. J'aimerais mentionner Micheline St-Germain, Diane Rodier, Geneviève Michon, Annie Lavertu, David Champigny et Diane Blais.

Un ÉNORME merci à mes collègues présentes et passées: Josiane Lefebvre-Lavoie pour sa rigueur scientifique, son sens de l'organisation, son dévouement et sa considération depuis le



début; Mathilde Leclere pour sa rigueur professionnelle, son esprit critique, son enseignement et sa confiance dans les projets que nous avons partagés. Sans oublier : Gaëlle Hirsh (partenaire neutrophilique), Karen Lemos (joie!), Natalia Rodrigues (confiance), Émilie Gélinas (magnifique!), Julia (vie!) et Émilie Setlakwe (profondeur), Jean Dubé (partner de mousses), Raphaël (mystères et boule de gomme), Emma Hamilton (enseignement), Hong H (les débuts), Véronique Desjardins, Karine GM, Mylène C, Norma Y, Laureline Lecoq, Julie Dauvillier, Johanne Vanderstock, Marie-Laure Cortes, nos stagiaires en santé animale, Céline Bourzac, Kathleen Théroux, Éric Laflamme, Robert Chidiak, Normand Lacasse et tous ceux qui m'ont aidé ou supporté et que j'oublie de mentionner.

Je suis maintenant à genoux pour remercier mes amis, pour leur fidélité, leur support inconditionnel, leur encouragements, leur confiance, leur personnalité distincte et magnifique: Karyne, Maria, Catherine Bol, Dominique, Catherine Bi, Kantuta, Mélissa, Sana, Michel et toute sa famille, Isa Bourgault, Evelyne M et Khang.

Comment remercier assez mes parents, Judith (Jude) et Raymond (Ray), pour leur amour et leur soutien, à chaque étape de ce parcours sinueux qu'ont représenté mes études supérieures. Je suis reconnaissante pour votre générosité astronomique et je tiens à vous dire que votre attention et vos efforts ont été essentiels à ma réussite. Je vous dois beaucoup et je vous aime. Merci à tous les membres des familles Lavoie-Lamoureux pour vos encouragements, je pourrai enfin vous dire à Noël que j'ai fini mon doc.

Enfin, merci Paul-André, pour ta confiance, ton respect, ta compréhension, ton amitié d'abord puis, ton amour, à tous les instants. Merci pour ces moments complices, pour ton enthousiasme scientifique et ton aide *talentueuse* dans tout ce processus. Tu es ma récompense après toutes ces années de travail. Je t'aime tant.

Anouk

# Introduction

Les maladies inflammatoires chroniques d'origine non-infectieuses représentent aujourd'hui une des causes principales de morbidité et de recours aux soins de santé dans les pays occidentaux. L'asthme compte parmi elles et touche environ 8,3%<sup>1</sup> des Canadiens. On estimait en 2007 que 300 millions de personnes souffraient d'asthme mondialement et que cette maladie était responsable de 250 000 morts par année<sup>2</sup>. L'asthme se présente sous différents phénotypes cliniques résultant d'une interaction complexe entre la génétique de l'individu et l'environnement. Ces phénotypes regroupent toutefois des caractéristiques communes : 1) une réponse inflammatoire chronique des voies respiratoires; 2) une hyperréactivité bronchique et; 3) un remodelage tissulaire des voies respiratoires. Les causes peuvent varier mais résultent en une symptomatique incluant de l'oppression respiratoire, de la dyspnée, une respiration sifflante, de l'hypersécrétion de mucus et de la toux (surtout nocturne).

On catégorise les phénotypes d'asthme selon qu'ils impliquent une allergie ou non, la première étant la plus commune. D'ailleurs, les mécanismes immunologiques et physiologiques associés à la réponse allergique ont été largement étudiés dans le contexte de l'asthme : les modèles d'asthme expérimentaux utilisant les rongeurs ont permis de caractériser en détails l'inflammation éosinophilique typiquement associée à la production de cytokines par les lymphocytes T *helper* 2 (Th2) et la production d'IgE, l'hyperréactivité bronchique et le remodelage tissulaire. Toutefois ces animaux ne développent pas les symptômes caractéristiques de l'asthme et souvent, les méthodes de sensibilisation allergique utilisées pour induire la maladie ne tiennent pas compte de l'effet de l'environnement sur sa pathogénèse. Les thérapies développées à partir des résultats obtenus à l'aide de ces modèles se sont révélées inefficaces chez plusieurs patients atteints d'asthme allergique. Enfin, une proportion considérable d'asthmatiques présente une inflammation neutrophilique plutôt qu'éosinophilique. L'inflammation neutrophilique s'associe à plusieurs phénotypes cliniques incluant ceux causés par l'allergie et plus fréquemment, aux phénotypes sévères. Néanmoins, les mécanismes physiopathologiques impliqués dans ce type d'inflammation demeurent jusqu'à ce jour mal décrits.

Les neutrophiles jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire de première ligne. Leur arsenal de produits antimicrobiens et leur rôle de phagocytes professionnels les placent comme

---

<sup>1</sup> Taux normalisé selon l'âge. Source: Statistique Canada, CANSIM, tableau 105-0503

<sup>2</sup> World Health Organization. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach, 2007.

acteurs principaux dans la défense contre les infections. Parce qu'ils produisent une variété de cytokines et de chimiokines, les neutrophiles contribuent également à réguler la réponse inflammatoire et servent de pont entre l'immunité innée et acquise. Leur activation exagérée contribue à la fois au dommage tissulaire par la relâche d'oxydants et de protéases dans le milieu, ainsi qu'à retarder leur apoptose, étape critique dans le processus de résolution de l'inflammation. De ce fait, l'activation des neutrophiles représente un point tournant dans l'initiation et la prolongation de la réponse inflammatoire. Les neutrophiles activés sont d'ailleurs impliqués dans plusieurs autres pathologies associées à l'inflammation chronique des tissus et à leur destruction.

Nous nous proposons d'utiliser le cheval atteint du souffle comme modèle animal naturel d'asthme pour l'étude de la contribution des neutrophiles dans l'inflammation associée à la réponse allergique. En effet, les chevaux sont naturellement affectés par le souffle et cette maladie partage avec l'asthme plusieurs caractéristiques physiopathologiques. Les chevaux atteints développent une inflammation neutrophilique chronique et une obstruction réversible des voies respiratoires lorsqu'ils sont exposés aux poussières et aux allergènes contenus dans le foin. Aussi, des études suggèrent que les exacerbations répétées pourraient mener au remodelage permanent des voies respiratoires chez ces chevaux. Bien que les causes exactes du souffle ne soient pas connues, il semble qu'une aberration dans les réponses immunitaires innée et acquise aux agents non-spécifiques et aux allergènes contenus dans le foin, respectivement, soit en cause. Plus spécifiquement, on a rapporté que l'inhalation d'endotoxines (réponse immunitaire innée) présentes en concentration élevée dans le foin et l'environnement des chevaux, contribuait significativement au développement des symptômes du souffle chez les animaux susceptibles. De plus, l'expression de cytokines de type Th2 est élevée au niveau pulmonaire et associée à la production d'IgEs spécifiques pour certains allergènes chez les chevaux atteints de souffle, deux caractéristiques typiques de la réponse allergique (réponse immunitaire acquise). Celles-ci sont concomitantes avec le recrutement des neutrophiles dans la lumière des voies respiratoires.

Le rôle des neutrophiles dans la réponse allergique n'est pas clairement défini. Ces granulocytes sont recrutés dans plusieurs contextes associés à la production de cytokines de types Th2 telles que les allergies (rhinite, asthme), la réponse antiparasitaire et plus récemment, la réponse anaphylactique dans laquelle ils agissent comme acteurs principaux [1]. Toutefois l'interaction entre les cytokines de type Th2 et les neutrophiles est pauvrement décrite chez

l'homme et inexistante dans la littérature chez le cheval. Dans ce contexte, une enzyme surrégulée par les cytokines de type Th2 chez les modèles d'asthme murins, l'arginase, s'est avérée centrale dans la régulation de la réponse inflammatoire, du tonus musculaire bronchique et du remodelage tissulaire. L'arginase est également surrégulée chez l'homme dans plusieurs contextes où l'on observe de l'inflammation chronique, incluant l'asthme. Or contrairement aux modèles de rongeurs, l'arginase est exprimée constitutivement et de manière restrictive par les neutrophiles périphériques et présents aux sites inflammatoires chez l'homme. Ainsi, l'arginase exprimée par les neutrophiles pourrait contribuer à la physiopathologie de l'asthme et du souffle cependant, aucune étude à ce sujet n'a encore été menée.

L'hypothèse générale de cette recherche est que les neutrophiles contribuent à la physiopathologie de l'asthme par l'expression de molécules ayant des effets immunomodulateurs tant au niveau de la réponse inflammatoire de première (immunité innée) que de seconde (immunité acquise) ligne.

Les objectifs spécifiques sont :

1. Comparer la réponse *ex vivo* des neutrophiles périphériques de chevaux contrôles et atteints du souffle à des agonistes de récepteurs de l'immunité innée.
2. Caractériser la réponse *ex vivo* des neutrophiles périphériques de chevaux normaux à l'interleukine (IL)-4 recombinante équine (re), une cytokine de type Th2 exprimée lors de la réponse immunitaire acquise spécifique à l'allergène, et la comparer à celle de chevaux atteints du souffle exposés ou non à l'allergène.
3. Caractériser l'expression des isoformes de l'arginase par le neutrophile équin et déterminer leur niveau d'expression chez les chevaux atteints du souffle.

## Recension des écrits

## **Maladies inflammatoires chroniques des voies respiratoires : mécanismes impliqués**

Le poumon est le lieu des échanges gazeux entre le sang et l'air. Il est chez la plupart des mammifères l'organe le plus volumineux, soulignant l'importance vitale de sa fonction biologique. Par sa structure, il offre une aire d'échange d'autant plus impressionnant, soit 70 - 80m<sup>2</sup> en fonction de la taille de l'individu (1500m<sup>2</sup> pour un cheval moyen), totalisant ~ 300 millions d'alvéoles chez l'homme [2, 3]. Il joue également le rôle de réservoir sanguin, de filtre de détoxification du sang et de site de métabolisation pour certaines substances [4]. Le poumon représente pour les pathogènes véhiculés dans l'air un site d'entrée critique vers l'intérieur du corps. L'inflammation causée par l'inhalation d'irritants ou d'agents infectieux se doit d'être étroitement régulée afin que l'intégrité physiologique de l'organe soit préservée. Chez l'homme et chez les animaux domestiques, l'inflammation chronique des voies respiratoires est typiquement associée à une infection par des mycobactéries ou par le virus respiratoire syncytial (RSV). L'inflammation chronique des voies respiratoires est aussi fréquemment associée à une réponse allergique de l'hôte envers des antigènes véhiculés dans l'air [5]. Cette réponse immunitaire aberrante envers d'inoffensifs antigènes implique l'activation spécifique des cellules de l'immunité acquise. De ce fait, elle indique aussi que la réponse inadaptée des cellules appartenant au système immunitaire inné qui ont reconnu cet antigène comme un agresseur potentiel.

Chez l'homme, l'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires qui possède diverses étiologies, associées ou non à une réponse allergique. Nos connaissances actuelles sur les mécanismes impliqués dans la réponse inflammatoire associée à l'asthme ont bénéficié largement des modèles expérimentaux rats, souris et cobayes. Ils ont permis de disséquer et d'identifier les événements et les molécules impliqués dans l'hyperréactivité bronchique, l'inflammation et le remodelage tissulaire associés à l'asthme. Le cheval atteint du souffle s'offre également comme modèle pour l'étude de la pathogénie de l'asthme. Cette maladie partage avec l'asthme plusieurs caractéristiques physiopathologiques, dont la symptomatique et changements histologiques mais surtout, le souffle se développe naturellement chez le cheval, contrairement aux modèles de rongeurs. Le souffle est en lui-même un sujet de recherche

vétérinaire très pertinent puisqu'il atteint une proportion considérable de la population de chevaux des régions tempérées et représente une cause de pertes économiques pour les propriétaires et pour l'industrie équine.

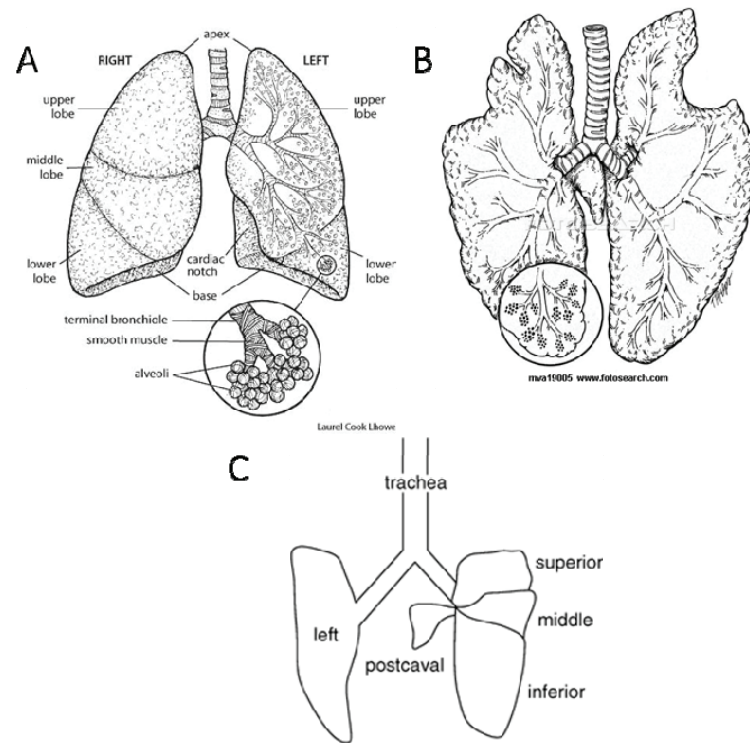
Seront décrits successivement dans ce chapitre les caractéristiques physiologiques du poumon chez l'homme et le cheval et les principaux acteurs des branches innée et acquise du système immunitaire, en particulier les neutrophiles. Puis, les caractéristiques physiopathologiques de l'asthme et du souffle seront revus, ainsi que les différents mécanismes immunopathologiques proposés pour expliquer le développement de ces maladies, avec un intérêt particulier pour le rôle des neutrophiles dans l'inflammation chronique associée à la réponse allergique.

## **Caractéristiques anatomiques et physiologiques du poumon**

### **Chez l'homme**

Les poumons de l'homme possèdent trois lobes à droite et deux à gauche, tel qu'illustré sur la **Figure 1** qui compare l'anatomie des poumons de l'homme et du cheval à celui de la souris. Les poumons et chacun de leurs lobes sont enveloppés par une fine couche de tissus conjonctifs appelée la plèvre viscérale. Elle est séparée de la plèvre pariétale qui recouvre la cage thoracique, le médiastin et le diaphragme, par la cavité pleurale. Les deux plèvres se joignent au niveau de l'hile pulmonaire. Les voies aériennes supérieures s'étendent du nez jusqu'au larynx (extra-thoraciques). Elles comptent les cornets nasaux qui ont pour fonction de réguler la température de l'air et son degré d'humidité ainsi que de capter les poussières inhalées qui seront dirigées vers le pharynx pour être dégluties. Les voies respiratoires inférieures incluent la trachée jusqu'aux parties les plus distales des bronchioles. Le parenchyme pulmonaire désigne les alvéoles associées aux bronchioles transitoires et les sacs alvéolaires distaux [2].





**Figure 1.** Anatomie comparée des poumons de l'homme (A), du cheval (B) et de la souris (C).

Les voies respiratoires conductrices se divisent de manière dichotomique de la trachée jusqu'aux bronchioles membraneuses (sans alvéole ni cartilage) inclusivement, générant successivement les bronches souches, lobaires, segmentaires et les bronchioles [2]. Cette portion des voies respiratoires ne permet pas d'échange gazeux (espace mort). On estime qu'approximativement 87% du volume total du poumon est alvéolaire, 6% se compose de tissus et le reste est occupé par du gaz (7%) [2]. Lorsque l'air entre dans le poumon durant l'inspiration, la vitesse du gaz diminue avec les générations de voies respiratoires compte-tenu de l'augmentation considérable de l'aire totale transversale qu'elles représentent au niveau des bronchioles respiratoires et la diffusion devient le mécanisme de ventilation dominant au niveau de la zone respiratoire. La chute de vitesse du gaz permet le dépôt des petites particules inhalées au niveau des bronchioles terminales, qui sont remontées jusqu'en haut de l'arbre bronchique sur le tapis de mucus propulsé par les cils des cellules épithéliales [4]. Le mucus est produit par les glandes trachéo-bronchiales situées dans la *submucosa* et par les cellules épithéliales à gobelets.

Le muscle lisse et le tissu élastique se propagent tout au long de l'arbre bronchique sous forme de spirales jusqu'à l'ouverture des sacs alvéolaires. Le muscle péribronchique répond à l'adrénaline (nerf vagal et glossopharégien) et à l'acétylcholine (système nerveux inhibiteur non-adrénergique non-cholinergique) par broncho-dilatation ou constriction, respectivement, régulant ainsi la résistance au passage de l'air. Le poumon est un tissu très élastique et très peu de pression est nécessaire pour provoquer son inflation. Cette propriété est appelée compliance et change selon la composition du tissu conjonctif pulmonaire, majoritairement composé d'élastine et de fibres de collagène. Le système de vascularisation est composé d'artères pulmonaires qui apportent le sang systémique veineux aux poumons en étroite association avec les voies respiratoires et de veines pulmonaires qui conduisent le sang oxygéné vers la circulation systémique en association avec le parenchyme ou les tissus conjonctifs des septa. Il est à noter qu'il n'y a pas de vascularisation bronchique chez la souris [6]. Les capillaires forment un réseau dense autour des alvéoles. Le gaz diffuse à travers la paroi des capillaires et des cellules alvéolaires en suivant la loi de *Fick's*<sup>3</sup>, principalement aux endroits dépourvus de noyaux cellulaires et de tissus conjonctifs et où il y a fusion des membranes basales épithéliales et endothéliales, totalisant 0,4 - 0,5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur [2].

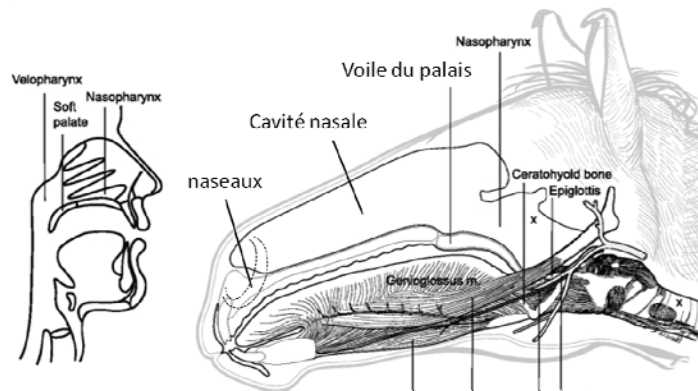
### Particularités chez le cheval

L'anatomie du poumon de cheval est somme toute similaire à celle de l'homme (**Figure 1**), par comparaison avec le poumon de souris qui possède une toute autre architecture macroscopique. Les voies respiratoires supérieures diffèrent évidemment quelque peu de par leur structure (**Figure 2**): elles incluent 1) des naseaux externes très flexibles pouvant se fermer complètement (par exemple pour prévenir l'entrée d'eau durant la nage) et s'ouvrir maximalelement durant l'exercice; 2) la cavité nasale abritant les cornets naseaux; 3) le pharynx et le larynx : le voile du palais étant très long, l'inspiration est nécessairement nasale, et enfin; 4) la partie extra-thoracique de la trachée. Macroscopiquement, les poumons du cheval ne sont pas divisés en lobes distincts toutefois une membrane de tissu conjonctif fibreux les séparent en deux

---

$\dot{V} \propto A / T * D * (P1-P2)$ , où  $\dot{V}$  correspond au taux de ventilation (débit),  $A$  à l'aire,  $T$  au à l'épaisseur,  $D$  à une constante de diffusion proportionnelle à la solubilité du gaz et inversement proportionnelle à la racine carrée de son poids moléculaire et  $P1$  et  $P2$  à la pression partielle du gaz de part et d'autre de la membrane [4].

lobes à gauche (crânial et caudal) et en trois lobes à droite (cranial, accessoire et caudal). Une particularité des bronches est leur division de type monopodial, c'est-à-dire que les bronches sources se dirigent vers la périphérie caudal du poumon et donne naissance à des bronches ventrales ou dorsales de calibre inférieur. Il n'existe pas de bronchiole transitoire chez le cheval. L'épithélium des bronches et bronchioles est similaire à celui de l'homme. On compte peu de glandes sous-muqueuses dans l'arbre trachéo-bronchique équin. La surface d'alvéoles capillarisées est d'environ 1 500 m<sup>2</sup> chez un cheval de 510 kg bien que l'aire alvéolaire totale soit 2 456 m<sup>2</sup>. Cela correspond à une surface d'échange gazeux 3 fois plus grande que chez l'homme, lorsque l'on considère l'air d'échange (m<sup>2</sup>) par kg du poids de l'animal. Les différents volumes pulmonaires sont décrits dans le **Tableau I**.



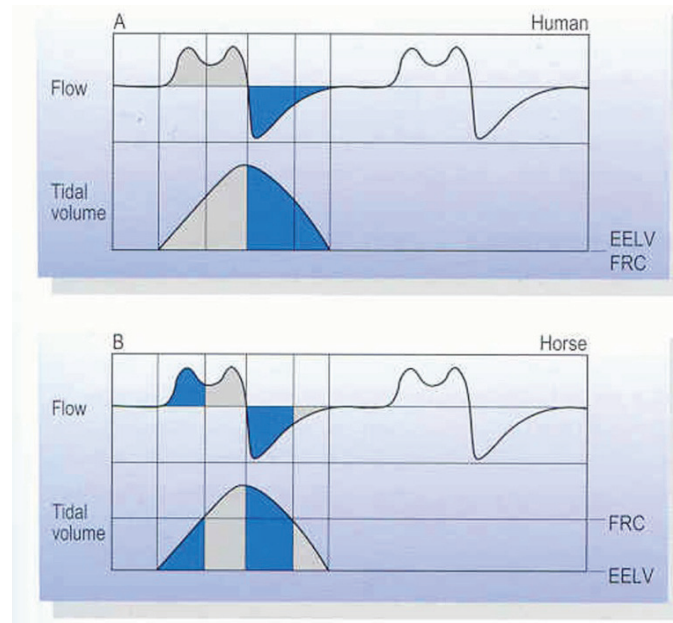
**Figure 2.** Anatomie comparée des voies supérieures chez l'homme et le cheval. *Modifiée de Cheetham et al, 2009 [7].*

**Tableau I.** Comparatif des volumes pulmonaires (en L) chez le cheval et chez l'homme de taille moyenne.

Paramètre	Description	Cheval	Homme
<b>Volume courant</b>	Volume d'air inhalé à chaque respiration	4-5	0.5
<b>Capacité résiduelle fonctionnelle</b>	Volume d'air résiduel à la fin d'une expiration normale	20	2.3
<b>Capacité pulmonaire totale</b>	Volume d'air maximal pouvant être contenu dans les poumons	~ 45	5.8
<b>Volume résiduel</b>	Volume résiduel d'air dans les poumons à la fin d'une expiration forcée	9.1	1.2
<b>Capacité vitale</b>	Différence entre la Capacité pulmonaire totale et le volume résiduel	~ 35	4.6
<b>Volume de l'espace mort</b>	Volume d'air contenu dans les voies respiratoires ou alvéoles peu ou non- perfusées.	3	0.15
<b>Débit respiratoire (repos/exercice) en L/min</b>	Volume d'air par minute qui entre et sort des poumons	60-100 1500	7,5 120

*Tiré des articles [3, 4, 8, 9].*

Chez le cheval, contrairement à l'homme et à la plupart des mammifères, le point d'équilibre mécanique du système respiratoire ne correspond pas au volume de capacité résiduelle fonctionnelle. Il se trouve plutôt au milieu du volume courant de telle sorte qu'un effort sera sollicité à la fin de chaque inspiration (diaphragme) et expiration (muscles abdominaux) et que le volume de fin d'expiration sera inférieur au volume de capacité résiduelle fonctionnelle (CRF) mécaniquement déterminé. La respiration du cheval est donc biphasique, avec une composante passive et active pour chaque inspiration et expiration (**Figure 3**). Il est à noter que les muscles intercostaux n'interviennent que pour stabiliser la cage thoracique en réponse aux changements de pression, contrairement à l'homme chez qui les muscles intercostaux sont sollicités durant l'inspiration au volume courant et à l'exercice (inspiration et expiration) [4].



**Figure 3.** Respiration biphasique chez le cheval, comparaison avec l'homme.

Comparaison entre l'homme et le cheval quant aux volumes de fin d'expiration du poumon (EELV) et de capacité résiduelle fonctionnelle (FRC). Ces deux volumes sont équivalents chez l'homme car ils correspondent à l'équilibre mécanique du poumon alors que l'EELV est inférieur au FRC chez le cheval en raison de la phase d'expiration active. *Tiré du chapitre de livre par Marlin et Deaton, 2007 [10].*

## Système de défense pulmonaire

### Mécanismes de défense immunitaire innés

La réponse innée comporte quatre types de barrières défensives soient anatomique, physiologique, phagocytaire et inflammatoire [11]. Elle se distingue de la réponse acquise en ce sens qu'elle n'est pas spécifique à un antigène particulier mais permet de défendre l'hôte contre une variété de pathogènes à l'aide d'un arsenal défensif diversifié.

### *Mécanismes physico-chimiques*

Le poumon représente une ouverture directe sur l'intérieur du corps. Il fût jusqu'à récemment considéré comme un environnement stérile, toutefois il semble qu'une microbiote tapisse les voies respiratoires et les alvéoles chez les sujets en santé [12]. Plusieurs des caractéristiques physico-chimiques du poumon lui permettent de se défendre contre les

agresseurs aériens. D'abord, les cornets nasaux, puis la trachée et les bronches constituent ensemble un filtre de turbulence qui propulse la plupart des particules inhalées les plus larges (90%, > 5µm) vers la paroi épithéliale où elles adhèrent à la couche de mucus qui la recouvre [13, 14]. Le mouvement synchronisé des cils des cellules épithéliales les expulsent ensuite hors du tractus respiratoire. Les récepteurs d'irritants provoquent la toux et le bronchospasme qui agissent aussi à cet effet. Le mucus est un gel viscoélastique avec une composition complexe [14, 15]. Quelques 200 protéines le composent incluant des substances antimicrobiennes, des cytokines et des antioxydants sécrétées par les cellules à mucus des glandes subépithéliales et les cellules à gobelet. Les mucines, de larges glycoprotéines fortement chargées qui forment la structure du mucus, possèdent en elles-mêmes des propriétés antivirales et inflammatoires, en plus d'interagir avec plusieurs autres composants du mucus soient les IgAs, les collectines et défensines [14]. La structure tridimensionnelle en mailles du mucus inhibe la migration des pathogènes [15]. Une altération de la sécrétion normale du mucus ou de sa clairance entraîne une accumulation et une détérioration de la fonction respiratoire, une réduction des défenses et l'augmentation du risque d'infection et possiblement de néoplasmes [15]. Enfin, les cellules épithéliales sont étroitement attachées entre elles par des jonctions serrées apicales, des jonctions adhérentes et des desmosomes latéraux formant une barrière physique imperméable à la plupart des substances [2]. Celle-ci limite en particulier l'entrée des virus et leur propagation en leur bloquant l'accès à certains récepteurs de la membrane basolatérale, un point d'entrée commun à plusieurs d'entre eux [14].

### *Mécanismes immunologiques*

#### La réponse inflammatoire

L'inflammation a pour buts principaux de : 1) défendre l'organisme hôte contre les invasions pathogènes et; 2) réparer les tissus après lésion (revu dans [5]). L'inflammation comporte deux phases, une aiguë et une chronique. La sévérité de l'inflammation, sa durée et le type de réponse dépendent du facteur qui l'a initiée et de la susceptibilité de l'hôte (espèce et race) à développer une inflammation à certains facteurs.

La phase aiguë est opérée par les neutrophiles, les éosinophiles et les mastocytes. Les cytokines TNF, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 sont produites tôt dans la phase inflammatoire aiguë. À faible dose, le TNF stimule l'activation des cellules de l'immunité innée responsables de la destruction du pathogène (ex. macrophages, neutrophiles) et la présentation d'antigènes par les cellules professionnelles. À forte dose, cette cytokine contribue à causer de sévères dommages au parenchyme pulmonaire et des maladies systémiques (choc septique). L'exsudat inflammatoire est constitué de cellules mortes, de débris de pathogènes et de l'accumulation de fluide et de protéines plasmatiques. L'IL-6 augmente la production de protéine de phase aiguë (PPA; *C reactive protein* (CRP), *serum amyloid A* (SAA), haptoglobine, etc.) par le foie et contribue à diminuer les taux de transferrine, d'albumine, de TNF et d'IL-1 $\beta$  et de ce fait, à diminuer le recrutement des leucocytes dans le tissu. Il permet aussi la différenciation des cellules B en plasmocytes et la permutation des classes des immunoglobulines.

Les protéines sériques impliquées dans la phase aiguë incluent le complément, les kinines (bradykinine et kallikréine), les protéines de la cascade de coagulation et les PPA. Ces dernières ont souvent des propriétés d'opsonisation. L'activation du complément mène à la relâche d'anaphylatoxines (C3a, C4a et C5a) qui favorisent la dégranulation des mastocytes et la perméabilisation des vaisseaux. Elles induisent aussi l'adhérence et le chimiotactisme des leucocytes et l'activation de la cascade de la coagulation. Celle-ci prévient la propagation de l'infection dans les tissus mais peut être alarmante dans le contexte pulmonaire. La plasmine renverse la formation de caillots, mais peut mener à l'activation complément et ainsi contribuer à amplifier l'inflammation.

La phase chronique de l'inflammation survient lorsque la réponse inflammatoire aiguë ne s'est pas avérée suffisante pour éliminer l'agent causateur. Un exemple typique est l'infection par des mycobactéries ou par le virus respiratoire syncytial (RSV). L'inflammation allergique représente une inflammation chronique anormale. Le but physiologique de la phase chronique de l'inflammation est de se débarrasser des débris de nécrose cellulaire dérivés de la phase aiguë, de promouvoir la défense contre une infection persistante et de réparer les dommages occasionnés au parenchyme pulmonaire. À cette étape, la formation de cicatrice peut être problématique dans le contexte respiratoire, en diminuant la surface d'échange gazeux. L'habileté à résoudre l'inflammation dépend de la cause, de la durée et du succès du système immunitaire à se

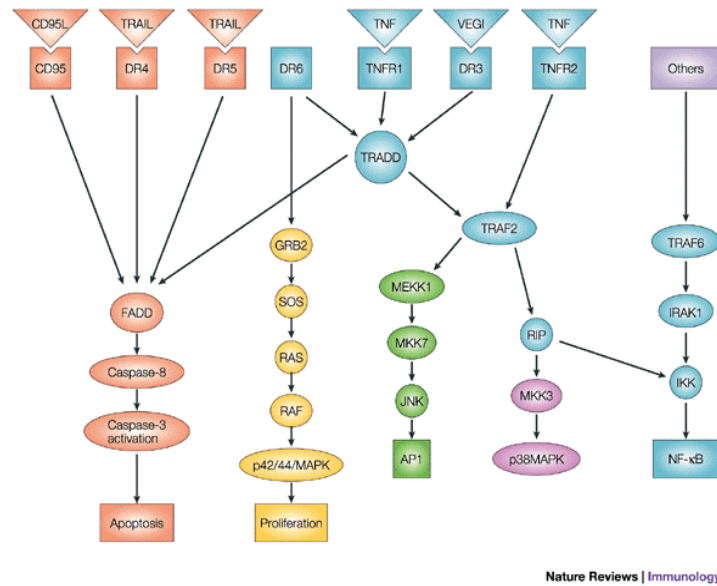
débarrasser de l'envahisseur. Il y aura une inflammation chronique aberrante si la réponse inflammatoire en réponse au stimulus de départ est inappropriée (ex. allergie) ou s'il est impossible de détruire l'agent infectieux (ex. mycobactérie). Dans le poumon, il y a alors soit la formation de fibrose, d'hypertrophie musculaire et de bronchoconstriction ou bien de granulomes, respectivement. Dans la phase chronique, les mêmes cytokines sont produites que pendant la phase aiguë, toutefois avec persistance et en excès. La cause la plus commune d'inflammation chronique chez plusieurs espèces est aujourd'hui l'allergie [5].

Les cytokines pro-inflammatoires

*TNF : description moléculaire et biologique.*

Le TNF (*tumor necrosis factor*, auparavant TNF- $\alpha$ ) a été identifié en 1975 comme facteur de nécrose pour les tumeurs induit par le LPS [16]. Son surnom de cachectine lui fut donné par un autre groupe qui étudiait son effet suppressif sur la lipoprotéine lipase A, avant que ces différentes fonctions ne soient attribuées à une seule et même molécule [17]. Chez l'homme, le gène du TNF est localisé au niveau du chromosome 6 (ch.20 chez le cheval : NC\_009163.2) et situé dans un groupement génique incluant les gènes codants pour les lymphotoxines (LT)- $\alpha$  (autrefois appelée TNF- $\beta$ ) et LT- $\beta$ , des cytokines de structure similaire (idem chez le cheval), appartenant à la superfamille du TNF. Cette superfamille compte 19 ligands qui sont destinés à lier 29 récepteurs appartenant à la superfamille du TNFR [18]. Les ligands de la superfamille du TNF partagent 20-30% d'homologie de séquence au niveau C-terminale, portion qui est responsable de la liaison au récepteur. Aussi, la majorité de ces ligands sont synthétisés sous forme de précurseurs membranaires. Pour sa part, le TNF est exprimé sous forme de pro-peptide transmembranaire de 26 KDa clivé par la TACE (matrix-metalloprotease TNF-convertase), aussi appelée ADAM 17, pour générer une sous-unité soluble de 17 KDa [19]. La protéinase-3 du neutrophile peut également activer les précurseurs membranaires du TNF et de l'IL-1 $\beta$  [20]. La forme membranaire et soluble forment des homotrimères pour accomplir leur fonctions biologiques.





**Figure 4.** Superfamille du récepteur au TNF

Voies de signalisation associées aux TNFR1 et TNFR2. *Tiré de Aggarwal et al, 2003 [18]*

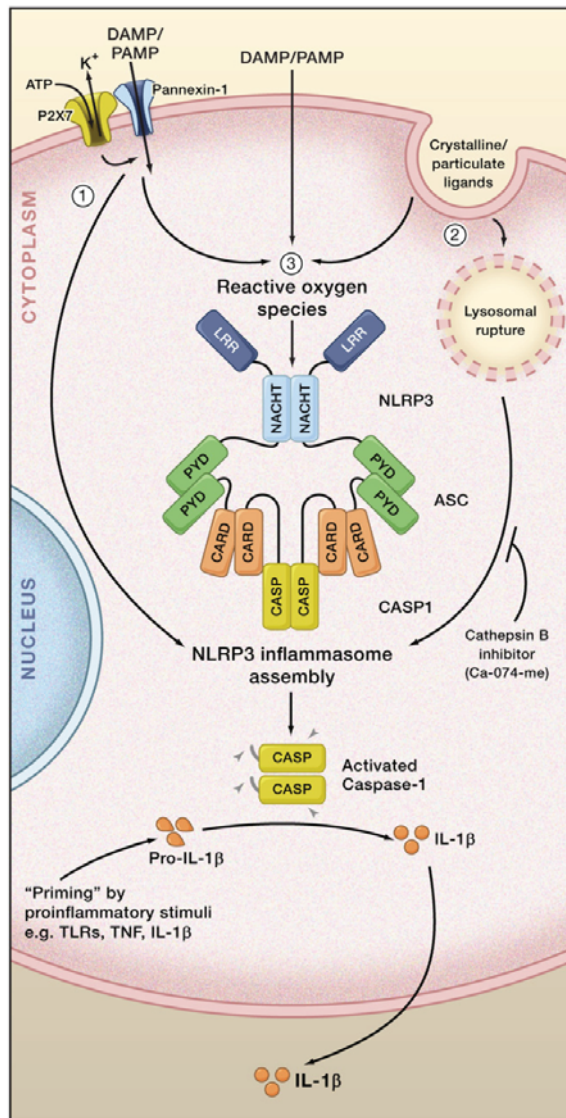
Deux récepteurs pour le TNF sont connus : le TNFR1 (Tnfrsf1a, p55, p60) et le TNFR2 (Tnfrsf1b, p75, p80) [16]. L'expression du TNFR1 est ubiquitaire tandis que l'expression du TNFR2 est restreinte aux cellules immunitaires et endothéliales [18]. Les voies de signalisation impliquées pour chacun diffèrent tout en ayant des effets biologiques qui se chevauchent (**Figure 4**). Le TNF membranaire se lie au TNFR1 alors que la forme soluble, au TNFR2. La liaison du TNF au TNFR1 permet le recrutement de TRADD (*TNFR-associated death domain*) et le déclenchement de l'apoptose. Le TNFR2 est associé à l'activation de facteurs de transcription pro-inflammatoires comme NF- $\kappa$ B et AP-1 via l'activation du TRAF2 (*TNFR-associated factor 2*). Chez le neutrophile humain, l'expression du TNFR2 est prédominante [21] toutefois l'activation des fonctions du neutrophiles semble être majoritairement opérée par le TNFR1 *in vitro* (production de ROS, dégranulation, adhésion, apoptose) avec un effet amplificateur du TNFR2 sur certaines d'entre elles (adhésion, apoptose) [21-24]. Le conditionnement du neutrophile par le TNF pour la phagocytose de particules opsonisées implique aussi uniquement le TNFR1 [23]. On suggère que le TNFR2 peut réguler la disponibilité du TNF à faible dose pour sa liaison au TNFR1 [23]. Parce que tous les types cellulaires expriment au moins un des récepteurs du TNF, cette cytokine est considérée centrale dans la réponse immunitaire et pléiotropique par la divergence de ses effets

biologiques. Bien qu'essentiel dans plusieurs processus homéostatiques, le TNF est associé à plusieurs pathologies, dont les maladies inflammatoires chroniques des voies respiratoires [25], en particulier à cause de son association à NF- $\kappa$ B.

#### *IL-1 $\beta$ : description moléculaire et biologique*

L'IL-1 $\beta$  (IL-1F2) appartient à la grande famille de l'IL-1 qui inclut 11 ligands dont l'IL-1 $\alpha$  (IL-1F1), IL-1Ra (*IL-1 receptor antagonist*, IL-1F3), l'IL-18 (IL-1F4) et l'IL33 (IL-1F11) [26]. Ses récepteurs sont aussi membres d'une superfamille, celle des immunoglobulines. Le récepteur de type I est responsable de la transduction du signal alors que l'IL-1RII sert de récepteur leurre (*decoy*) permettant de réguler la disponibilité de l'IL-1 [26]. Comme le TNF, l'IL-1 $\beta$  est produit sous forme de pro-peptide (31KDa) clivé par l'ICE (IL-1 $\beta$ -converting enzyme), aussi appelée caspase-1, possédant une activité cystéine protéase générant la forme mature et bioactive d'IL-1 $\beta$  (17KDa). Les mécanismes impliqués dans la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  demeurent incertains toutefois on a proposé l'implication de changements au niveau du potentiel de membrane, l'efflux d'ions potassium et la formation de pores réversibles liés à l'activation de la cellule par les récepteurs purinergiques [26]. Ainsi, l'ATP relâchée par les cellules en situation de stress ou endommagées permettrait l'activation de l'inflammasome (NLRP3, membre d'une sous-famille des *NOD-like receptors* (NLRs)) auquel s'associe la procaspase-1 [27] (**Figure 5**). La production de ROS et la libération d'enzymes granulaires pourrait également contribuer à l'activation de l'inflammasome et donc à l'autoclivage et à l'activation de la pro-caspase-1 [27].

Comme le TNF, l'IL-1 $\beta$  est exprimée précocement dans la réponse inflammatoire, soit dans la phase aiguë, et agit ainsi comme principal pyrogène endogène, cause l'hypotension, la perte de poids et la neutrophilie qui y sont associés. Elle induit l'expression de gènes pro-inflammatoires comme la COX-2, l'iNOS, les MMPs, les cytokines et chimiokines [26]. L'IL-1 $\beta$  et le TNF ont la propriété de réguler à la hausse leur propre expression, créant ainsi des boucles de rétroaction positives de la réponse inflammatoire, et d'augmenter l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales et les leucocytes, favorisant ainsi le recrutement de ces derniers dans les tissus. L'IL-1 $\beta$  a aussi été impliquée dans la pathogénèse de diverses maladies inflammatoires chroniques, davantage que l'IL-1 $\alpha$ , dont l'inflammation allergique [25, 28, 29], les maladies autoimmunes et la propagation des cellules cancéreuses (revus dans [26]).



**Figure 5.** Inflammasome et sécrétion d'IL-1 $\beta$ .

Schéma représentant les mécanismes possiblement impliqués dans l'activation de la pro-caspase-1. 1) L'ATP active la formation de pores membranaires (hémicanal pannexin-1) de manière P2X7-dépendante (efflux de K<sup>+</sup>) ce qui permet aux agonistes extracellulaires d'entrer et de stimuler le NLRP3. 2) la libération du contenu lysosomal suite à la rupture du lysosome par des particules ou des cristaux phagocytés est détectée et mène à la formation du NLRP3, via la Cathepsin-B, par exemple. 3) Tout agoniste suscitant la production de ROS et la formation ROS-dépendante du complexe NLRP3. L'assemblage des Caspase-1 mène à leur auto-activation et à la maturation de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18. Tiré de Schroder et Tschopp, 2010 [27]

### IL-8 (CXCL8): description moléculaire et biologique

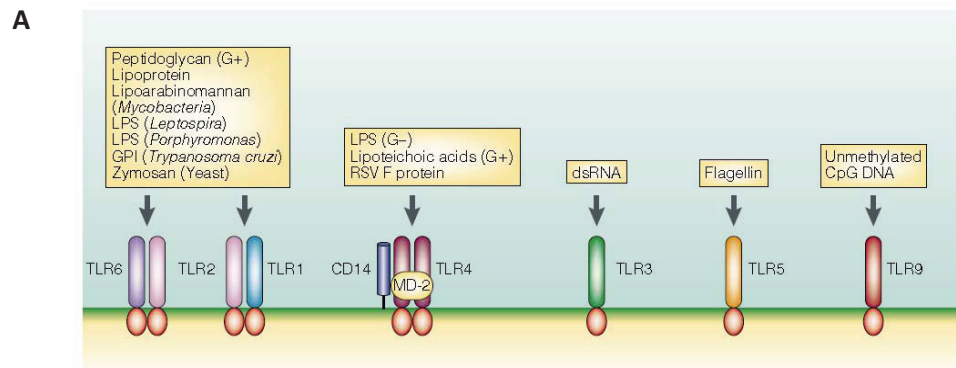
L'IL-8 fût en 1987 la première chimiokine découverte (revu dans [30]). Appelée à l'époque NAF (*Neutrophil Activating Factor*), l'IL-8 s'est avérée apte à induire la relâche de calcium, des changements morphologiques, la production de ROS et la dégranulation chez les neutrophiles de manière PTX (*Pertussis toxin*/anatoxine coquelucheuse)-dépendante et comparable au fMLP [31]. La production d'IL-8 est régulée au niveau transcriptionnel par les facteurs NF- $\kappa$ B et AP-1, et au niveau post-transcriptionnel (stabilisation de l'ARNm) par le p38 MAPK [32, 33]. Plusieurs types de cellules sécrètent l'IL-8 dont les cellules épithéliales, endothéliales, musculaires lisses et

synoviales, les fibroblastes, kératinocytes, mastocytes, monocytes, lymphocytes T, NK, neutrophiles, etc. [33, 34]. L'IL-8 humain est d'abord traduit sous forme de protéine précurseur de 99 acides aminés dont la séquence signal est clivée pour générer la forme mature de 77 (fibroblastes et cellules endothéliales) ou 72 aa (leucocytes) [32, 35]. L'IL-8 peut être tronquée davantage au niveau NH<sub>2</sub>-terminale en fragments de 71, 70 ou 69 aa par des protéases exprimées par les cellules sécrétant l'IL-8 ou accessoires. Les formes les plus courantes sont celles de 77, 72 et 69 aa, la première étant clivée rapidement *in vivo* pour générer le fragment de 72 aa. Les différents homologues tronqués possèdent une activité chimiotactique qui croît avec la réduction de la taille du fragment. Les sérines protéases du neutrophile peuvent augmenter l'affinité de l'IL-8 pour leur récepteurs en apprêtant sa portion N-termial [20]. À des concentrations nanomolaires et donc physiologiques, l'IL-8 agit sous forme de monomère. Comme mentionné précédemment, l'IL-8 se fixe à deux récepteurs avec une affinité forte et similaire, les CXCR1 (350 aa) et 2 (360 aa)[32]. Ils partagent des séquences homologues à 80%, sauf dans la portion NH<sub>2</sub>-terminale qui détermine leur affinité pour d'autres chimiokines. Aussi, les deux récepteurs diffèrent quant à l'activation des différentes voies de signalisation associées aux fonctions du neutrophile. Par exemple, l'activation de la phospholipase D et de la NADPHox ainsi que la désensibilisation de récepteurs à d'autres chimiokines (C5a et fMLP) s'effectuent principalement par le CXCR1 [32]. En plus d'activer les neutrophiles et de contribuer à leur recrutement, l'IL-8 agit sur plusieurs autres types cellulaires. Ainsi, l'IL-8 recrute et active les basophiles pour la synthèse d'histamine et de leucotriènes, induit le chimiotactisme des lymphocytes directement et indirectement via la relâche du contenu des granules du neutrophile (voir la section Granulopoïèse, granules et processus de dégranulation) (revus dans [32]). L'IL-8 possède également un pouvoir chimiotactique pour les cellules du muscle lisse vasculaire [36] et bronchique [37], les cellules endothéliales et les fibroblastes [32], l'impliquant de la sorte à la fois dans les processus de réponse inflammatoire aiguë que dans le remodelage tissulaire.

### *Toll-like Receptors (TLRs)*

Les TLRs constituent une famille de 10 à 15 récepteurs (selon les espèces) dédiés à discriminer les molécules du soi et du non-soi. Ces récepteurs ont été initialement identifiés en étudiant la drosophile et *Toll*, un gène essentiel pour sa défense contre les infections fongiques

[38]. Subséquemment, on a identifié des homologues chez l'homme (**Figure 6**) [39]. Les TLRs qui détectent les acides nucléiques se situent dans des compartiments intracellulaires (lysosomes-endosomes). Ils ne sont donc normalement pas accessibles pour la reconnaissance des acides nucléiques de l'hôte, à moins d'une déficience au niveau de la clairance des cellules apoptotiques.



**Figure 6.** Récepteurs Toll-like (TLRs).

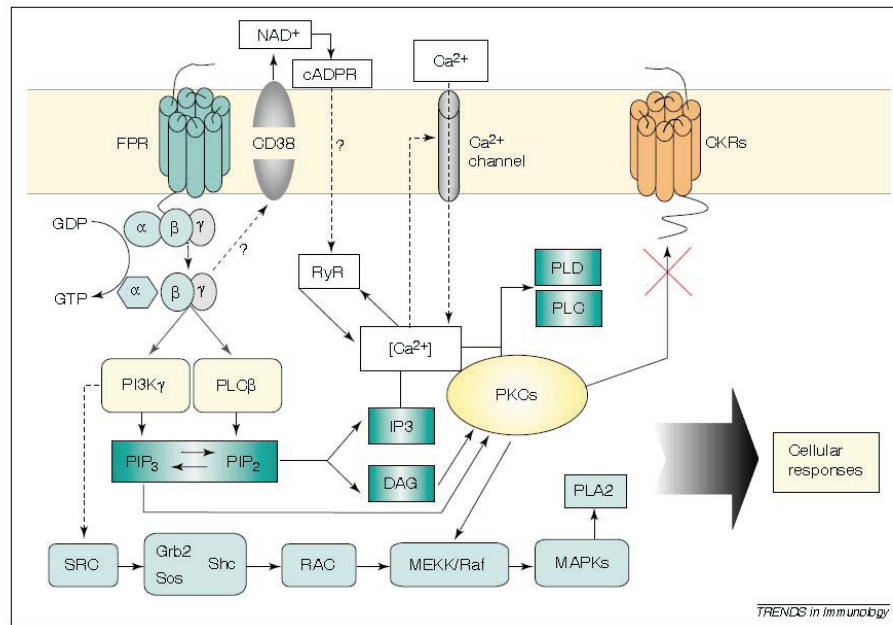
Ligands des différents récepteurs Toll-like. Tiré de Medzhitov et al, 2001 [40].

Les TLRs partagent des voies de signalisation similaires entre eux, et avec le récepteur de l'IL-1, qui mènent à l'activation de facteurs de transcription ciblant la régulation de gènes pro-inflammatoires [41]. Brièvement, tous les TLRs sauf le TLR3 utilisent l'adaptateur MyD88 pour la transduction du signal. Ce dernier recrute les kinases IRAK1, IRAK4 et TRAF6 qui activent les IKKs, permettant la dégradation des inhibiteurs du facteur de transcription *Nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B), les I $\kappa$ Bs, et ainsi la translocation au noyau du NF- $\kappa$ B pour la transcription de médiateurs inflammatoires [41] et anti-inflammatoires (IL-10, [42]). La voie de signalisation dépendante de MyD88 mène à l'activation de la cascade des MAPK (*mitogen activated protein kinases*) dont p38 MAPK, ERK et c-Jun N-terminal kinase (JNK). Une voie indépendante de MyD88 impliquant les molécules adaptatrices TRIF et TRAM, mène à la production des interférons de type 1, et est initiée suivant l'activation des TLR3 et 4 seulement [41]. Elle n'est toutefois pas activée suivant la stimulation du TLR4 chez les neutrophiles humains [43].

#### Récepteur des peptides formylés (FPR)

Les peptides formylés sont de puissants facteurs chimiotactiques pour les neutrophiles humains et pour les autres cellules qui expriment leurs récepteurs. Ils peuvent aussi stimuler la

production de cytokines pro-inflammatoires et l'activation de métabolisme oxydatif (voir section sur les neutrophiles). Ces peptides sont dérivés des mécanismes de traduction de l'ARNm propre aux procaryotes, chloroplastes et mitochondries, pour lesquels l'acide aminé initial, la méthionine (Met), est formylé (fMet) [44]. La formylation est reconnue par le facteur d'initiation de la traduction chez la bactérie. Il a été démontré que l'activité chimiotactique des peptides d'origine bactérienne est déterminée par la présence de cette fMet, et non d'une méthionine non formylée ou d'un autre acide aminé formylé, et par une taille minimum de deux résidus [45]. Le formyl Met-Leu-Phe (fMLP) en est le prototype. Deux types de récepteurs existent pour les peptides formylés, le FPR et le FPR-like 1 (FPRL1) [46]. Ce sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sensibles à l'inhibition par l'anatoxine coquelucheuse (**Figure 7**). Le récepteur est internalisé suivant sa liaison au ligand, dégradé puis de nouveaux récepteurs sont ensuite ré-exprimés. Le FPRL1 est un récepteur de faible affinité au fMLP qui requiert de fortes doses pour être activé (de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ) [46] possiblement en modifiant sa conformation et son état [47]. Cela pourrait justifier les effets différentiels du fMLP en fonction de sa dose. Il est à noter que plusieurs peptides non-formylés (i.e. annexin 1, produits de dégradation des protéines de phase aiguë, peptides de l'enveloppe de certains virus) sont aussi des ligands pour les FRP et FRPL1 et il existe des ligands lipidiques pour le FPRL1 (ex. lipoxine A4)[46]. Plusieurs de ces ligands et les peptides formylés eux-mêmes ont des effets « anti-inflammatoires » et entre autres, provoquent la désensibilisation d'autres récepteurs pour agents chimiotactiques (ex. CXCR1 et CXCR2) [48].



**Figure 7.** Récepteur du fMLP (FPR)

Suivant l'activation du FPR, il y a dissociation de la protéine G<sub>i</sub> et activation de plusieurs voies de signalisation, dont l'entrée de calcium et l'activation de la PKC. Cette dernière effectue la désensibilisation des récepteurs de chimiokines indépendants. CKR: chemokine receptor. DAG: diacylglycerol. IP: inositol phosphate. MAPK: mitogen-activated protein kinase. PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase. PIP<sub>2</sub>, phosphatidylinositol diphosphate. PIP<sub>3</sub>, phosphatidylinositol trisphosphate. PKC: protein kinase C. PLA: phospholipase A. PLC: phospholipase C. PLD: phospholipase D. RAC, Rac guanine triphosphatase family. SRC: Src-like tyrosine kinases. *Tiré de Le et al, 2002 [46]*

### Cellules épithéliales

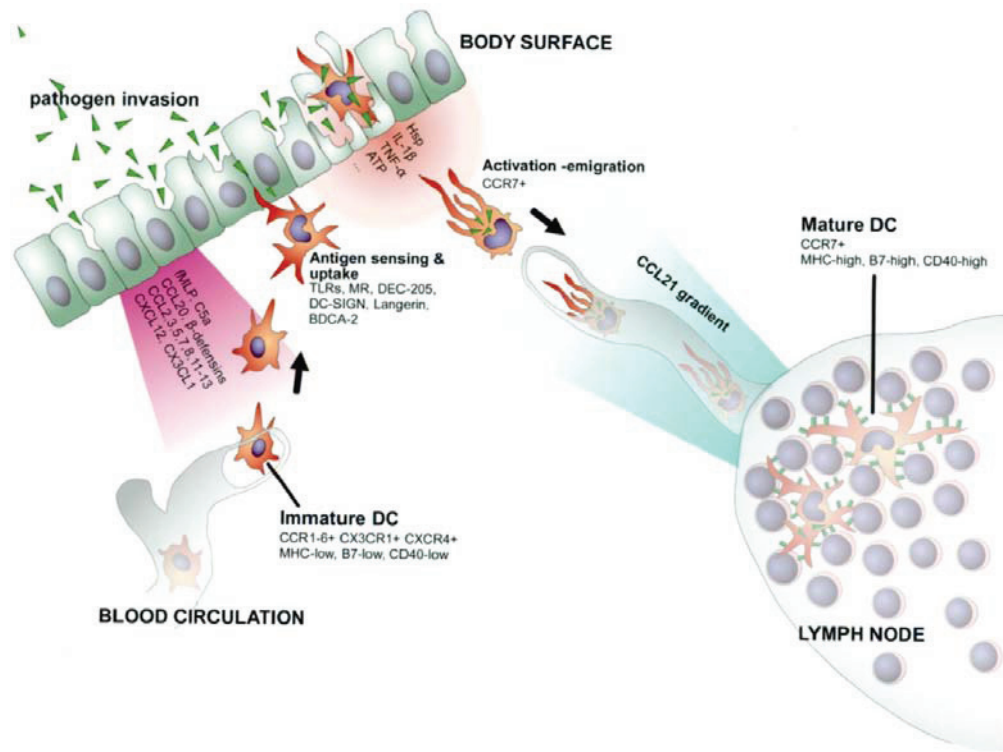
En plus de leur fonction de barrière physique, les cellules épithéliales sécrètent de nombreux médiateurs de l'inflammation et contribuent à réguler le trafic cellulaire pulmonaire. Les cellules épithéliales de type II et les cellules de Clara sont responsables de la production des protéines de surfactant hydrophiles SP-A et SP-D, aussi appelées collectines [49], qui agissent comme opsonines des microorganismes et des cellules apoptotiques [50, 51] et contribuent à réguler le niveau d'activation des cellules inflammatoires [51]. Les cellules épithéliales produisent du peroxyde d'hydrogène via l'expression de la Duox [52] et, en association avec la lactoperoxydase sécrétée à forte concentration dans les voies respiratoires, forment des



métabolites oxydés constituant un mécanisme de défense antibactérien important [53]. Elles sécrètent aussi des  $\beta$ -défensines, la lactoferrine, des interférons de type I et III et produisent le NO, qui sont aussi des acteurs importants dans la défense antibactérienne et anti-virale [14]. Les cellules épithéliales possèdent plusieurs récepteurs de l'immunité innée dont les TLR1 à 10 [14], NOD 1 et 2 [54] et les récepteurs aux  $\beta$ -glucanes (dectin-1) [55]. La localisation des TLRs peut être apical (TLR2) ou basolatérale (TLR4 et TLR5) [56]. Leur stimulation entraîne la production d'une variété de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de facteurs de croissance permettant de réguler la réponse inflammatoire [57] et la relâche de plusieurs types de métalloprotéinases (MMP-1, 8, 9, 10 et 13) [58].

Notons qu'en plus de leur fonction de première ligne, les cellules épithéliales jouent un rôle important dans le recrutement et la maturation des cellules dendritiques immatures via leur expression de multiple chimiokines de type CC, du TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) [55] ainsi que de facteurs de croissance (ex. GM-CSF) [59] (**Figure 8**). De plus, les cytokines pro-inflammatoires TNF et IL-1 $\beta$  ont pour effet de briser la tolérance immunologique en activant les cellules dendritiques et en favorisant la production synergique des chimiokines et facteurs de croissance par les cellules épithéliales (voir section cellules dendritiques) [60]. De cette manière, les cellules épithéliales permettent d'établir un pont entre la réponse innée et acquise.





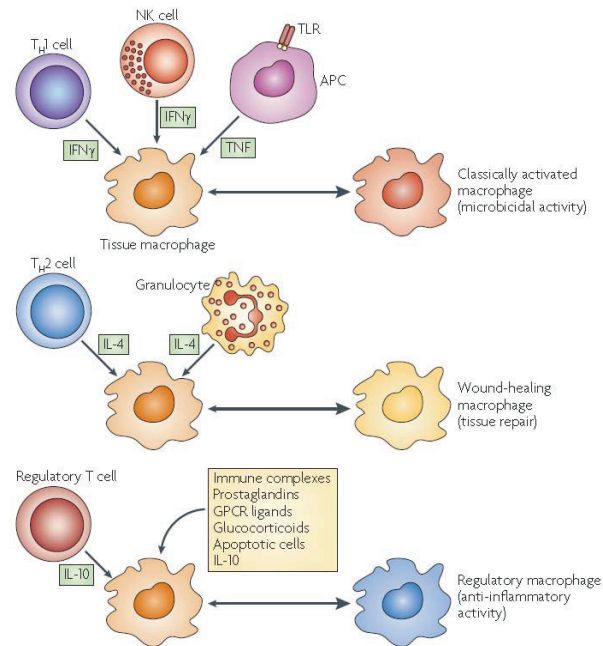
**Figure 8.** Activation et recrutement des cellules dendritiques par les cellules épithéliales.  
Tiré de Varmaelen et al, 2005 [61]

### Macrophages

Les macrophages pulmonaires sont en intime association avec la surface épithéliale chez l'homme. Ils sont présents dans les voies respiratoires, sur ou sous l'épithélium; dans le tissu interstitiel alvéolaire (macrophages interstitiels); sur la surface alvéolaire (macrophages alvéolaires) et aux niveaux intravasculaire et pleural [2, 62]. Les macrophages alvéolaires se situent à la jonction des septums alvéolaires mais ne sont pas présents librement dans l'espace alvéolaire (discuté dans [63]). Cet état est en fait un artéfact de fixation des poumons qui déloge les macrophages de leur position réelle [64]. Les macrophages alvéolaires possèdent des phénotypes hétérogènes, tant par leur taille, leur densité que par leur expression d'antigènes de surface [62]. Ils phagocytent les particules qui se déposent sur la surface alvéolaire à l'intérieur de 24h. De plus, ils engouffrent les phagocytes qui ont capturé des particules, comme les neutrophiles recrutés dans l'espace alvéolaire ou alors d'autres macrophages [62]. Ils ont également la capacité de

présenter l'antigène aux lymphocytes, toutefois avec une efficacité inférieure à celle des cellules dendritiques [65]. Les macrophages sont une source importante de cytokines et de chimiokines [66]. L'ingestion de particules et l'activation des macrophages résultent en la production de chimiokines de type CXC ELR<sup>+</sup> et ainsi, au recrutement de neutrophiles dans l'espace alvéolaire. La réponse inflammatoire implique aussi le recrutement de macrophages interstitiels et de monocytes sanguins dans les alvéoles ou les voies respiratoires. En général, le nombre de phagocytes recruté est exagéré par rapport au nombre de particules déposées afin d'assurer leur clairance. Néanmoins, le poumon est un organe dit « immunosuppresseur », c'est-à-dire que la réponse inflammatoire et immunitaire est étroitement régulée afin de préserver l'intégrité du tissu, essentielle à la survie de l'hôte. En ce sens, on a montré que les macrophages alvéolaires (MAs) ont un effet inhibiteur sur le développement d'une réponse immunitaire [67] et plus particulièrement, sur le recrutement des cellules dendritiques vers les poumons chez les modèles expérimentaux. Les macrophages ont pour ainsi dire un effet tampon sur l'activation de la réponse immunitaire. Chez l'homme et la souris, les macrophages interstitiels seraient particulièrement impliqués dans ce phénomène, par opposition aux MAs [65, 68].

L'environnement pulmonaire est donc spécialisé dans la reconnaissance et l'élimination des intrus sans causer d'inflammation excessive. Ainsi, le type d'activation qui caractérise les macrophages pulmonaires est *alternatif* (AAM $\phi$ , *alternatively activated macrophages*) ou *cicatriciel* (*wound-healing macrophages*), par opposition à l'activation classique des macrophages (CAMs, *classically activated macrophages*) [66, 69] (**Figure 9**). Le microenvironnement pulmonaire contribuerait à ce type d'activation [70, 71]. Un exemple de réponse immunitaire spécifique aux poumons et à la présence de AAM $\phi$  est l'infection par *mycobacterium tuberculosis* [69]. Les AAM $\phi$  ne sont pas efficaces pour combattre les infections, particulièrement par cette bactérie. De plus, en produisant l'IL-10, ils retardent l'activation et la migration des cellules dendritiques, le recrutement des cellules Th1 et l'activation classique des macrophages par le TNF et l'INF $\gamma$  et de ce fait, la clairance du pathogène. Il en résulte un nombre élevé de AAM $\phi$  infectés qui forment des granulomes isolés des macrophages classiques et des cellules Th1 [69]. Bien que l'activation des macrophages soit catégorisée en CAM $\phi$ , AAM $\phi$  et M $\phi$  régulateurs, il est à noter que ces polarisations sont plastiques et non exclusives, c'est-à-dire que les macrophages peuvent changer leur phénotype et partager les caractéristiques de deux types d'activation [66].



**Figure 9.** Différents types d'activation des macrophages.

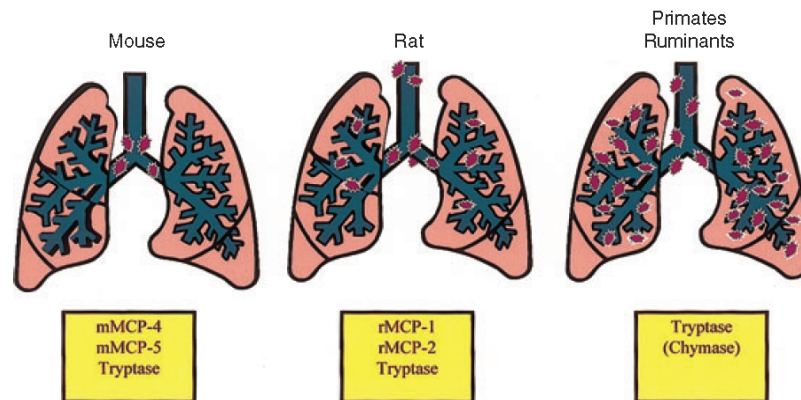
*Tiré de Mosser et al, 2008 [66]*

### *Cellules métachromatiques : mastocytes et basophiles*

Les mastocytes sont postés tout au long du poumon dans le tissu interstitiel des voies respiratoires, des alvéoles, de la plèvre et des lobes pulmonaires, près des petits vaisseaux et des veinules post-capillaires, où ils guettent les microorganismes [2]. Ces sites changent en fonctions de l'espèce (**Figure 10**) [72]. Les mastocytes possèdent des granules dont le contenu est majoritairement composé de protéases neutres préformées et liées à l'héparine, soit la tryptase et la chymase [73]. Leur réponse est rapide (secondes à minutes) suivant la reconnaissance d'un pathogène via les TLRs, des IgEs et IgGs spécifiques (FcγRI, FcγRII) ou indirectement par la stimulation avec la substance P, la neurotensine, l'endothéline-1 ou le C5a [74]. La dimérisation des récepteurs aux IgEs ou IgGs par des antigènes multimériques est nécessaire afin de provoquer la dégranulation et la relâche d'histamine de protéases et de VEGF par les mastocytes. Ils synthétisent aussi des médiateurs lipidiques (PGD<sub>2</sub>, LTC<sub>4</sub>) et des cytokines (IL-1, TNF). Ces produits permettent d'augmenter le débit circulatoire et la perméabilité vasculaire, le recrutement des

neutrophiles et la contraction du muscle lisse bronchique [5, 73]. L'inflammation locale et l'accumulation de fluide causée par l'activation des mastocytes peuvent compromettre la fonction pulmonaire.

Le rôle préjudiciable des mastocytes et de leur activation systémique dans la réponse anaphylactique est bien connu [73]. Ainsi, la réponse des mastocytes se caractérise par deux phases, aiguë et tardive, la première étant caractérisée par la dégranulation de particules préformées, et la seconde par la synthèse *de novo* de médiateurs (cytokines, éicosanoïdes). Bien que les mastocytes soient souvent associés à une réponse immunitaire de type Th2, ils peuvent produire l'IL-12 dans certaines conditions et aussi contribuer au recrutement de lymphocytes cytotoxiques suivant leur activation par des agonistes des TLR3. Leur production d'IL-10 et d'autres médiateurs anti-inflammatoires leur confèrent également un rôle dans la résolution de l'inflammation [73]. Les mastocytes assurent d'autre part le contrôle et l'élimination des parasites en recrutant les cellules immunitaires appropriées, en régulant la perméabilité de la paroi intestinale, la production de mucus et l'expulsion des parasites par la contraction musculaire spasmodique [73].



**Figure 10.** Localisation des mastocytes pulmonaires : comparaisons inter-espèces.

Les enzymes tryptase et chymase du mastocytes sont des sérines protéases neutres qui possèdent une activité similaire à la trypsine ou à la chymotrypsine, respectivement [72]. Chez l'homme, les mastocytes pulmonaires expriment tous la tryptase ( $MC_T$ ) mais l'expression de la chymase ( $MC_{TC}$ ) n'est pas ubiquitaire : celle-ci est principalement exprimée par les mastocytes situés près des glandes (73%) et dans le muscle lisse (15%) [72, 74]. Les  $MC_T$  se situent dans l'épithélium de l'arbre bronchique et dans le tissu interstitiel alvéolaire proximal et périphérique [74]. Une augmentation de la présence de  $MC_{TC}$  est observable dans la

périphérie des voies respiratoires chez des patients asthmatiques [75]. *Figure tirée de Miller, H.R. and Pemberton, A.D., 2002 [72].* **Chez le cheval**, il a été démontré que les mastocytes sont présents sur tout l'arbre bronchique, bien que la fréquence de leur détection soit variable au niveau de la trachée (revu dans [76]). Tous les mastocytes pulmonaires équins n'expriment pas la tryptase [77], contrairement à l'homme. Il existe une prépondérance de mastocytes chymase+ (MC<sub>C</sub>) dans la paroi des bronches et bronchioles (lamina propria et épithélium) alors que les MC<sub>T</sub> dominent autour des vaisseaux sanguins. Les chevaux atteints de souffle ont plus de MC<sub>C</sub> [77] et de MC<sub>T</sub> intra-épithéliaux [78] bronchiques et bronchiolaires par rapport aux chevaux normaux.

Les basophiles sont pour leur part des cellules circulantes matures et recrutées aux sites de la réponse immunologique ou inflammatoire (revu dans [79]). Comme les mastocytes, ils représentent une source importante d'histamine et sont activés par la liaison des IgEs et l'agrégation de leurs récepteurs FcεRI. Leur profil de médiateurs inflammatoires est similaire à celui des mastocytes, excepté que leurs protéases neutres possèdent une activité similaire à la bradykinine et se lient au sulfate de chondroïtine. Ils expriment en plus l'élastase et une enzyme similaire à la cathepsine G et sécrètent moins de médiateurs lipidiques et de cytokines par rapport aux mastocytes (LTC<sub>4</sub>, IL-4 et IL-13, principalement). Avec les mastocytes, les basophiles sont impliqués dans la réponse de type Th2. On a rapporté une augmentation du nombre de basophiles dans les voies respiratoires des patients asthmatiques par rapport aux individus normaux lors de l'exacerbation des symptômes et de l'inhalation d'un allergène (revus dans [80]). Les basophiles sont aussi les principales cellules métachromatiques présentes dans l'expectoration induite chez les patients asthmatiques atopiques et pourraient jouer un rôle dans la phase tardive de la réponse allergique chez ces patients [80].

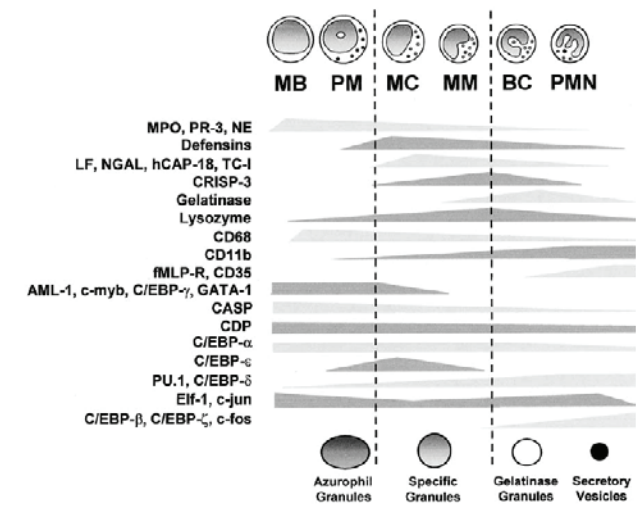
## ***Neutrophiles***

Les neutrophiles sont produits en grande quantité à partir des cellules souches myéloïdes de la moelle osseuse à raison de  $10^{10}$  quotidiennement chez l'humain [11]. Une des fonctions principales du neutrophile est de migrer vers les tissus infectés afin d'éliminer les agents pathogènes envahisseurs par phagocytose et par la relâche de produits antimicrobiens. Dans ces conditions, la production et la relâche de neutrophiles dans le sang périphérique peuvent être augmentées jusqu'à 10 fois, via l'expression de facteurs de croissance comme le G-CSF. Il existe 3 états du neutrophiles dans le sang périphérique, soient 1) au repos (inactif, *resting*); 2) conditionné (*primed*) ou 3) activé [81]. Les facteurs de croissance exprimés en situation de réponse inflammatoire conditionnent les neutrophiles à répondre à certaines chimiokines exprimées par l'endothélium activé au site de l'inflammation. Lors d'une inflammation, le programme de mort cellulaire des neutrophiles qui limite leur demi-vie en circulation est inhibé afin de permettre aux neutrophiles de mener à terme leurs fonctions [82]. En plus de leur rôle plus traditionnel de phagocytes professionnels, les neutrophiles contribuent à réguler la réponse immunitaire et constituent un pont entre la réponse immunitaire innée et acquise. En effet, plusieurs des molécules contenues dans leurs granules ou produites *de novo* (cytokines et chimiokines), leur métabolisme oxydatif, et même leur mort permettent aux neutrophiles de diriger la réponse immunitaire. Ainsi, l'activation excessive ou aberrante des neutrophiles contribue au dommage tissulaire associé aux maladies inflammatoires chroniques qu'elles soient traumatiques, autoimmunes ou allergiques. Certaines des fonctions des neutrophiles étudiées dans le cadre de cette thèse seront décrites plus en détails dans cette section (exclues : phagocytose, métabolisme oxydatif, production de leucotriènes). Lorsqu'observables, certaines des caractéristiques spécifiques aux neutrophiles équins seront décrites.

### Granulopoïèse, granules et processus de dégranulation

La granulopoïèse est un processus continu permettant la génération d'un grand nombre de neutrophiles matures à partir d'un nombre relativement faible de cellules souches hématopoïétiques. Le précurseur commun de la lignée myéloïde est le myéloblaste, lui-même dérivé d'une cellule souche progénitrice pluripotente commune à tous les leucocytes (**Figure 11**). Les étapes de différenciation successives sont le promyélocyte, le myélocyte, métamyélocyte, le

neutrophile immature non-segmenté (*band cells*) et le neutrophile segmenté [83]. Elles sont identifiables chez le neutrophile humain par des changements au niveau de l'expression de molécules de surface [84] et de la synthèse des différents types de granules (**Figure 11, Tableau II**). Les granules azurophiles, ou primaires, riches en myéloperoxydase (MPO) sont les premières à apparaître au stade promyélocyte par bourgeonnement et fusion de vésicules immatures à partir du Golgi [85]. Ces granules réagissent positivement avec le colorant basique azyre A, d'où leur appellation. Les granules formées ultérieurement sont peroxydase-négatives et subdivisées en granules secondaires (ou « spécifiques ») et tertiaires (ou « gélatinase »). Les granules spécifiques sont formées au stade myélocytes et métamyélocytes et ont une haute teneur en lactoferrine. Les granules tertiaires sont caractérisées par leur contenu élevé en gélatinase [85]. Ces étapes de différenciation sont régulées par une variété de facteurs de transcriptions (ex. LEF-1, RUNX, PU.1, C/EBP- $\alpha$ ) et diverses cytokines (ex. G-CSF, GM-CSF, IL-3) [83, 85].



**Figure 11.** Granulopoïèse chez le neutrophile.

Séquence de synthèse des protéines et de leur stockage dans les différents types de granules des neutrophiles lors de leur maturation. Les facteurs de transcription impliqués à chacune des étapes sont identifiés. MB : myéloblaste. PM : Pro-myélocyte. MM : métamyélocytes. BC : band cells. PMN : neutrophile polymorphonucléaire. Tiré de Faurchow et Borregaard, 2003 [85]

La dégranulation du neutrophile s'opère tout au long de son parcours vers le site inflammatoire. D'abord, en réponse aux cytokines exprimées par les cellules endothéliales, il y a exocytose des granules spécifiques des neutrophiles permettant l'exposition des intégrines au niveau de la membrane (adhésion ferme), mais aussi de plusieurs autres récepteurs tel FPR, le CR1 (complement receptor 1), le CD14 (LPS/lipoteichoic acid-receptor), le Fc $\gamma$ III [85] qui leur permettront de reconnaître et de phagocytter ultérieurement les microorganismes à l'origine de la réponse inflammatoire (**Tableau II**). La dégranulation des granules spécifiques correspond dans le

temps avec le clivage des L-sélectines par des métalloprotéinases membranaires [86]. Chaque type de granule possède une sensibilité propre à l'exocytose. Les granules formées précocement requièrent un stimulus plus puissant, tant *in vitro* qu'*in vivo* [85].

**Tableau II.** Protéines membranaires et solubles des granules du neutrophile

Azurophil granules	Specific granules	Gelatinase granules	Secretory vesicles
<i>Membrane</i>			
CD63	CD11b/CD18	CD11b/CD18	Alkaline phosphatase
CD68	CD15	Cytochrome <i>b</i> <sub>558</sub>	CD10
Presenilin 1	CD66	Diacylglycerol deacetylating enzyme	CD11b/CD18
Stomatin	CD67	fMLP-R	CD13
V-type H <sup>+</sup> -ATPase	Cytochrome <i>b</i> <sub>558</sub>	Leukolysin	CD14
	fMLP-R	NRAMP-1	CD16
	Fibronectin-R	SCAMP	CD45
	G-protein <sub>γ</sub> -subunit	SNAP-23, -25	CR1
	Laminin-R	uPA-R	C1q-R
	Leukolysin	VAMP-2	Cytochrome <i>b</i> <sub>558</sub>
	NB1 antigen	V-type H <sup>+</sup> -ATPase	Decay-accelerating factor (DAF)
	19-kDa protein		fMLP-R
	155-kDa protein		Leukolysin
	Rap1, Rap2		VAMP-2
	SCAMP		V-type H <sup>+</sup> -ATPase
	SNAP-23, -25		
	Stomatin		
	Thrombospondin-R		
	TNF-R		
	uPA-R		
	VAMP-2		
	Vitronectin-R		
<i>Matrix</i>			
Acid β-glycerophosphatase	β <sub>2</sub> -Microglobulin	Acetyltransferase	Plasma proteins
Acid mucopolysaccharide	Collagenase	β <sub>2</sub> -Microglobulin	
α <sub>1</sub> -Antitrypsin	CRISP-3 (SGP-28)	CRISP-3	
α-Mannosidase	Gelatinase	Gelatinase	
Azurocidin	hCAP-18	Lysozyme	
BPI	Histaminase		
β-Glycerophosphatase	Heparanase		
β-Glucuronidase	Lactoferrin		
Cathepsins	Lysozyme		
Defensins	NGAL		
Elastase	uPA		
Lysozyme	Sialidase		
MPO	Transcobalamin-I		
N-acetyl-β-glucosaminidase			
Proteinase-3			
Sialidase			
Ubiquitin-protein			

R, receptor; CRISP, cystein-rich secretory protein; SGP-28, specific granule protein of 28 kDa; uPA, urokinase-type plasminogen activator. Other abbreviations as explained in text.

*Tiré de Faurschou et Borregaard, 2003 [85]*

Les neutrophiles possèdent dans leurs granules une variété de médiateurs aux propriétés antibactériennes et cytotoxiques. Les granules tertiaires, plus facilement soumises à l'exocytose,



contiennent principalement des enzymes qui permettent la dégradation de la matrice extracellulaire et des récepteurs membranaires impliqués dans l'extravasation et la migration. Les granules secondaires, par leur contenu, participent d'avantage à l'activité antimicrobienne, bien qu'elles partagent plusieurs protéines avec les granules tertiaires puisqu'elles sont transcrites et stockées continuellement entre les étapes myélocytes à neutrophiles segmentés [85]. Citons parmi les enzymes de dégradation de la matrice les métalloprotéinases (MMP)-2 et 8 (gélatinase A et B) et MMP-9 (collagénase). Elles sont stockées sous forme d'un précurseur inactif et activées par clivage protéolytique suivant leur exocytose. Ces MMPs contribuent à la destruction et au remodelage tissulaire (dont l'angiogénèse [87]) lors d'inflammation chronique ainsi qu'à la régulation du recrutement de cellules inflammatoires, incluant les neutrophiles. Elles génèrent des produits de clivage de la matrice ayant des propriétés chimiotactiques via les récepteurs CXCR1 et 2 [88] ou encore en clivant diverses chimiokines au niveau N ou COOH-terminal [89]. Les MMPs peuvent également contribuer au clivage de protéines ou de récepteurs membranaires [86, 90]. Le déséquilibre entre la relâche de MMPs et de leurs inhibiteurs (TIMPs, *Tissue Inhibitors of Metalloproteases*) est considéré comme un facteur déterminant dans plusieurs maladies inflammatoires pulmonaires dont l'ALI (*acute lung injury*), l'asthme et lors de fibrose pulmonaire pathologique [85]. Autrement, certains constituants des granules des neutrophiles ont des effets antimicrobiens en altérant la membrane bactérienne ( $\alpha$ -défensines, BPI, hCAP-18, lactoferrine, lysozyme), d'autres en interférant avec le métabolisme fer-dépendant de certains microorganismes (NGAL, lactoferrine, Nramp1) ou en générant des réactifs toxiques dérivés de l'oxygène via le cytochrome  $b_{558}$  (constituant de la NADPHox) et la MPO, qui convertit le peroxyde ( $H_2O_2$ ) en acide hypochloreux (HOCl) et génère d'autres produits de chloration, radicaux tyrosyles et intermédiaires du nitrogène s'attaquant aux membranes cellulaires. Certaines des enzymes granulaires du neutrophiles ont en elles-mêmes des propriétés chimiotactiques et activatrices pour les neutrophiles, les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes CD4+ et CD8+, amplifiant la réponse inflammatoire et constituant de la sorte un pont entre l'immunité innée et adaptative [85]. Particulièrement, les alpha-défensines et cathelicidines des neutrophiles peuvent recruter et activer les cellules dendritiques en plus de promouvoir la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales [91]. Ces peptides peuvent se lier à la fibrine et au

plasminogène, inhiber la fibrinolyse et ainsi mener à la déposition de fibrine [92]. Ce phénomène peut contribuer à la fibrose des tissus en situation d'inflammation chronique [93].

Les sérines protéases des granules azurophiles du neutrophile, la protéinase-3, la cathepsine G et l'élastase, sont reconnues pour agir non seulement comme enzymes antibactériennes et de dégradation de la matrice mais aussi comme immunomodulateurs (revus dans [20]). Elles agissent au niveau des membranes bactériennes soit en clivant les facteurs de virulence ou en causant leur dépolarisation et leur rupture. Au niveau extracellulaire, les sérines protéases s'associent à la chromatine sous forme de NETs (*neutrophil extracellular traps*) expulsés suivant leur simulation [94]. Une forte proportion de ces enzymes demeure ancrée dans la membrane plasmique à la surface des neutrophiles suivant l'exocytose des granules azurophiles [20]. Sous cette forme active, protégée de l'effet des inhibiteurs endogènes ( $\alpha$ -1 antitrypsin, elafin et anti-chymotrypsin), elles contribuent à réguler l'activité de chimiokines, de cytokines et de récepteurs. Enfin, les sérines protéases peuvent également activer certains récepteurs comme les  $\beta$ 2 intégrines, le TLR4 et les récepteurs PAR2 (proteinase-activated receptor 2) (revus dans [20]).

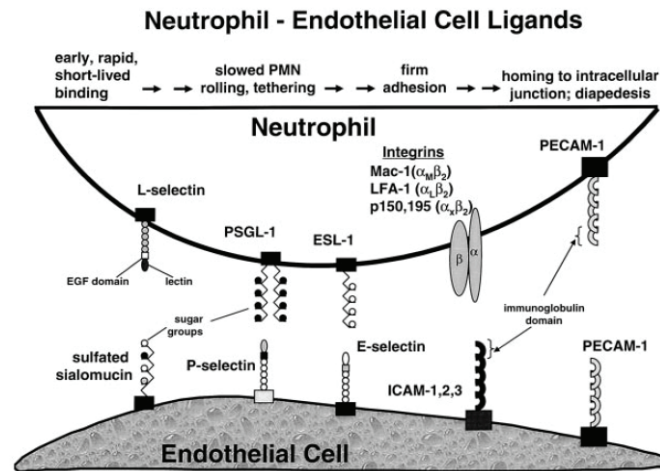
### Recrutement

Roulement, adhésion ferme, transmigration et molécules impliquées.

Les neutrophiles agissent comme des cellules sentinelles. Ils roulent sur les parois endothéliales et détectent les changements moléculaires associés à l'inflammation. Le roulement est un processus de marginalisation normal, en particulier au niveau de la vascularisation pulmonaire [95]. Seulement lors d'un dommage ou d'une infection, l'activation des cellules endothéliales des veinules post-capillaires permettra aux neutrophiles d'y adhérer pour ensuite migrer vers les tissus.

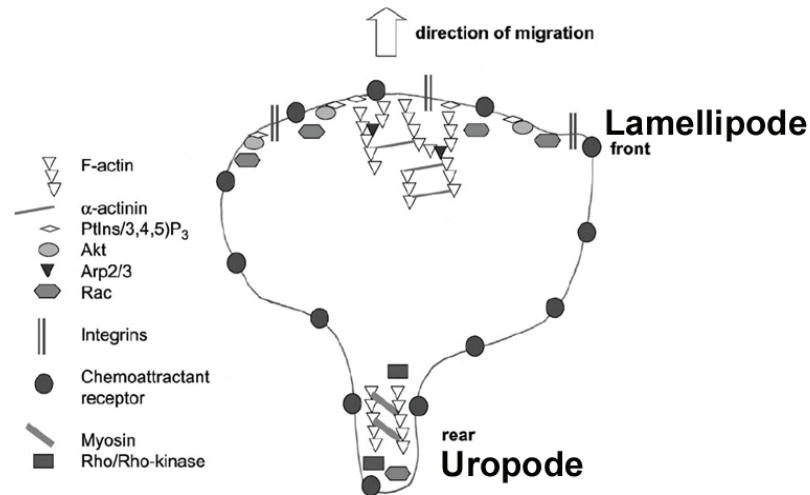
Le roulement résulte d'un attachement réversible du neutrophile aux cellules endothéliales. Il requiert des interactions entre des molécules d'adhésion exprimées à la surface de ces deux types cellulaires soient les L-sélectines du neutrophile et les différents ligands des cellules endothéliales constitués de protéines fucosylées incluant le CD34 et GlyCAM-1[95-97]. Il est possible d'inhiber le roulement des neutrophiles à l'aide d'anticorps bloquant les L-sélectines. Les neutrophiles fraîchement relâchés de la moelle osseuse expriment des taux élevés de L-sélectine, qui au fil du temps sont naturellement clivées [95]. Dans les premières minutes suivant

sa stimulation, la cellule endothéliale exprime la P-sélectine, une molécule stockée dans ses granules, qui se lie au PSGL-1 (CD162), une autre molécule d'adhésion constitutivement exprimée par les neutrophiles. Cette interaction, plus forte que l'interaction initiale entre les L-sélectines et ses ligands constitutifs endothéliaux, a pour effet de diminuer la vélocité du roulement des neutrophiles. L'E-sélectine est ensuite transcrite et exprimée par la cellule endothéliale et permet d'entretenir cette interaction. En présence de signaux appropriés, il y a une redistribution rapide des molécules de PSGL-1 au niveau de l'uropode du neutrophile (**Figure 12** et **Figure 13**). Cette étape signale la transition du roulement à l'adhésion [95].



**Figure 12.** Molécules d'adhésion et transmigration.

Séquence des interactions entre les molécules d'adhésion du neutrophile et de la cellule endothéliale lors du roulement et de l'adhésion ferme. *Tiré de Wagner et al, 2000 [95]*



**Figure 13.** Morphologie polarisée du neutrophile activé

Distribution des molécules de structure et de signalisation dans le cytoplasme et la membrane. *Modifié de Faurschou et Borregaard, 2003 [85].*

L'adhésion ferme s'effectue grâce à la présence de chimiokines, particulièrement l'IL-8, qui est internalisé au niveau abluminal par les cellules endothéliales, puis transcytosé vers le pôle luminal [81]. L'IL-8 est présenté sur les projections membranaires que forme la membrane cytoplasmique de la cellule endothéliale. Les CXCR2 et E-sélectines exprimés par les neutrophiles et cellules endothéliales respectivement, interviennent de manière coopérative pour l'adhésion ferme des neutrophiles sur la paroi endothéliale (arrêt du roulement) et l'initiation du processus de transmigration. Il y a alors un changement phénotypique du neutrophile associé à son activation, se traduisant par des modifications au niveau de l'expression de ses récepteurs et de molécules d'adhésion, particulièrement les intégrines [95, 98]. Les intégrines principalement impliquées dans l'adhésion ferme du neutrophile sont formées du complexe CD11b/CD18 (aussi Mac-1, CR3; **Figure 12**). Il s'agit de glycoprotéines transmembranaires possédant une portion extracellulaire formée des sous-unités  $\alpha_M$  et  $\beta_2$ , constituant le site de liaison extracellulaire. La portion intracellulaire est munie de sites de phosphorylation et de liaison aux protéines signalétiques du cytosquelette [95]. Les intégrines sont stockées au niveau des granules du neutrophile et exprimées à sa surface suivant sa stimulation avec une variété d'agonistes (ex. C5a, l'IL-8, GM-CSF, fMLP, LPS, facteur de venin de cobra), mais pas tous (ex. IL-3, IL-5) [98, 99]. On

peut tout de même considérer que la régulation à la hausse des intégrines est une réponse d'activation stéréotypée du neutrophile. La phosphoinositide 3-phosphate (PI3)-kinase  $\gamma$  permet la phosphorylation de protéines associées à l'actine et responsables de l'adhésion CD18-dépendante des neutrophiles à l'endothélium [81, 95]. Les intégrines se lient à l'ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), molécule d'adhésion membre de la superfamille des immunoglobulines (Ig), exprimée par les cellules endothéliales activées par des cytokines pro-inflammatoires. D'autres molécules exprimées par les neutrophiles, les LECAM-1 (lymphocyte peripheral lymph node homing receptor-1) permettent leur adhésion CD18-indépendante à l'endothélium, qui exprime le ligand ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule-1) [100].

La transmigration, aussi appelée diapédèse, est initiée lorsque les neutrophiles traversent à la manière d'amiboïdes la barrière endothéliale. Ce processus implique des interactions homophiles séquentielles entre les PECAM-1, également membres de la superfamille des Igs [101], exprimées constitutivement par le neutrophile et la cellule endothéliale, particulièrement aux jonctions intercellulaires (transmigration paracellulaire). Plus récemment, d'autres molécules d'adhésion impliquées dans la transmigration des neutrophiles ont été identifiées telles JAM-A (interaction homophile), JAM-C (hétérophile avec CD11b/CD18b) et ESAM (homophile) [102, 103]. Il est à noter que la migration transendothéliale peut s'effectuer par voie transcellulaire, processus par lequel la cellule endothéliale forme des projections cytoplasmiques recouverte de molécules d'adhésion symétriquement autour du neutrophile qui initie la migration du neutrophile à travers la cellule endothéliale [104]. La transmigration implique la protéolyse du tissu conjonctif de la lamina basale et réunit plusieurs composantes de la matrice extracellulaire (collagène type IV, laminine, fibronectine et glycosaminoglycan). Le passage des neutrophiles à travers la membrane basale permet, dans certaines circonstances, le passage subséquent d'autres cellules inflammatoires, comme les éosinophiles [105]. Ce phénomène est dépendant des MMP-9 qui dévoilent des sites de liaison pour les intégrines et les chimiokines par clivage des protéines de la matrice extracellulaire. Les cellules épithéliales, pour leur part, représentent une source abondante de chimiokines pour les neutrophiles. Leur niveau d'activation est donc déterminant pour diriger la migration des leucocytes vers le site d'infection/lésion. Ces cellules expriment également des molécules d'adhésion intercellulaires comme ICAM-1 qui permettent le passage

des leucocytes vers la lumière des voies aériennes. Les neutrophiles adhèrent de manière CD18-dépendante aux cellules épithéliales [99].

Mécanismes de migration du neutrophile : changements morphologiques, chimiokines et autres agonistes

Les neutrophiles peuvent se déplacer rapidement, soit jusqu'à une vitesse de  $20 \mu\text{m}/\text{min}$  [106]. Peu après (secondes) avoir été mis en présence d'agents chimiotactiques, des plissements se forment tout autour du corps cellulaire des neutrophiles où se polymérise l'actine. Quelques minutes plus tard, il y a formation d'une queue contractile appelée uropode, à l'arrière de la cellule, conduisant au développement d'une morphologie polarisée [106]. Le lamellipode est formé à l'avant de la cellule, riche en F-actine. Au moment de la migration, il y a une réorganisation constante de l'actine polymérisée en association avec le cytosquelette, dépendante ou non de l'adhérence du neutrophile aux substrats du milieu via les intégrines (**Figure 13**).

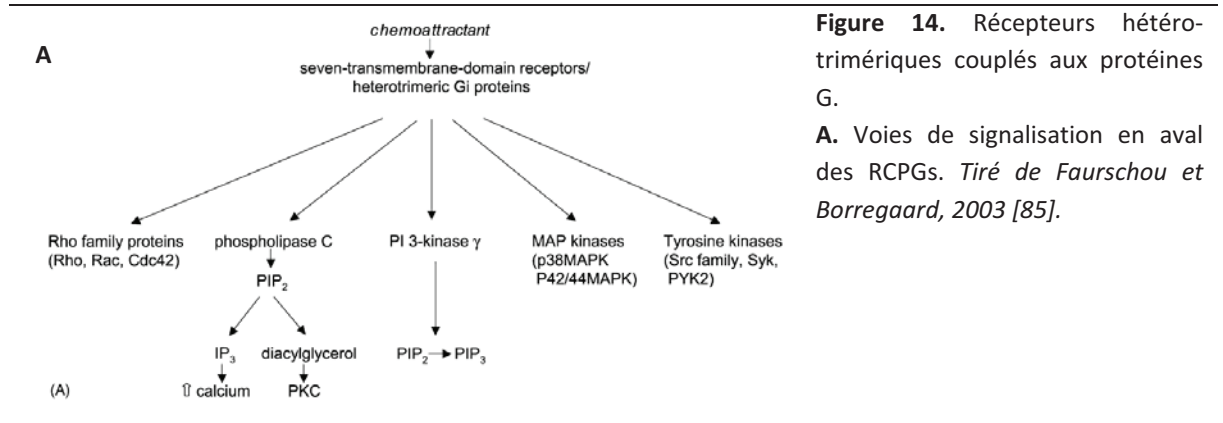
Deux formes de migration sont principalement décrites : la chémocinétique et la chimiotaxie. La chémocinétique implique un mouvement global aléatoire de la cellule en présence de concentrations uniformes de facteurs chimiotactiques tandis que la chimiotaxie sera orientée (ou directionnelle) dans un gradient de chimiokines [107]. Durant la chimiotaxie, les forces générées sont supérieures à celles impliquées en chémocinétique et la direction est maintenue tant que la position de la source reste inchangée.

Les agonistes responsables de la migration des neutrophiles incluent les chimiokines (des cytokines ayant des propriétés chimiotactiques), les peptides formylés d'origine bactérienne, la sphingosine-1-phosphate [108], le  $\text{LTB}_4$ , et les anaphylatoxines du complément ( $\text{C3a}$ ,  $\text{C5a}$ ). Ils signalent généralement via le même type de récepteur possédant sept domaines hélicoïdaux transmembranaires et couplé à des protéines liées au guanosine triphosphate (GTP), appelés récepteurs hétérotrimériques couplés aux protéines G (RCPG, **Figure 14A**). Les protéines G représentent un complexe formé des protéines  $\text{G}\alpha$ ,  $\text{G}\beta$  et  $\text{G}\gamma$  (**Figure 14B**). Dans sa forme inactive, le complexe est lié au guanosine diphosphate (GDP) et une fois activée (lié au GTP), la sous-unité  $\text{G}\alpha$  se dissocie. Autant  $\text{G}\alpha$  que  $\text{G}\beta\gamma$  participent aux voies de signalisation subséquentes. Celles-ci incluent l'activation de la phosphoinositide-3-kinase (PI3K)- $\gamma$  et la génération localisée de phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate ( $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ ) sur la surface interne de la membrane

plasmique, particulièrement au front de la cellule, où il participe à la réticulation des filaments de F-actine et à la polarisation de la cellule par la création d'un gradient interne (**Figure 13**) [106].

Les quelques 50 chimiokines décrites sont constituées de 67–127 acides aminés et sont particulièrement homologues au niveau de leur structure. Elles sont caractérisées par la présence de résidus cystéines localisés dans la partie N-terminale de la protéine [89, 109, 110]. Elles sont catégorisées par sous-groupes en fonction du nombre de cystéines qu'elles possèdent, séparées ou non par d'autres acides aminés (X) : C, CC, CXC, and CX3C (**Figure 15**). La présence des trois acides aminés glutamate, leucine et arginine, précédant la première cystéine des chimiokines CXC, appelé motif ELR+, détermine une certaine spécificité pour le recrutement des neutrophiles.

Les radeaux lipidiques sont de petits microdomaines membranaires (~50nm) riches en cholestérol et en sphingolipides, ayant le pouvoir de recruter certaines molécules de signalisation situées au niveau des membranes cellulaires. Ils servent à organiser le développement de la polarité cellulaire et la migration en localisant les enzymes et les canaux calciques aux endroits déterminants dans la cellule. Ainsi, la déplétion du neutrophile en cholestérol prévient la polymérisation de l'actine et l'accumulation de Rac dans le lamellipode [106, 111].



**Figure 14.** Récepteurs hétéro-trimériques couplés aux protéines G.

**A.** Voies de signalisation en aval des RCPGs. Tiré de *Faurschou et Borregaard, 2003 [85]*.

B

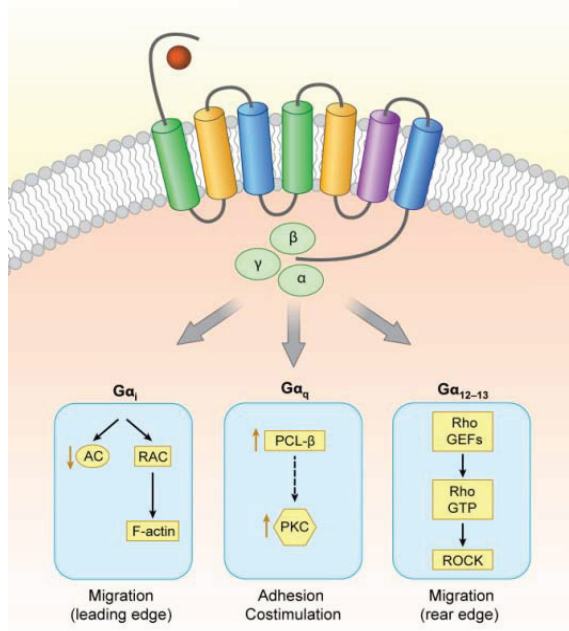


Figure 14 (suite)

B. Rôle et voies de signalisations en aval des différentes protéines G, associées aux RCPGs. Tiré de Viola et al, 2008 [110].

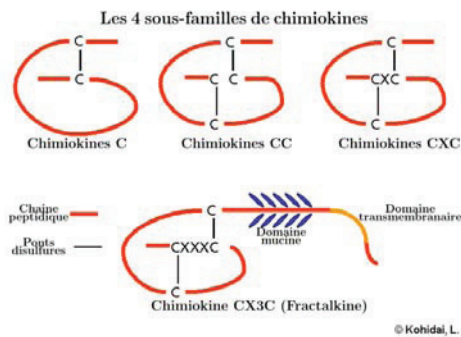


Figure 15. Les quatre sous-familles de chimiokines et leurs récepteurs.

Structure des sous-familles de récepteurs aux chimiokines, déterminée par la présence de deux à quatre cystéines reliées par des ponts disulfures. Tiré de <http://upload.wikimedia.org>.

Comme mentionné précédemment, les neutrophiles sont recrutés spécifiquement par les chimiokines CXC ELR+ (CXCL1, 2, 3, 4, 5, 7 et 8). Ils expriment fortement et de manière homogène le CXCR1 et le CXCR2 qui possèdent différents niveaux d'affinité et de sensibilité aux chimiokines [110]. Le CXCR1 est spécifique à l'IL-8 et au CXCL6 tandis que le CXCR2 se lie également à l'IL-8 avec une forte affinité mais aussi aux CXCL1, CXCL2 et CXCL5 avec une plus faible affinité. Ces chimiokines sont exprimées de manière redondante lors du processus inflammatoire [112]. L'expression membranaire du CXCR1 et 2 sur les neutrophiles est régulée par la liaison du ligand qui provoque la désensibilisation et l'internalisation transitoire des récepteurs [32, 113]. Des



inhibiteurs des CXCR1 et 2 ont été développés pour contrer la migration des neutrophiles impliquée dans diverses pathologies. Des anticorps monoclonaux (spécifique à l'espèce), des bloqueurs allostériques non-compétitifs (modification du site de liaison du ligand) et des compétiteurs antagonistes de faible poids moléculaire de l'IL-8 (famille des diarylurées, ex. SB225002 et SB265610; CXCL8 (3–73) K11R/G31P [112]) ont montré leur efficacité tant *in vitro* qu'*in vivo* (revus dans [114]).

#### Expression par les neutrophiles de récepteurs associés à la réponse immunitaire innée

Des études rapportent que les neutrophiles humains expriment les TLR1 à 10 sauf le TLR3 [115, 116]. On a montré qu'ils répondent à une stimulation avec leurs agonistes respectifs par des changements morphologiques, l'expression d'IL-8 (ARNm et protéine), le conditionnement pour la production de réactif de l'oxygène (TLR1/2, 5, 6, 7/8) et la phagocytose ainsi que par le clivage des L-sélectines [116]. Les neutrophiles expriment des niveaux similaires de TLR2, 4 et 9 par rapport aux monocytes [117]. Toutefois, la stimulation des neutrophiles par le CpG, un agoniste du TLR9, requiert un conditionnement préalable afin de générer des changements fonctionnels chez les neutrophiles [116]. L'expression des TLRs par les neutrophiles est régulée par les facteurs de croissance de la lignée myéloïde tels C-CSF et GM-CSF ainsi que par l'INF $\gamma$  [117].

Les neutrophiles humains expriment fortement les deux types de récepteurs pour les peptides formylés, le FPR et le FPR-like 1 (FPRL1) [46]. La liaison du fMLP aux neutrophiles génère de multiples signaux intracellulaires (**Figure 7**) [46-48]. S'en suit l'activation des fonctions du neutrophile soient l'adhésion, la migration, la production d'anion superoxyde (O $_2^-$ ) et l'exocytose des granules. Le fMLP augmente aussi la transcription de gènes pro-inflammatoires par les neutrophiles [118]. Les récepteurs se trouvent préformés dans les granules du neutrophile (**Tableau II**) [47]. Les faibles doses induisent seulement la migration du neutrophile alors que de fortes doses induisent l'activation du métabolisme oxydatif et une forte génération de calcium et d'AMPc intracellulaire. À forte dose (10 $^{-6}$ M), le fMLP a des effets "anti-inflammatoires" *in vitro* et par exemple, inhibe la relâche de TNF par les neutrophiles stimulés avec du LPS ou diminue l'expression des récepteurs de la portion Fc des IgGs [118].

### Particularité du neutrophile équin

Les neutrophiles équins au repos expriment de faible taux du récepteur à haute affinité pour les peptides formylés à sa surface (FPR, ~ 660 par cellule *versus* 2100 haute-affinité et 36000 faible-affinité chez le neutrophile humain) [119]. Leur conditionnement préalable (ex. LPS à 0.01-1µg/mL) est nécessaire pour induire des réponses fonctionnelles au fMLP, telles la production de ROS et l'adoption d'une polarité cellulaire, en parallèle avec l'augmentation du nombre de récepteurs exprimés (2.5 fois). Toutefois, le fMLP demeure inapte à induire le chimiotactisme des neutrophiles équins. Ces derniers migrent en contre partie efficacement dans un gradient d'IL-8, PAF et LTB<sub>4</sub> [120] et sont sensibles à la désensibilisation réciproque des récepteurs du PAF par l'IL-8, médiée par le CXCR2. Cet effet est associé à une élévation de la concentration intracellulaire d'AMPc. PAF semble être un agoniste supérieur pour l'adhérence des neutrophiles équins au plastique revêtu de sérum autologue (10%) [120]. Le LPS, pour sa part, augmente significativement l'expression des intégrines (>30 min, 0.5-5ug/mL), la relâche des granules primaires par les neutrophiles équins [121] et l'expression génique de cytokines pro-inflammatoires [122]. Les neutrophiles équins expriment l'ARNm du TLR4 [122, 123] et du TLR9 [124]. La réponse du neutrophile équin au LPS requiert la présence de sérum donc suggère l'implication des co-récepteurs LPS binding protein (LBP) et CD14 pour l'activation du TLR4 [119]. Le p38 MAPK s'avère essentiel dans la migration du neutrophile équin envers le LTB<sub>4</sub> et PAF [125]. Il est impliqué dans la réorganisation de l'actine et la polarisation du neutrophile, mais pas dans l'adhésion ni l'augmentation de l'expression des intégrines induits par ces agonistes, en opposition à l'adhésion induite par le TNF qui est p38 MAPK-dépendente, comme chez l'humain [126].

Avec les informations présentement disponibles, on peut postuler qu'en général, les neutrophiles équins répondent aux divers agonistes de manière analogue aux neutrophiles humains et possiblement par le biais de voies de signalisation similaires. Toutefois, leur répertoire de récepteurs diffère quelque peu de celui des neutrophiles humains, en particulier concernant le FPR. De ce fait, l'ampleur de la réponse inflammatoire du neutrophile équin en réponse aux peptides formylés pourrait en être affectée et cela pourrait être le résultat d'une adaptation évolutive chez le cheval.

### Les neutrophiles tissulaires

Les neutrophiles qui ont transmigrés montrent une expression accrue de récepteurs (CD11b, CD14, CD16, CD66b, FPR, CR1), une augmentation de leur métabolisme oxydatif et de leur pouvoir microbicide [127, 128]. Ces neutrophiles sont réfractaires à une stimulation supplémentaire avec des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF et montrent une sensibilité différente aux chimiokines associées à la régulation de l'expression de leurs récepteurs respectifs (ex. sensibilité plus grande pour les chimiokines terminales). Les neutrophiles tissulaires montrent également un retard de l'apoptose spontanée ou induite [127].

Une étude utilisant les microréseaux a permis de montrer des changements importants au niveau de l'expression de gènes associés à la réponse inflammatoire, à la migration, à la survie et aux voies de signalisation de I $\kappa$ B kinase (IKK)/NF- $\kappa$ B lors de la transmigration du neutrophile [129]. Dit autrement, les neutrophiles de l'espace alvéolaire ne présentent pas du tout le même profil génique que les neutrophiles sanguins. De plus, les changements observés chez les neutrophiles transmigrés au niveau des voies respiratoires d'individus ayant inhalé du LPS ne sont pas entièrement dus au stimulus et à l'activation cellulaire comme tels puisque la même stimulation *in vitro* des neutrophiles sanguins n'entraîne pas l'expression des mêmes gènes. L'analyse fonctionnelle de ces cellules confirme que les neutrophiles tissulaires produisent davantage d'anion superoxyde, montrent un retard de l'apoptose, une baisse de capacité migratoire envers l'IL-8 et des différences au niveau de la sécrétion de cytokines et de chimiokines par rapport aux neutrophiles périphériques stimulés ou non *in vitro*.

Les neutrophiles sont généralement considérés comme des cellules effectrices de la réponse immunitaire innée qui ne présentent pas la plasticité fonctionnelle liée à une différenciation tissulaire, comme les lymphocytes par exemple. De plus, l'opinion actuelle suggère que les neutrophiles sont des cellules différenciées, de courte demi-vie, qui ne recirculent pas puisqu'ils meurent dans les tissus par apoptose et sont débarrassés par les macrophages. Toutefois, des études ont montré que les neutrophiles peuvent émigrer des tissus vers la circulation, à la manière des mononucléaires [130]. Ces neutrophiles montrent un phénotype et une fonctionnalité distincts et sont présents en nombre important dans le sang des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques (~ 1% chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde et d'athérosclérose versus ~ 0.25% normalement).

### Production de cytokines et chimiokines par les neutrophiles

Les neutrophiles expriment et produisent plusieurs cytokines et chimiokines en réponse à divers agonistes. Ainsi, ils peuvent contribuer à la régulation de la réponse inflammatoire en influençant le comportement des cellules résidentes ou recrutées au site de l'inflammation de manière autocrine et paracrine. Il est à noter que la production de cytokines par le neutrophile est nettement moins abondante que celle d'un leucocyte mononucléaire par exemple, et l'on rapporte en moyenne des différences de niveau d'expression de 10-20 (ARNm) et 10-300 (protéine) fois plus faible par cellule chez le neutrophile [131]. Toutefois, considérant la prédominance du neutrophile dans certaines conditions inflammatoires, leur production de cytokine peut-être considérable. Le **Tableau III** présente une liste des cytokines produites par le neutrophile humain, soit de manière constitutive ou induite. Celles-ci incluent des cytokines pro- et anti-inflammatoires, des chimiokines pour diverses lignées myéloïdes (famille CC ou CXC) et des facteurs de croissance ciblant les leucocytes mais aussi les cellules du parenchyme. Nous ciblerons ici certaines cytokines pro-inflammatoires à l'étude et produites par le neutrophile soient l'IL-1 $\beta$ , le TNF et l'IL-8.

**Tableau III.** Cytokines et chimiokines produites par le neutrophile humain.

Pro-inflammatoires	Anti-inflammatoires	Chimiokines	
TNF- $\alpha$	IL-1RA	IL-8	MIP-1 $\alpha$
IL-1 $\alpha$	TGF- $\beta$	GRO- $\alpha$	MIP-1 $\beta$
IL-1 $\beta$	IL-10	GRO- $\beta$	MCP-1 <sup>a</sup>
IL-12		CINC-1	
IFN- $\alpha$		CINC-2 $\alpha$	
IFN- $\gamma$		IP-10	
IL-6 <sup>a</sup>		MIG	
		I-TAC	
Facteurs de croissance	Facteurs de l'angiogénèse/fibrose	Autres	
G-CSF	VEGF	Fas Ligand	
M-CSF <sup>a</sup>	TGF- $\alpha$	CD30 ligand	
GM-CSF <sup>a</sup>	HGF	Oncostatin M	
IL-3 <sup>a</sup>	LDGF	GDF	
SCF <sup>a</sup>	CEMF	NGF	
		BDNF	
		NT-4	

*Italique: demande confirmation définitive. <sup>a</sup>: ARNm seulement. Tiré de Cassatella M.A., 1999 [34].*

## TNF

Les conditions dans lesquelles les neutrophiles humains expriment et relâchent le TNF ont été décrites en détails par Cassatella [34]. Les faits les plus pertinents seront rapportés ici. Les premiers écrits (1990) rapportent la relâche protéique de TNF par une population de neutrophiles d'une pureté supérieure à 99% [132, 133] suivant une stimulation avec des lipopolysaccharides bactériens (LPS, 1 ng/mL-5ug/mL) et des agonistes particuliers (*C. albicans*). On y note une variabilité considérable entre individus (jusqu'à 10 fois). Le temps de stimulation nécessaire à la détection du TNF dans les surnageants est d'une heure (30 minutes pour l'ARNm). La relâche de TNF par le neutrophile semble être régulée par le taux d'AMPc cytosolique puisque des agonistes comme le fMLP, qui induisent une relâche transitoire d'AMPc [134], ou des analogues (dibutyrylAMPc) inhibent la relâche de TNF par les neutrophiles humains stimulés avec du LPS [118]. Ce phénomène est associé aux voies de sécrétion du TNF, plus précisément à l'actine du cytosquelette qui est régulée par des enzymes AMPc-dépendantes.

Le LPS (5ug/mL) stimule l'expression membranaire de TNF de manière maximale après 1h de stimulation [118]. Elle redescend aux niveaux de base après 2h, probablement suite au clivage de la cytokine et à la génération de sa forme soluble par la TACE. L'apogée de production de TNF par le neutrophile est atteinte après 5-10h de stimulation avec du LPS et sa détection diminue par la suite jusqu'à 24h. Le TNF sécrété dans le surnageant de culture est susceptible d'être clivé par les enzymes protéolytiques des neutrophiles suivant leur activation. Mentionnons entre autres l'élastase et la cathepsine G [20, 34]. Autrement, les récepteurs du TNF soient sous leur forme membranaire ou soluble peuvent capturer le TNF et empêcher sa détection dans le surnageant [135, 136]. La production de TNF dans le neutrophile est agoniste-dépendante [34] : sa sécrétion protéique varie en fonction des stimuli, en dépit de la synthèse de son ARNm [118, 129]. Cette régulation semble être spécifique au TNF parmi d'autres cytokines étudiées (IL-8, MIP1 $\beta$ , MCP-1). Inversement, certains facteurs (ex. NO) peuvent augmenter la relâche de TNF par les neutrophiles humains stimulés avec du LPS sans modifier les taux d'ARNm [137]. D'ailleurs, cet effet semble être spécifique aux neutrophiles car les macrophages n'augmentent pas leur relâche de TNF dans un même contexte. Enfin, des effets spécifiques de certains agonistes sur les différentes populations de leucocytes ont été rapportés suggérant que les neutrophiles puissent représenter la source principale de TNF dans certaines conditions [34].

## IL-1 $\beta$

La production d'IL-1 $\beta$  par les neutrophiles est rapportée chez plusieurs espèces (revus dans [34]). Plusieurs agonistes, particuliers (zymosan, microcristaux) ou solubles (GM-CSF, TNF, PMA, A23187 avec cytochalasine B, LPS), mais aussi des conditions de culture à forte densité cellulaire, induisent l'expression génique et protéique d'IL-1 $\beta$  par les neutrophiles humains. Au moins 4-5h sont requises avant de pouvoir détecter l'IL- $\beta$  dans le surnageant de culture. On a rapporté que suivant une stimulation avec du LPS, des niveaux similaires d'ARNm d'IL-1 $\beta$  étaient transcrits chez les cellules mononucléaires et les neutrophiles toutefois, les neutrophiles étaient moins efficaces pour sa traduction en protéine [138]. Le TNF et l'IL-1 $\beta$  régule de manière autocrine l'expression d'IL-1 $\beta$  par les neutrophiles. Aussi, le TNF utilisé seul augmente l'expression protéique d'IL-1 $\beta$  qui reste associée à la cellule à 70% [139]. Une stimulation supplémentaire avec des agonistes insolubles (cristaux) génère la sécrétion extracellulaire d'IL-1 de 4 à 8 fois supérieure. Il est à noter que les neutrophiles sécrètent constitutivement l'IL-1RA [139], une anticytokine agissant comme antagoniste compétitif des récepteurs à l'IL-1 en s'y liant sans initier la transduction du signal [34]. Cela représente donc un mécanisme d'autorégulation négative de la réponse inflammatoire par le neutrophile. L'expression de l'IL-1 et de l'IL-1RA est différenciellement régulée en présence de certains agonistes. Par exemple, le TNF fait passer le ratio IL-1RA/IL-1 de  $591 \pm 79$  à  $187 \pm 25$  en augmentant de 3 et 10 fois la relâche d'IL-1RA et d'IL-1 $\beta$ , respectivement [139]. De ce fait, certaines conditions inflammatoires peuvent favoriser la relâche de l'un au détriment de l'autre, amplifiant ou atténuant la réponse inflammatoire [34]. La production d'IL-1 $\beta$  par les neutrophiles a été démontrée in situ dans plusieurs contextes d'inflammation chronique [140-143].

## IL-8 (CXCL8)

L'IL-8 est la cytokine la plus abondamment produite par les neutrophiles. Les neutrophiles fraîchement isolés expriment de manière constitutive l'ARNm de l'IL-8. Cette observation pourrait être justifiée soit par l'activation des neutrophiles durant les procédures d'isolation cellulaire car les taux d'ARNm de l'IL-8 diminuent après quelques heures de culture [144] ou alors par la présence d'un pool d'ARN facilitant l'apparition rapide de la protéine après activation cellulaire. Nombreux sont les agonistes pouvant induire la production d'IL-8 par le neutrophile humain (revus

dans [34]). Mentionnons les ionophores, la substance P, la lactoferrine et autres peptides de nature basique, certains virus comme le RSV, plusieurs bactéries, champignons et leur produits dérivés ainsi que le C5a, PAF, le LTB<sub>4</sub> et tous les agents chimiotactiques pour les neutrophiles, créant ainsi un effet amplificateur de la réponse immunitaire et de l'inflammation neutrophilique [34]. La production d'IL-8 peut être considérée comme un marqueur de l'activation non spécifique des neutrophiles. Le stimulus le plus puissant décrit par Cassatella est la phagocytose de particules de levures opsonisées (Y-IgG), générant des concentrations d'IL-8 dans les surnageants de culture atteignant les ng par mL. La production d'IL-8 peut être transitoire ou soutenue, selon l'aptitude des agonistes à induire la production concomitante d'IL-1 $\beta$  et de TNF, qui amplifient de manière autocrine et paracrine la relâche d'IL-8 par les neutrophiles [131]. Ainsi, le fMLP induit uniquement un pic de production d'IL-8 suivant 2-3h de stimulation, alors que le LPS mène à une relâche biphasique d'IL-8 : une phase précoce qui débute 20 à 30 minutes suivant l'initiation de la stimulation et pendant laquelle 20-30% de l'IL-8 totale est sécrétée et une phase tardive qui survient 5-6h suivant l'activation et se poursuit jusqu'à 20h après. Cette dernière est inhibée par l'utilisation d'anticorps contre l'IL-1 $\beta$  et le TNF [131]. Le TNF est un puissant stimulateur de la synthèse d'IL-8, supérieur à l'IL-1 $\beta$  lorsqu'utilisée seule. Par contre, cette dernière est dramatiquement synergiste lorsque qu'utilisée en combinaison avec le TNF.

Dans un contexte d'inflammation neutrophilique, soit l'asthme non-éosinophilique, les neutrophiles se sont avérés être la principale source d'IL-8 parmi les cellules présentes dans l'expectoration de patients atteints [145]. Aussi, chez des patients atteints d'asthme allergique, les neutrophiles peuvent produire l'IL-8 via la réticulation des IgEs [145]. Une étude comparant des patients atteints de diabète de type 2 et des sujets normaux rapporte aussi une augmentation de la production basale (IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-8 et TNF) et induite par le LPS (IL-1 $\beta$ , IL-8 et TNF) de cytokines pro-inflammatoires [146]. Dans cette étude, l'expression différentielle de cytokines était plus marquée chez les neutrophiles que les monocytes, suggérant une contribution particulière des neutrophiles à la réponse inflammatoire aberrante associée à cette maladie.

#### Particularités du neutrophile équin

Chez le cheval, l'expression génique du TNF, de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-8 par les neutrophiles stimulés ou non a été rapportée plus d'une fois par PCR [147-149]. L'expression protéique du TNF

et de l'IL-1 $\beta$  a été suggérée par l'utilisation d'anticorps anti-TNF et anti-IL-1 $\beta$  neutralisants qui a permis de bloquer le retard de l'apoptose spontanée observée chez les neutrophiles pulmonaires de chevaux atteints du souffle [150]. À l'heure actuelle, bien qu'un anticorps anti-CXCL8 équin ait été produit chez le lapin, son utilisation n'a pas permis d'étudier l'expression d'IL-8 par le neutrophile équin et son exportation s'avère limitée par les réglementations douanières canadiennes. L'IL-6, l'INF $\gamma$ , l'IL-12 et l'IL-23 ont été détectées par PCR quantitatif chez une population de neutrophiles sanguin pure à >98% [149]. En plus de l'IL-8, les neutrophiles équins transcrivent le MIP-2 [148] et l'IL-17A [123] suivant leur activation, suggérant qu'ils puissent amplifier l'inflammation neutrophilique, comme chez l'homme.

### Apoptose

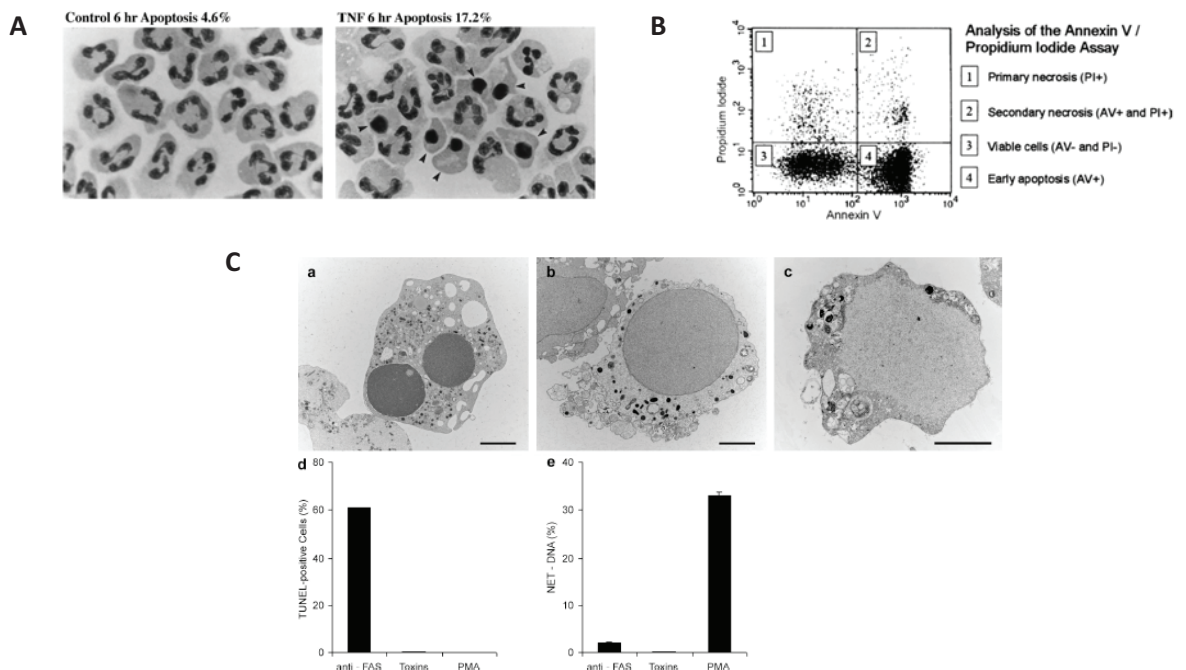
#### Mécanismes de l'apoptose spontanée chez le neutrophile

Les neutrophiles ne survivent que de 8 à 20h en circulation et, de un à quatre jours dans les tissus. L'apoptose constitutive ou spontanée des neutrophiles est essentielle pour conserver leur homéostasie et l'intégrité des tissus [151]. Un changement dans le nombre de neutrophiles périphériques peut prédisposer l'hôte aux infections microbiennes (neutropénie) ou refléter la conséquence d'une infection bactérienne ou d'une leucémie myéloïde, par exemple (neutrophilie). En condition homéostatique, il a été démontré que les neutrophiles préphériques retournent vers la moelle osseuse lorsque sénescents et sont phagocytés par les macrophages qui y sont présents. Ce phénomène est dirigé par la chimiokine CXCL12 et l'expression de son récepteur par les neutrophiles, le CXCR4. Les neutrophiles en voie d'apoptose expriment des niveaux réduits de CXCR1 et 2 et plus forts de CXCR4, consistant avec le fait qu'en condition homéostatique, il n'y a pas de neutrophiles apoptotiques circulants. D'autres sites de clairance incluent la rate (31%) et le foie (29%) [82]. Les neutrophiles tissulaires entrent dans le processus d'apoptose une fois qu'ils ont ingéré le microorganisme invasif et sont « proprement » phagocytés par les macrophages. Cette étape est cruciale afin de mener à terme la réponse inflammatoire, prévenant la libération de médiateurs toxiques dans le milieu extracellulaire, ce qui survient dans le cas de la nécrose. La phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages contribue à diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires par ces derniers, en plus de stimuler



leur relâche de médiateurs « anti-inflammatoires » (IL-10, TGF- $\beta$ ) [152] représentant ainsi un mécanisme d'autorégulation négative de la réponse inflammatoire.

L'apoptose constitutive du neutrophile est semblable à l'apoptose classique, qui implique la condensation et la convolution du cytoplasme, l'exposition des phosphatidylsérines au niveau de la membrane extracellulaire, la formation de vacuoles cytoplasmiques, la dépoliarisation de la membrane mitochondriale, la condensation nucléaire et la fragmentation internucléosomale de l'ADN [151]. Une fois la chromatine clivée, les fonctions du neutrophile incluant la relâche de produits toxiques, la transcription de gènes et la migration deviennent limitées [153]. Il y a ensuite formation de corps apoptotiques destinés à la phagocytose par les macrophages. Si les neutrophiles apoptotiques ne sont pas reconnus et phagocytés, on parle de nécrose secondaire des neutrophiles (**Figure 16, A et B**) [154].



**Figure 16.** Les différents processus de mort cellulaire chez le neutrophile.

**A.** Morphologie du neutrophile en apoptose induite par le TNF (6h) montrant la condensation du noyau en microscopie à lumière blanche. *Tiré de Murray, J. et al 1997 [24].* **B.** Analyse du taux d'apoptose (quadrant #4), de nécrose primaire (#1), de nécrose secondaire (#2) et de viabilité (#3) par cytométrie de flux. L'annexine V marquée d'un fluorochrome se lie aux phosphatidyls sérines exposées à la surface du neutrophile apoptotique et l'iodure de propidium colore l'ADN des cellules dont la perméabilité membranaire est altérée (cellules nécrotiques). *Tiré de Turina, M., et al 2005 [154].* **C.** Morphologie du neutrophile évaluée par microscopie électronique montrant (a) l'apoptose induite par un anticorps anti-

Fas, caractérisée par la condensation du noyau et la présence de vacuoles cytoplasmiques; (b) la nécrose induite par des toxines, caractérisée par la perte de ségrégation de l'eu- et de l'hétérochromatine mais le maintien des granules et de l'enveloppe nucléaire et; (c) la mort cellulaire active par formation de NETs (*neutrophil extracellular traps*) induite par le PMA, caractérisée par la fragmentation des membranes nucléaires et la dissolution des granules permettant le mélange de leur contenu avec celui du cytoplasme. Barre, 2 µm. (d) Marquage positif pour l'ADN fragmentée (TUNEL<sup>+</sup>) des neutrophiles apoptotiques. (e) Présence d'ADN extracellulaire dans la mort cellulaire induite par le PMA (formation de NETs). *Tiré de Fuchs, T.A. et al 2007 [155].*

Deux types de voie de signalisation mènent à l'apoptose [156]. La voie extrinsèque (type I) implique un récepteur de mort cellulaire comme FasR (CD95), TNFR1 (DR1) ou TRAILR (*TNF-related apoptosis inducing Ligands Receptor*) et la formation du *Death inducing signalling complex* (DISC) par association avec le *Fas-associated death domain* (FADD) et la pro-caspase 8. Cette voie mène à l'activation de la caspase 3 et au clivage de l'ADN. La voie intrinsèque (type II) implique la formation d'un apoptosome suite à la dépoliarisation de la membrane mitochondriale. Cette voie est empruntée dans les cas de dommage au niveau de l'ADN, formation de médiateurs oxydatifs dérivés de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) ou de la perte de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. En fait, les protéines Bid et Bax (pro-apoptotiques) sont relâchées suivant leur dissociation d'avec le Mcl-1 (anti-apoptotique) et transloquées vers les mitochondries dépoliarisées, provoquant leur perméabilisation. S'en suit la relâche de cytochrome c par les mitochondries et formation de l'apoptosome avec les molécules Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*), le dATP et la pro-caspase 9 [151, 156]. Ce groupe active finalement la caspase 3. Ces deux voies ne sont pas mutuellement exclusives.

Malgré le fait que les neutrophiles expriment les récepteurs de mort cellulaire en plus de leur ligand, CD95L [157] et TRAIL [158], ces voies de signalisation ne semblent pas être nécessairement impliquées dans leur apoptose spontanée puisque l'utilisation d'anticorps anti-TNF, Fas ou TRAILR ne la prévient pas. De plus, les neutrophiles de souris déficientes pour le gène Fas ou son ligand montrent un taux normal d'apoptose spontanée [156]. Les facteurs impliqués dans le cycle cellulaire et anti-apoptotiques clés comme Bcl-2, p53, cdc2, and Rb ne sont pas exprimés par les neutrophiles humains fraîchement isolés ou stimulés [159]. Ils expriment toutefois d'autres protéines de fonction homologue telles Mcl-1 et A-1 [160] et des protéines pro-apoptotiques (Bak, Bax). L'expression de Bcl-xL (survie) par les neutrophiles humains semble controversée [161]. Il a été proposé que le taux de Bax soit maintenu et que les niveaux de Mcl-1 diminuent au cours de la vie du neutrophile. D'ailleurs, Bcl-2 semble exprimé par les

promyélocytes ou la lignée précurseur HL-60, mais son expression cesse une fois la cellule différenciée, suggérant que le déclenchement du processus d'apoptose survient dès la relâche du neutrophile par la moelle osseuse [157, 162]. On suggère aussi que la perte de contact avec des facteurs de croissance présents dans la moelle osseuse (G-CSF et GM-CSF) mène à la préformation du DISC chez les neutrophiles, même sans liaison du DR. L'expression des récepteurs pour TRAIL peut augmenter chez les neutrophiles sénescents, les rendant plus susceptibles à l'apoptose induite par TRAIL [158]. L'expression des TRAIL-R1 et R2 peut aussi être régulée par l'engagement des CXCR4 par le SDF-1 [158].

Scheel-Toellner et collègues [156] proposent un modèle représentant l'initiation de la signalisation impliquée dans l'apoptose spontanée chez le neutrophile. Selon eux, la production de ROS peut causer le regroupement des DRs et activer la pro-caspase-8. Apuyant ce concept, on a montré chez des patients atteints de granulomatose septique chronique (défaut de la production de ROS) un retard marqué de l'apoptose spontanée des neutrophiles en culture (i.e. > 60% viabilité après 96h pour GSC *versus* ~0% pour normaux) [163]. De plus, l'administration d'antioxydant (catalase) retarde l'apoptose spontanée des neutrophiles normaux. Scheel-Toellner et collègues proposent que les niveaux de GSH (glutathion) diminuent au cours de la vie des neutrophiles et ainsi limite le contrôle de la production de ROS.

Les facteurs de croissance (GM-CSF, G-CSF), des composants bactériens (LPS), les chimiokines LTB<sub>4</sub>, IL-8 et PAF ainsi que l'IL-1 $\beta$  et l'hypoxie peuvent supprimer le programme d'apoptose tant *in vitro* qu'*in vivo* [24, 153]. L'activation du NF- $\kappa$ B, de la PI3-K et de ERK1/2 [164, 165] serait impliquée dans la transcription de Mcl-1, un protéine formant un complexe avec Bax et prévenant l'activation de la voie de l'apoptose intrinsèque [151]. Dans un contexte allergique, les IgEs retardent l'apoptose des neutrophiles provenant de patients asthmatiques en augmentant les niveaux de Mcl-1, réduisant l'activité de la caspase-3 et la dissociation de Smac de la mitochondrie vers le cytosol (voie mitochondriale) [166]. Une dérégulation de l'apoptose est observée dans d'autres contextes d'inflammation chronique tels que l'arthrite rhumatoïde et le syndrome de détresse respiratoire aigu (ARDS).

Enfin, d'autres formes de mort cellulaire, distinctes de l'apoptose et de la nécrose, sont rapportées chez les neutrophiles humains : 1) la relâche de NETs (*neutrophil extracellular traps*)

constitués de l'assemblage de la chromatine et des enzymes granulaires des neutrophiles [155] (**Figure 16C**); et 2) l'autophagie [167], qui implique la fusion de vacuoles intracytoplasmiques avec les lysosomes [168], observable chez certains patients atteints d'inflammation chronique [169].

### **La réponse immunitaire acquise:**

Elle est stimulée par la réponse immunitaire innée lors de laquelle des pathogènes seront détectés, capturés et présentés aux lymphocytes qui possèdent des récepteurs uniques et spécifiques à un épitope antigénique. La réponse acquise est divisée en réponse humorale (production d'anticorps spécifiques) et en réponse à médiation cellulaire (lyse cellulaire des cellules du Soi altérées), toutes deux associées à une mémoire immunitaire.

### *Cellules dendritiques*

Les cellules dendritiques (DCs) se situent entre les cellules épithéliales sur la couche basolatérale de l'épithélium bronchique [59] ou dans les alvéoles [60]. On retrouve aussi des cellules dendritiques « résidentes » dans les nœuds lymphatiques pulmonaires [60]. Ces cellules représentent le pont de base entre l'immunité innée et acquise. C'est une population spécialisée de cellules présentatrices de l'antigène. Elles possèdent tout l'arsenal de récepteurs de l'immunité innée, peuvent endocyter ou phagocyter les pathogènes et les apprêter pour les présenter aux lymphocytes T sur leur CMH I et II [59]. Les cellules dendritiques détiennent ce nom car elles possèdent des prolongements cytoplasmiques, à la manière des dendrites des neurones, qui font en sorte d'augmenter leur surface cellulaire. Ainsi leur potentiel de contact avec les lymphocytes est accru et elles peuvent atteindre l'extérieur des tissus, à travers la barrière épithéliale, et patrouiller pour la présence de pathogènes.

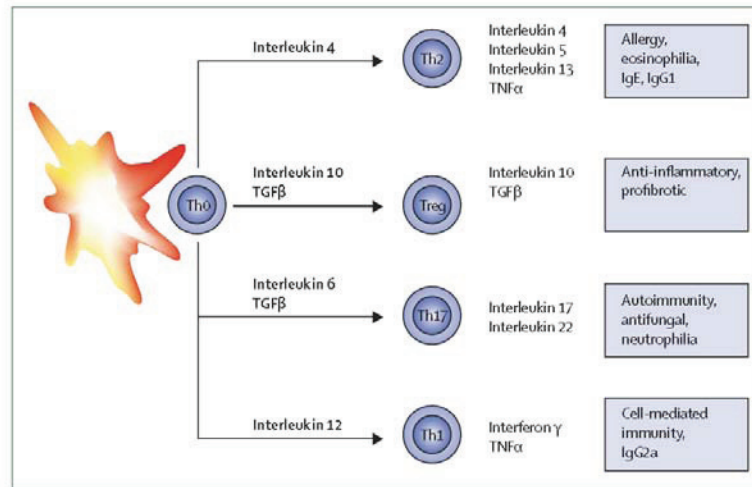
### Différents types de cellules dendritiques

Chez la souris, 5 types différents de cellules dendritiques ont été identifiés sur la base du profil d'expression de molécules de surface et de la localisation dans le poumon (revus dans [59]). En bref, on distingue les cellules dendritiques conventionnelles (DCc) chez la souris, autrefois nommées DC myéloïdes (DCm) chez l'homme et le rat, exprimant fortement le CD11c (CD11c<sup>hi</sup>) des cellules dendritiques plasmatoïdes (DCp) l'exprimant faiblement (CD11c<sup>dim</sup>). Ensuite, les différents types sont catégorisés selon leur expression relative de CD11b, un marqueur de la lignée myéloïde, et de leur situation (voies ou parenchyme respiratoires). On ne connaît pas encore entièrement tous les types et la distribution anatomique des cellules dendritiques dans le poumon humain, toutefois, on distingue trois types de DCc, CD1c+, CD16+ et CD141+, et des DCp qui expriment les CD304 et CD123 [59, 170]. Il semble qu'une spécialisation des cellules dendritiques existent et que certaines populations soient plus sensibles que d'autres à certains agonistes. Ces

différences s'exprimeraient par l'expression de récepteurs variés et de différentes enzymes protéolytiques impliquées dans l'apprêtement de l'antigène. D'ailleurs, on observe que les DCc des muqueuses sont plus efficaces pour présenter l'antigène que les DCc parenchymateuses [59].

#### Activation des cellules dendritiques : tolérance versus activation de la réponse immunitaire

Les cellules dendritiques peuvent être activées directement par des MMAPs, mais aussi par des ligands endogènes associés à une réponse inflammatoire (complément, tryptase des mastocytes, protéines de choc thermique (hsp), thrombine, produits dérivés de cellules nécrotiques (DAMPs, *danger-associated molecular patterns*), ATP extracellulaire, neurokinines, prostaglandines (PGE<sub>2</sub>)) [60]. Ainsi, l'activation des cellules dendritiques se fait normalement dans un contexte où l'inflammation est présente, soit lorsque les cellules de l'immunité innée, en particulier les cellules épithéliales, auront reconnu l'antigène pathogène et sécrété des cytokines, chimiokines et autres molécules pro-inflammatoires (**Figure 8**) [171]. Les précurseurs des cellules dendritiques sont constamment recrutés dans les poumons à partir de la moelle osseuse [61]. L'inflammation augmente rapidement leur migration et leur concentration maximale est atteinte 2h suivant l'inhalation de substances antigéniques chez certains modèles. Leur activation concorde avec l'augmentation de leur motilité, de leur expression de molécules de co-stimulation (CD86 et CD40) et du CMH II ainsi que de leur capacité à faire proliférer les lymphocytes [59]. Après capture de l'antigène, les cellules dendritiques perdent toute expression de récepteurs pour les chimiokines sauf ceux pour le CCL21 (CCR7 et CCR8) qui les recrute vers les nœuds lymphatiques médiastinaux [61] environ 12h suivant l'inhalation d'antigènes [60, 172]. La présentation de l'antigène aux lymphocytes s'y fait principalement, mais aussi dans les tissus lymphoïdes qui se forment dans l'espace interstitiel pulmonaire, en intimité avec les voies respiratoires et les vaisseaux sanguins lors d'une réponse inflammatoire [173]. Ce sont surtout les cytokines produites par les cellules dendritiques qui influenceront l'activation, la polarisation et la prolifération des différents types de lymphocytes Th (**Figure 17**).



**Figure 17.** Sécrétion de cytokines et fonctions effectrices des lymphocytes polarisés

*Tiré de Lambrecht B.N and Hammad H, 2008 [59]*

Bien que la majorité des antigènes inhalés soit véhiculés vers les nœuds lymphatiques pour y être présentés à des lymphocytes naïfs, ils induisent pour la plupart la tolérance puisqu'ils sont inoffensifs. La tolérance pourrait être induite par le contact entre une cellule dendritique partiellement mature et d'un lymphocyte T naïf pour lequel l'activation et la survie seraient subséquentement abortives. Alternativement, la tolérance pourrait être le résultat de l'activation de lymphocytes T régulateurs (Treg) produisant l'IL-10 et/ou le TGF $\beta$ , via l'expression d'IL-10 et/ou de ICOSL (*inducible T-cell co-stimulator ligand*) [60]. Les pDCs, plus particulièrement, seraient responsables d'induire la tolérance dans les nœuds lymphatiques chez la souris [173]. Les Tregs activés pourraient favoriser l'expression de l'indoleamine- 2,3-dioxygénase (IDO) par les pDCs. Les métabolites du tryptophane générés par cette enzyme semblent avoir des propriétés anti-inflammatoires et peuvent inhiber l'activation des cellules T [60]. Les effets combinés de privation en tryptophane et de répression de l'expression des TCR $\zeta$  par les lymphocytes CD8 $^+$  et CD4 $^+$  expliqueraient la tolérance induite par l'expression d'IDO [174]. Les modèles expérimentaux et les études épidémiologiques montrent que les agonistes des PRRs, s'ils sont présents au même moment qu'un antigène non-pathogène est capturé, peuvent contribuer à activer les cellules dendritiques de telle sorte qu'une réponse immunitaire sera générée envers cet antigène. Ce processus serait en cause dans le développement des maladies allergiques et auto-immunes [60].

## *Lymphocytes*

Les lymphocytes B et T sont les effecteurs de l'immunité acquise. Ils se chargent de la réponse humorale et cellulaire qui assurent l'élimination des pathogènes extra- et intracellulaires, respectivement. Ils sont donc recrutés lorsque la réponse immunitaire innée n'a pu, à elle seule, éliminer le pathogène impliqué. Les cellules NK classiques sont aussi des lymphocytes, n'expriment pas les récepteurs typiques des lymphocytes T et B et sont spécialisées dans la détection des cellules anormales de l'hôte, c'est-à-dire infectées ou tumorales. Contrairement aux lymphocytes B et T, leurs récepteurs ne sont pas spécifiques à un seul antigène et la variété de leur récepteurs leur permet de répondre à une diversité de facteurs de stress exprimés par les cellules environnantes. Les cellules NKT possèdent des récepteurs typiques aux lymphocytes T (TCR) mais, le spectre de leur répertoire de reconnaissance antigénique est restreint. Sont revus dans cette section les principales sous-populations de lymphocytes et leurs fonctions biologiques dans le poumon et l'inflammation chronique.

### Lymphocytes B

Les lymphocytes B font leur maturation dans la moelle osseuse chez les mammifères et la bourse de Fabricius chez les oiseaux, d'où leur appellation [11]. Dans le poumon, les lymphocytes B se situent dans les nœuds lymphatiques et les tissus lymphoïdes associés aux bronches (BALT, *Bronchus-Associated Lymphoid Tissue*) présents lors de réponse inflammatoires ou chez environ 40% des enfants [6]. On les retrouve également dans le tissu interstitiel pulmonaire [175]. Ils sont responsables de la production d'anticorps qui leur font aussi office de récepteurs membranaires (BCR, *B cell receptor*), spécifiques à un seul épitope. Leur interaction avec les cellules accessoires qui sécrètent les cytokines (cellules T *helper* (Th), principalement, mastocytes, cellules épithéliales, fibroblastes), permettre leur activation, leur différenciation en cellules B mémoires ou en plasmocytes sécréteurs d'anticorps (n'expriment pas le BCR) et la permutation des classes d'immunoglobulines. Ainsi, lors d'une réponse humorale indépendante des cellules T, par exemple dans le cas de lymphocytes B activés par le LPS, il y a sécrétion d'IgMs et IgGs de faible affinité et absence de développement d'une mémoire immunitaire efficace. Les cytokines et les molécules de co-stimulation fournies par les lymphocytes T permettent la production d'IgG (IL-10, IFN $\gamma$  et IL-4), d'IgA (TGF- $\beta$ , IL-5, et IL-10) et d'IgE (IL-4 et IL-13) par les cellules B [175]. Les IgEs, mille fois



moins présents que les IgGs dans le sang, sont sécrétés abondamment dans le poumon à peine 24h suivant une exposition allergénique chez les patients atteints d'asthme extrinsèque [175].

#### Particularités du cheval

Chez le cheval, on trouve sept sous-classes d'IgG et quatre allotypes d'IgE, en plus des classes IgA, IgD et IgM [13, 176]. Les mécanismes utilisés chez le cheval pour générer la diversité d'anticorps et le site de recombinaison des gènes V(D)J (moelle osseuse ou tissus lymphoïdes associés à l'intestin comme chez le lapin et le mouton) demeurent incertains [176]. Les sous-classes d'IgG7 > IgG4 > IgG1 > IgG5 > IgG3 active le métabolisme oxydatif des leucocytes périphériques [177], les IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG7 activent la cascade classique du complément et les IgGE, IgG3 ainsi que IgG5 se lient et activent les mastocytes [178].

#### Lymphocytes T

Les populations de cellules T  $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$  diffèrent par leur localisation (organes lymphoïdes secondaires et épithélium des muqueuses et de la peau, respectivement) et leur expression des corécepteurs CD4 et CD8, qui est restreinte aux lymphocytes T  $\alpha\beta$ . Les deux types de lymphocytes sont CD3<sup>+</sup>. Dans le poumon, les lymphocytes T  $\alpha\beta$  se situent dans le paracortex des nœuds lymphatiques pulmonaires. Ils y sont en association avec les cellules présentatrices de l'antigène (lymphocytes B et cellules dendritiques). L'activation des lymphocytes T *helper* (Th) (CD4<sup>+</sup>) survient suivant la présentation d'un antigène spécifique en association avec les molécules de co-stimulation (CD40L, CD28) et la sécrétion de cytokines par les cellules présentatrices de l'antigène.

#### Th1 et réponse à médiation cellulaire

La réponse à médiation cellulaire est caractérisée par la production d'INF $\gamma$  et de TNF par les lymphocytes Th1 permettant d'activer les cellules cytotoxiques dont les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (T<sub>c</sub>), les cellules NK, les macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles. Ces cellules effectrices causent la mort des cellules infectées ou anormales de façon anticorps-dépendante (granulocytes, macrophages et cellules NK) ou indépendante (T<sub>c</sub>) par la sécrétion d'enzymes qui forment des pores membranaires (perforines) et l'activation de la cascade apoptotique (granzymes et TNF) [11]. L'activation du facteur de transcription T-bet est responsable de la polarisation des lymphocytes au profil Th1. Les lymphocytes B sont également actifs durant la réponse à médiation

cellulaire puisqu'il y a production favorable de certaines classes d'IgG (IgG1 chez l'homme). Dans le poumon, l'activation de la réponse immunitaire à médiation cellulaire est critique lors d'infection par des mycobactéries, champignons, virus et par certains parasites [179]. Les lymphocytes  $\gamma\delta$  pour leur part agissent tôt dans la réponse à médiation cellulaire en sécrétant l'INF $\gamma$  [180, 181].

#### Th2, réponse humorale et allergie

La réponse humorale est fortement orchestrée par les lymphocytes Th2. En effet, la production d'anticorps est amplifiée par la présence de lymphocytes Th2 par rapport à celle engendrée par les Th1 [13], surtout concernant les anticorps de type IgA, IgE et IgG4. En fait, l'IL-5 sécrétée par les lymphocytes de type Th2 favorise la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes [13]. L'activation du facteur de transcription GATA-3 est responsable de la polarisation des lymphocytes CD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes Th2 [182]. L'IL-4 peut induire l'expression de GATA-3 mais récemment, d'autres cytokines ont montré une certaine efficacité à promouvoir la réponse de type Th2, soit le TSLP, l'IL-33 et l'IL-25 [183]. Les Th2 sécrètent eux-mêmes l'IL-4, essentielle avec l'IL-13 à la commutation de classe des isotopes de l'IgM à l'IgE et à l'IgG1 (chez la souris). L'IL-4 induit aussi chez plusieurs types cellulaires l'expression des récepteurs de haute (Fc $\epsilon$ RI) et de faible affinité (Fc $\epsilon$ RII, CD23) aux IgEs. L'IL-5 agit sur les éosinophiles en favorisant leur différenciation, leur activation et leur survie [182]. L'IL-13 agit davantage sur les cellules structurelles (cellules épithéliales et du muscle lisse, fibroblastes) en augmentant la production de mucus et de protéines de la matrice extracellulaire ainsi que la contractilité du muscle lisse [182]. Ces effets sont communs à la réponse anti-parasitaire au niveau de l'intestin [184] et à la réponse allergique, deux contextes où les lymphocytes Th2 sont les principales cellules effectrices.

Les cellules NKT pourraient représenter une source abondante d'IL-4 (4 fois plus que les Th) et contribuer au milieu cytokinique favorable à la différenciation des cellules T naïves en cellules Th2. Contrairement à ces dernières, les cellules NKT ne requièrent pas la présence d'IL-4 afin de pouvoir en produire elles-mêmes suivant leur stimulation via le CD3 [185]. Certaines cellules de lignée lymphoïde appartenant à l'immunité innée ont été identifiées comme source de cytokines de type Th2 mais ne portent aucun des marqueurs leucocytaires jusqu'à ce jour utilisés [183]. Ces « *innate helper cells* » peuvent diriger une réponse allergique chez les souris déficientes en cellules

B et T. Les lymphocytes CD8<sup>+</sup> participent aussi à la réponse de type 2 en sécrétant les cytokines IL-4 et IL-5 [183]. Ces lymphocytes CD8<sup>+</sup> polarisés (Tc2) seraient inefficaces pour éliminer les virus et cela expliquerait la sévérité et la durée des infections avec les rhinovirus chez les asthmatiques [183]. La contribution des lymphocytes Tγδ a également été amplement étudiée dans la réponse allergique chez les modèles murins [186]. Ils constituent d'ailleurs la source principale d'IL-4 lors d'une infection parasitaire extracellulaire chez la souris [181]. De cette façon, ils peuvent contribuer à polariser les cellules dendritiques et les lymphocytes T αβ CD4<sup>+</sup> en créant un milieu cytokinique précoce favorable. Il existe actuellement un débat quant au rôle des lymphocytes CD8<sup>+</sup> dans la réponse allergique alors que certaines études montrent un effet protecteur [187] ou détrimentaire [188] de ces cellules sur les paramètres physiologiques associés à la réponse allergique pulmonaire chez le rat et la souris. L'utilisation d'anticorps anti-CD8α (OX-8) pour effectuer la déplétion de lymphocytes CD8<sup>+</sup> dans certaines études [187] pourrait affecter d'autres populations cellulaires exprimant également cet antigène de surface comme les macrophages tissulaires, les cellules NK et une certaine population de cellules dendritiques ayant des propriétés tolérogéniques [189], et ainsi expliquer ces divergences.

#### Th17

L'identification de ce « nouveau » profil dans les modèles murins d'encéphalite auto-immune et d'arthrite a suscité beaucoup d'intérêt car il défiait le paradigme simple et bien établi de la balance des profils Th1/Th2, chacun responsable du développement des maladies auto-immunes et allergiques, respectivement. Le profil Th17 se caractérise principalement par l'expression d'IL-17A en association avec le facteur de transcription RORγt (*retinoic acid-related orphan receptor γt*) chez la souris ou du RORc chez l'homme. Le TGFβ, l'IL-6, l'IL-21 et l'IL-23 sont crucial pour la polarisation de ce sous-groupe de lymphocytes chez la souris [183], par contre les éléments requis pour ce faire chez l'homme demeurent indéfinis (revu dans [190]). Les lymphocytes Th17 sont également une source importante de cytokines pro-inflammatoires, telles le TNF, l'IL-1β, et l'IL-6 en plus de cytokines nouvellement caractérisées comme l'IL-17F, l'IL-21, IL-22 et l'IL-26. Ces cellules ont un effet indirect sur le recrutement et l'activation des neutrophiles en stimulant les cellules épithéliales à produire l'IL-8, avec l'IL-6, le TNF, le GROα et le GM-CSF. Le profil Th17 est donc associé aux formes sévères d'asthme chez l'homme où l'on observe le

recrutement prédominant des neutrophiles dans les voies respiratoires et à la dermatite atopique sévère. Un des rôles physiologiques postulés d'une réponse Th17 est de conserver et promouvoir la fonction de la barrière épithéliale tout en stimulant la production de peptides antibactériens, en particulier via l'expression d'IL-22 en réponse aux infections bactériennes [182]. Dans le poumon, il est possible que les infections virales récurrentes puissent dévier un profil Th2 établi vers un profil Th17 tel que suggéré par une étude récente [191]. Cela expliquerait l'aggravation des symptômes de l'asthme vers un phénotype sévère. De plus cette étude suggère que chez l'homme, les profils Th2 et Th17 ne soient pas mutuellement exclusifs dans ce contexte. De plus chez la souris, l'IL-23 amplifie la réponse de type Th2 spécifique à l'antigène inhalé chez les animaux sensibilisés [192].

#### Treg

Il existe deux types de lymphocytes T régulateurs (Treg): le premier se développe naturellement au sein du système immunitaire (*naturally occurring* Treg) et l'autre est généré suivant une exposition antigénique, de manière similaire aux lymphocytes T naïfs polarisés en différents sous-ensembles Th1, Th2, etc (revu dans [193]). Les Treg naturels expriment fortement le CD25 qui correspond à la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 et le facteur de transcription FoxP3 (*forkhead box P3*, CD4+CD25<sup>hi</sup>FoxP3+). Les individus pour lesquels l'expression de FoxP3 est déficiente développent de l'auto-immunité et sont atopiques. Les mécanismes d'action de ces cellules incluent la production de cytokines (IL-10, TGF $\beta$ ), l'expression de molécules membranaires affectant l'activation des lymphocytes effecteurs (*Program Death-1*, PD-1; *B- and T-lymphocyte attenuator*, BTLA) et l'inhibition directe des cellules dendritiques de manière LFA-1- et CTL4-dépendante. Cette interaction avec les cellules présentatrices d'antigènes a pour effet de diminuer l'expression de molécules de co-stimulation (CD80 et CD86) en plus d'offrir de la compétition aux lymphocytes naïfs pour la reconnaissance de l'antigène. Chez l'homme, on distingue les Foxp3+ Tregs exprimant l'ICOS qui inhibent la fonction des cellules dendritiques via l'IL-10 et les cellules T via le TGF $\beta$ , des Tregs ICOS<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup> qui utilisent le TGF $\beta$  seulement. Ils peuvent également agir au niveau des cellules effectrices de l'immunité innée. Par exemple, les cellules Treg CD4+CD25+ inhibent l'activation du métabolisme oxydatif chez les neutrophiles ainsi que leur production de

cytokines pro-inflammatoires induite par le LPS et ce, de manière IL-10- et TGF $\beta$ -dépendante [194].

## Résolution de l'inflammation

### *Égression des leucocytes*

L'égression correspond au passage des cellules inflammatoires, particulièrement les neutrophiles et les éosinophiles, du tissu vers la lumière des voies respiratoires. Ce phénomène est usuellement considéré comme étant pathogénique et constitue un paramètre d'évaluation clinique des pathologies respiratoires [195]. Toutefois, ce phénomène semble représenter un mécanisme normal de clairance des granulocytes tissulaires. Les cellules épithéliales produisent un gradient de chimiokines facilitant le mouvement de ces cellules dans cette direction. Cela justifie la présence de chimiokines telles que l'éotaxine [196] et l'IL-8 [197] dans le fluide luminal pulmonaire chez les modèles expérimentaux d'asthme éosinophilique et neutrophilique, respectivement, et dans les pathologies pulmonaires humaines [198, 199].

Par exemple, chez le cheval, on a montré que la résolution de l'inflammation après le retrait du stimulus antigénique correspond dans le temps à l'égression des neutrophiles du tissu vers la lumière des voies respiratoires, et à leur phagocytose par les macrophages [200]. Le passage des granulocytes laisse l'épithélium intact grâce son élasticité et à la perméabilité de sa membrane basale, ainsi qu'à la déformabilité des granulocytes [195]. Le dessein de ces cellules est d'être transportées par le tapis muco-ciliaire, qu'elles soient viables, apoptotiques ou phagocytosées, afin d'être expulsées par expectoration ou dégluties.

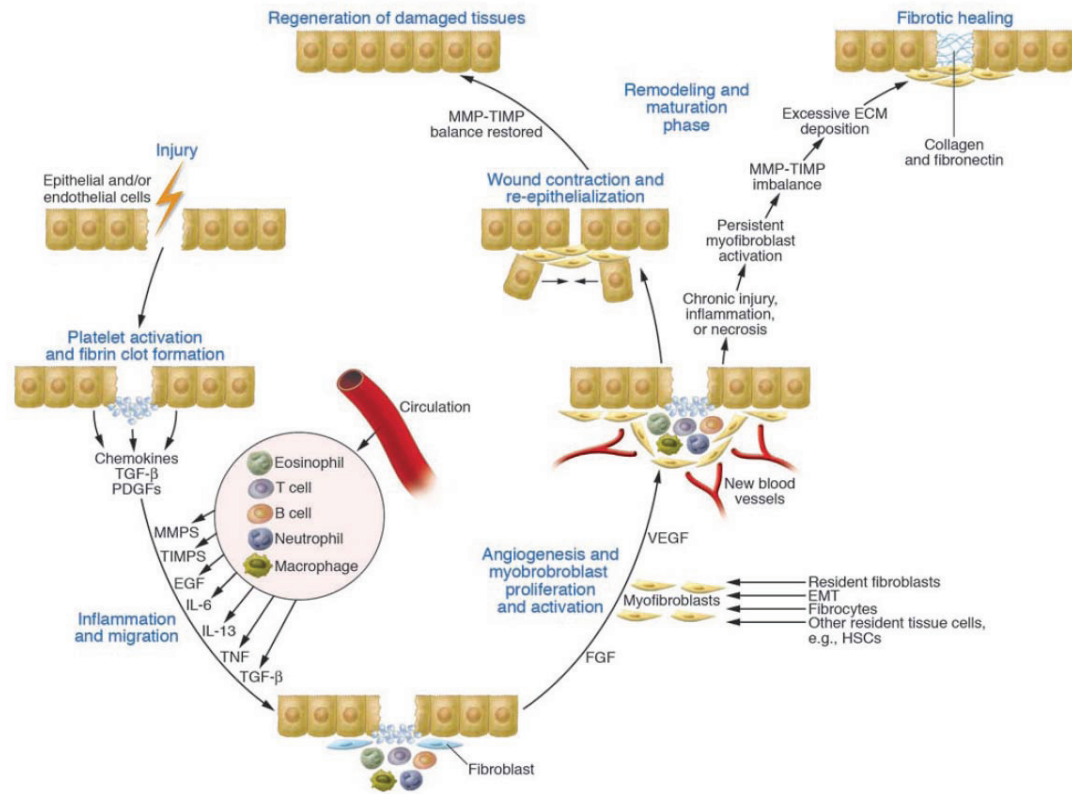
### *Processus de cicatrisation normale*

Lors d'une inflammation pulmonaire « normale » causée par un trauma mécanique, thermique ou par une infection ultimement résolue, les dommages causés au niveau de l'épithélium sont rapidement réparés (24h) et se caractérisent par la ré-épithélialisation de la zone de la membrane basale dénudée [201, 202]. Ce processus implique la formation d'un caillot et d'une couche de matrice extracellulaire temporaire au site de dénudation de la membrane basale (revu dans [203]) (**Figure 18**). Les plaquettes activées stimulent la vasodilatation et la perméabilité vasculaire afin de permettre le recrutement de cellules inflammatoires. Les neutrophiles sont les

cellules les plus abondantes dans la phase initiale de cicatrisation. Avec les macrophages recrutés subséquemment, les neutrophiles débarrassent l'environnement des cellules apoptotiques et des débris tissulaires. Ils produisent des cytokines et chimiokines qui amplifient la réponse cicatricielle et favorisent l'angiogénèse. Les lymphocytes T recrutés sont activés sur place et sécrètent l'IL-13, l'IL-4 et le TGF $\beta$  qui activent à leur tour les fibroblastes et les macrophages (activation « alternative » des macrophages, voir section Macrophages) [203, 204]. Les fibroblastes activés en contexte pro-inflammatoire sécrètent l'IL-8, et ainsi peuvent maintenir le recrutement des neutrophiles dans le tissu cicatriciel [35].

Dans le processus de cicatrisation, les fibroblastes sous-épithéliaux prolifèrent avec les cellules du muscle lisse alors que la ré-innervation et la sécrétion de tachykinines s'effectuent [201]. Les fibroblastes sécrètent les protéines de la matrice extracellulaires (collagène I et III, fibronectine, élastine, protéoglycane, et laminine) mais aussi les enzymes de clivage de la matrice (MMP-2 et 9) et leurs inhibiteurs (TIMP) impliqués dans son remodelage [201, 202]. Les myofibroblastes contractent la cicatrice et permettent sa fermeture, puis les cellules épithéliales migrent sur la membrane basale nouvellement formée afin de reconstituer l'épithélium [203]. La prolifération, la différenciation et la survie des cellules impliquées dans le remodelage cicatriciel de l'épithélium sont régulées par des facteurs de croissance comme EGF, PDGF et les cytokines reliées (TGF- $\alpha$ , amphiréguline, *heparin binding EGF*) [201].

Un équilibre dynamique entre la prolifération et l'apoptose contrôle le nombre de fibroblastes et par le fait même, l'homéostasie du dépôt de tissu matriciel et le maintien de la fonction physiologique de l'organe impliqué. Un processus de cicatrisation anormal a pour cause pathologique la fibrose des tissus. La fibrose cystique, la fibrose idiopathique pulmonaire et l'asthme sont trois des pathologies pulmonaires présentant une fibrose pathologique des tissus.



**Figure 18.** Étapes de la cicatrisation normale et pathologique de l'épithélium.  
Tiré de Wynn T.A., 2007 [203]

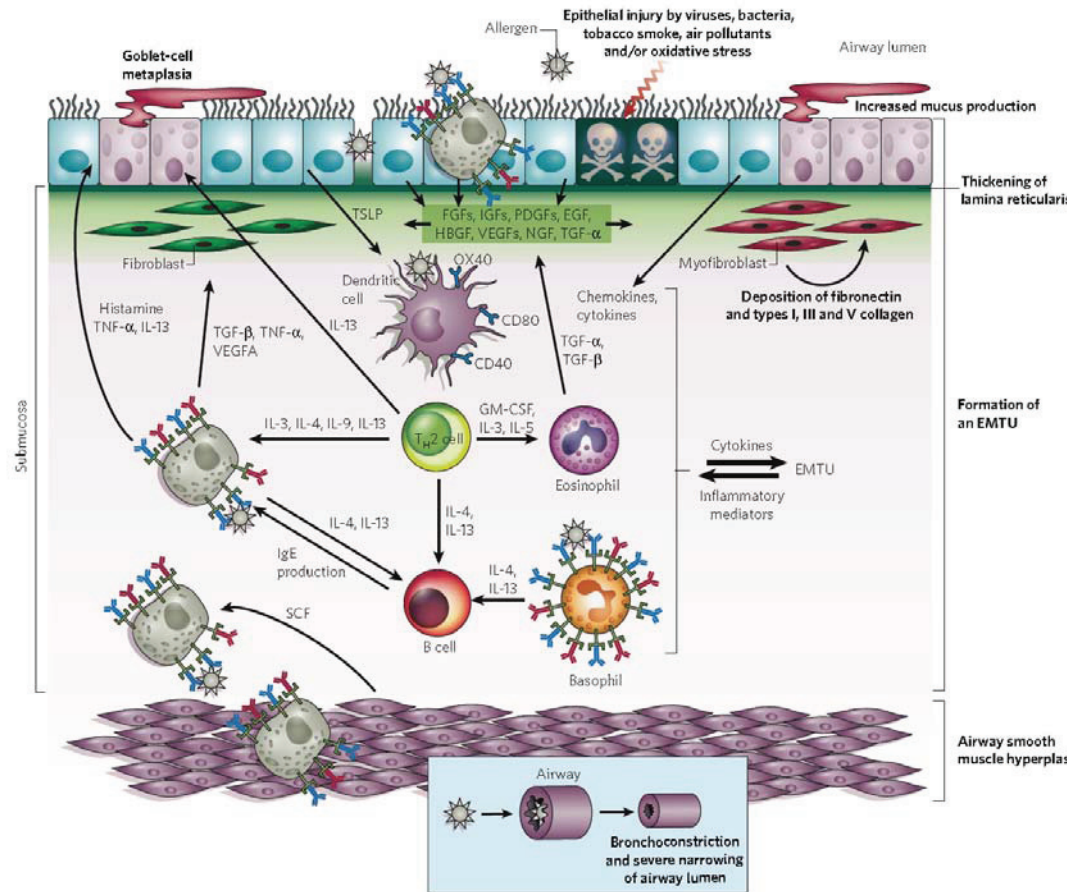
## Effet de l'inflammation chronique sur la fonction respiratoire

### Remodelage tissulaire

La résolution de l'inflammation tissulaire implique une séquence d'évènements bien orchestrés, telle que décrite dans la section précédente, et le retour de l'organe réparé à son état fonctionnel [202]. La persistance d'un pathogène dans le tissu (infection chronique) ou une réponse immunitaire aberrante de la part de l'hôte peuvent générer une cicatrisation excessive compromettant la fonction physiologique du tissu. Le remodelage correspond à un changement au niveau de l'architecture et des propriétés du tissu, découlant d'une série de cycles d'inflammation/cicatrisation. Le remodelage des voies respiratoires chez les patients asthmatiques implique la fibrose sous-épithéliale, l'augmentation de la masse muscle lisse, l'hyperplasie des cellules et des glandes à mucus, des changements dans l'épithélium (prolifération ou dénudation



de la membrane basale) et l'apparition de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogénèse) [205]. Ces changements sont associés à un déficit de la fonction respiratoire chez les patients asthmatiques (revu dans [205]) (**Figure 19**).



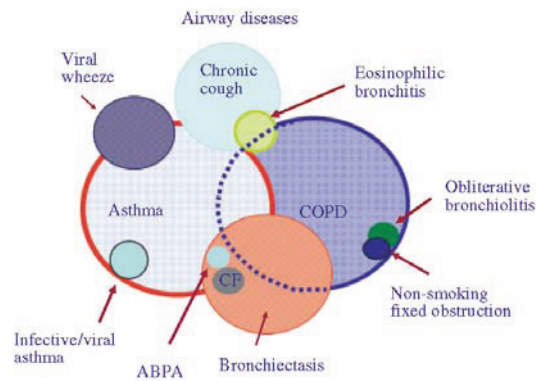
**Figure 19.** Processus du remodelage tissulaire

EMTU : epithelial–mesenchymal trophic unit. Tiré de Galli S.G. et collègues, 2008 [206].



## Asthme : définition par phénotypes cliniques

L'asthme est une maladie hétérogène en termes de mécanismes inflammatoires et étiologiques, et résulte d'interactions complexes entre l'environnement et la génétique de l'hôte. Plusieurs sous-types d'asthme ou « endotypes » ont été caractérisés cliniquement [207, 208]. Encore en 2004, il n'y avait toujours pas de certitude quant à l'inclusion de ces phénotypes comme variations cliniques d'une même maladie, l'asthme, ou comme des maladies distinctes. D'ailleurs, on travaillait encore récemment à distinguer les différentes pathologies impliquant à la fois une inflammation chronique des voies respiratoires et une obstruction respiratoire (**Figure 20**) [209].



**Figure 20.** Relations complexes entre les différentes maladies inflammatoires chroniques des voies respiratoires

ABPA : *allergic bronchopulmonary aspergillosis*. COPD : *chronic obstructive pulmonary disease* (en français : Maladies pulmonaires obstructives chroniques, MPOC). Tiré de Pavord et al, 2010 [209]

Un système de classification a été proposé dans lequel on évalue la présence de 5 paramètres cliniques : 1) l'hyperréactivité bronchique (HRB); 2) la bronchiolite; 3) l'hypersensibilité du réflexe de toux; 4) le dommage tissulaire et 5) les facteurs extra-pulmonaires [209]. Ces facteurs de classifications permettent de distinguer l'asthme des autres maladies respiratoires chroniques présentant une symptomatique similaire. On identifie aujourd'hui à l'asthme les conditions où l'on observe une obstruction variable du débit respiratoire et de l'HRB. Ceci est en opposition avec l'obstruction respiratoire irréversible associée à la MPOC. Différents phénotypes cliniques d'asthme ont aussi été définis selon l'âge d'apparition de la maladie, la cause, le type d'inflammation et le degré de sévérité [207] (**Tableau IV**). On définit un « phénotype » comme

« les caractéristiques visibles d'un organisme résultant de l'interaction entre son profil génétique et l'environnement » [210]. Il est à noter que les phénotypes, tels que décrits dans le Tableau IV ne sont pas mutuellement exclusifs entre eux.

**Tableau IV.** Phénotypes cliniques d'asthme.

Phénotype clinique	Caractéristiques
<b>Asthme infantile</b>	
<i>Respiration sifflante transitoire</i>	Respiration sifflante chez l'enfant de < 3 ans
<i>Respiration sifflante non-atopique chez les jeunes enfants</i>	Respiration sifflante chez l'enfant de < 3 ans Histoire d'infection virale des voies respiratoires inférieures Altération du contrôle du tonus des voies respiratoire : susceptibilité à développer de l'obstruction respiratoire en réponse à une infection virale. Traitement spécifique : Montelukast (antagoniste des récepteurs aux leucotriènes)
<i>Respiration sifflante /asthme IgE-dépendant persistant</i>	Associé à un haut niveau d'atopie, à l'HRB et à une fonction respiratoire altérée.
<i>Asthme infantile tardif</i>	Affecte surtout les femmes pendant ou suivant la puberté L'atopie est la cause principale de l'HRB
<i>Asthme persistant de l'enfance à l'âge adulte</i>	Présence d'inflammation des voies respiratoires continue Facteurs de risque : apparition précoce de la maladie, sexe féminin, atopie, eczéma, fonction respiratoire altérée et HRB.
<b>Asthme de l'adulte (adult-onset asthma)</b>	<i>Plus hétérogène que l'asthme infantile persistant, mélange de phénotypes allergique, infectieux et autres. Souvent associé à une fonction pulmonaire inférieure par rapport à l'asthme infantile persistant.</i>
<i>Asthme « extrinsèque » ou allergique</i>	Test cutané positif, a débuté avant l'âge de 30 ans, fréquence des exacerbations plus élevée et associées à l'exposition à l'allergène.
<i>Asthme « intrinsèque »</i>	Non-allergique (pas de réactivité au test cutané, pas d'IgE circulant spécifique aux allergènes communs), a débuté après 40 ans, prédominance chez les femmes, haut degré de sévérité, association plus fréquente avec les polypes nasaux, pas de prédisposition familiale claire.
<b>Sous-types cliniques</b>	
<i>Sensibilité à l'aspirine (aspirin-induced asthma (AIA))</i>	Associé à la rhinosinusite chronique hyperplasique, aux polypes nasaux et aux attaques asthmatiques suivant l'ingestion d'AINS. Inflammation éosinophilique Prévalence de 10 à 20% chez les adultes asthmatiques, plus forte chez les femmes, phénotype sévère, faibles évidences d'atopie. Associé à une production élevée de leucotriènes et à une réduction de la production de PGE <sub>2</sub> par les fibroblastes.
<i>Associé aux infections respiratoires chroniques et persistantes</i>	Associé aux infections avec <i>Chlamydia pneumoniae</i> ou <i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Asthme occupationnel</i>	Prévalence élevée dans cette catégorie (15- 20%). Causes immunologiques (IgE-dépendant ou non) ou non-immunologiques (irritants de bas poids moléculaire, <i>irritant-induced asthma</i> ou syndrome réactionnel des voies respiratoires, ex. exposition au chlore ou à la fumée).
<b>Asthme sévère</b>	Dans l'enfance et chez l'adulte Causé par des facteurs immunologiques ou non. Inflammation éosinophilique ou non-éosinophilique
<i>Asthme enclin aux exacerbations ou asthme quasi-mortel</i>	Les facteurs de risques majeurs incluent des exacerbations sévères récurrentes avec hospitalisation, visites à l'urgence durant l'année précédente et facteurs psychologiques.

<i>Asthme avec obstruction fixe des voies respiratoires</i>	Malgré la définition de l'asthme comme condition d'obstruction réversible des voies respiratoires, développement graduel d'une obstruction irréversible ou fixe chez 35-50% des asthmatiques. Facteurs de risque: sexe masculin, absence d'atopie, apparition à l'âge adulte, persistance de l'inflammation éosinophilique malgré traitement intensif. Remodelage des voies respiratoires centrales (fibroblastes et muscle lisse)
<i>Asthme résistant aux CS</i>	Inflammation tissulaire persistante malgré un traitement avec de fortes doses de CS inhalés ou oraux. La résistance aux CS est acquise chez 95% des patients asthmatiques

---

Revu dans [207, 210, 211]

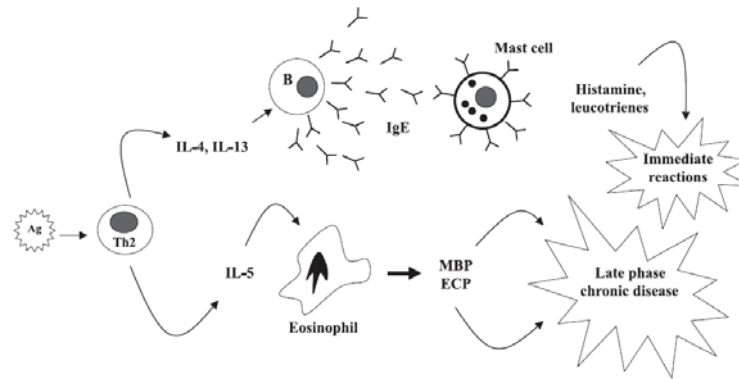
### **L'asthme extrinsèque: hypersensibilité de type I et atopie**

Il s'agit du phénotype le plus commun, particulièrement chez les enfants (>80%), puis chez l'adulte (>50%) [212]. Il implique une sensibilisation allergique suivant l'exposition à des allergènes tôt dans l'enfance et une histoire familiale d'allergie. On s'explique encore mal le phénomène par lequel les enfants sensibilisés développent ou non des symptômes respiratoires. L'asthme extrinsèque est associé à l'atopie. En 2001, on définissait l'asthme dans le *New England Journal of Medicine* sur la base de la présence d'atopie et de son interaction avec les facteurs environnementaux (exposition aux allergènes, virus et agents occupationnels) [213]. Toutefois, cette définition s'est révélée erronée étant donnée la prévalence considérable d'asthme non-allergique ou « intrinsèque», qui n'est pas lié à la détection d'anticorps sériques spécifiques pour un des allergènes répertoriés. Il est à noter que l'atopie n'est pas toujours responsable des réponses allergiques (hypersensibilités de type 1) et de la production d'IgE en général (aussi lors de la réponse antiparasitaire). Tout individu peut produire des IgEs dans certaines circonstances, soit lorsque l'exposition allergénique est particulière et très puissante (ex. venin d'insecte ou drogue), alors que les atopiques répondent par une production d'IgEs à des expositions normales d'allergènes communs. Le *World Allergy Organization* définit l'atopie telle que:

*« Atopy is a personal and/or familial tendency, usually in childhood or adolescence, to become sensitized and produce IgE antibodies in response to ordinary exposures to allergens, usually proteins. As a consequence, these persons can develop typical symptoms of asthma, rhinoconjunctivitis, or eczema »* [212].

Essentiellement, les mécanismes impliqués dans la réponse allergique sont ceux décrits dans la section précédente sous la section Th2 (**Figure 21**) [214]. On a aussi montré que la production basale de cytokines de type Th2 chez les individus atopiques est plus élevée que chez les sujets sains ou asthmatiques non-atopiques [215], justifiant la propension des patients

atopiques à produire des IgEs en grande quantité. Chez l'homme toutefois, le paradigme Th2 n'est pas aussi clair que chez les modèles murins lors d'une réponse allergique et un éventail de cytokines Th1 et Th2 est produit, avec une balance favorable pour le profil Th2 chez les atopiques [214]. D'ailleurs, on a montré que l'exacerbation clinique de l'asthme chez des patients atopiques est associée à une production élevée de cytokines de types Th1 par les leucocytes sanguins mis en culture [215, 216]. Des études rétrospectives quant à l'utilisation de traitements anti-IgEs (ex. omalizumab : empêche la liaison aux FcεR1) démontrent par ailleurs que ce ne sont pas tous les patients avec un diagnostic d'asthme allergique qui répondent à la thérapie anti-IgEs [210]. Ces observations suggèrent que des mécanismes complexes sont responsables de l'expression clinique de l'asthme allergique.



**Figure 21.** Le paradigme Th2 associé aux maladies atopiques.

Ag : *antigen*, MBP : *major basic protein*, ECP : *eosinophil cationic protein*. Tiré de El Biaze M. et collègues, 2003 [214]

### L'asthme intrinsèque et mécanismes impliqués

L'asthme intrinsèque est moins commune que l'asthme extrinsèque et est estimé à 10% parmi la population de patients ayant développé l'asthme à l'âge adulte (revu dans [211]). On ne sait pas encore s'il existe une augmentation de la prévalence de ce type d'asthme dans les pays industrialisés comme c'est le cas pour l'asthme extrinsèque et les autres maladies d'ordre allergique. Parce qu'on peut aussi détecter une augmentation de la concentration d'IgE sanguins totaux chez les asthmatiques intrinsèques, on suggère qu'il puisse être causé par une sensibilisation à un allergène non commun ou alors qu'un test cutané d'allergie aurait été positif chez ces patients dans l'enfance mais ne l'est plus à l'âge adulte. Cliniquement, les paramètres de

l'asthme intrinsèque sont similaires à ceux de l'asthme extrinsèque : obstruction variable des voies respiratoires et traitement des symptômes avec des bronchodilatateurs ou des corticostéroïdes (à plus forte dose). Aussi, les deux types d'asthme peuvent être exacerbés par des causes non-spécifiques similaires comme les irritants, l'exercice ou l'air froid, suggérant l'implication de mastocytes sensibilisés (liés aux IgEs) dans les deux cas. En effet, on a rapporté que le même type d'inflammation pouvait être observé dans les voies respiratoires des patients asthmatiques intrinsèques et extrinsèques, soit l'activation des mastocytes et des cellules T, le recrutement d'éosinophiles, la présence de cytokines Th2 et de chimiokines pour les éosinophiles, la synthèse locale d'IgEs et l'expression du FcεRI (revu dans [211]). On suggère qu'une réponse allergique « entopique », définie par une allergie locale des muqueuses chez les individus non-atopiques, soit en cause chez ces patients [217].

Un autre mécanisme proposé est le développement d'une réponse IgE-spécifique envers les épitopes de pathogènes dont l'infection des voies respiratoires supérieures est connue comme pouvant exacerber les symptômes de l'asthme intrinsèque. Un rôle prometteur pour les entérotoxines ou superantigènes provenant de *Staphylococcus aureus* a d'ailleurs été décrit [211, 218]. Ces superantigènes sont libérés lors de l'infection des cellules épithéliales par *S aureus* et peuvent promouvoir la prolifération CMHII-dépendante des cellules T et B ainsi que la commutation de classe d'Igs vers l'IgE. Ils ont été identifiés chez des patients asthmatiques sévères et sensibles à l'aspirine. Les superantigènes peuvent être produits par d'autres types de bactéries, virus, parasites et champignons et contribuer à induire la corticorésistance et le développement d'une réponse Th17 favorisant l'inflammation neutrophilique. L'implication d'une réponse auto-immune sous-jacente à l'asthme intrinsèque a aussi été mise en évidence. Des anticorps circulants anti-cytokératine et α-énolase, deux protéines des cellules épithéliales, ont été détectés chez ces patients. Ils pourraient contribuer à endommager l'épithélium, facilitant ainsi la pénétration tissulaire des pathogènes, et la production de superantigènes capables de déclencher une inflammation de type allergique.

**L'asthme occupationnel** se définit comme une forme d'asthme causée spécifiquement par une exposition à des agents présents dans l'environnement de travail : poussières en suspension, gaz, vapeurs ou fumées [219]. Il représente environ 10% des phénotypes asthmatiques adultes

[220]. Les agents responsables de l'asthme occupationnel sont catégorisés en fonction de leur taille : 1) les agents de haut poids moléculaire, des protéines (>5000 Da) ; et 2) de faible poids moléculaire, souvent des produits chimiques (ex. : isocyanates, <5000 Da). Les premiers suscitent fréquemment une réponse immunitaire dirigée par les IgEs et une inflammation éosinophilique, avec une période de latence liée au temps de sensibilisation allergique à l'agent en question [220]. La physiopathologie de l'asthme occupationnel causé par des agents de faible poids moléculaire est moins bien comprise, mais implique fréquemment une inflammation neutrophilique [221].

### **Autres spécifications et terminologies par rapport à l'asthme sévère**

Les patients atteints d'**asthme stable** ne requièrent pas de médication de secours ( $\beta_2$ -agonistes de courte durée), ne présentent pas d'exacerbation et n'ont pas utilisé de stéroïdes systémiques dans les 12 derniers mois. Les patients avec de l'asthme **instable ou réfractaire** nécessitent une hospitalisation et le recours à des doses de CS orales au moins 3 fois durant l'année. Ces derniers prennent des CS inhalés en fortes doses et des  $\beta_2$ -agonistes de longue durée pour 6 mois consécutifs ou plus [222]. Ils représentent 40% des patients atteints d'asthme sévère [210]. Les asthmatiques sévères présentent moins d'atopie, une fonction respiratoire inférieure et une histoire de pneumonie plus fréquente que les patients atteints d'asthme léger. Quant à la **résistance aux CS**, elle est observable à tous les niveaux de sévérité de l'asthme, mais est particulièrement associée aux phénotypes sévères. La résistance aux CS peut s'expliquer par divers mécanismes tels des anomalies au niveau de la déacétylation des histones, la surrégulation de l'isotype  $\beta$  du récepteur aux CS (non-fonctionnel), des interférences empêchant la liaison des CS à leur récepteur ( $GR\alpha$ ), etc (revus dans [223]). Parce que les neutrophiles prédominent dans les voies respiratoires chez plusieurs patients atteints d'asthme sévère, on a suggéré que ces cellules étaient résistantes à l'effet des CS. En effet, les CS retardent l'apoptose des neutrophiles humains [224] contrairement aux éosinophiles et ils expriment en proportion élevée l'isoforme  $\beta$  du récepteur aux CS [225]. Toutefois, on ne connaît pas encore l'effet global des corticostéroïdes sur les fonctions pro-inflammatoires du neutrophile. Des études sont actuellement en cours à ce sujet.

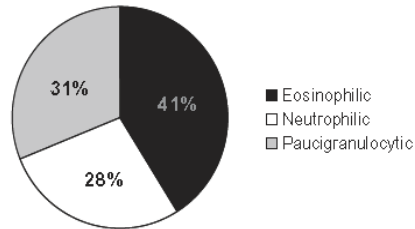
### **Phénotypes cliniques basés sur le type d'inflammation**

À la fin du 19<sup>e</sup> siècle, on a pu associer l'inflammation éosinophilique à l'HRB associée à la phase tardive de l'asthme grâce au développement de colorations à base d'aldéhyde (Paul Ehrlich)

(revu dans [226]). Cette avancée a donné lieu à « l'Hypothèse de l'asthme éosinophilique » et l'utilisation de corticostéroïdes pour traiter ce type d'inflammation et de bronchodilatateurs pour renverser l'HRB révolutionna alors les soins cliniques de l'asthme. Toutefois l'hypothèse de l'asthme éosinophilique a été remise en question dans les années 1989-1995 lorsque des patients ne présentant pas d'HRB mais une inflammation éosinophilique répondaient très bien aux corticostéroïdes, ou inversement (présence d'HRB sans éosinophiles) [226]. L'asthme se caractérise en fait par différents types d'inflammation des voies respiratoires, soit éosinophilique, neutrophilique ou paucigranulocytaire (niveaux normaux d'éosinophiles et de neutrophiles). Les formes d'asthme plus sévères tendent à s'associer à une inflammation mixte éosinophilique-neutrophilique. Les formes quasi-mortelles d'asthme ainsi que l'asthme occupationnel sont généralement associés à l'inflammation neutrophilique [207]. Toutefois, des phénotypes plus légers ont aussi été caractérisés par ce type d'inflammation [227].

Une étude a montré que la présence d'éosinophiles dans l'expectoration des patients asthmatiques se traduit également par la présence d'une inflammation de même type dans le lavage bronchoalvéolaire (LBA) et les tissus pulmonaires (muqueuse des voies respiratoires, évaluée par biopsie bronchiques) [228]. Ces observations ne sont pas valables pour les neutrophiles cependant, dont le % dans le LBA et la muqueuse ne diffère pas de celui des patients éosinophiliques et des contrôles, contrairement au % de neutrophiles retrouvé dans l'expectoration. On qualifie d'éosinophilique une inflammation lorsque >3% des cellules sont représentées par des éosinophiles dans l'expectoration, alors que >1% est considéré anormale. Ce seuil est basé sur le fait que les patients présentant >3% d'éosinophiles répondent mieux aux corticostéroïdes. L'inflammation neutrophilique est définie par la présence de >61% de neutrophiles dans l'expectoration. Il est à noter que le % de neutrophiles change avec l'âge et que l'inflammation neutrophilique est en général associée à une augmentation du nombre de cellules totales et au degré d'obstruction fixe des voies respiratoires, paramètres qui n'ont pas encore été intégrés dans la définition de ce phénotype. L'inflammation non-éosinophilique n'est pas nécessairement associée à la prise antérieure de corticostéroïdes (résolution de l'inflammation éosinophilique) car elle caractérise aussi une sous-population de patients n'en ayant jamais utilisé, estimée à 30% [226]. La **Figure 22** montre la proportion de chaque phénotype inflammatoire dans une sous-population de patients référés par une clinique de soins tertiaires et qui utilisaient des

corticostéroïdes pour soulager leurs symptômes. Ainsi, la proportion de chaque phénotype dépend de la sélection des patients. Ici par exemple, le profil mixte n'a pas été répertorié (corticostéroïdes-résistants). Il est à noter que le fait d'évaluer le nombre absolu de granulocytes recrutés dans les voies respiratoires devient problématique lorsque le nombre de cellules totales augmente (ex. certains cas de MPOC, bronchiectasie, infection bactérienne).[226]



**Figure 22.** Phénotype inflammatoire dans l'expectoration chez des patients atteints d'asthme stable.  
*Tiré de Gibson et al, 2009 [226].*

Les phénotypes associés aux différents types d'inflammation ne permettent pas d'être discernés de manière certaine sur la base d'une évaluation clinique seulement. Toutefois, les patients atteints d'asthme neutrophilique tendent à être plus vieux, à avoir une prévalence pour l'obstruction fixe des voies respiratoires, une histoire de fumeur ainsi qu'une prévalence moindre pour l'atopie. Les patients présentant l'asthme éosinophilique tendent à être plus jeunes et à avoir une hyperréactivité des voies respiratoires plus sévère [226].

### **Le rôle de l'immunité innée dans l'asthme allergique et "l'hypothèse de l'hygiène"**

Les plus récentes recherches dans le domaine de l'asthme indiquent que cette maladie ne repose pas uniquement sur un défaut de la réponse spécifique à l'antigène, mais que le dialogue entre les branches innée et acquise de l'immunité est crucial pour l'initiation et le développement de cette pathologie.

L'hypothèse de l'hygiène (*hygiene hypothesis*) a été proposée par David P Strachan en 1989 alors qu'il établissait une relation inverse entre la prévalence de manifestations atopiques (rhinite et eczéma) et le nombre de frères et sœurs aînés dans une population de jeunes adultes britanniques (n = 17 414) suivis depuis leur naissance [229]. Il suggérait à l'époque que la fréquence plus élevée d'infections transmises entre frères et sœurs dans l'enfance soit protectrice contre le développement de l'atopie. Ainsi, l'amélioration de l'hygiène de vie et des standards de



propreté avec la diminution de la taille des familles pourrait être en cause dans l'augmentation de la prévalence de maladies atopiques observée au même moment. Bien que certaines études aient obtenu des résultats similaires, d'autres associations et possibles causes de l'augmentation de la prévalence d'atopie ont été proposés par le même auteur 10 ans plus tard [230]: 1) effet socioéconomique : augmentation de la prévalence d'atopie chez les enfants de familles aisées; 2) diminution de la prévalence d'atopie chez les enfants ayant grandi sur une ferme et ayant eu des contacts avec des animaux domestiques (chiens, vaches); 3) augmentation de la prévalence avec la prise d'antibiotique et inversement, avec un mode de vie anthroposophique (ex. écoles de Steiner : alimentation organique/nourriture fermentée, vaccination et médicaments réduites). Un article récent semble confirmer l'effet protecteur d'un mode de vie agricole particulièrement sur la prévalence d'atopie et dans une moindre mesure, sur celle de l'asthme chez des enfants vivant sur une ferme [231]. Cette étude montre par contre que la diversité des microorganismes retrouvés à l'intérieur des maisons est inversement associée à la prévalence d'asthme, mais pas d'atopie. Parmi les mécanismes possibles, l'activité immunorégulatrice de ces microorganismes sur l'hôte ou leur effet compétitif sur la colonisation des voies respiratoires par d'autres pathogènes qui eux sont associés au développement de l'asthme, sont avancés par les auteurs.

Depuis la stipulation de cette hypothèse, plusieurs études ont été menées afin de caractériser le rôle des microorganismes et de la réponse immunitaire innée dans la pathogénie des maladies inflammatoires chroniques, particulièrement de l'asthme. Ainsi, à l'aide de modèles murins, on a montré que le développement d'une réponse acquise de type Th2 était dépendante de la voie de signalisation TLR-MYD88 [171, 232-234]. Les cellules épithéliales semble contribuer pour leur part à l'activation des cellules dendritiques (induction de OX40L) et au développement de la réponse allergique par la sécrétion de cytokines et chimiokines favorisant la réponse de type Th2 (CCL20, TSLP, IL-33, IL-25) (revu dans [60]) et ce, de manière TLR4-dépendante [171]. Toutefois, la sensibilisation à un nouvel antigène peut se faire de manière indépendante à la branche de l'immunité innée dans un poumon qui est déjà aux prises avec une inflammation allergique, un processus nommé « sensibilisation collatérale » [235]. Dans ce cas, l'IL-4 sécrétée dans le milieu agit sur les cellules dendritiques et les lymphocytes naïfs pour favoriser leur activation et leur polarisation. Cette situation décrit bien la tendance des individus atopiques à être sensibilisés à plusieurs allergènes étant donné que leurs lymphocytes produisent

spontanément plus d'IL-4 [216]. Le GM-CSF et le TNF, aussi sécrétés lors de la réponse allergique, semblent jouer des rôles similaires [233, 236].

Ainsi, selon ces approches, *la sensibilisation allergique initiale implique qu'un signal de danger soit transmis via l'activation des TLRs exprimés par les cellules de l'immunité innée. Celui-ci favorise ensuite l'activation des cellules dendritiques ayant capturé un antigène inhalé, leur expression de molécules de co-stimulation et leur migration vers les nœuds lymphatiques pulmonaires. Ces événements permettraient de dévier l'acquisition de la tolérance immunologique envers l'antigène inhalé.* Aussi, il implique qu'une réponse immunitaire innée aberrante soit présente chez les individus susceptibles aux allergies ou qu'alternativement [237, 238], la sensibilisation allergique survienne collatéralement à une inflammation causée par l'infection des voies respiratoires [239]. Il est à noter que certains allergènes possèdent une activité protéase intrinsèque comme par exemple les antigènes des acariens (*house dust mites*) et d'*Aspergillus fumigatus* et peuvent activer d'eux-mêmes la signalisation via le clivage de récepteurs tel le Proteinase-activated receptor (PAR)-2 [240].

On a suggéré, en lien avec la théorie de l'hygiène, que la maturation du système immunitaire s'effectue en bas âge par contact avec des microorganismes et qu'elle soit une étape clé dans la protection contre le développement des maladies allergiques en déviant la réponse immunitaire Th2 vers type Th1. En effet, les cellules immunitaires des nouveau-nés adoptent une réponse immunitaire biaisée vers le type Th2 en réponse à des allergènes communs, qu'elles soient isolés de nouveau-nés ayant un faible ou haut risque de développer de l'atopie [241]. Ce biais de la réponse immunitaire vers le type Th2 est observable chez les poulains [242] et les souriceaux [243] également. Les mécanismes expliquant ce phénomène ont été investigués chez ces derniers. Ainsi, on a montré que lors d'une réponse immunitaire secondaire à un antigène rencontré avant 6 jours d'âge, les lymphocytes Th1 subissaient l'apoptose alors que les lymphocytes Th2 proliféraient et dominaient la réponse immunitaire [243]. En fait, dans ces conditions, les lymphocytes Th1 ont une expression augmentée d'IL-13R $\alpha$ 1 via lequel leur apoptose est induite par l'IL-4 ou l'IL-13 sécrétés par les lymphocytes Th2. À partir de 6 jours d'âge, on note une augmentation du nombre de cellules dendritiques qui expriment l'IL-12 suivant leur rencontre avec l'antigène ce qui permet d'inhiber l'expression du récepteur à l'IL-13R $\alpha$ 1 par les lymphocytes Th1 et ensuite, d'induire leur production d'INF $\gamma$ . Des différences de méthylation

au niveau du locus Th2 chez les cellules T naïves des nouveau-nés par rapport aux lymphocytes T d'adultes peuvent également expliquer ce phénomène (revu dans [244]).

Les mécanismes sous-jacents à la théorie de l'hygiène et de la maturation du système immunitaire tels qu'expliqués ci-haut ne permettent pas d'expliquer la hausse de la prévalence des maladies autoimmunes (ex. diabète de type 1, maladie de Crohn, sclérose en plaque), celles-ci impliquant souvent une réponse à médiation cellulaire dirigée par les cytokines de type Th1, dans les régions où la prévalence de maladies allergiques l'est aussi (revu dans [245]). D'ailleurs, les infections parasitaires s'associant à une réponse Th2 peuvent aussi prévenir le développement de l'atopie, ce qui peut sembler paradoxal. Ces controverses peuvent s'expliquer par divers mécanismes (revus dans [245]). Premièrement, une compétition antigénique pourrait s'effectuer lors d'une infection et favoriser le développement des lymphocytes spécifiques à l'agent infectieux (forte réponse immunitaire) au détriment des lymphocytes spécifiques aux auto-antigènes ou aux allergènes (réponse faible). Autrement, l'infection peut favoriser le développement de lymphocytes  $T_{reg}$  ( $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ), NKT ou lymphocytes B, ayant une action immunorégulatrice outrepassant le spectre des antigènes de l'agent infectieux, via la production d'IL-10 et de TGF- $\beta$ . Ceci est aussi en accord avec le fait que l'on retrouve moins de  $T_{regs}$  dans les poumons des patients asthmatiques en comparaison avec les sujets normaux [246].

### **Génétique de l'asthme**

L'asthme extrinsèque possède sans contredit une composante génétique. Un enfant ayant un ou des parents asthmatiques est à plus fort risque de développer la maladie par rapport aux enfants ayant des parents non-asthmatiques [247, 248]. Toutefois cette tendance familiale est dépendante de la présence d'atopie puisqu'elle-même possède une forte composante génétique [249]. Ainsi, on ne reconnaît pas clairement la composante génétique de l'asthme intrinsèque. On considère plutôt que l'environnement est un facteur de risque plus important pour ce phénotype [211]. Les gènes codant l'IL-13, IL-4, IL-10, le TNF, le récepteur à l'IL-4 (*IL4RA*), le CD14 et les gènes liés au complexe majeur d'histocompatibilité (HLA), ont été associés à l'asthme en utilisant l'approche par gènes candidats (revu dans [250]). Cette approche sélectionne des gènes surrégulés ou impliqués dans les voies de signalisation associées à la pathologie, découverts par exemple par l'utilisation de modèles expérimentaux, et tente d'évaluer si des polymorphismes

mononucléotidiques (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) fonctionnels sont présents dans ces gènes et liés à l'asthme dans une population d'individus incluant des cas et des contrôles.

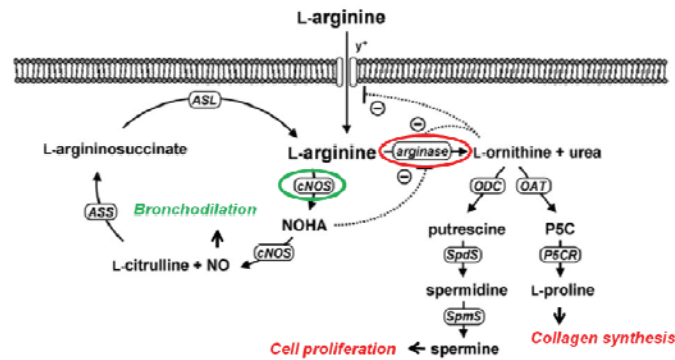
Par exemple, un SNP causant un changement d'acide aminé en position 576 sur le gène de l'*IL4RA* augmente le risque de développer un phénotype atopique (9.3X) et est associé à la sévérité de l'asthme chez les patients homozygotes pour l'allèle portant ce polymorphisme [251]. Des études fonctionnelles ont permis de montrer que ce polymorphisme provoquait un gain de fonction du récepteur se traduisant par une augmentation de l'expression du récepteur de faible affinité aux IgEs, le CD23, par les leucocytes mononucléaires stimulés avec l'IL-4 [252]. Une autre variation génétique sur ce gène (position 50), aussi associée à l'atopie, provoque une augmentation du taux de prolifération des lymphocytes B, de l'activation de STAT-6 et du promoteur du gène des IgEs (*Ig germline* □) [253]. Une augmentation de la sensibilité à l'IL-4 a aussi été rapportée chez les patients atteints de fibrose kystique associée à l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique [254].

Dans le même ordre d'idée, mais cette fois en lien avec la réponse immunitaire innée, des polymorphismes associés aux gènes codant les récepteurs de MMAPs ont été associés à l'asthme. Le CD14 a pour sa part un SNP sur la région 5' non-codante qui est associé à la concentration d'IgEs et de CD14 soluble (CD14s) dans le sérum et à la production d'INF $\gamma$  par les leucocytes [255]. Il semble exister une importante influence de l'environnement sur l'expression de la pathologie en rapport avec la présence de ce polymorphisme. Donc, les individus portant le génotype CC sont « protégés » contre le développement des allergies s'ils sont exposés à de fortes concentrations de LPS et inversement [256]. Ces interactions semblent toutefois complexes et à l'origine de résultats discordants par rapport à l'association de modifications génétiques associées au gène CD14 et à l'asthme (revu dans [257]). Des associations similaires sont obtenues avec les gènes TLR2 [237], TLR4 [258, 259] et TLR9 [260]. Il est d'ailleurs intéressant de constater que l'association entre la présence de polymorphismes dans le gène du TLR2 et l'asthme semble être indépendant de l'atopie [237]. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que des variations génétiques associées à la fois aux gènes de l'immunité innée et acquise influencent le développement des allergies et de l'asthme, et ce, en interaction avec l'environnement, ce dernier pouvant contribuer jusqu'à 50% à l'expression d'un phénotype associé à un variant génétique donné [250]. Les facteurs environnementaux pouvant influencer la susceptibilité d'un phénotype génétique incluent

l'exposition aux endotoxines, au diésel, à la fumée de cigarette, aux aéroallergènes, à la diète, aux infections virales et à l'environnement *in utero* [250]. À noter également l'effet de l'interaction entre les gènes eux-mêmes, tel que rapporté pour *IL4* et *TLR4* et leur association avec l'asthme [261].

### **Le métabolisme de la L-arginine dans l'asthme**

Durant ces dernières années, on a porté une attention particulière au métabolisme de la L-arginine et à son rôle potentiel dans la physiopathologie de l'asthme. Une des premières études à soulever cet intérêt a été effectuée par Zimmerman et collègues, dans laquelle l'expression génique pulmonaire associée à la réponse allergique a été comparée chez deux modèles murins sensibilisés à des allergènes différents (ovalbumine et *Aspergillus fumigatus*) [262]. Chez les deux modèles, on a observé une importante surrégulation des gènes associés au métabolisme de la L-arginine, soient les isoenzymes 1 et 2 de l'arginase, ainsi que d'un transporteur membranaire de la L-arginine (CAT-2). L'activité de l'arginase et de la synthèse de putrescine, une polyamine dérivée du métabolisme de la L-arginine (**Figure 23**), sont aussi surrégulées dans les poumons des souris exposées aux deux types d'allergènes. Ces auteurs ont montré que l'expression de l'arginase 1 était fortement régulée par les cytokines IL-4 et IL-13 (Th2) de manière STAT6-dépendante, contrairement à l'arginase 2. L'augmentation de l'expression de l'arginase ou de son activité chez les patients asthmatiques a également été démontré dans cette étude et d'autres, tant au niveau pulmonaire que périphérique [263-265]. De plus, des polymorphismes présents dans les gènes codant l'arginase 1 et 2 sont d'ailleurs liés au risque de développer l'asthme chez les enfants [266, 267] ainsi qu'au degré de sévérité de l'asthme et à la réponse aux traitements chez les adultes asthmatiques [268].



**Figure 23.** Métabolisme de la L-arginine.

La L-arginine du milieu est transporté via le *Cationic amino acid transporter* (CAT)-2 ( $\gamma^+$ ) et métabolisée par l'arginase pour générer la L-ornithine et l'urée. La L-ornithine est par la suite métabolisée en polyamines (putrescine, spermidine et spermine) via l'ornithine décarboxylase (ODC) et en L-proline via l'ornithine aminotransférase (OAT). L'arginase entre en compétition directe avec la NOS pour l'utilisation de la L-arginine. *Modifiée de Maarsingh et al, 2008 [269]*

Plusieurs études ont mis en évidence les mécanismes pouvant expliquer la contribution de l'activité de l'arginase dans la pathophysiologie de l'asthme. Citons entre autres son effet sur la contraction du muscle lisse, qui s'effectue par l'utilisation compétitive du substrat principal de la NOS (L-arginine) pour la synthèse de NO, un agoniste relaxant du muscle lisse bien connu puisque effecteur exclusif du système nerveux iNANC chez l'homme [270]. Ainsi une augmentation de l'activité de l'arginase correspond à une diminution de la disponibilité de la L-arginine et de la synthèse de NO par la NOS constitutive. Même si l'affinité (valeurs de  $K_m$ ) pour la L-arginine de la NOS et de l'arginase est de l'ordre micromolaire ( $\mu M$ ) et millimolaire (mM), respectivement, le  $V_{max}$  de l'arginase est 1000 fois supérieur à celui de la NOS permettant de justifier l'interaction compétitive entre ces enzymes [271, 272]. Ces observations se sont concrétisées dans une étude *ex vivo* de Maarsingh et collègues en 2005, dans laquelle ils ont utilisé des inhibiteurs de la NOS (L-NNA) et de l'arginase (nor-NOHA) ainsi que de la L-arginine exogène sur des anneaux de trachée de cobayes [273]. Ten Broeke et collaborateurs ont également montré le rôle déterminant du NO sur la contraction du muscle lisse *in vivo* à l'aide un modèle murin transgénique pour la eNOS dont l'hyperréactivité bronchique est abolie suivant une provocation antigénique par rapport aux souris de type sauvage [274]. De plus, le NO possède un effet inhibiteur sur le facteur de transcription NF- $\kappa B$ , dans certaines circonstances, et sur la production de cytokines pro-inflammatoires [275,

276]. Il diminue aussi le recrutement de cellules et la production de cytokines associées à la réponse allergique dans les poumons [274]. De cette manière, une augmentation de l'expression et de l'activité de l'arginase peut contribuer à amplifier l'inflammation.

Il est à noter que paradoxalement, les niveaux de NO retrouvés dans le condensat d'air expiré sont élevés chez les patients atteints d'asthme. On attribue cette augmentation à l'expression d'iNOS, dont la capacité de synthèse de NO (portion réductase de l'enzyme) associée avec la production de réactifs de l'oxygène (portion oxygénase) est grandement supérieur aux NOS constitutives (voir section Neutrophiles) [277]. Il a été suggéré que le NO soit un marqueur de la présence d'une inflammation éosinophilique [278-280] et de l'atopie [281]. De ce fait, une augmentation de la concentration en NO expiré correspondrait à une attaque aiguë d'asthme extrinsèque. De récentes études effectuées sur de larges population de patients suggèrent toutefois que le NO expiré provenant du compartiment alvéolaire ou bronchial n'est corrélé ni à la sévérité de la maladie ni au niveau de contrôle des symptômes [282] et que le suivi médical basé sur la mesure du NO ne permet pas d'améliorer globalement les symptômes, la fonction pulmonaire, ou de diminuer la fréquence d'accès aux soins de santé [283].

L'arginase pourrait aussi contribuer au remodelage des tissus entourant les voies aériennes chez les patients asthmatiques. Les produits dérivés de l'activité de l'arginase peuvent influencer la prolifération cellulaire (polyamines) et participer à la synthèse de collagène (L-proline) (**Figure 23**) (revus dans [269, 284]). En effet, la L-proline est un composant essentiel du collagène et l'augmentation de sa synthèse est associée à la fibrose tissulaire chez un modèle murin infecté par des parasites et dont l'expression d'arginase 1 est surrégulée [285]. Les arginases 1 et 2 semblent d'ailleurs jouer un rôle important dans la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris [286]. La synthèse de polyamines, pour sa part, est induite par transfection du gène de l'arginase dans des macrophages humains et est associée à la prolifération de cellules tumorales en co-culture [287]. Les polyamines sont requises pour la prolifération et la différenciation des cellules en général [288] via leur activité sur les histones acétylases et l'hyperacétylation de la chromatine [289] et ce, pour plusieurs types de cellules de structure pulmonaires (fibroblastes [290], cellules endothéliales [291] et musculaires lisses [292, 293]).

*Les neutrophiles et le métabolisme de la L-arginine chez l'homme*

L'utilisation d'inhibiteurs de l'arginase a permis de démontrer la contribution importante du métabolisme de la L-arginine dans l'apparition des caractéristiques physiopathologiques typiques de l'asthme chez la souris [263] et le cobaye [294, 295] sensibilisés et exposés à un allergène. Les mécanismes décrits jusqu'à présents chez la souris suggèrent que ce sont les macrophages qui représentent une source principale d'arginase 1 dans ce contexte [262, 263]. L'expression d'arginase 1 est d'ailleurs considérée comme un marqueur de la polarisation des macrophages activés de manière alternative (par les cytokines de type Th2) chez la souris [66]. Toutefois, chez l'homme, ni les monocytes circulants, ni les macrophages polarisés par l'IL-4 ou présents au site de l'inflammation allergique n'expriment l'arginase 1 [296-298]. Les neutrophiles humains, par contre, expriment constitutivement l'arginase 1 dans leurs granules, sans être régulée davantage par les cytokines de type Th2 [296, 299]. Tout de même, on associe les neutrophiles exprimant l'arginase 1 à plusieurs contextes associés à l'inflammation chronique des tissus, incluant certains cancers [300, 301], infections parasitaires [302] ou fongiques [296], les ulcères [303], la cicatrisation de la peau [304], l'arthrite rhumatoïde [305] ou l'environnement placentaire [306]. Par conséquent, on peut s'interroger quant à la relation existant entre les neutrophiles recrutés dans les voies respiratoires des patients asthmatiques et les conséquences physiopathologiques associées à une activité élevée de l'arginase (bronchoconstriction, prolifération cellulaires et dépôt de collagène). D'ailleurs, il est à noter que les éosinophiles circulants ou présents au site de l'inflammation chez les patients asthmatiques ne représentent pas une source d'arginase 1 [298], suggérant que celle-ci pourrait être déterminante dans la pathogénèse de l'asthme neutrophilique.

En plus de son rôle probable dans le remodelage tissulaire et la bronchoconstriction, l'arginase exprimée par le neutrophile possède d'autres fonctions biologiques. Notamment, l'appauvrissement en L-arginine du milieu phagosomal et extracellulaire, contribuerait à limiter la survie des microorganismes ingérés [307] et à influencer les facultés de réponses des lymphocytes [300, 303, 306], respectivement. Ainsi, en présence de faibles concentrations extracellulaires de L-arginine, l'expression membranaire des chaînes  $\zeta$  du récepteur des lymphocytes T (TCR) et leur prolifération en réponse aux antigènes sont réduites [308, 309].



### Production d'oxyde nitrique (NO) par les neutrophiles

Le NO est un radical libre synthétisé à partir de la L-arginine et d'oxygène par la synthase d'oxyde nitrique (NOS, *nitric oxide synthase*) [270, 277, 310]. La NOS entre en compétition directe avec l'arginase pour l'utilisation de L-arginine. Le NO, possède plusieurs fonctions physiologiques : à faible concentration, il agit comme neurotransmetteur du système iNANC, régule le débit sanguin et l'activité plaquettaire tandis qu'à forte dose, il a une activité cytotoxique et cytostatique envers les cellules tumorales et certains pathogènes. Il réagit principalement avec les différentes biomolécules par nitration (-NO<sub>2</sub>), nitrosation (-NO<sup>•</sup>), et nitrosylation (-NO). Cette dernière réaction s'effectue au niveau de la guanylyl cyclase qui converti le GTP en GMPc, un messenger intracellulaire régulant certaines fonctions cellulaires comme la relaxation du muscle lisse. La nitration exécute ses effets cytotoxiques en modifiant les lipides, l'ADN et les protéines (modifications post-transcriptionnelles). Il existe quatre isoformes de la NOS qui sont codés par des gènes différents : la NOS neuronale (nNOS, constitutive), NOS endothéliale (eNOS, constitutive), mitochondriale et inducible (iNOS). L'expression de cette dernière est régulée par les cytokines pro-inflammatoires et produits dérivés de microorganismes qui activent le NF-κB.

L'expression de la NOS par les neutrophiles humains et leur production de NO est controversée. On rapporte soit une génération de nitrites, produits de dégradation du NO en solution aqueuse, en concentrations presque nulles par les neutrophiles humains [311] ou alors en concentrations significatives mais sans évidence directe de la production de NO [312] malgré la présence d'une guanylyl cyclase fonctionnelle chez les neutrophiles humains [137]. Toutefois, on rapporte une production élevée de nitrites et de L-citrulline par les neutrophiles périphériques chez des patients asthmatiques [313]. On observe une inconsistance dans la littérature quant aux isoformes de la NOS exprimées par les neutrophiles humains puisque soit l'expression de la forme neuronale [314], soit la forme induite combinée [315] ou non [316] avec la forme endothéliale de la NOS est rapportée. *In situ*, l'expression de l'iNOS par les neutrophiles humains a été observée chez les patients atteints d'infections bactériennes (iNOS)[315], de maladie intestinale inflammatoire (iNOS)[317] et de parodontite [318]. Une faible production de NO par le neutrophile humain peut expliquer l'absence d'augmentation de NO exhalé chez les patients atteints d'asthme neutrophilique [280].

#### Particularités du neutrophile équin

Le neutrophile équin ne semble pas transcrire l'iNOS lorsque stimulé avec une combinaison de LPS et d'INF $\gamma$  et la quantification de nitrites/nitrates dans les surnageants de ces cultures suggèrent une très faible production de NO par ceux-ci (environ 2-3 fois par rapport aux niveaux de base, soit ~22  $\mu$ M après 6 et 12h de stimulation, même taux pour les leucocytes totaux [319]). Ces niveaux de production de nitrites/nitrates sont similaires à ceux rapportés chez l'homme pour les leucocytes pulmonaires d'asthmatiques [320]. Il reste à déterminer si d'autres isoformes de la NOS sont exprimées par les neutrophiles équins et si leur expression dépend de l'inflammation tissulaire.

#### **Inflammation systémique associée à l'asthme**

L'asthme est une pathologie affectant principalement les voies respiratoires, cela va sans dire. Cependant, on sait que des changements systémiques sont également observables chez les patients asthmatiques. Par exemple, on note une augmentation de la concentration plasmatique de médiateurs inflammatoires comme l'histamine et les prostaglandines [321], les leucotriènes [322] ainsi que certaines cytokines (ex. IL-5, IL-6, IL-8, TNF) et facteurs de croissance (ex. G-CSF) associés au recrutement de granulocytes ou autres cellules inflammatoires vers les poumons [323-327]. On rapporte d'ailleurs que les leucocytes circulants sont activés dans la phase active de la maladie [328, 329]. Des marqueurs plus « conventionnels » de l'inflammation systémique, les protéines de phase aiguë CRP [265, 330-333], fibrinogène [333], haptoglobine [334] et protéine amyloïde A sérique [333, 335, 336], sont également élevés dans le sérum des patients asthmatiques. Les causes, conséquences et traitements ciblant l'inflammation systémique associée à l'asthme font l'objet d'un intérêt substantiel dans la littérature [337].

#### **Les neutrophiles dans l'asthme : effecteurs de la réponse allergique ou de la réponse innée?**

Les causes et les conséquences du recrutement des neutrophiles dans les voies respiratoires chez les patients asthmatiques ne sont pas bien comprises. On sait que l'inflammation neutrophilique est associée à l'asthme sévère [145, 198, 338-340]. Les neutrophiles sont par ailleurs reconnus pour jouer un rôle central dans la progression du syndrome de détresse respiratoire aiguë [341], soulignant leur impact potentiel dans la dégénérescence de la fonction pulmonaire. Clairement, l'inflammation neutrophilique des voies respiratoires est associée à la

résistance aux corticostéroïdes chez l'homme et se présente donc comme problématique au niveau thérapeutique (revu dans [342]).

Les mécanismes initialement proposés pour expliquer la neutrophilie observée chez certains patients asthmatiques étaient dissociés de la réponse allergique comme telle. On suggérait que l'inflammation neutrophilique était associée aux exacerbations causées par une infection virale ou alors par des irritants provoquant une inflammation non-spécifique (ozone, particules de pollution, endotoxines) (revus dans [339, 343-345]). Pourtant, l'induction expérimentale de l'asthme par sensibilisation et provocation antigénique chez diverses espèces implique le recrutement des neutrophiles dans les voies respiratoires [346-349]. Chez des patients allergiques, les neutrophiles sont également présents dans la sous-muqueuse des bronches 5 à 6h suivant une provocation antigénique locale [350]. De plus, chez des patients souffrant de rhinite allergique, la neutrophilie et sa persistance dans les voies respiratoires lors la phase tardive de la réponse allergique distinguait distingue les patients développant qui développent également des symptômes de l'asthme *deversus ceux qui demeurent* les patients non-asthmatiques [327], l'amplitude a magnitude de l'inflammation éosinophilique étant similaire dans les deux groupes. *Ex vivo*, les neutrophiles isolés de patients asthmatiques allergiques répondent spécifiquement à l'allergène par le clivage des L-sélectines [351], la production d'IL-8 [352], un signal calcique et l'activation du métabolisme oxydatif [353] ainsi que par l'inhibition de leur programme d'apoptose spontanée [166]. Dans une étude récente [280], on ne trouve pas de différence quant à la fréquence des résultats positifs au test cutané chez des sujets présentant une inflammation neutrophilique dans l'expectoration (>40% neutrophiles, avec ou sans augmentation d'éosinophiles), suggérant que l'inflammation neutrophilique puisse être associée autant à l'asthme extrinsèque qu'intrinsèque.

Peu d'informations sont disponibles quant à la relation entre les neutrophiles et les cytokines effectrices de la réponse allergique c'est-à-dire, les cytokines de type Th2. Ceci est contraire à l'interaction bien décrite entre la production de ces cytokines et le recrutement des éosinophiles (**Figure 21**). Toutefois, on rapporte qu'*in vivo*, l'administration d'IL-4 entraîne le recrutement de neutrophiles dans le modèle murin de poche d'air [354] et une neutrophilie systémique chez l'homme lorsqu'injectée par voie sous-cutanée [355]. Des études *in vitro* suggèrent qu'indirectement, l'IL-4 et l'IL-13 peuvent contribuer au recrutement des neutrophiles

en stimulant la production d'IL-8 et/ou l'expression de molécules d'adhésion par les cellules épithéliales [99, 356], endothéliales [357] et les mastocytes [358]. L'IL-4 favorise également la différenciation de précurseurs promyélocytiques (lignée HL-60) en neutrophiles [359]. Des conclusions contrastantes sont néanmoins décrites dans la littérature quant à l'effet biologique de l'IL-4 et l'IL-13 sur les neutrophiles, tantôt pro- tantôt anti-inflammatoire. Girard et collègues ont montré que ces deux cytokines activent les neutrophiles humains et induisent chez eux des changements morphologiques ainsi que la synthèse d'ARN et de protéines, plus particulièrement d'IL-8 [360, 361]. De plus, on a montré que l'IL-4 retarde l'apoptose spontanée des neutrophiles humains et favorise leur adhérence [361], leur phagocytose de particules opsonisées [359, 362], leur dégranulation et l'activation de leur métabolisme oxydatif [362]. L'IL-9, une cytokine ayant des effets pleiotropiques et souvent associée à la réponse allergique [363], active les neutrophiles humains et ces derniers expriment des niveaux élevés du récepteur à l'IL-9 chez les patients asthmatiques [364]. Cependant, d'autres études suggèrent une action anti-inflammatoire ou même nulle de ces mêmes cytokines sur les fonctions du neutrophile [365-368].

Alternativement, Gibson, parmi d'autres, propose que l'inflammation neutrophilique sous-jacente à l'asthme soit le reflet d'une réponse immunitaire innée dysfonctionnelle [226]. Il souligne que le recrutement des neutrophiles, dirigé par la présence de fortes concentrations d'IL-8, et leur activation (relâche d'élastase) sont représentatifs d'un programme typique de la réponse innée. Celle-ci implique la reconnaissance de PAMPS via les récepteurs de l'immunité innée (TLRs) et l'activation des voies de signalisation associées (NF- $\kappa$ B). L'auteur suggère que la production de LTB<sub>4</sub> par les neutrophiles contribuerait à augmenter la réponse contractile des voies respiratoires. Une étude dans laquelle on a quantifié l'expression des récepteurs et cytokines associés à la réponse immunitaire innée chez des patients atteints d'asthme neutrophilique a généré des résultats supportant ces affirmations [369]. Ainsi, comparés aux cellules récupérées dans l'expectoration de patients atteints d'asthme éosinophilique, paucigranulocytique ou de sujets contrôles, celles des patients atteints d'asthme neutrophilique présentaient une expression supérieure de TLR2, TLR4, et CD14 associée à une forte expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-8 et TNF. De plus, les auteurs ont pu corrélérer la proportion de neutrophiles avec les niveaux d'endotoxine dans le surnageant d'expectoration, suggérant que l'inhalation de LPS soit associée au phénotype asthmatique neutrophilique. Ceci pourrait justifier

le fait que les patients asthmatiques possèdent une sensibilité accrue à développer la bronchoconstriction suivant l'inhalation de LPS par rapport à des sujets normaux [370].

## **Le Souffle comme modèle d'asthme neutrophilique**

Les modèles murins s'avèrent essentiels pour l'identification des mécanismes immunologiques impliqués dans la physiopathologie de l'asthme et de la réponse immunologique en générale. Les technologies permettant de faire la délétion de gènes ou la transgénèse ainsi que la panoplie d'anticorps disponibles pour cette espèce ont permis de cibler les molécules d'importance et d'orienter les efforts vers la compréhension de la pathogénie de l'asthme et le développement de thérapies. Malgré tout, ces modèles présentent des lacunes, surtout par rapport au fait que les méthodes utilisées pour induire la maladie mènent à la création d'un phénotype homogène (par exemple, la sensibilisation allergique à l'ovalbumine), qui est courte durée et chez des animaux autogames (*inbred*), maintenus dans des environnements exempts de pathogènes et donc, ne tenant pas compte de l'effet des interactions gènes-environnement et gènes-gènes possibles. Le cheval atteint du souffle vient offrir des perspectives intéressantes et plus réalistes pour l'étude l'asthme, en ce sens que cette maladie se développe naturellement, chez des animaux ayant une génétique hétérogène et qui ont vécu des épisodes symptomatiques sur une longue période de temps. Surtout, le souffle s'avère un modèle pertinent pour l'étude de la contribution du neutrophile dans l'inflammation chronique des voies respiratoires qui, rappelons-le, affecte une proportion considérable des patients atteints d'asthme.

### **Définition : historique et caractéristiques cliniques**

Le souffle (en anglais: *heaves* ou *recurrent airway obstruction, RAO*) est une maladie respiratoire chronique, non septique, commune chez les chevaux adultes vivant dans des régions de climat tempéré. La prévalence exacte n'est pas connue et varie probablement avec les régions. Une récente étude la situe à 14% en Grande Bretagne [371]. Cette maladie est associée à la domestication des chevaux, les premiers écrits décrivant une affection respiratoire similaire chez le cheval remontent à l'époque de la Grèce antique [372]. Le souffle était déjà comparé à l'asthme humain en 1893 par Henri Bouley [373]. Le souffle était préalablement retrouvé dans la littérature sous l'appellation *equine COPD*, toutefois cette terminologie fut éradiquée dans un consensus de 2001 étant donné les dissimilarités avec l'étiologie (tabagisme), la pathogénie (emphysème), et les manifestations cliniques (réversibilité par des bronchodilatateurs et les corticostéroïdes) de la MPOC humaine [374].

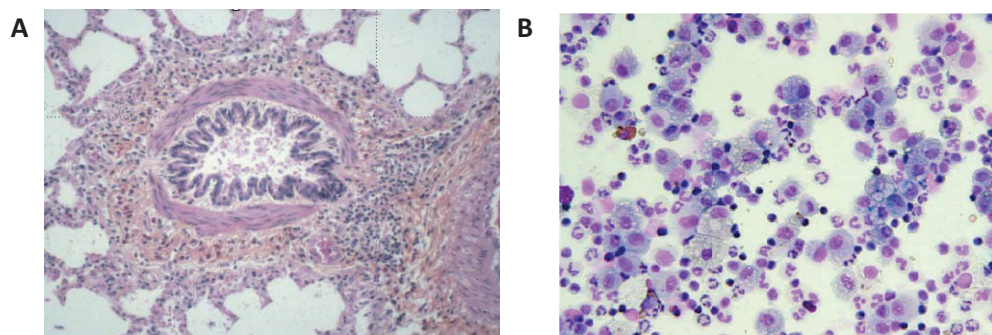
Les caractéristiques cliniques du souffle incluent un effort respiratoire accru chez le cheval au repos, de la toux et des écoulements nasaux (séreux, séromuqueux ou mucopurulents) (revus dans [374, 375]). L'hypoxémie est aussi une caractéristique clinique observée lors de l'exacerbation clinique de la maladie. Les chevaux atteints du souffle sont intolérants à l'exercice, habituellement âgés de plus de 7 ans et leurs symptômes sont exacerbés lorsqu'ils sont exposés aux poussières libérées du foin avec lequel ils sont nourris et de la paille utilisée comme litière dans l'écurie. Avec la progression de la maladie, on observe une augmentation de la sévérité et la fréquence de la toux menant à des épisodes paroxystiques de toux non-productive, une augmentation de la fréquence respiratoire avec allongement du cou et de la tête, la dilatation des nasaux et la perte de poids. Certains chevaux développent une symptomatologie identique en réponse au pollen et aux particules inhalées au pâturage. Cette forme de la maladie, moins fréquente que le souffle, est appelée « *summer heaves* » ou « *summer pasture-associated obstructive pulmonary disease, SPAOPD* » [376-378] mais ne sera pas discutée dans cette thèse.

Les critères de définition de la maladie se basent sur la réversibilité de l'obstruction respiratoire, observable par le retrait de l'agent causateur ou par l'administration de bronchodilatateurs et sur la présence d'inflammation des voies respiratoires [374]. La réduction de l'exposition aux poussières inhalables s'effectue efficacement soit en mettant les chevaux au pâturage ou en remplacement la litière de paille par des copeaux de bois et le foin par des granulés ou autres alternatives non poussiéreuses. Les outils diagnostiques utilisés sont, entre autres, les scores cliniques [379], l'évaluation de la fonction respiratoire (**Annexe 2**) et les lavages bronchoalvéolaires (LBA). Le pourcentage de neutrophiles dans le LBA des chevaux atteints de souffle en exacerbation est généralement  $>25\%$  (normal  $\leq 5\%$ ) (revu dans [375]). Toutefois, on peut observer dans les cas sévères une plus faible inflammation neutrophilique (10-20% de neutrophiles) malgré la présence d'une obstruction respiratoire évidente. La méthode d'investigation utilisée pour détecter la présence d'inflammation des voies respiratoires chez les chevaux atteints de souffle diffère de celle généralement utilisée chez l'homme, soit l'expectoration induite par l'inhalation de saline, qui s'avère être une procédure moins invasive mais qui nécessite la participation du sujet. L'expectoration induite est reconnue pour générer des échantillons qui représentent les populations cellulaires présentes au niveau des voies respiratoires centrales [380]. Chez le cheval, une technique apparentée est le lavage trachéal.

Cette technique permet d'échantillonner les sécrétions provenant des voies périphériques et centrales par instillation de saline au niveau de la trachée. Par contre, les changements observés dans le différentielle cellulaire du lavage trachéal ne sont ni spécifiques au souffle ni corrélés avec la cytologie bronchoalvéolaires et les changements histologiques qui lui sont associés (revu dans [375]). Le **Tableau V**, présenté plus loin, résume les caractéristiques communes et divergentes à l'asthme et au souffle.

### *Histopathologie et remodelage tissulaire*

Tel que mentionné, les voies respiratoires périphériques représentent le site principal des changements histopathologiques associés au souffle. Les coupes histologiques des chevaux atteints du souffle en crise montrent dans la lumière des bronchioles une accumulation de mucus et un exsudat inflammatoire principalement composé de neutrophiles (**Figure 24**) (revu dans [374, 375]). On peut observer une hyperplasie/métaplasie des cellules à mucus ainsi que la métaplasie/desquamation des cellules épithéliales. Au niveau péribronchiolaire, on note une infiltration de cellules mononucléaires (lymphocytes et plasmocytes), de la fibrose (dépôt de collagène) et une augmentation de la masse du muscle lisse [381, 382]. Cette dernière est observable pour toutes les tailles de voies respiratoires mais s'avère plus accentuée dans les petites voies. Autrement, des régions emphysémateuses ont été rapportées mais l'hyperinflation alvéolaire résultant de la capture d'air causée par la fermeture des voies respiratoires est plus commune.



**Figure 24.** Images représentatives d'une coupe histologique des bronchioles (**A**) et d'une cytologie du LBA (**B**) chez un cheval atteint du souffle en crise.

Les proportions de cellules inflammatoires considérées normales dans le LBA sont : 40-70% de macrophages, 30-60% de lymphocytes, < 5% de neutrophiles, < 2% de mastocytes et <0.5-



1% d'éosinophiles [383]. Chez le cheval atteint de souffle en crise, le % de neutrophiles augmente et, de manière inconsistante, celui des mastocytes et des éosinophiles (revu dans [374]). On considère plus souvent les changements du % plutôt que le nombre absolu de cellules inflammatoires puisque le volume de fluide récupéré lors du LBA et son degré de dilution varient en fonction du volume de saline infusé, du cheval et de la sévérité de la maladie [384].

### *Principaux traitements*

Les corticostéroïdes et les bronchodilatateurs sont efficaces pour contrôler les symptômes du souffle (revus dans [375]). Si le simple changement d'environnement n'est pas possible (réduction du niveau de poussière), l'administration de corticostéroïdes permet d'améliorer le plus efficacement la fonction respiratoire des chevaux atteints du souffle. La dexaméthasone (0.05-0.1mg/kg i.v., PO, q24h) est le corticostéroïde le plus efficace. La prednisolone (1-2mg/kg per os, q24h) l'est moins [385]. Les corticostéroïdes inhalés (beclométhasone dipropionate et fluticasone propionate) sont efficacement administrés à l'aide d'un masque nasal, d'un *spacer* et d'un aérosol-doseur. Les corticostéroïdes ont un effet tardif, dose-dépendant et généralement faible sur la résolution de la neutrophilie pulmonaire. Les bronchodilatateurs sont utilisés pour provoquer une amélioration rapide mais transitoire de la fonction respiratoire. Les agonistes  $\beta_2$  sont administrés par voie orale (clenbuterol) ou inhalée (albuterol, salmeterol, etc.). Enfin, l'atropine induit une bronchodilatation rapide et transitoire chez les chevaux en crise mais les effets secondaires indésirables de cet anti-cholinergique limitent son utilisation régulière. Le tiotropium est un anticholinergique inhalé bien toléré par les chevaux.

### **Les causes du souffle**

L'exacerbation du souffle est clairement associée à l'environnement toutefois on ne connaît pas encore exactement les causes de la maladie. La poussière que l'on retrouve dans les écuries véhicule près de 50 espèces de moisissures, une variété d'acarien, des endotoxines bactériennes et des composants inorganiques (revu dans [374]). Le fait que seule une faible proportion des chevaux développe les symptômes de la maladie dans un environnement donné suggère que le souffle soit une conséquence de la sensibilisation « allergique » à un antigène véhiculé dans l'air chez certains animaux prédisposés (hypersensibilité). Des études proposent que des mécanismes non-spécifiques puissent également contribuer à déclencher la

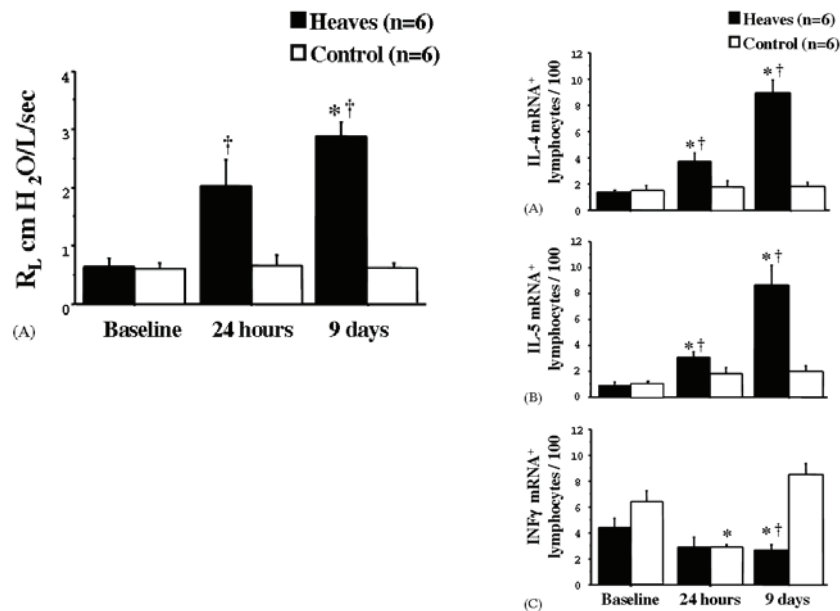
bronchoconstriction due à l'hyperréactivité bronchique non-spécifique caractéristique chez les chevaux atteints du souffle.

### *Allergènes*

Les chevaux atteints du souffle asymptomatiques développent une neutrophilie pulmonaire et une obstruction respiratoire en réponse à l'inhalation d'extraits solubles d'*Aspergillus fumigatus* et *Faenia Rectivirgula* [386], similaires à celles induites par une exposition au foin et à la paille (défi antigénique « naturel ») et ce, contrairement aux chevaux sains utilisés comme contrôles. Toutefois, les tests de réactivité cutanée à ces mêmes antigènes ne permettent pas de différencier les chevaux contrôles et atteints de la maladie, ni ne sont corrélés avec l'amplitude de l'inflammation et de l'obstruction respiratoire chez ces derniers [387]. Une étude par Schmallenbach et collègues confirme l'absence de différence entre les taux d'IgEs et IgGs spécifiques pour certains antigènes d'*A. fumigatus* au niveau sérique entre les groupes de chevaux mais rapporte des concentrations significativement supérieures d'IgEs et d'IgGs spécifiques dans le surnageants du LBA des chevaux malades [388]. L'absence de corrélation entre les taux d'anticorps sériques et pulmonaires implique qu'une réponse immunologique essentiellement locale soit impliquée dans le souffle (contrairement à l'atopie). À l'opposé, une étude plus récente démontre des taux sériques d'IgEs significativement plus élevés contre *A. fumigatus* et *Alternaria alternata* chez les chevaux atteints du souffle [389]. La discordance entre ces résultats peut s'expliquer par l'effet important de l'environnement et de la génétique sur la concentration sérique des IgEs chez les chevaux. Tel que démontré par Eder et ses collègues sur une population de 448 chevaux Lippizans provenant de 6 fermes différentes, le pourcentage de chevaux positifs pour les IgEs sériques spécifiques pour des antigènes de moisissures communes est fortement dépendant de la ferme d'origine [390]. D'ailleurs, cette étude a révélé qu'il existait d'importantes interactions entre le sexe et l'environnement ainsi que l'âge et l'environnement. Néanmoins, le chevauchement important entre les niveaux d'anticorps sériques chez les chevaux atteints du souffle et sains ne permet pas d'en faire un outil diagnostique solide.

La production d'anticorps spécifiques est garant d'une réponse immunitaire acquise envers les antigènes inhalés. Qui plus est, la présence d'IgEs suggère qu'une réponse allergique soit impliquée dans le souffle. Les mastocytes, acteurs importants dans la réponse allergique,

semblent également participer à la réponse inflammatoire associée au souffle sans pour autant qu'une bronchoconstriction typique de phase aiguë ne soit observable chez les chevaux atteints [391]. Hare et collègues ont rapporté une dégranulation d'histamine significativement supérieure par les cellules du LBA de chevaux atteints du souffle par rapport à des chevaux contrôles en réponse à une stimulation *in vitro* avec des allergènes [392]. Par ailleurs, McGorum et collègues ont démontré que la relâche d'histamine était augmentée localement, c'est-à-dire dans le LBA mais pas le plasma des chevaux malades, seulement après 5h d'exposition antigénique [393]. Un plus grand nombre de mastocytes chymase<sup>+</sup> dans les bronches et bronchioles des chevaux symptomatiques a également été rapporté [77]. Enfin, notre équipe a montré par hybridation *in situ* que l'expression de cytokines de type Th2 par les cellules du LBA était élevée et concomitante à l'inflammation neutrophilique et à la bronchoconstriction chez les chevaux atteints du souffle, contrairement aux chevaux normaux dans deux études consécutives utilisant des chevaux distincts [394, 395] (Figure 25).



**Figure 25.** Expression de cytokines de type Th2 associée à l'obstruction respiratoire et à la neutrophilie pulmonaire chez les chevaux atteints du souffle.

*Gauche.* Mesure de la résistance pulmonaire chez les chevaux contrôles et atteints de souffle avant (baseline), 24h ou 9 jours suivant un défi antigénique naturel. *Droite.* Pourcentage de lymphocytes positifs pour l'expression de cytokines de type Th2 (IL-4 et IL-5) ou Th1 (INF $\gamma$ ) dans le LBA aux mêmes temps. \* différence significative par rapport à baseline. † différence significative entre les groupes pour un temps donnée. Tiré de Cordeau et collègues, 2004 [394]

Un modèle équin de sensibilisation allergique à l'ovalbumine développé par Bowles et collègues supporte le fait qu'une réponse allergique impliquant l'expression de cytokines de type Th2 par les cellules pulmonaires soit accompagnée d'une inflammation principalement neutrophilique des voies respiratoires chez le cheval [347]. D'autres évidences d'un lien entre l'allergie et la réponse neutrophilique chez le cheval ont été apportées par l'étude de l'expression des récepteurs pour des cytokines de type Th2 sur les neutrophiles périphériques. On a montré par immunohistochimie l'expression des sous-unités  $\alpha$  des récepteurs à l'IL-5 et IL-9 sur une sous-population de neutrophiles équins [396], davantage représentés dans le sang des chevaux atteints du souffle asymptomatiques par rapport aux contrôles, et encore plus nombreux lorsque les chevaux sont exposés à un environnement poussiéreux. Ces résultats suggèrent qu'une sous-population de neutrophiles périphériques pourrait être prédisposée à répondre aux cytokines de type Th2, exprimées au niveau pulmonaire chez chevaux atteints de souffle.

Il est à noter cependant que d'autres études ont tenté de caractériser le profil cytokinique pulmonaire et périphérique associé au souffle en utilisant d'autres techniques, particulièrement la PCR en temps réelle. Elles sont arrivées à des conclusions différentes et inconsistantes entre elles par rapport à la dominance des profils Th1 et Th2 [397-401], plusieurs suggérant une réponse mixte. Malgré ce fait, une d'entre elles a démontré qu'un traitement avec de la fluticasone propionate permettait de diminuer l'expression d'IL-4 et le ratio IL-4/INF $\gamma$  dans les poumons des chevaux atteints de souffle, évoquant une certaine contribution de l'IL-4 dans l'exacerbation des symptômes [399]. Mentionnons également l'association qui a été démontrée dans le souffle entre l'inflammation neutrophilique et l'expression d'IL-17 par les cellules du lavage bronchoalvéolaire et les cellules épithéliales [123, 402].

### *Agents non-spécifiques*

Les écuries peuvent fournir un environnement très riche en endotoxines bactériennes inhalables. McGorum et collègues ont comparé les niveaux de poussières et la fraction d'endotoxines inhalables dans des établissements régis différemment quant à la litière et à la nourriture des chevaux : 1) écuries conventionnelles (paille et foin); 2) écuries peu poussiéreuses (copeaux et ensilage); et 3) pâturage [403]. La concentration d'endotoxines inhalables était 15 fois supérieure dans les écuries conventionnelles par rapport aux écuries peu poussiéreuses et au

pâturage, dans lequel les symptômes du souffle peuvent être renversés [375]. Les niveaux d'endotoxines présents dans la poussière des écuries conventionnelles étaient comparables à ceux retrouvés dans certains domiciles, dans l'industrie du coton ou du grain, tous deux associés aux maladies pulmonaires chroniques chez l'homme, mais moindre que ceux trouvés dans les porcheries ou poulaillers (discuté dans [403]). Pirie et ses collègues ont montré que les chevaux atteints de souffle asymptomatiques développaient une neutrophilie pulmonaire à plus faible dose de LPS inhalé (20µg), par rapport aux chevaux contrôles ( $\geq 200\mu\text{g}$ ) et une augmentation des valeurs de résistance pulmonaire 5h après l'inhalation de 2mg de LPS alors que la fonction pulmonaire des chevaux normaux ne variait pas [404]. Parce que les niveaux d'endotoxines mesurés dans la poussière émanant du foin et de la paille soient nettement inférieurs à ceux nécessaires pour induire la neutrophilie pulmonaire avec du LPS aérosolisé, les auteurs suggèrent que les endotoxines ne représentent pas l'unique cause de la maladie. Des études subséquentes par le même groupe ont montré, par déplétion et reconstitution, que le LPS présent dans une suspension de poussières de foin ou d'extraits d'*A. fumigatus* contribuait significativement à la neutrophilie et à l'obstruction pulmonaires chez les chevaux atteints de souffle [405, 406]. Ces observations sont similaires à celles faite par Michel et collègues chez les asthmatiques, tel que cité précédemment [370].

Le niveau d'activation du NF-κB, présent sous forme d'homodimères de p65, est supérieur dans les cellules du LBA des chevaux atteints du souffle en crise par rapport aux cellules des chevaux contrôles exposés au même environnement [407]. Le % de neutrophiles est fortement associé au degré d'activité du NF-κB qui lui-même est négativement corrélé à la fonction pulmonaire des chevaux. De plus, l'expression génique de TLR4 est plus élevée dans les cellules du LBA des chevaux atteints de souffle symptomatiques par rapport aux chevaux normaux exposés au même environnement, mais la source de cette augmentation n'est pas précisée (recrutement d'une population cellulaire spécifique exprimant le TLR4 ou surrégulation par les neutrophiles ou une autre population cellulaire) [123]. Ces molécules sont typiquement impliquées dans la réponse immunitaire innée. Les neutrophiles équins expriment en effet les récepteurs et répondent au LPS par l'activation de plusieurs de leurs fonctions cellulaires (voir section sur le neutrophile), en particulier leur expression de cytokines et chimiokines [148] et la transcription du TLR4 (autorégulation positive) [122, 123]. Compte tenu des polymorphismes observés dans la

séquence du TLR4 chez certains chevaux [408], il reste à déterminer si les neutrophiles des chevaux atteints du souffle ont une réponse intrinsèque au LPS altérée, et de cette manière, s'ils peuvent contribuer à amplifier la réponse inflammatoire et augmenter la sensibilité de ces chevaux aux poussières inhalées, tel que décrit dans le paragraphe précédent.

D'autres agents environnementaux non-spécifiques sont présents dans les poussières inhalées ( $\beta$ -glucanes, spores, protéases de moisissures et d'acariens, gaz néfastes) [375, 409] et pourraient également contribuer à initier la réponse inflammatoire mais ne seront pas abordés dans le cadre de cette recherche.

### *Génétique et facteurs de risque*

L'héritabilité du souffle a été démontrée dans une étude sur la prévalence de la maladie effectuée sur des chevaux provenant de grande ferme d'élevage de Lippizans et de chevaux Allemands Warmblood [410]. Dans ces deux « familles », la fréquence des maladies respiratoires chroniques augmentait avec le fait d'avoir un (~ 6-17%) ou deux parents (~ 38-48%) atteints de souffle et ce, en comparaison avec la progéniture n'ayant aucun parent atteint. L'héritabilité de la maladie ne suivait pas le modèle simple mendélien et était fortement influencée par l'environnement (exposition à la poussière). Il n'y a pas d'évidence que le souffle affecte plus particulièrement certaines races de chevaux. Des études suggèrent que les femelles pourraient être à plus haut risque de développer le souffle [411], mais cette observation ne fait pas l'unanimité (revu dans [375]).

Des polymorphismes dans les gènes TLR4, CD14, C $\epsilon$  et Fc $\epsilon$  R1 $\alpha$  ont été identifiés chez certaines races de chevaux [408, 412] toutefois aucune étude jusqu'à présent n'a pu les associer au risque de développer le souffle. Onze polymorphismes ont été identifiés dans le gène codant l'IL-4R $\alpha$  par Solberg et collègues [413], dont quatre représentent des changements de base non-synonymes. Récemment, des variations génétiques dans la région du génome équin logeant le gène *IL-4RA* (ECA13q13) ont été associées au souffle dans une des deux « familles » de chevaux à forte prévalence étudiées par Jost et ses collègues [414]. Ces observations, combinées avec les résultats d'une étude récente sur l'héritabilité du souffle [415], suggèrent que cette maladie possède un caractère génétique complexe, n'impliquant pas les mêmes gènes majeurs d'héritabilité de famille en famille, et que la présence de SNPs dans le gène de l'IL-4R $\alpha$  pourrait

contribuer à la susceptibilité de développer cette maladie chez certains animaux. Une conséquence fonctionnelle a déjà été associée à ce polymorphisme, soit une résistance accrue aux infections parasitaires [416]. Encore une fois, ces observations sont similaires à celles associées à l'asthme chez l'homme (voir section génétique de l'asthme et [417]).

**Tableau V.** Similarités et différences entre l'asthme et le souffle.

Caractéristiques physiopathologiques	Asthme	Souffle
<b>Obstruction respiratoire réversible</b>	X	X
<b>HRB</b>	X	X
Phase aiguë	X	
Phase tardive	X	X
<b>Inflammation neutrophilique</b>	X (certains phénotypes)	X
<b>Réponse IgE-spécifique</b>	X (certains phénotypes)	X (locale)
<b>Cytokines de type Th2</b>	X	X
<b>↑ Sensibilité aux endotoxines</b>	X	X
<b>Site de l'inflammation</b>		
Voies périphériques	X	X
Voies centrales	X	?
<b>Remodelage tissulaire</b>		
↑ Masse du muscle lisse	X	X
Fibrose de la sous-muqueuse	X	X
Fibrose de la membrane basale	X	
<i>Site du remodelage</i>		
Voies périphériques	X	X
Voies centrales	X	X (muscle lisse)
<b>Traitements</b>		
Corticostéroïdes	X	X
Agonistes β2	X	X
Anti-leucotriènes	X	

### **Les neutrophiles, potentielles cellules effectrices de la réponse inflammatoire associée au souffle**

Sans contredit, l'expression d'IL-8 est surrégulée dans les poumons des chevaux atteints de souffle, tant au niveau génique que protéique [123, 197, 399, 400] et son expression est significativement diminuée suivant un traitement avec des corticostéroïdes [399]. Les neutrophiles sont recrutés dans les voies respiratoires 3-5h suivant le début d'une exposition au foin et leur nombre regagne le niveau de base après 4 jours si cette exposition est brève (5-7h) [200, 418,

419]. La résolution de l'inflammation correspond dans le temps à l'apoptose des neutrophiles et à leur phagocytose par les macrophages. La neutrophilie perdure si les chevaux sont continuellement exposés au foin (ex. 9 [394] et 30 jours [385]) et l'inflammation des voies respiratoires est détectable jusqu'à 21 jours suivant le retrait de l'antigène, dans certains cas [407]. Les chevaux sains présentent parfois une neutrophilie pulmonaire suivant l'exposition au foin, toutefois elle n'est pas associée à de l'obstruction respiratoire, est moins importante que celle observée chez les chevaux atteints de souffle et se résout généralement malgré la prolongation de la stimulation antigénique [385, 394, 420].

### **Neutrophiles périphériques**

Le recrutement des neutrophiles dans les voies respiratoires est suivi d'une augmentation du nombre de ces cellules dans le sang périphériques, de 7 à 24h suivant l'initiation du défi antigénique [200, 404, 418]. Chez les chevaux atteints du souffle seulement, les neutrophiles sanguins présentent une augmentation de l'adhérence CD18-dépendante et de l'activité basale du métabolisme oxydatif 24h suivant l'exposition antigénique [421, 422]. Un certain degré d'adhérence constitutive des neutrophiles périphériques est également notable chez les chevaux asymptomatiques, contrairement aux contrôles. Enfin, Olszewski et ses collègues ont montré que les neutrophiles périphériques des chevaux symptomatiques présentaient un retard de l'apoptose spontanée (après 20h culture cellulaire) 5h et 24h suivant le début du défi antigénique de 7h [423]. Ces caractéristiques constituent des marqueurs de l'activation périphériques des neutrophiles. Des auteurs ont suggéré que le conditionnement « tardif » des neutrophiles périphériques (24h suivant le début d'une stimulation antigénique) contribue à l'accumulation pathologique des neutrophiles dans les voies respiratoires et implique des mécanismes différents de ceux qui sont responsables de l'inflammation aiguë observée après 5h [421].

### **Neutrophiles pulmonaires**

Le niveau d'activation des neutrophiles recrutés dans les voies respiratoires des chevaux atteints du souffle pourrait contribuer à la pathologie. On a montré que les neutrophiles pulmonaires de ces chevaux sont plus denses que ceux des chevaux sains [420]. Ces derniers se sont avérés relâcher de l'élastase, des réactifs de l'oxygène et du LTB4 [200, 424]. La présence de pro-MMP-9 et de MMP-9 active est également accrue chez les chevaux atteints du souffle par



rapport à des chevaux contrôles exposés à la paille et au foin et est corrélée avec le % de neutrophiles présents dans le LBA [425]. Brazil et ses collègues ont mis en évidence la présence de facteurs de survie pour les neutrophiles dans les surnageants de LBA provenant des chevaux malades [200]. Turlej et collègues ont montré que la survie des neutrophiles pulmonaires mis en culture *ex vivo* était supérieure chez ces chevaux à celle des neutrophiles sanguins et pulmonaires de chevaux sains (30 *versus* 100% de neutrophiles apoptotiques après 48h) [426]. Également, on a rapporté que l'indice de stress oxydatif pulmonaire est élevé dans le souffle (glutathion disulfure élevé, GSSG) et corrélé avec le pourcentage de neutrophiles [427]. Ces observations suggèrent que les neutrophiles sont activés plus longtemps et relâchent plus de produits toxiques pour les tissus chez les chevaux en crise. Des inhibiteurs de la production de leucotriènes, soit un antagonistes de la 5-lipoxygénase (fenleuton) [419] et un antagoniste de la *5-LO activating protein* (FLAP) [428], ainsi qu'un antagoniste du récepteur du LTD4 [429] ne se sont pas avérés efficaces pour bloquer l'inflammation neutrophilique chez ces chevaux. L'antagoniste du récepteur pour PAF (*platelet activating factor*), un médiateur impliqué dans le recrutement des neutrophiles lors de la réponse anaphylactique chez la souris [1], n'a pas montré d'effet significatif non plus sur l'apparition de la neutrophilie associée au souffle [430].

## **Retour sur les objectifs de la thèse**

À la lumière de ces informations, nous avons entrepris d'étudier dans le cadre de cette thèse la contribution des neutrophiles à l'inflammation associée aux réponses immunitaires innée et acquise impliquées dans l'asthme, en utilisant les chevaux atteints du souffle comme modèle naturel d'asthme neutrophilique. Nous avons pour objectifs de comparer *ex vivo* le profil et le niveau d'activation des neutrophiles périphériques de ces chevaux à celui d'animaux contrôles suivant leur stimulation avec des médiateurs susceptibles de contribuer à l'asthme et au souffle : les produits dérivés de bactéries soient les lipopolysaccharides et peptides formylés (immunité innée), ainsi que les cytokines de type Th2, associées à la réponse allergique (immunité acquise). De plus, nous nous sommes intéressés à l'expression des isoformes de l'arginase par les neutrophiles équins et à leur profil d'expression dans les poumons des chevaux atteints de souffle afin de d'évaluer la contribution du métabolisme de la L-arginine à la physiopathologie de l'asthme neutrophilique.

## Méthodologie et Résultats

## Article #1

### ***Systemic inflammation and priming of peripheral blood leukocytes persist during clinical remission in horses with heaves***

#### Sommaire

La réponse immunitaire innée est susceptible de contribuer à l'exacerbation clinique du souffle en réponse aux agents non-spécifiques contenus dans les poussières environnementales.

Les neutrophiles sont recrutés en réponse aux endotoxines et aux produits formylés dérivés des bactéries et répondent entre autres à ces agonistes par l'expression de cytokines pro-inflammatoires pouvant amplifier la réponse inflammatoire.

Cet article décrit les travaux effectués afin de comparer la réponse innée des leucocytes sanguins isolés de chevaux normaux et atteints du souffle en périodes de rémission clinique. La présence d'inflammation systémique a également été évaluée dans ce contexte.

#### **Contributions originales**

Ma contribution est de 100% à toutes les manipulations expérimentales. J'aurai participé à 80% à la rédaction de l'article.

Article en préparation pour soumission dans *Am J Vet Research*

## **Systemic inflammation and priming of peripheral blood leukocytes persist during clinical remission in horses with heaves**

Anouk Lavoie-Lamoureux MSc<sup>1</sup>, Guy Beauchamp PhD<sup>1</sup>, Sylvain Quessy DVM PhD<sup>1</sup>, James G. Martin DM<sup>2</sup>, Jean-Pierre Lavoie, DVM<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Faculté de médecine vétérinaire, U. of Montreal, St-Hyacinthe, Canada. <sup>2</sup>Meakins-Christie Laboratories, McGill U., Montreal, Canada.

This manuscript represents a portion of a thesis submitted by A. Lavoie-Lamoureux to the University Of Montreal, Department Of Clinical Sciences, as partial fulfillment of the requirements for a PhD of Science degree.

Supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarships (Lavoie-Lamoureux).

Presented in abstract form by A. Lavoie-Lamoureux at the 2008 International Conference of the American Thoracic Society, Toronto, Canada, May 2008.

The authors would like to acknowledge Mathilde Leclère, Marie-Laure Cortes, Josiane Lefebvre Lavoie and Julie Dauvillier for their help related to blood sample collection and processing.

**Corresponding author.** Jean-Pierre Lavoie, [REDACTED] 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, Canada. J2S 2M2. Fax: [REDACTED] [REDACTED]

## Abstract

**Objective:** To compare innate immune responses of peripheral blood leucocytes from healthy and asymptomatic heaves-affected horses.

**Animals:** Heaves-affected horses (n = 5-6) and healthy controls (n = 4-5) kept under low dust environments (pasture or shavings and pellets).

**Procedures:** Blood neutrophil and mononuclear cell populations were isolated using MACS system. Cells were incubated with or without bacterial products (LPS, 100 ng/mL and fMLP,  $10^{-8}$ M, 5h). Cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF, IL-4, INF $\gamma$  and IL-10) and receptor (TLR4) mRNA expression was assessed by qPCR. TNF concentration in culture supernatants and serum samples was assessed using ELISA. Apoptotic rate of resting and stimulated neutrophils were assessed by flow cytometry using AnnexinV and 7-AAD (18h) and correlated with early pro-inflammatory cytokine expression in the same cells (5h).

**Results:** Stimulation with bacterial-derived products resulted in overexpression of pro-inflammatory cytokines in both neutrophils (IL-1 $\beta$  and TNF) and mononuclear cells (IL-1 $\beta$  and IL-8) from heaves-affected horses. Mononuclear cells from these horses also had significantly increased basal TNF mRNA levels. TLR4 expression was correlated with pro-inflammatory cytokines only in neutrophils. Neutrophil survival (18h) was associated with their early TNF expression, but not IL-8. Serum TNF concentration was significantly higher in heaves-affected horses compared to healthy horses kept in similar environment.

**Conclusions and clinical relevance:** Aberrant innate immune response toward bacterial products is observable in leukocytes from asymptomatic asthmatic animals. This may be due to intrinsic alterations in immune responses related to the disease genetic background or to the persistence of systemic inflammation and priming of peripheral blood leucocytes despite antigen avoidance.

**Abbreviations**

BAL: bronchoalveolar lavage

CD: cluster of differentiation

fMLP: Nformyl-Met-Leu-Phe

IL: Interleukin

INF: Interferon

LPS: Lipopolysaccharide

mRNA: messenger RNA

NF- $\kappa$ B: Nuclear factor-kappaB

PAMPS: Pathogen-associated molecular patterns

PBMC: Peripheral blood mononuclear cells

PRR: PAMPS-related receptor

RBCs: red blood cells

Th: lymphocyte T helper

TLR: Toll-like receptor

TNF: Tumor necrosis factor

**INTRODUCTION**

Heaves is a chronic airway disease of horses featuring episodes of reversible bronchoconstriction upon exposure to barn-derived organic dusts<sup>1</sup>. This disease shares with human asthma several pathophysiological features including reversible airway obstruction and inflammation. The inflammatory events in heaves are mainly characterized by a neutrophilic recruitment in the airway lumen<sup>1</sup>. The etiopathogenesis of the disease remains unknown although studies have shown the presence of adaptative immune responses to mouldy hay components (moulds, fungi) through the recruitment of activated lymphocytes<sup>2</sup>, the expression of cytokines associated with the *helper* T lymphocytes subsets (Th)<sup>3-5</sup>, as well as specific antibody production in the airways<sup>6,7</sup>. Bacterial endotoxins and  $\beta$ -glucans also present in high concentration in exacerbating environments were propounded as contributing factors to heaves aetiology.

Whether innate immune responses are altered in heaves-affected horses and contribute to the development of aberrant acquired immune responses to barn-derived antigens remains to

be determined. Limited evidences of an altered innate immune response were highlighted by the finding that inhalation of lipopolysaccharides (LPS) induces a more pronounced airway neutrophilia and obstruction in horses with heaves compared to healthy controls<sup>8</sup>. LPS also enhanced the airway obstruction and inflammation induced by aerosolized moldy hay suspensions<sup>9,10</sup> or purified allergen extracts<sup>11</sup> in susceptible horses. Furthermore, lower doses of LPS were required to induce significant release of gelatinolytic metalloproteinase (MMP)-9 in the airways of heaves-affected horses compared to normal horses<sup>12</sup>. An ex vivo study also showed that alveolar macrophages from these horses exhibited enhanced pro-inflammatory cytokine expression compared to macrophages isolated from normal healthy controls following inhalational challenge with LPS<sup>13</sup>. Lastly, a genetic component of heaves was demonstrated in certain breeds of horse<sup>14</sup> and polymorphisms and/or mutations in the Toll-like receptor (TLR4) and CD14 genes were reported<sup>15,16</sup>.

Equine neutrophils are rapidly recruited to the airways after allergen challenge and endotoxin inhalation (within 5h). These cells possess receptors for LPS as well as other specific microbial-derived molecule receptors including receptors for formylated peptides (FPR)<sup>17,18</sup>. They respond to such agonist through priming of respiratory burst machinery, degranulation as well as enhanced pro-inflammatory cytokines expression and chemokines for other leukocytes<sup>17-19</sup>. In pathological conditions, neutrophils activation and survival is unnecessarily prolonged<sup>20</sup>, phagocytosis by tissue macrophages is inhibited<sup>21</sup>, and excessive release of toxic mediators contributes to tissue destruction. We hypothesized that innate immune responses of horses affected with heaves are altered and contribute to disease exacerbation. To verify this hypothesis, we compared the ex-vivo pro-inflammatory cytokine response of peripheral blood neutrophils from control and heaves-susceptible horses to bacterial-derived stimuli, LPS and synthetic formylated peptide fMLP (N-formyl-Met-Leu-Phe), and its functional consequence on cell survival in vitro. We chose to study peripheral blood neutrophils as airway neutrophils would be activated by transmigration and by the inflammatory milieu which may differ between healthy and diseased animals. Also, we used asymptomatic heaves-affected horses as antigen challenge was reported to induce peripheral neutrophil activation<sup>22,23</sup>. The pro-inflammatory responses of other leukocyte populations to microbial stimuli was also compared between group as well as their expression of



prototypical cytokines of the Th1, Th2 and immunosuppressive phenotypes as these could modulate innate immune responses.

## MATERIAL AND METHODS

### Animals

Control horses (n = 5) and heaves-affected horses (n = 10) belonging to the Respiratory Cellular and Molecular Biology Laboratory research herd were studied. The two groups of horses were kept together during the entire course of the study and were regularly vaccinated and dewormed. Control horses had no previous history of lung diseases and did not develop airway obstruction upon challenge with moldy hay. Sampling was performed over 3 years during periods when heaves-affected horses were unexposed to moldy hay/straw (clinical remission) (Figure 1). During these periods, horses were housed in a well-ventilated barn or in pasture/paddocks and were fed with pellets and sweet feed twice a day for more than 3 months or otherwise stated. Remission of heaves was assessed by clinical scoring as described earlier<sup>24</sup>. Briefly, a score from 0 to 4 is attributed to abdominal movement (0 : no abdominal effort; 4 : severe and marked abdominal movement) and nasal flaring (0 : no flaring; 4 : severe, continuous flaring). Abdominal and nostril scores are added for a maximal score of 8. Scores  $\geq 5$  indicates the presence of airway dysfunction. All experimental procedures were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council for Animal Care and were approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal.

### Positive and negative isolation of leukocyte populations from peripheral blood using immunomagnetic selection (MACS)

Blood was drawn from the jugular vein in heparinised sterile tubes<sup>a</sup>. Neutrophils were isolated as previously described using positive immunomagnetic selection<sup>19</sup>. Briefly, after sedimentation of blood for 1h at room temperature, neutrophils were retrieved from the leukocyte-rich supernatant by sequential incubation with primary monoclonal antibody<sup>b</sup> and secondary rat anti-mouse IgM antibody conjugated to paramagnetic microbeads<sup>c</sup> before being loaded on a ferromagnetic LS separation column<sup>c</sup>.

Neutrophil-depleted leukocytes eluted in the negative fraction of cell isolation were pelleted and the remaining RBCs were removed by two treatments with 0.83% ammonium chloride<sup>d</sup>. The cells were washed twice in PBS (w/o  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , pH 7.4)<sup>e</sup> using low speed centrifugation<sup>f</sup> (900 rpm, 15 min) to remove platelets.

Cell counts and viability assessment were performed using a hemacytometer and Trypan blue dye<sup>e</sup>. Cytospins were prepared for differential counting<sup>g</sup> and stained with Protocol Hema 3<sup>h</sup>. A minimum of 400 cells were counted.

### **Cell culture conditions for gene expression analysis**

Neutrophils and neutrophil-depleted leukocytes were suspended at  $5 \times 10^6$  cells/mL in culture medium RPMI 1640<sup>e</sup> supplemented with 10% heat inactivated low-endotoxin FBS<sup>e</sup>, 2mM L-glutamine<sup>e</sup>, 100U/mL penicillin<sup>e</sup> and 100µg/mL streptomycin<sup>e</sup> and cultured in 6 or 12 well plates (non-treated plastic)<sup>i</sup> in the presence or absence of Lipopolysaccharide from *E. coli* 0:111B4<sup>d</sup> (100 ng/mL) and Nformyl-Met-Leu-Phe<sup>d</sup> (fMLP, 5 ng/mL) for 5h in a CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. These concentrations were shown to induce pro-inflammatory gene expression by equine neutrophils<sup>19</sup>. Cell viability was assessed before homogenization in TRIzol<sup>®</sup> Reagent<sup>j</sup> ( $10^7$  cells/test). Samples were kept at -80°C until further use.

### **RNA extraction and reverse transcription (RT)**

ARN extraction was performed according to the manufacturer instructions using 3 steps nucleic acid precipitation with 0.2 volume chloroform, 1 volume isopropanol and ethanol. ARN pellets were air-dried and total ARN concentration and purity was evaluated using spectrophotometry (GeneQuantpro, Biochrom). Five hundred nanograms of total RNA was used for reverse transcription as described earlier<sup>25</sup> using Oligo(dT)<sub>-12,18</sub> primers<sup>j</sup> and AMV reverse transcriptase<sup>k</sup>. cDNA samples were stored at -20°C. For gene analysis using primers that did not span exon-intron boundaries (IL-4, INFγ and IL-10), ARN samples from neutrophil-depleted leukocytes were further treated with Amplification Grade DNase1<sup>j</sup> following manufacturer's instructions before reverse transcription.

### **qPCR**

Real-time PCR was performed using Quantitect SYBR Green PCR kit<sup>l</sup> as described earlier<sup>25</sup> on the RotorGene thermal cycler<sup>m</sup>. PCR runs included a first 10 min denaturation step at 95°C followed by a maximum of 50 amplification cycles. Quantification was performed using optimised gene-specific standard curves made of serial dilution (10X) of PCR products (QIAGEN's Gel Extraction Kit) with reproducible efficiency coefficient over 90% and a calibrator sample in the

target run. Absolute gene expression was corrected using ubiquitin as a reference gene. Primers sequences are as following (5' → 3'): IL-1 $\beta$  sens (S) GAC TGA CAA GAT ACC TGT GGC CT and IL-1 $\beta$  anti-sens (AS) AGA CAA CAG TGA AGT GCA GCC T; IL-4.S TCG TGC ATG GAG CTG ACT GTA and IL-4.AS AS GCC CTG CAG ATT TCC TTT CC; IL-8.S CTT TCT GCA GCT CTG TGT GAA G and IL-8.AS GCA GAC CTC AGC TCC GTT GAC; IL-10.S TGC TAT GTT ACC TGG TCT TCC TGG and IL-10.AS TAG TAG AGT CAC CGT CCT GGA TGC; INF $\gamma$ .S TCT TTA ACA GCA GCA CCA GCA A and INF $\gamma$ .AS GCG CTG GAC CTT CAG ATC AT; TNF.S CTT GTG CCT CAG CCT CTT CTC CTT C and TNF.AS CTTGTGCCTCAGCCTCTTCTCCTTC; TLR2.S GAA TCA CTG GAC AAT GCC ACA TGC and TLR2.AS AGA CAC CAG TGG GAT CAC AAG ACA; TLR4.S TGG GAC TCT GAT CCC AGC CAT and TLR4.AS AGG TCC AGT TCC TTG GTT GAT GTG; Ubiquitin.S TAG CAG TTT CTT CGT GTC CGT and Ubiquitin.AS TGT AAT CGG AAA GAG TGC GG.

### **Apoptosis assays**

The association between gene expression and survival was studied in neutrophils from heaves-affected horses during clinical remission (n = 5). Briefly, isolated neutrophils were cultured with or without microbial products for 18h in supplemented RPMI, as described above. Aliquots of the cells ( $10^7$ ) cultured in separate plates were homogenized in TRIzol® Reagent after 5h for mRNA analysis. Apoptosis was assessed after 18h using APC-conjugated AnnexinV and 7-AAD<sup>o</sup> as markers of cell apoptosis and death, respectively, following the manufacturer's instructions. Briefly, neutrophils were washed twice in cold PBS w/o Ca<sup>2+</sup>Mg<sup>2+</sup> and 100  $\mu$ L aliquots were incubated in the dark with AnnexinV-APC and/or 7-AAD for 15 min at room temperature in 1X binding buffer<sup>o</sup>. The cells were placed on ice after adding 400 $\mu$ L of binding buffer and analyzed immediately on a FACSCalibur flow cytometer<sup>o</sup>. Data were acquired on 10 000 events and analyzed using BD CellQuest™ Pro Software<sup>o</sup>. APC-AnnexinV fluorescence was detected in FL-4 channel (690nm) and 7-AAD in FL-3 channel (650nm). Fluorescence threshold levels were set using single-labelled neutrophils.

### **Determination of TNF concentrations in serum and culture supernatants by ELISA**

TNF was used as a marker of systemic inflammation in serum samples<sup>26</sup>. Blood was collected by venipuncture in dry sterile Vacutainers tubes<sup>a</sup>. Blood samples were allowed to clot at room temperature and were centrifuged for 10 min at 1500 rpm<sup>f</sup>. Serum was collected and frozen

at -80°C within 2 hours of collection. TNF dosage in serum samples and culture supernatants were performed using equine TNF- $\alpha$ /TNFSF1A DuoSet® ELISA<sup>P</sup> with minor modification to the manufacturer's protocol, as described elsewhere<sup>27</sup>. Serum samples diluted in Bio-Plex Pro Isotyping Diluent<sup>9</sup> 1:4 to 1:256 and culture supernatants (1:1) in reagent diluent (bovine serum albumin 1% in PBS). The assay detection limit was 3.9 pg/ml.

### **Statistical analysis**

Data obtain from PCR experiments were analyzed using repeated-measures linear models using SAS v.9.1.<sup>r</sup>. Stimulation (resting *versus* LPS + fMLP) was treated as within-subject factors and the group (controls *versus* heaves) as a between-subject factor. Graphpad Prism 5 software<sup>5</sup> was used to perform all other analyses. Pearson's correlation analysis was used to assess the association between the TLR4 expression by neutrophils and mononuclear cells and pro-inflammatory cytokines as well as the association between TNF expression by neutrophils and their % of viability after 18h on log<sub>10</sub>-transformed data. A repeated measures linear model, with the same factors as above, was performed on log<sub>10</sub>-transformed neutrophils viability parameters and TNF concentrations in neutrophil and mononuclear cell culture supernatants. Serum TNF data were log<sub>10</sub> transformed and mean concentrations between controls and heaves-affected horses were compared using a two-tailed unpaired *t*-test. For statistical analysis purposes, a value of 3.9 pg/ml corresponding to the assay detection threshold was assigned to samples with undetectable TNF in ELISAs. Graphs show raw data, expressed as mean  $\pm$  SEM. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

### Animals

Horses did not show signs of pulmonary dysfunction at times of sampling as assessed by clinical scoring: total scores were  $\leq 4$  for all horses in all experiments.

### Enhanced pro-inflammatory gene expression by peripheral blood neutrophils and mononuclear cells from horses with heaves

We first compared the innate immune response of neutrophils from healthy and heaves-affected horses by assessing pro-inflammatory cytokine expression. The purity of isolated neutrophils was  $97.80 \pm 0.38\%$  and  $98.00 \pm 0.17\%$  for controls and heaves respectively, and viability was  $95.35 \pm 1.01\%$  and  $97.08 \pm 1.27\%$ , respectively. Neutrophils expressed significantly more IL-8 and TLR4 mRNA after stimulation with bacterial products for 5h in both group of horses ( $p < 0.05$ , **Figure 2**). However, only neutrophils from heaves-affected horses showed significant up-regulation of TNF mRNA and IL-1 $\beta$  expression.

In order to evaluate if the differences observed in gene expression patterns were restricted to neutrophils, gene expression by neutrophil-depleted leukocytes from the two horse groups were also studied. This population consisted primarily of mononuclear cells (>85%) (**Table 1**). Cell viability was  $99.02 \pm 0.08\%$  and  $99.14 \pm 0.06\%$  for controls and heaves, respectively. As for neutrophils, mononuclear cells showed a different gene expression profile whether they were isolated from diseased or healthy horses. Indeed, stimulation with microbial antigens significantly enhanced the relative IL-1 $\beta$  and IL-8 mRNA expression in mononuclear cells from heaves-affected horses only ( $p < 0.01$ , **Figure 3A**). Surprisingly, TNF expression was not increased by stimulation in mononuclear cells from either group. This phenomenon was reproduced in neutrophil-depleted leukocytes isolated from different horses and stimulated with LPS only (100ng/ml, n = 4, not shown) suggesting that mononuclear cells have different kinetics for TNF gene expression compared to neutrophils in horses. However, mononuclear cell baseline TNF expression was significantly higher in heaves-affected horses compared to control horses ( $p < 0.05$ ). Another contrasting observation was that LPS + fMLP did not significantly induce TLR4 up-regulation in mononuclear cells after culture for 5h.

Prototypical cytokines of the Th1 (INF- $\gamma$ ), Th2 (IL-4) and immunosuppressive (IL-10) phenotypes were also studied (**Figure 3B**). Differences in peripheral blood levels of these cytokines have been reported during both disease remission and exacerbation<sup>28</sup>. Here, we found no difference between groups in the expression of INF- $\gamma$  and IL-10 in unstimulated cells. Stimulation with microbial products for 5h did not affect INF- $\gamma$  expression whereas a slight but significant decrease in IL-4 expression was observed in mononuclear cells from heaves-affected horses only. LPS + fMLP significantly enhanced the expression of IL-10 mRNA in both groups.

Correlation analyses were performed using data from both groups for each stimulation separately to account for sample independence. The mRNA expression of TLR4 was significantly correlated with IL-1 $\beta$  ( $p < 0.01$ ,  $r^2 = 0.71$ ) and IL-8 ( $p < 0.05$ ,  $r^2 = 0.47$ ) in stimulated neutrophils whereas TLR4 expression was significantly associated with TNF expression in resting neutrophils ( $p = 0.0001$ ,  $r^2 = 0.86$ ). In mononuclear cells, only IL-1 $\beta$  was significantly correlated with TLR4, however this was primarily due to 2 extreme values (circled in gray).

#### **TNF release by neutrophils and mononuclear cells in culture supernatants**

ELISA was used to evaluate if increased release of TNF in cell cultures from heaves-affected horses could attest of or contribute to paracrine cellular priming. As shown in **Figure 5**, detectable TNF concentrations were found in 4 over 9 samples from LPS+fMLP-stimulated neutrophils, 3 of which were from heaves-affected horses. Neither stimulation nor group effect could reach statistical significance. All but one mononuclear cell culture supernatants had detectable levels of TNF. In contrast to mRNA data, microbial stimulation resulted in significant release of TNF by mononuclear cells from both groups and no difference in baseline TNF release was observed.

#### **LPS+fMLP-induced TNF expression by neutrophils, but not IL-8, correlates with their survival**

Microbial stimulation delays spontaneous apoptosis in neutrophils<sup>29</sup> partly through paracrine/autocrine release of pro-inflammatory cytokines<sup>29-31</sup>. We found a significant effect of microbial stimuli on neutrophil's survival. **Figure 6B** shows the significant increase in the mean % of live cells ( $21.80 \pm 6.84\%$  versus  $30.01 \pm 7.63$ ,  $p < 0.05$ ) and decreased dead cells ( $4.14 \pm 0.55\%$  versus  $2.69 \pm 0.53\%$ ,  $p < 0.01$ ) in stimulated compared to non-stimulated neutrophils after culture for 18h. The decreased % of apoptotic cells did not reach significance ( $73.97 \pm 7.23\%$  versus  $67.13$

$\pm 7.61\%$ , Figure 6B). The % of viable cells after 18h was correlated with TNF, but not with IL-8, in stimulated neutrophils (**Figure 6C**). This association was not found in unstimulated neutrophils (not shown).

#### **Increased serum TNF concentration in asymptomatic heaves-affected horses compared to controls**

The presence of systemic inflammation in asymptomatic heaves-affected horses could also contribute to peripheral blood leukocyte priming. We thus compared serum TNF concentration as a marker of systemic inflammation in normal and heaves-affected horses during clinical remission (Figure 7). TNF was detected in 4 over 5 horses affected with heaves and 1 over 4 controls. The mean TNF concentration was significantly higher in heaves-affected horses compared to controls ( $9125.34 \pm 4181.13$  versus  $40.18 \pm 36.28$  pg/ml, respectively).



## DISCUSSION

In the present study, we investigated the innate immunoregulatory functions of leukocytes from horses with heaves by comparing the response of peripheral blood neutrophils and mononuclear cells from diseased and healthy horses to common bacterial-derived antigens. We found that in horses with heaves, both cell populations were primed for enhanced pro-inflammatory responses to LPS and formylated peptides *ex vivo*. Stimulated neutrophils from asymptomatic heaves-affected horses had up-regulated IL-1 $\beta$  and TNF expression; the latter was strongly associated with their survival rates. Mononuclear cells from these horses also had up-regulated pro-inflammatory cytokine (IL-1 $\beta$  and IL-8) expression following stimulation and showed high basal TNF mRNA levels compared to controls, suggestive of cellular priming or activation. This led us to investigate whether systemic inflammation was involved in this phenomenon. Indeed, we found significantly higher TNF concentrations in serum samples from asymptomatic heaves-affected horses compared to normal horses kept in the same environment. Taken together, these results suggest that systemic inflammation persists in heaves-affected horses despite antigenic avoidance and that this may contribute to prime peripheral blood neutrophils and mononuclear cells to subsequent microbial stimulation.

Our present and previous findings<sup>25,32</sup> reveal that gene expression is not altered in resting peripheral blood neutrophils of asymptomatic heaves-susceptible horses compared to normal horses. Neutrophil aberrant activation in susceptible horses appears to be agonist-specific since it is observable using microbial products (LPS + fMLP), but not IL-4<sup>25</sup>, suggesting that altered innate immune responses to PAMPs may be associated with heaves pathology. We found here that mononuclear cells also present an exaggerated response to these stimuli in horses with heaves. These results are in accordance with, and extend the previous findings by Laan *et al* that alveolar macrophages of LPS-challenged heaves-affected horses expressed higher IL-8 and IL-1 $\beta$  mRNA levels than those from normal horses<sup>13</sup>. Taken together, these results suggest that in heaves, peripheral blood leukocytes are prone to have exaggerated responses following activation with microbial stimuli and therefore the differential cytokine expression of pulmonary leukocytes may not solely reflect the influence of the local inflammatory milieu. The contribution of innate immune stimuli to this phenomenon, as opposed to adaptive responses, is further demonstrated

in Laan *et al*'s study by the overexpression of inflammatory cytokine by heaves-susceptible horses in response to hay dust suspension, but not after stimulation with purified antigen extracts. It has been shown that LPS may possibly participate to the development of airway inflammation and obstruction in heaves-affected horses in response to moldy hay or purified allergens<sup>9,11</sup>. Leukocyte exaggerated response to LPS in heaves may also contribute to increase the horses' sensibility to LPS inhalational challenges, as reported by Pirie *et al*<sup>8</sup>. In asthmatic individuals, the nature of the agonist is also pivotal in identifying dysregulated cell activation as aberrant cytokine profiles were found in LPS-stimulated but not phytohemagglutinin (PHA)-stimulated peripheral blood leukocytes<sup>33</sup>.

Interestingly, in human asthmatics, a potentiation of LPS responses by peripheral blood neutrophils and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) is also described<sup>34,35</sup>. This phenomenon was not associated with an increased expression of TLR4 by these cells. Similarly, we did not find difference in the TLR4 mRNA expression by neutrophils and mononuclear cells between groups of horses. However, we found that the expression of pro-inflammatory cytokines is more strongly associated with TLR4 expression in neutrophils than in mononuclear cells. These differences are likely due to the lack of TLR4 and TNF up-regulation after microbial stimulation for 5h in mononuclear cells, as opposed to neutrophils. However it may imply that increase in TLR4 expression by stimulated neutrophils contribute to their enhanced pro-inflammatory cytokine expression induced by microbial products. These results also suggest that an increased proportion of neutrophil in sputum or BAL samples from asthmatics or heaves-affected horses, respectively, would contribute to the associated increased expression of innate immune molecules. In support for this hypothesis, Simpson *et al* showed that pulmonary inflammation in patients with neutrophilic asthma was associated with increased mRNA expression of receptors related to innate immune responses, particularly to LPS (TLR4, TLR2 and CD14), as well as up-regulated expression of signature cytokines of innate immunity (IL-1 $\beta$ , IL-8 and TNF), in sputum samples when compared with different inflammatory phenotypes<sup>36</sup>. Similar findings are reported in heaves-affected horses as their bronchoalveolar lavage (BAL) cells expressed higher TLR4 and IL-8 mRNA levels compared to control horses exposed to similar environment<sup>37</sup>.

Possible mechanisms implicated in differential intrinsic innate immune responses include aberrant receptors expression or signaling pathways. Polymorphisms in CD14<sup>38</sup>, TLR2<sup>39</sup> and TLR4<sup>40</sup>

genes have been associated with the development of asthma in children or to LPS responsiveness<sup>41</sup>. Importantly, gene-environment interactions seem to be pivotal for the determination of outcomes related to asthma and allergic sensitization in humans<sup>39,42</sup> and in horses<sup>14,43</sup>. Hence, it can be postulated that horses bearing alteration in genes related to innate immunity could be at higher risk for the development of heaves if housed in certain environments. Of note, TLR4 and CD14 SNPs were reported in certain breeds of horses<sup>15</sup>, but have not yet been associated to altered LPS responsiveness using equine whole blood leucocytes<sup>16</sup>. Alternatively, as the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 was not significantly higher in mononuclear cells from heaves-affected horses compared to controls, we can infer that cellular activation by microbial stimuli in heaves is prone toward a global pro-inflammatory balance. This altered balance also characterized the LPS response of pulmonary cells from COPD patients, a neutrophilic airway disease of human, mainly through a dysregulated TNF/IL-10 expression ratio<sup>44</sup>. Nonetheless, from our results, it may be hypothesized that heaves-susceptible horses possess an hyperresponsive phenotype concerning their inflammatory response to PAMPS and that this would allow antigen presenting cell activation upon inhalation of endotoxins whereas hyporesponsive phenotypes would not<sup>45</sup>. The concomitant presence of allergens in inhaled air would favour the process of allergic sensitization in these horses.

One consequence of inappropriate neutrophil activation is the inhibition of spontaneous apoptosis and their prolonged release of toxic mediators at inflammatory sites. In heaves-affected horses, resolution of inflammation corresponds in time with pulmonary neutrophils apoptosis and their removal by macrophages<sup>21</sup>. Neutrophil apoptosis can be regulated by pro-inflammatory cytokines in autocrine and paracrine manners as well as by microbial-derived stimuli. Therefore, we explored the relationship between neutrophil cytokine expression and their survival as a consequence of dysregulated innate immune responses. We found that microbial-induced TNF expression by neutrophils from heaves-affected horses, unlike IL-8, was strongly associated with their survival *ex vivo*. Although both cytokines are up-regulated in the lungs of these horses after hay exposure<sup>46,47</sup>, and may contribute to neutrophil activation and recruitment to the lungs, the autocrine TNF production by neutrophils may particularly contribute to sustain cellular activation and survival in the airways. This hypothesis is in agreement with Bureau *et al's* proposal that high NF- $\kappa$ B activity and release of IL-1 $\beta$  and TNF by airway neutrophils prevent apoptosis and

contribute to chronic airway inflammation in horses with heaves<sup>31</sup>. In human neutrophils, it has been shown that LPS induces early TNF expression which contributes to its anti-apoptotic effect<sup>48</sup>. LPS induced-TNF also enhances the late IL-8 secretion by human neutrophils<sup>49</sup>, which is associated to TNF-induced neutrophils survival<sup>30</sup>, in contrast to the early IL-8 expression evaluated in the present study (5h). Other mechanisms implicated in TNF-induced survival include activation of NF- $\kappa$ B, phosphoinositide-3-kinase (PI3-K) and ERK1/2<sup>30,50</sup> and the transcription of the survival factor myeloid cell leukemia-1(Mcl-1) which inhibits in the intrinsic apoptosis pathway<sup>51</sup>. Also, it is known that TNF delays apoptotic neutrophils phagocytosis by macrophages *in vivo*<sup>52</sup>.

We hypothesized that systemic inflammation could account for the priming of peripheral blood leukocytes in asymptomatic heaves-susceptible horses. Systemic inflammation is indeed a feature of chronic inflammatory diseases including obesity<sup>53</sup>, cancer<sup>54</sup>, rheumatoid arthritis (RA)<sup>55</sup>, inflammatory bowel diseases<sup>56</sup>, asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)<sup>26,57</sup>. The presence of inflammatory molecules such as cytokines or acute phase proteins (APP) in the systemic circulation may directly modulate leukocytes activation state. For example, serum amyloid protein A (SAA), a typical APP, was shown to possess several inflammatory properties including the induction of pro-inflammatory cytokines synthesis in neutrophils and their survival<sup>58,59</sup>. TNF is a cytokine found to be up-regulated in the blood of patients with asthma<sup>26,60</sup> along with other acute phase proteins. We previously showed that serum TNF concentrations were high in heaves-affected horses during exacerbation<sup>27</sup>. Here we report for the first time that systemic inflammation persists in asymptomatic heaves-affected horses. Activated PBMCs could represent a source of TNF as its mRNA expression was highly expressed at baseline in heaves-susceptible horses. However, we did not find agreement between the mRNA expression and protein content of PBMCs culture supernatants suggesting that the secretion TNF is tightly regulated. Post-transcriptional regulation of TNF is indeed well described in other species<sup>61,62</sup> and occurs in peripheral blood leukocytes in horses<sup>63</sup>. Also, it may be hypothesized that LPS + fMLP-induced TNF transcription and secretion is an early event in PBMCs as we did not find a significant effect of stimulation on TNF mRNA expression in these cells compared to neutrophils despite significant increase of protein content in supernatants. This observation has been replicated in another study performed by our team<sup>64</sup>. Interestingly, in a murine model of thermal injury, systemic priming of neutrophils involves p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation and activation

of both NF- $\kappa$ B and activator-protein (AP)-1 through TNF-dependant and -independent pathways<sup>65</sup>. It remains to be determined whether similar mechanisms are involved in systemic leukocytes priming in heaves-affected horses and contribute to enhance their pro-inflammatory cytokine expression in response to microbial stimuli, as an alternative of altered TLR4 expression.

In conclusion, we found that peripheral blood leukocytes from heaves-susceptible horses in clinical remission of the disease show exaggerated pro-inflammatory cytokine responses to common bacterial-derived products. These altered innate immune responses are associated with systemic inflammation in these horses. It may be postulated that horses with heaves have a susceptible genotype/phenotype for enhanced responses to PAMPS and that low levels of microbial products inhalation in low dust environments may contribute to sustain low-grade local and systemic inflammation despite the absence of airway obstruction. Alternatively, heaves may underlie a systemic disease component which may modulate leukocytes innate immune responses and contribute to disease exacerbation. Systemic inflammation could also be a consequence of airway remodeling as the latter is a stable process in heaves<sup>66</sup> and involves inflammatory mediator release by proliferating cells. Future studies are required to identify the mechanisms involved in systemic priming of leukocytes and other systemic inflammation markers in heaves-affected horses.

#### Footnotes

- a. BD Vacutainer
- b. #DH24A, VMRD Inc.
- c. MACS, Miltenyi Biotec
- d. Sigma-aldrich
- e. GIBCO
- f. GS-6R Centrifuge, BECKMAN
- g. Cytospin2, Shadon
- h. Fisher Scientific
- i. Ultident, Canada
- j. Invitrogen
- k. Roche Diagnostic

- l. QIAGEN
- m. Corbett Research, Montreal-Biotec
- n. Flovent, Glaxo Wellcome, Mississauga, Ontario, Canada
- o. BD Biosciences, Becton Dickinson, San Jose, California, USA
- p. R&D Systems
- q. Bio-Rad
- r. (Cary, N.C.)
- s. (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA)

## REFERENCES

1. Robinson N. International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University 16-18 June 2000. *Equine Vet J* 2001;33:5-19.
2. McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE. Phenotypic analysis of peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in control and chronic obstructive pulmonary disease affected horses, before and after 'natural (hay and straw) challenges'. *Vet Immunol Immunopathol* 1993;36:207-222.
3. Lavoie JP, Maghni K, Desnoyers M, et al. Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1410-1413.
4. Ainsworth DM, Grunig G, Matychak MB, et al. Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN-gamma and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2003;96:83-91.
5. Debrue M, Hamilton E, Joubert P, et al. Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2005;105:25-31.
6. Halliwell RE, McGorum BC, Irving P, et al. Local and systemic antibody production in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. *Vet Immunol Immunopathol* 1993;38:201-215.

7. Schmallenbach KH, Rahman I, Sasse HH, et al. Studies on pulmonary and systemic Aspergillus fumigatus-specific IgE and IgG antibodies in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Vet Immunol Immunopathol* 1998;66:245-256.
8. Pirie RS, Dixon PM, Collie DD, et al. Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses. *Equine Vet J* 2001;33:311-318.
9. Pirie RS, Collie DD, Dixon PM, et al. Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma). *Clin Exp Allergy* 2003;33:676-683.
10. Nevalainen M, Raulo SM, Brazil TJ, et al. Inhalation of organic dusts and lipopolysaccharide increases gelatinolytic matrix metalloproteinases (MMPs) in the lungs of heaves horses. *Equine Vet J* 2002;34:150-155.
11. Pirie RS, Dixon PM, McGorum BC. Endotoxin contamination contributes to the pulmonary inflammatory and functional response to Aspergillus fumigatus extract inhalation in heaves horses. *Clin Exp Allergy* 2003;33:1289-1296.
12. Simonen-Jokinen T, Pirie RS, McGorum B, et al. Dose responses to inhalation of endotoxin, hay dust suspension and Aspergillus fumigatus extract in horses as measured by levels and activation of matrix metalloproteinase-9. *Equine Vet J* 2005;37:155-160.
13. Laan TT, Bull S, Pirie R, et al. The role of alveolar macrophages in the pathogenesis of recurrent airway obstruction in horses. *J Vet Intern Med* 2006;20:167-174.
14. Marti E, Gerber H, Essich G, et al. The genetic basis of equine allergic diseases. 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. *Equine Vet J* 1991;23:457-460.
15. Vychodilova-Krenkova L, Matiasovic J, Horin P. Single nucleotide polymorphisms in four functionally related immune response genes in the horse: CD14, TLR4, Cepsilon, and Fcepsilon R1 alpha. *Int J Immunogenet* 2005;32:277-283.
16. Werners AH, Bull S, Vendrig JC, et al. Genotyping of Toll-like receptor 4, myeloid differentiation factor 2 and CD-14 in the horse: an investigation into the influence of genetic polymorphisms on the LPS induced TNF-alpha response in equine whole blood. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;111:165-173.
17. Weiss DJ, Evanson OA. Evaluation of lipopolysaccharide-induced activation of equine neutrophils. *Am J Vet Res* 2002;63:811-815.

18. Brazil TJ, Rossi AG, Haslett C, et al. Priming induces functional coupling of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine receptors in equine neutrophils. *J Leukoc Biol* 1998;63:380-388.
19. 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;33:730-733.
20. Haslett C. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:S5-11.
21. Brazil TJ, Dagleish MP, McGorum BC, et al. Kinetics of pulmonary neutrophil recruitment and clearance in a natural and spontaneously resolving model of airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 2005;35:854-865.
22. Marr KA, Foster AP, Lees P, et al. Effect of antigen challenge on the activation of peripheral blood neutrophils from horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Res Vet Sci* 1997;62:253-260.
23. Marr KA, Lees P, Cunningham FM. Antigen challenge increases adherence of circulating neutrophils in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Equine Vet J* 2002;34:65-70.
24. Robinson NE, Olszewski MA, Boehler D, et al. Relationship between clinical signs and lung function in horses with recurrent airway obstruction (heaves) during a bronchodilator trial. *Equine Vet J* 2000;32:393-400.
25. Lavoie-Lamoureux A, Moran K, Beauchamp G, et al. IL-4 activates equine neutrophils and induces a mixed inflammatory cytokine expression profile with enhanced neutrophil chemotactic mediator release ex vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;299:L472-482.
26. Higashimoto Y, Yamagata Y, Taya S, et al. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and asthma: Similarities and differences. *Respirology* 2008;13:128-133.
27. Lavoie-Lamoureux A, Maghni K, Lavoie JP. Optimization of a procedure to accurately detect equine TNFalpha in serum samples. *Vet Immunol Immunopathol* 2010;138:118-123.
28. Horohov DW, Beadle RE, Mouch S, et al. Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol* 2005;108:237-245.
29. Colotta F, Re F, Polentarutti N, et al. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 1992;80:2012-2020.



30. Cowburn AS, Deighton J, Walmsley SR, et al. The survival effect of TNF-alpha in human neutrophils is mediated via NF-kappa B-dependent IL-8 release. *Eur J Immunol* 2004;34:1733-1743.
31. Bureau F, Delhalle S, Bonizzi G, et al. Mechanisms of persistent NF-kappa B activity in the bronchi of an animal model of asthma. *J Immunol* 2000;165:5822-5830.
32. Joubert P, Cordeau ME, Boyer A, et al. Cytokine expression by peripheral blood neutrophils from heaves-affected horses before and after allergen challenge. *Vet J* 2008;178:227-232.
33. Bettiol J, Bartsch P, Louis R, et al. Cytokine production from peripheral whole blood in atopic and nonatopic asthmatics: relationship with blood and sputum eosinophilia and serum IgE levels. *Allergy* 2000;55:1134-1141.
34. Baines KJ, Simpson JL, Bowden NA, et al. Differential gene expression and cytokine production from neutrophils in asthma phenotypes. *Eur Respir J* 2010;35:522-531.
35. Chun E, Lee SH, Lee SY, et al. Toll-like receptor expression on peripheral blood mononuclear cells in asthmatics; implications for asthma management. *J Clin Immunol* 2010;30:459-464.
36. Simpson JL, Grissell TV, Douwes J, et al. Innate immune activation in neutrophilic asthma and bronchiectasis. *Thorax* 2007;62:211-218.
37. Ainsworth DM, Wagner B, Franchini M, et al. Time-dependent alterations in gene expression of interleukin-8 in the bronchial epithelium of horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res* 2006;67:669-677.
38. Lachheb J, Dhifallah IB, Chelbi H, et al. Toll-like receptors and CD14 genes polymorphisms and susceptibility to asthma in Tunisian children. *Tissue Antigens* 2008;71:417-425.
39. Eder W, Klimecki W, Yu L, et al. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:482-488.
40. Fageras Bottcher M, Hmani-Aifa M, Lindstrom A, et al. A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:561-567.
41. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000;25:187-191.
42. Vercelli D. Gene-environment interactions in asthma and allergy: the end of the beginning? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010;10:145-148.

43. Eder C, Curik I, Brem G, et al. Influence of environmental and genetic factors on allergen-specific immunoglobulin-E levels in sera from Lipizzan horses. *Equine Vet J* 2001;33:714-720.
44. Hackett TL, Holloway R, Holgate ST, et al. Dynamics of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine release during acute inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: an ex vivo study. *Respir Res* 2008;9:47.
45. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5:987-995.
46. Giguere S, Viel L, Lee E, et al. Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;85:147-158.
47. Franchini M, Gill U, von Fellenberg R, et al. Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay. *Am J Vet Res* 2000;61:1369-1374.
48. Keel M, Ungethum U, Steckholzer U, et al. Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood* 1997;90:3356-3363.
49. Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 1995;16:21-26.
50. Kilpatrick LE, Sun S, Mackie D, et al. Regulation of TNF mediated antiapoptotic signaling in human neutrophils: role of delta-PKC and ERK1/2. *J Leukoc Biol* 2006;80:1512-1521.
51. Luo HR, Loison F. Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. *Am J Hematol* 2008;83:288-295.
52. Borges VM, Vandivier RW, McPhillips KA, et al. TNFalpha inhibits apoptotic cell clearance in the lung, exacerbating acute inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;297:L586-595.
53. Park HS, Park JY, Yu R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract* 2005;69:29-35.
54. Deans C, Wigmore SJ. Systemic inflammation, cachexia and prognosis in patients with cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005;8:265-269.

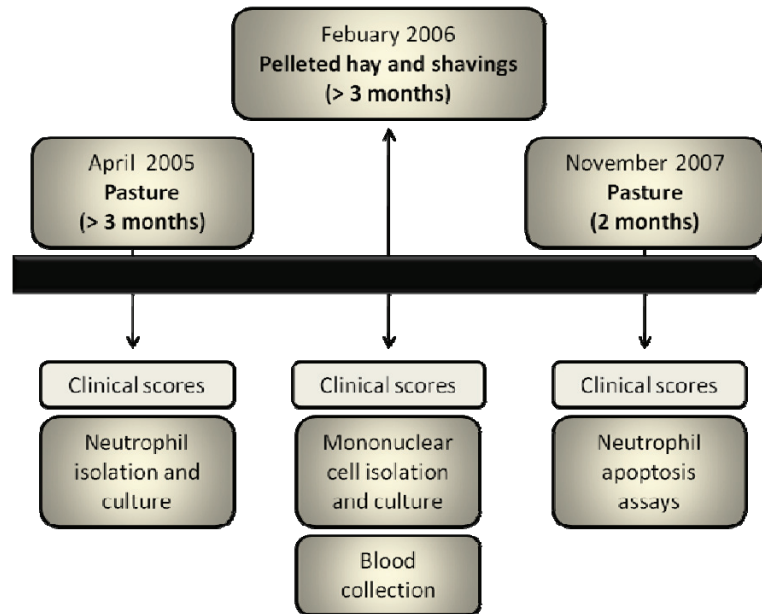
55. Snow MH, Mikuls TR. Rheumatoid arthritis and cardiovascular disease: the role of systemic inflammation and evolving strategies of prevention. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:234-241.
56. Niederau C, Backmerhoff F, Schumacher B. Inflammatory mediators and acute phase proteins in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* 1997;44:90-107.
57. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, et al. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004;59:574-580.
58. Hatanaka E, Furlaneto CJ, Ribeiro FP, et al. Serum amyloid A-induced mRNA expression and release of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human neutrophils. *Immunol Lett* 2004;91:33-37.
59. Christenson K, Bjorkman L, Tangemo C, et al. Serum amyloid A inhibits apoptosis of human neutrophils via a P2X7-sensitive pathway independent of formyl peptide receptor-like 1. *J Leukoc Biol* 2008;83:139-148.
60. Barnes PJ. Cytokine-directed therapies for the treatment of chronic airway diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:511-522.
61. Lai WS, Carballo E, Strum JR, et al. Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Mol Cell Biol* 1999;19:4311-4323.
62. Seko Y, Cole S, Kasprzak W, et al. The role of cytokine mRNA stability in the pathogenesis of autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 2006;5:299-305.
63. Vick MM, Adams AA, Murphy BA, et al. Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. *J Anim Sci* 2007;85:1144-1155.
64. Hirsch G, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie J-P. Comparison Of Blood Neutrophils And Mononuclear Cells Steroid Responsiveness. American Thoracic Society International Conference 2011.
65. Chen LW, Huang HL, Lee IT, et al. Thermal injury-induced priming effect of neutrophil is TNF-alpha and P38 dependent. *Shock* 2006;26:69-76.

66. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Gelinas-Lymburner E, et al. Effect of Antigen Exposure on Airway Smooth Muscle Remodeling in an Equine Model of Chronic Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010.

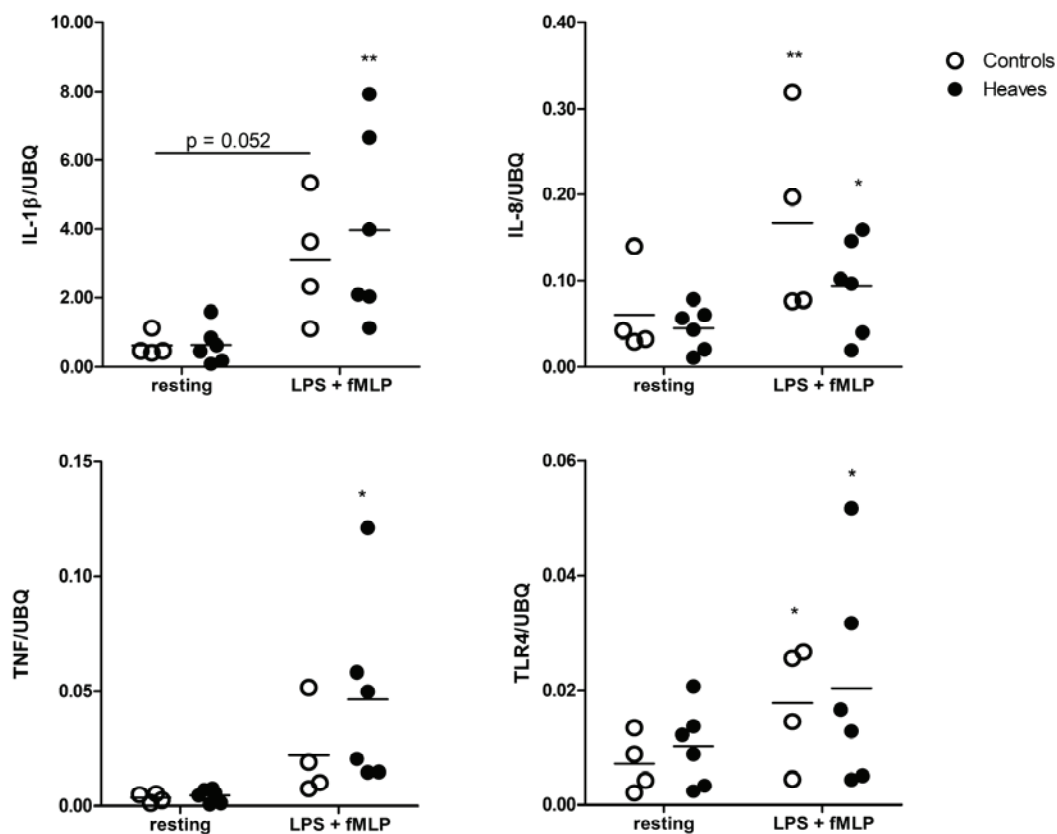
## Figures et Tableaux de l'Article #1

**Table 1.** Differential cell counts in neutrophil-depleted isolation fraction

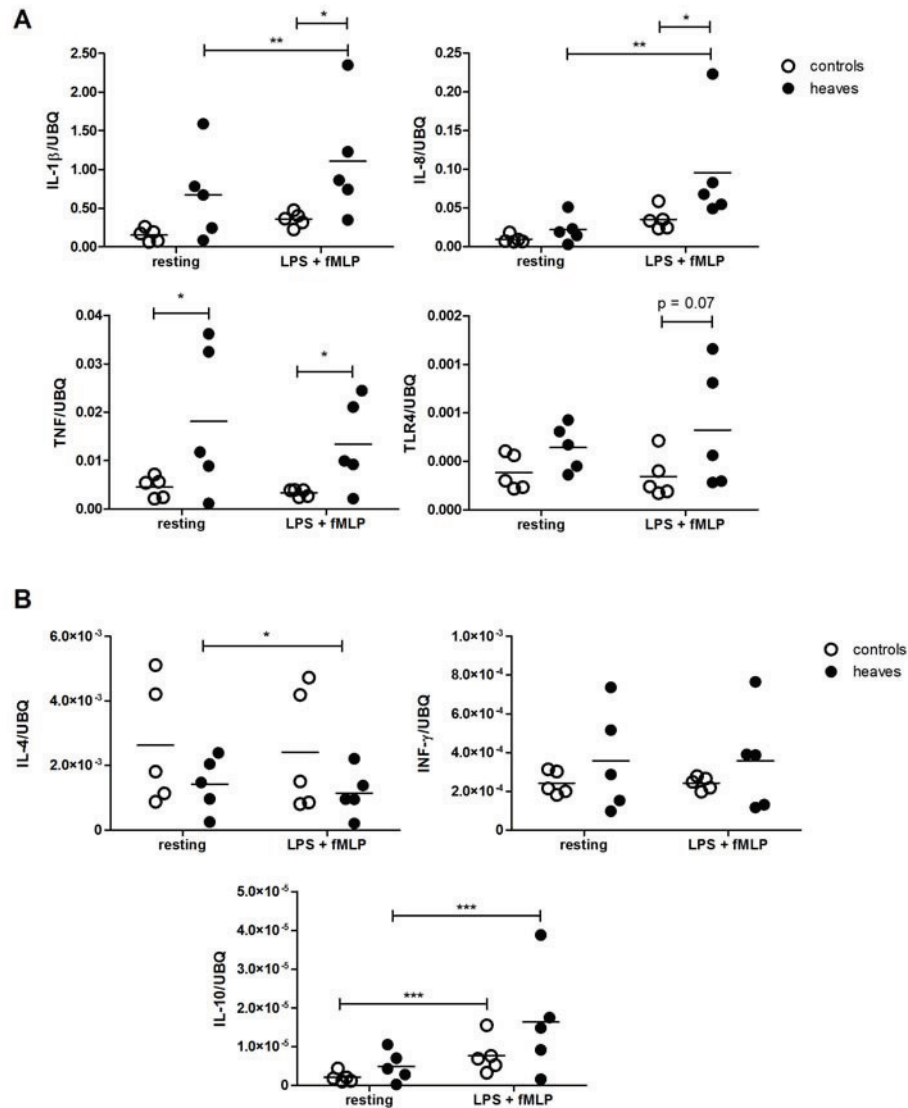
	Controls		Heaves	
	Mean (%)	SEM	Mean (%)	SEM
<b>Mononuclear cells</b>	<b>86.91</b>	<b>3.68</b>	<b>88.45</b>	<b>3.98</b>
Lymphocytes	76.66	3.9	79.65	4.01
Monocytes	10.25	0.56	8.8	0.83
<b>Granulocytes</b>	<b>13.09</b>	<b>3.68</b>	<b>11.55</b>	<b>3.98</b>
Neutrophils	3.49	1.9	6.94	2.43
Eosinophils	9.6	2.67	4.6	1.97



**Figure 1. Study time line.** Horses were studied at various time points over a 3 year period while they were housed in low dust exposure environments (pasture or stabling with pellets and shavings, time of remission is indicated between brackets) to induce clinical disease remission in horses with heaves.



**Figure 2. Gene expression in neutrophils from control and heaves-affected horses after stimulation with microbial products.** Neutrophils were isolated from the peripheral blood of healthy controls (n = 4) and heaves-affected horses (n = 6) during clinical remission. Cells were stimulated with microbial products (LPS 100ng/ml and fMLP 5ng/mL) for 5h. Quantitative PCR for pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF) and TLR4 was performed to compare the innate immune responses of neutrophils from both groups. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01.



**Figure 3. Gene expression in mononuclear cells from control and heaves-affected horses after stimulation with microbial products.** Mononuclear cells were retrieved from the negative fraction of neutrophil isolation using MACS in healthy controls ( $n = 5$ ) and heaves-affected horses ( $n = 5$ ) during clinical remission. Cells were stimulated with microbial products (LPS 100ng/ml and fMLP 5ng/mL) for 5h. A. Quantitative PCR for pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF) and TLR4 was performed to compare the innate immune responses of mononuclear cells from both groups. B. INF $\gamma$ , IL-4 and IL-10 were quantified as prototypical cytokines of the Th1, Th2 and immunosuppressive adaptative phenotypes. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



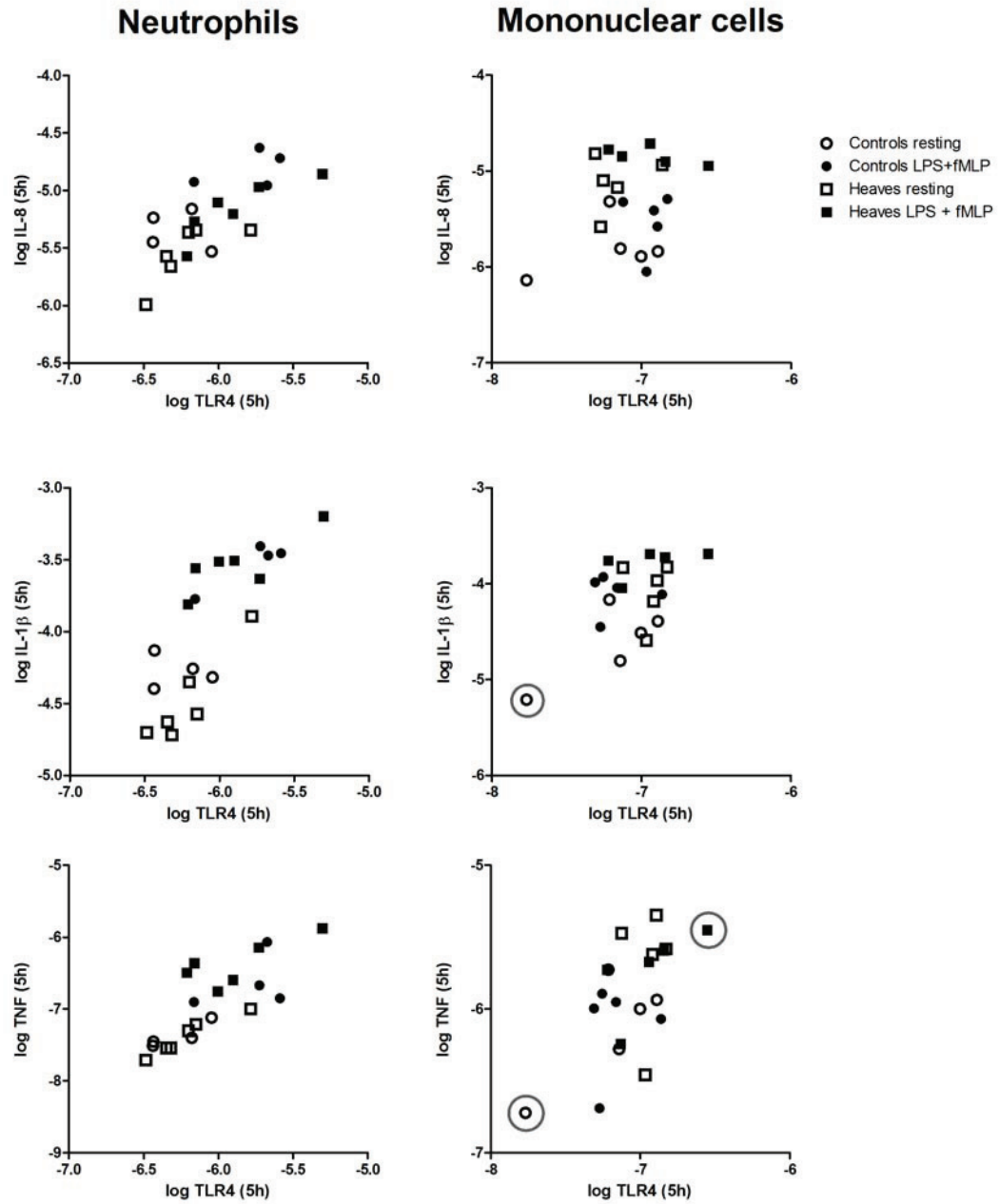
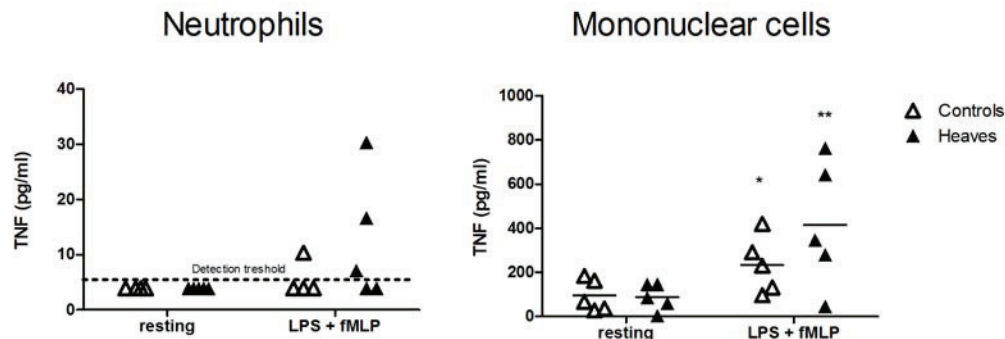
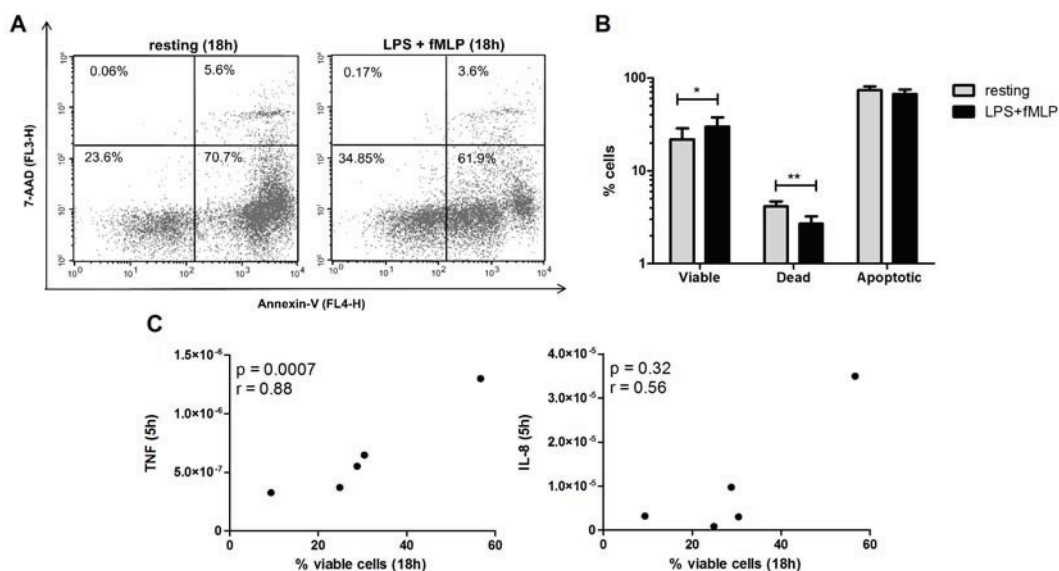


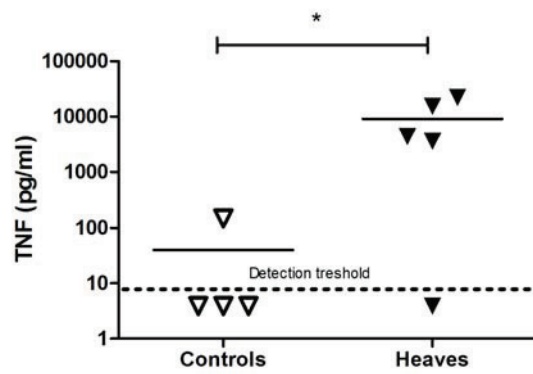
Figure 4. Correlations between TLR4 and pro-inflammatory cytokines mRNA expression in neutrophils and mononuclear cells. See text for statistical significance of correlations.



**Figure 5. TNF concentrations in culture supernatants measured by ELISA. A.** TNF detection in neutrophil culture supernatants. Controls (n = 4), heaves-affected horses (n = 5). **B.** TNF detection in mononuclear.



**Figure 6. The enhanced survival of peripheral blood neutrophils from asymptomatic heaves-affected horses cultured with microbial products is strongly associated with their expression of TNF. A.** Representative scatterplots showing flow cytometry analysis of the rate of spontaneous apoptosis in neutrophils with or without stimulation. Upper left: Necrosis, Upper right: Death, Lower left: Viable, Lower right: Apoptosis. **B.** Effects of stimulation with microbial products (LPS 100ng/ml and fMLP 5ng/ml) neutrophils viability parameters after 18h in heaves-affected horses (n = 5). **C.** Correlation between TNF or IL-8 mRNA expression by stimulated neutrophils (5h) and the percentage (%) of viable cells after 18h (n = 5). \*p < 0.05, \*\* p < 0.01.



**Figure 7. Serum TNF concentrations in controls (n = 4) and heaves-affected horses (n = 5) during clinical remission.** A minimum value a 3.9 pg/ml was assigned to samples with undetectable TNF concentrations. \*p < 0.05

## Article #2

### *Optimization of a procedure to accurately detect equine TNF $\alpha$ in serum samples*

#### Sommaire

Le TNF est une cytokine pro-inflammatoire servant de marqueur de l'inflammation systémique. Des concentrations élevées de TNF ont été quantifiées dans le sang des patients asthmatiques. L'inflammation systémique chez les chevaux atteints du souffle pourrait influencer la réponse des leucocytes aux agonistes et contribuer à la physiopathologie du souffle. Cet article décrit les travaux effectués pour optimiser un ELISA spécifique au TNF équin afin de pouvoir détecter cette cytokine dans le sérum des chevaux atteints du souffle et contrôle.

#### **Contributions originales**

Ma contribution était de 100% à toutes les manipulations expérimentales. J'ai participé à 80% à la rédaction de l'article.

#### *Article publié*

Vet Immunol Immunopathol. 2010 Nov 15;138(1-2):118-23. Epub 2010 Jul 6.

DOI : S0165-2427(10)00236-9 [pii] 10.1016/j.vetimm.2010.06.018

**Optimization of a procedure to accurately detect equine TNF $\alpha$  in serum samples.**

Anouk Lavoie-Lamoureux<sup>a</sup>, Karim Maghni<sup>b</sup>, Jean-Pierre Lavoie<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte J2S 2M2, St-Hyacinthe, Canada.

<sup>b</sup>Laboratory of asthma neuro-immunology, Research center of the Hôpital Sacré-Cœur, Université de Montréal, 5400 Gouin Ouest H4J 1C5 Montreal, Canada.

**Corresponding author**

Jean-Pierre Lavoie

[REDACTED]

3200 rue Sicotte

St-Hyacinthe, Québec, Canada. J2S 2M2

Fax: [REDACTED]

[REDACTED]

**Abstract**

The systemic component of chronic inflammatory diseases may lead to clinical complications. High levels of TNF $\alpha$ , a pro-inflammatory cytokine, are found in human patients with COPD and asthma. Horses are also susceptible to an array of chronic inflammatory disorders possibly associated with systemic inflammation, including respiratory diseases. Currently, there is no commercially available ELISA validated to assess TNF $\alpha$  in equine serum samples. Moreover, the reported normal mean concentration of serum TNF $\alpha$  in horses vary greatly. Hence, we sought to optimize and validate a procedure to quantify this cytokine in equine serum samples using a sandwich ELISA. Our results indicate that the nature of diluent buffers greatly impact the detection of TNF $\alpha$  in equine serum samples as its quantification increased in some cases from non-detectable levels to the ng/ml range. Linearity assays performed with serum samples from 6 animals serially diluted in 4 different buffers showed that serum matrix interference was animal-dependent. The specificity of TNF $\alpha$  detection was also assessed. Our optimized assay conditions were validated by quantifying levels of TNF $\alpha$  in serum samples from normal horses and horses affected with chronic pulmonary disease (heaves).

**Keywords:** sandwich ELISA, TNF $\alpha$ , horse, serum, matrix effect.

## INTRODUCTION

There is an increased interest for the study of the systemic component of a variety of chronic inflammatory diseases. Acute phase proteins as well as pro-inflammatory cytokines are increased in peripheral blood of patients with obesity (Park et al., 2005), cancer (Deans and Wigmore, 2005), rheumatoid arthritis (RA) (Snow and Mikuls, 2005), inflammatory bowel diseases (Niederau et al., 1997), asthma (Jousilahti et al., 2002) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (Gan et al., 2004; Higashimoto et al., 2008). The importance and the impact of this phenomenon on disease progression and exacerbation remain to be determined. One hypothesis suggests that primed peripheral blood leukocytes favours perpetuating tissue inflammation (Nikolaus et al., 1998). Increased levels of TNF $\alpha$ , a pro-inflammatory cytokine produced by a variety of immune cells, were reported in the bloodstream of obese peoples (Olszanecka-Glinianowicz et al., 2004) and subjects with pulmonary diseases such as asthma and COPD (Barnes, 2003; Higashimoto et al., 2008). Moreover, TNF $\alpha$  is already a therapeutic target to treat patients with RA (Ariza-Ariza et al., 2007) and is being considered for the treatment of a subset of patients with severe asthma (Matera et al., 2009).

Horses can be affected with pathologic conditions similar to the above mentioned human diseases (Kalck, 2009; Sutton et al., 2009; Theon, 1998; Vick et al., 2007). Our current focus of research is heaves, a common chronic inflammatory disease of the airways affecting mature horses that shares several pathophysiological characteristics with human asthma (Robinson, 2001). Currently, there is no commercially available ELISA designed for the measure of serum TNF $\alpha$  in horses: both R&D Systems® and Thermo Fisher scientific (Endogen) offer kits validated for the assessment of cell culture supernatants only. In addition, considerable variability amongst reports is found for TNF $\alpha$  concentrations in normal horse sera (100 to 500 000 pg/ml) (Donovan et al.,

2007; McFarlane and Holbrook, 2008; Woodward AD, 2007). The methods used in these studies are mainly “homemade” ELISAs with either unpublished assay validation (Woodward AD, 2007) and/or variable assay conditions (Adams et al., 2008; Figueiredo et al., 2008; McFarlane and Holbrook, 2008; Woodward AD, 2007). One study describes the optimization of Endogen’s ELISA for equine serum TNF $\alpha$  (Vick et al., 2007), however the mean serum concentration obtained using this method is not reported.

The aim of the present study was to validate the use of R&D Systems’ equine TNF- $\alpha$ /TNFSF1A DuoSet ELISA kit (cat. No. DY1814) to quantify TNF $\alpha$  concentration in blood samples from horses affected with heaves. We provided evidences that interacting factors present in blood samples prevented TNF $\alpha$  detection. This revealed to be strongly dependent on the buffer used to dilute serum samples and subjected to considerable inter-animal variability. Finally, we established suitable and reproducible experimental conditions to allow linear and specific detection of TNF $\alpha$  in equine serum samples using R&D Systems’ equine TNF- $\alpha$ /TNFSF1A DuoSet ELISA kit.



## **MATERIAL AND METHODS**

### **Reagents**

All chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Mississauga, ON, Canada) if not otherwise stated. Bio-Plex Pro Isotyping Diluent used for sample dilution was from Bio-Rad (#171-305030, Mississauga, ON, Canada). Tetramethylbenzidine (TMB) containing peroxide was purchased from Calbiochem (#613544, Cincinnati, OH, USA). Ninety-six wells flat bottom plates for ELISA were from VWR, Mississauga, ON, Canada (Microlon 96W, High binding Flat bottom, Greiner Bio-One # 655061).

### **Animals**

Horses with a diagnosis of heaves (Robinson, 2001) (mean weight 473.8 (range 386-534 Kg), mean age 16.8 (range 15-20 years), **n = 6**) and control horses (mean weight 515.0 (485-548 Kg), mean age 13.7 (12-15 years), **n = 3**) from our research herd were studied. Blood samples were collected while heaves-affected horses in clinical exacerbation of the disease ( $\geq 3$  weeks antigenic exposure with mouldy hay and straw, mean clinical scores  $7.18 \pm 0.40$  *versus*  $3.0 \pm 0.58$  in heaves-affected and control horses respectively (Robinson et al., 2000)). Serum samples collected in previous research projects from control (**n = 4**) and heaves-affected horses (**n = 8**) either before or after antigenic exposure were also used in preliminary studies. All experimental procedures were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council for Animal Care and were approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal.

### **Samples**

Blood samples were collected by venipuncture in dry Vacutainers tubes (BD Biosciences). Blood samples were allowed to clot at room temperature and centrifuged for 10 min at 1500 rpm (GS-6R

Centrifuge, BECKMAN). Serum was collected and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  within 2 hours of collection. Samples were subjected to a maximum of three freeze-thaw cycles. Repeated freeze-thaw cycles do not affect TNF $\alpha$  quantification in human serum samples (Aziz et al., 1999).

### **ELISA assay**

ELISA was performed according to the manufacturer's instructions with minor modifications: primary antibody coating was performed in 0.1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 9.0) overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  and the duration of incubations with Streptavidin-HRP and TMB were both increased to 30 min instead of 20 min. Quantification of all serum and standard curve samples were performed in duplicates. Results are expressed as either mean specific OD values (sOD, blank-corrected) or as mean TNF $\alpha$  concentration (pg/ml) of duplicate samples. Inter and intra-assay coefficient of variations (CVs) were assessed by comparing standard curve sOD (15.63-1000 pg/mL) between tests performed on 3 different days and sOD from sample duplicate on one plate, respectively.

### **Statistics**

For statistical analysis, a value of 7.8 pg/ml corresponding to the assay detection limit was attributed to samples with non-detectable TNF $\alpha$ . Also, where sOD values were compared, a minimum value of 0.001 was assigned to samples with null OD. Data from the specificity assay were analyzed using Friedman's test on  $\log_{10}$  transformed sOD values and selected means were further compared using Bonferroni's multiple comparison test. An unpaired one-tailed t-test with Welch's correction was performed on  $\log_{10}$  transformed data from the comparative study of control and heaves-affected horse samples as higher TNF $\alpha$  levels were expected in serum of heaves-affected horses *versus* controls. Analysis was done using Graphpad Prism 5 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). P values less than 0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

### **Detection of TNF $\alpha$ in 20 serum samples using manufacturer's instructions.**

The assay linearity was assessed using the manufacturer's instructions by performing a standard curve using recombinant equine TNF $\alpha$  (rTNF $\alpha$ ) serially diluted in PBS 1% BSA (2-fold dilution). Correlation coefficients ( $R^2$ ) were greater than 0.997 with dilutions ranging from 7.8 - 1000 pg/ml. Serum samples from animals expected to have high (animal #1, heaves-affected horse) and low (animal #2, control horse) TNF $\alpha$  serum concentration according to PBMCs mRNA expression (Lavoie-Lamoureux A., 2008) were tested using the same conditions. In line with our expectations, TNF $\alpha$  concentration was higher in serum from horse #1 and was linearly detected (mean sOD values: 0.803, 0.396, 0.197, 0.107 for dilutions 1/32, 1/16, 1/8 and 1/4 respectively) as it remained undetected in serum from animal #2. Therefore, we proceeded to TNF $\alpha$  quantification in 20 serum samples from 14 horses with different clinical conditions and stages of the disease using a single dilution (1:4 in PBS 1% BSA, Table 1). TNF $\alpha$  was only detected in serum from animal #1, in a reproducible manner. Given that the increased levels of TNF $\alpha$  in serum samples from horses affected with heaves during clinical exacerbation were expected, we postulated that some serum factors may have interfered with the detection of TNF.

### **Linearity of TNF $\alpha$ detection in equine serum: effect of dilution and diluents**

The complexity of samples in terms of proteins, lipids and other compounds present may vary due to sample types, sources, or preparative methods and cause assay interference preventing TNF $\alpha$  detection. Furthermore, these matrix effects are likely to be animal dependent and a function of health conditions. Therefore, we evaluated the ability of different buffers for reducing the matrix effect and allowing the detection of TNF $\alpha$  in serum samples. Firstly, linearity assays were performed using either PBS 1% BSA, PBS 4% BSA (McFarlane and Holbrook, 2008),

50% fetal bovine serum diluted in PBS (FBS 50%, according to R&D System's assay optimization instructions) or the Bio-Plex Pro Isotyping diluent from Bio-Rad Laboratories, a buffer designed to allow titration of antibodies in human serum samples. Standard curves drawn using 2-fold serial dilutions of *rTNF $\alpha$*  are shown in Figure 1A. The polynomial equation shows that the relationship between *rTNF $\alpha$*  concentrations and sOD values for each buffer had a R<sup>2</sup> value superior to 0.99, which indicates a very high linearity for *rTNF $\alpha$*  detection.

In order to assess the effects of buffer composition, dilution fold and inter-animal variability on native TNF $\alpha$  detection, we next performed linearity assays by serially diluting serum samples from 6 horses in the 4 different buffers (range from 1:2 to 1:64). Figure 1B shows that for a given animal, quantification varied considerably by changing the dilution buffer. Hence, except for horse #21, sOD values were higher in serum samples diluted in the Bio-Plex Pro Isotyping diluent, followed by PBS 1% BSA. PBS 4% BSA and PBS 50% FBS revealed to be mostly unsuitable to allow TNF detection. Linearity of detection was achieved using the Bio-Plex Pro Isotyping diluents in 4 of the 6 horses suggesting that it is the most suitable. Although the exact composition of this buffer remains unknown, its effect is likely to derive from appropriate salts and detergent concentrations leading to reduced matrix interference. Marked inter-individual variability in the strength of this matrix effect is observed as some samples with high concentrations of TNF $\alpha$  generated detection signals in multiple buffers (e.g. Horse #1 and 22 in both PBS 1%BSA and Bio-Rad's buffer, Table 1 and Figure 1b, respectively) whereas others required Bio-Rad's buffer to allow detection, suggesting higher strength of the matrix interference in these samples. Inter- and intra-assay coefficients of variations varied from 8.7-22.7% and 0-5% respectively, using this latter buffer.

Some of the known interacting factors for TNF $\alpha$  detection by ELISA include the presence of soluble receptors (Engelberts et al., 1991) in plasma/serum samples as well as the recognition of oligomers (bioactive) *versus* monomers of TNF $\alpha$  subunits by monoclonal antibodies (Petyovka et al., 1995). Detergents such as Triton X-100 and Tween 20 can dissociate bioactive TNF $\alpha$  complexes into monomers and facilitate its detection as well as modulating the viscosity effect of the matrix for antibody-antigen interaction (Morgan et al., 1998). Therefore, we hypothesize that the efficacy of the Bio-Rad's Bio-Plex Pro Isotyping buffer may rely on adequate concentrations of such detergent which allow to enhance TNF detection by polyclonal antibodies provided in R&D System's TNF- $\alpha$ /TNFSF1A DuoSet ELISA kit. Soluble receptors cleaved from leukocytes membranes upon activation (Dri et al., 2000) may also interfere with TNF $\alpha$  detection, especially when assessing TNF $\alpha$  levels in pathological conditions. Nevertheless, we were able to detect serum TNF $\alpha$  concentrations near the assay detection threshold suggesting that our optimized conditions were sufficient for counteracting the effect of these matrix interfering factors.

#### **Specificity of native TNF $\alpha$ detection in equine serum**

We used both capture antibody omission and competitive binding assay to assess the specificity of TNF $\alpha$  detection in serum samples diluted in the Bio-Plex Pro Isotyping diluent. Serum samples from 4 animals with variable levels of TNF were diluted 1:32 in triplicate sets based on their linear detection range. For each animal, coating of wells with capture antibody was omitted for one set of samples whereas another set was pre-treated with capture Ab (200ng/ml) at room temperature for 2h with gentle agitation before being assayed for TNF quantification. The third set of samples was assayed following the above described optimized ELISA procedure. Table 2 shows the drop in sOD values after competitive binding assays as well as complete abrogation of

signal in all serum samples when capture antibody was omitted. The reduction in sOD with competitive binding strongly suggests that OD readings are specific to TNF $\alpha$ .

### **Reassessment of serum TNF $\alpha$ using the optimized assay conditions**

Finally, we validated our optimized ELISA procedure by reassessing serum samples from well characterized horses with varying clinical conditions i.e. 3 healthy horses with no previous history of lung disease and 6 horses presenting clinical exacerbation of heaves. Thus, we used a starting dilution of 1:32 in the Bio-Rad's Bio-Plex Pro Isotyping diluent for all samples. When required, samples with sOD values outside the range of standard curve were tested using lower (serial dilutions from 1:4 to 1:32) or higher (1:32 up to 1:256) dilution factors. Data indicate that serum TNF $\alpha$  concentrations varied from undetectable levels to approximately 500,000 pg/ml (Figure 2). Importantly, using these conditions, we were able to detect TNF $\alpha$  in serum samples for which we previously obtained non-detectable or low values when using PBS 1% as a serum diluent. Although the inter-individual variation in serum TNF $\alpha$  concentrations was of several logs of magnitude, the mean concentration was significantly higher in serum samples from horses with heaves ( $84\,630 \pm 64\,730$  pg/mL) compared to healthy horses ( $105.2 \pm 97.4$  pg/mL,  $p = 0.04$ ). Nevertheless, the intra-individual variations evaluated over time in serum samples from 5 animals were less than tenfold (i.e. before and during allergen exposition, not shown). Of note, TNF $\alpha$  concentration was not associated with age (Adams et al., 2008) nor with weight (Vick et al., 2007) in the present study but was rather significantly correlated to respiratory obstruction (lung resistance, not shown). Overall, these results indicate that this optimized ELISA protocol for TNF $\alpha$  detection is appropriate for the study of equine serum samples and allowed to generate data with biological significance.

Reasons possibly accounting for discrepancies among reported normal horse serum TNF $\alpha$  concentrations include the use of unstandardized methods with variable detection and capture antibodies, sample diluents and dilution ranges, biological fluid preparation (processing and pre-heating at 37°C) as well as kit-related chemiluminescence reagents. Moreover, it appears that standards could also impact on absolute TNF $\alpha$  values as quantitative differences can be found between lots of ELISA kits from the same manufacturer (Aziz et al., 1999) as well as between standards from different manufacturers. We found no improving effect when heating samples at 37°C as reported by others (Figueiredo et al., 2008; McFarlane and Holbrook, 2008) nor when using plasma instead of serum to detect TNF $\alpha$  in samples diluted in PBS 1% BSA (data not shown). Similarly, no difference in TNF $\alpha$  concentrations was reported between plasma or serum samples in human (Aziz et al., 1999).

Quantification of TNF levels in serum may discriminate between healthy *versus* pathological conditions. A meta-analysis revealed a small, yet significant difference in TNF $\alpha$  concentrations in serum samples from COPD patients and normal controls (approx. 5.73 *versus* 20.48 pg/ml) (Gan et al., 2004). Increased values were also reported in asthmatic patients in another study ( $5.30 \pm 0.31$  *versus*  $7.26 \pm 0.31$  pg/ml) (Higashimoto et al., 2008). Although these differences are far under the range of variations observed in horses of the present study (< 7.8 pg/mL to 405 ng/mL), TNF $\alpha$  concentrations as high as 4 897 ng/ml (mean  $1285 \pm 1 093$  ng/ml) were reported in other human pathological settings such as graft *versus* host disease (Huang et al., 2001), suggesting that the variation in serum TNF $\alpha$  concentrations in horses and humans pathological state may be comparable.

**Conclusion**

The goal of this study was to optimize assay conditions to allow specific and reproducible detection of TNF $\alpha$  in blood samples from normal and heaves-affected horses using R&D Systems TNF- $\alpha$ /TNFSF1A DuoSet ELISA kit. To the best of our knowledge, this is the first study showing the diluent-dependent inter-individual variability in serum cytokine detection. Thus, we found that the use of Bio-Rad's Bio-Plex Pro Isotyping buffer as a diluent to prepare serum samples enabled to quantify a wide range of TNF $\alpha$  as compared to buffers used in other studies. Importantly, we found that by using this protocol it is possible to quantify with specificity the pathological changes in TNF $\alpha$  concentration when initial (not optimized) quantification showed no detectable levels. In light of these results, it may be appropriate to revisit previously reported TNF $\alpha$  concentrations in equine serum especially in studies where changes were expected but not observed (McFarlane and Holbrook, 2008). Similar procedures may be used to optimize ELISA kits directed to other specie cytokines for which the assay was not validated for blood samples.

**Acknowledgements**

This study was founded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. The authors would like to acknowledge Mrs Lucero Castellanos and Dr Mélanie Welman for their precious technical assistance, Ms Sana Siddiqui for providing language help as well as Dr James G. Martin for his obliging intellectual contribution to this study.



**REFERENCES**

- Adams, A.A., Breathnach, C.C., Katepalli, M.P., Kohler, K., Horohov, D.W., 2008, Advanced age in horses affects divisional history of T cells and inflammatory cytokine production. *Mech Ageing Dev* 129, 656-664.
- Ariza-Ariza, R., Navarro-Sarabia, F., Hernandez-Cruz, B., Rodriguez-Arbolea, L., Navarro-Compan, V., Toyos, J., 2007, Dose escalation of the anti-TNF-alpha agents in patients with rheumatoid arthritis. A systematic review. *Rheumatology (Oxford)* 46, 529-532.
- Aziz, N., Nishanian, P., Mitsuyasu, R., Detels, R., Fahey, J.L., 1999, Variables that affect assays for plasma cytokines and soluble activation markers. *Clin Diagn Lab Immunol* 6, 89-95.
- Barnes, P.J., 2003, Cytokine-directed therapies for the treatment of chronic airway diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 511-522.
- Deans, C., Wigmore, S.J., 2005, Systemic inflammation, cachexia and prognosis in patients with cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8, 265-269.
- Donovan, D.C., Jackson, C.A., Colahan, P.T., Norton, N., Hurley, D.J., 2007, Exercise-induced alterations in pro-inflammatory cytokines and prostaglandin F2alpha in horses. *Vet Immunol Immunopathol* 118, 263-269.
- Dri, P., Gasparini, C., Menegazzi, R., Cramer, R., Alberi, L., Presani, G., Garbisa, S., Patriarca, P., 2000, TNF-Induced shedding of TNF receptors in human polymorphonuclear leukocytes: role of the 55-kDa TNF receptor and involvement of a membrane-bound and non-matrix metalloproteinase. *J Immunol* 165, 2165-2172.
- Engelberts, I., Stephens, S., Francot, G.J., van der Linden, C.J., Buurman, W.A., 1991, Evidence for different effects of soluble TNF-receptors on various TNF measurements in human biological fluids. *Lancet* 338, 515-516.
- Figueiredo, M.D., Moore, J.N., Vandenplas, M.L., Sun, W.C., Murray, T.F., 2008, Effects of the second-generation synthetic lipid A analogue E5564 on responses to endotoxin in [corrected] equine whole blood and monocytes. *Am J Vet Res* 69, 796-803.
- Gan, W.Q., Man, S.F., Senthilselvan, A., Sin, D.D., 2004, Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 59, 574-580.

- Higashimoto, Y., Yamagata, Y., Taya, S., Iwata, T., Okada, M., Ishiguchi, T., Sato, H., Itoh, H., 2008, Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and asthma: Similarities and differences. *Respirology* 13, 128-133.
- Huang, X.J., Wan, J., Lu, D.P., 2001, Serum TNFalpha levels in patients with acute graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Leukemia* 15, 1089-1091.
- Jousilahti, P., Salomaa, V., Hakala, K., Rasi, V., Vahtera, E., Palosuo, T., 2002, The association of sensitive systemic inflammation markers with bronchial asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 89, 381-385.
- Kalck, K.A., 2009, Inflammatory bowel disease in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 25, 303-315.
- Lavoie-Lamoureux A., B.G., Quessy S, Martin JG, Lavoie J-P. 2008. Altered inflammatory response to microbial stimuli by peripheral blood leukocytes in an equine model of chronic asthma (heaves) (Toronto, American Thoracic Society 2008 International Conference).
- Matera, M.G., Calzetta, L., Cazzola, M., 2009, TNF-alpha inhibitors in asthma and COPD: We must not throw the baby out with the bath water. *Pulm Pharmacol Ther*.
- McFarlane, D., Holbrook, T.C., 2008, Cytokine dysregulation in aged horses and horses with pituitary pars intermedia dysfunction. *J Vet Intern Med* 22, 436-442.
- Morgan, C.L., Newman, D.J., Burrin, J.M., Price, C.P., 1998, The matrix effects on kinetic rate constants of antibody-antigen interactions reflect solvent viscosity. *J Immunol Methods* 217, 51-60.
- Niederau, C., Backmerhoff, F., Schumacher, B., 1997, Inflammatory mediators and acute phase proteins in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* 44, 90-107.
- Nikolaus, S., Bauditz, J., Gionchetti, P., Witt, C., Lochs, H., Schreiber, S., 1998, Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation. *Gut* 42, 470-476.
- Olszanecka-Glinianowicz, M., Zahorska-Markiewicz, B., Janowska, J., Zurakowski, A., 2004, Serum concentrations of nitric oxide, tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF soluble receptors in women with overweight and obesity. *Metabolism* 53, 1268-1273.

- Park, H.S., Park, J.Y., Yu, R., 2005, Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract* 69, 29-35.
- Petyovka, N., Lyach, L., Voitenok, N.N., 1995, Homologous ELISA for detection of oligomeric human TNF: properties of the assay. *J Immunol Methods* 186, 161-170.
- Robinson, N., 2001, International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University 16-18 June 2000. *Equine Vet J* 33, 5-19.
- Robinson, N.E., Olszewski, M.A., Boehler, D., Berney, C., Hakala, J., Matson, C., Derksen, F.J., 2000, Relationship between clinical signs and lung function in horses with recurrent airway obstruction (heaves) during a bronchodilator trial. *Equine Vet J* 32, 393-400.
- Snow, M.H., Mikuls, T.R., 2005, Rheumatoid arthritis and cardiovascular disease: the role of systemic inflammation and evolving strategies of prevention. *Curr Opin Rheumatol* 17, 234-241.
- Sutton, S., Clutterbuck, A., Harris, P., Gent, T., Freeman, S., Foster, N., Barrett-Jolley, R., Mobasher, A., 2009, The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet J* 179, 10-24.
- Theon, A.P., 1998, Intralesional and topical chemotherapy and immunotherapy. *Vet Clin North Am Equine Pract* 14, 659-671, viii.
- Vick, M.M., Adams, A.A., Murphy, B.A., Sessions, D.R., Horohov, D.W., Cook, R.F., Shelton, B.J., Fitzgerald, B.P., 2007, Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. *J Anim Sci* 85, 1144-1155.
- Woodward AD, N.B., O'Connor CI, Skelly CD, Webel SK and Orth MW 2007, Supplementation of dietary long-chain polyunsaturated omega-3 fatty acids high in docosahexaenoic acid (DHA) increases plasma DHA concentration and may increase trot stride lengths in horses. *Equine and Comparative Exercise Physiology* 4, 71-78.

## Tableaux et figures de l'Article #2

**Table 1.** Quantification of serum TNF $\alpha$  in 20 samples from 14 horses with different clinical conditions using manufacturer's instructions.

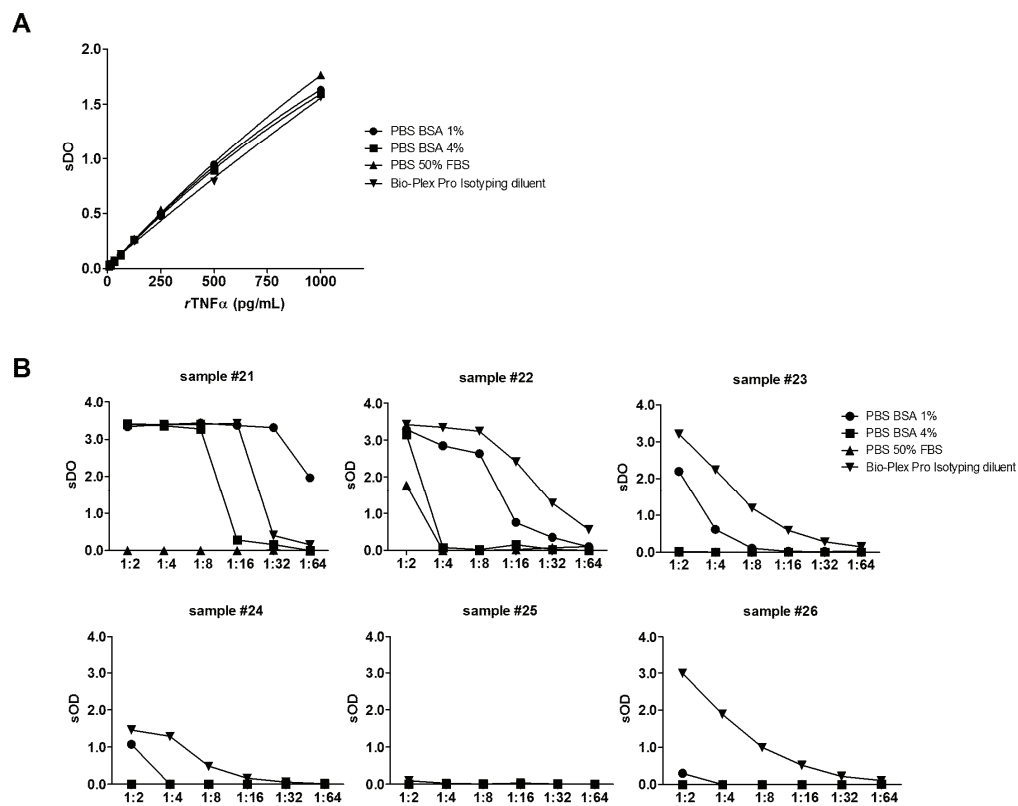
Sample	Clinical status	sOD	Serum TNF $\alpha$ (pg/ml) <sup>A</sup>	Sample	Clinical status	sOD	Serum TNF $\alpha$ (pg/ml)
1	H/NE <sup>B</sup>	0.773	423.0	11	C/E	0	ND
2	C/NE	0	ND <sup>C</sup>	12	C/E	0	ND
3	C/NE	0.008	(11.30) <sup>D</sup>	13	H/E	0.061	(36.62)
4	C/NE	0.067	(39.29)	14	H/E	0	ND
5	C/NE	0.039	(26.04)	15	H/E	0	ND
6	H/NE	0	ND	16	H/E	0	ND
7	H/NE	0	ND	17	H/E	0	ND
8	H/NE	0	ND	18	H/E	0	ND
9	H/NE	0.061	(36.62)	19	H/E	0	ND
10	C/E	0	ND	20	H/E	0.031	(21.98)

<sup>A</sup> Serum TNF $\alpha$  concentrations are adjusted for dilution factor (1:4)

<sup>B</sup> C: Control; H: Heaves; E: Exposed to antigen (mouldy hay); NE: Non-Exposed

<sup>C</sup> ND : not detected

<sup>D</sup> Concentrations between parentheses are extrapolated from sOD below the range of the assay's standard curve (< 0.117)

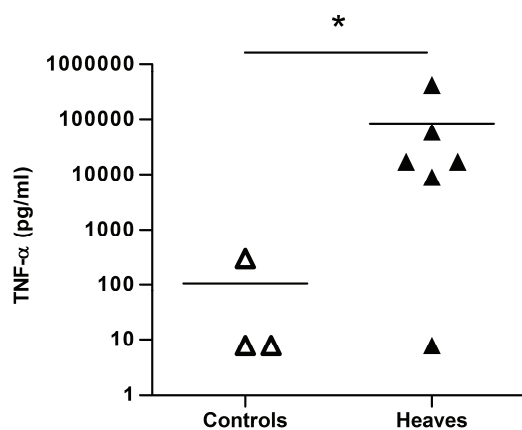


**Figure 1. A.** Standard curves obtained from serial dilution of rTNF $\alpha$  in 4 different reagent diluents. **B.** Comparison of dilution buffers for detection of native TNF $\alpha$  in serum samples from 6 different horses.

**Table 2.** Specificity of native TNF $\alpha$  detection in serum samples using the optimized ELISA protocol.

Sample #	sOD		
	Standard procedure <sup>A</sup>	Competitive binding	Capture Ab Omission
22	1.272	0.098	0.00
23	0.263	0.000	0.00
24	0.049	0.005	0.00
26	0.121	0.000	0.00

<sup>A</sup> Serum samples were assayed in triplicate sets using either the optimized standard ELISA procedure (1:32 in Bio-Plex Isotyping Diluent), competitive pre-treatment with capture antibody (200 ng/ml, 2h at room temperature) or capture antibody omission.



**Figure 2.** TNF $\alpha$  concentration in serum samples from healthy control (n = 3) and heaves-affected horses (n = 6) during antigen challenge. A minimum value of 7.8 pg/ml was attributed to samples with undetectable TNF $\alpha$ . Data was analyzed using an unpaired one-tailed t-test with Welch's correction on log<sub>10</sub> transformed data. Means are represented by horizontal bars. \* Significant difference between the means (p < 0.05).

## Article #3

### *IL-4 activates equine neutrophils and induces a mixed inflammatory cytokine expression profile with enhanced neutrophil-chemotactic mediator release ex vivo*

---

#### Sommaire

L'interaction entre les neutrophiles et les cytokines de type Th2, impliquées dans la réponse allergique, est mal comprise.

Dans cet article, l'effet biologique d'une cytokine de type Th2, l'Interleukine(IL)-4, a été testé dans un premier temps sur les neutrophiles isolés de chevaux normaux. L'expression de cytokines, de chimiokines et de récepteurs pouvant contribuer à l'inflammation allergique a été évalué par la suite chez des neutrophiles isolés de chevaux normaux et atteints du souffle afin d'évaluer si une réponse modifiée à l'IL-4 pourrait être impliquée dans la pathologie.

#### **Contributions originales**

Ma contribution était de 100% à toutes les manipulations expérimentales, sauf pour les tests de migration (50%), les statistiques (25%), les buvardages de Western (90%) et les mécaniques respiratoires (25%). J'ai participé à 80% à la rédaction de l'article.

#### *Article publié*

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2010 Oct;299(4):L472-82. Epub 2010 Jul 16.

DOI : ajplung.00135.2009 [pii] 10.1152/ajplung.00135.2009

**IL-4 activates equine neutrophils and induces a mixed inflammatory cytokine expression profile with enhanced neutrophil-chemotactic mediator release *ex vivo***

Anouk Lavoie-Lamoureux<sup>1</sup>, Kantuta Moran<sup>1</sup>, Guy Beauchamp<sup>1</sup>, Susanne Mael<sup>2</sup>, Falko Steinbach<sup>3</sup>, Josiane Lefebvre-Lavoie<sup>1</sup>, James G. Martin<sup>4</sup>, Jean-Pierre Lavoie<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Faculté de médecine vétérinaire, Dép. de sciences cliniques, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Canada.

<sup>2</sup>Dept of Veterinary Pathology, FU Berlin, Berlin, Germany

<sup>3</sup>Virology Department, Veterinary Laboratories Agency (VLA), Addlestone, UK

<sup>4</sup>Meakins-Christie Laboratories, McGill University, Montreal, Canada.

RUNNING TITLE: The role of neutrophils in allergic inflammation

CORRESPONDING AUTHOR

Jean-Pierre Lavoie

  
3200 rue Sicotte

St-Hyacinthe, Québec, Canada. J2S 2M2

Fax: (450) 778-8102





**ABSTRACT**

Neutrophils are potent contributors to the lung pathophysiological changes occurring in allergic airway inflammation which typically involve Th2 cytokine overexpression. We have previously reported that equine pulmonary endothelial cells are activated by the Th2 cytokine IL-4 and express chemotactic factors for neutrophils after stimulation. We have further explored the possible mechanisms linking Th2-driven inflammation and neutrophilia by studying the effects of recombinant equine IL-4, a prototypical Th2 cytokine, on peripheral blood neutrophils (PBN) isolated from normal animals and from horses with asthmatic airway inflammation (equine heaves). We found that IL-4 induced morphological changes in PBN, dose and time-dependent expression of IL-8 mRNA as well as the release of chemotactic factors for neutrophils in culture supernatants. Also, IL-4 induced a mixed inflammatory response in PBN from control and asthmatic-animals with increased expression of pro-inflammatory IL-8 and TNF- $\alpha$  but a marked inhibition of IL-1 $\beta$ . IL-4R $\alpha$  and CD23 (Fc $\epsilon$ RII) expression were also up-regulated by IL-4. Importantly, disease as well as chronic antigenic exposure modified gene expression by PBN. Finally, we found that activation of equine neutrophils with IL-4 involved STAT6 phosphorylation and p38 MAPK and PI3-K; the pharmacological inhibitors SB203580 and LY294002 respectively significantly reversed IL-4-induced gene modulation in PBN. Overall, results from this study add to the link between Th2-driven inflammation and neutrophilia in the equine model and further extend the characterization of IL-4 effects on neutrophils.

**KEY WORDS:** neutrophils, cytokines, allergy, equine asthma

## INTRODUCTION

The presence of neutrophils in allergic inflammation is well established (44). These first-line effector cells interact with the inflammatory milieu by means of their receptors (Toll-like receptors (TLRs), cytokine receptors, antibody and complement receptors, integrins, etc.) and respond by the release of cytokines, proteases, lipid mediators and oxidants (13, 17, 22). In states of persistent inflammation, aberrant neutrophil activation leads to tissue damage and remodeling (65). Neutrophils are observed in subset of patients with asthma (21, 55), a chronic inflammatory airway disease typically described as a consequence of allergic reaction to airborne antigens. However, the triggers and pathways involved in tissue neutrophilia in chronic inflammatory diseases remain incompletely understood, particularly in asthma. In this latter condition airway neutrophilia is associated with the over-expression of IL-8 (57).

T helper type 2 (Th2) cytokines, including interleukin (IL)-4, IL-5, IL-9 and IL-13 (64), are recognized as orchestrators of inflammatory events associated with allergic inflammation. We have previously explored the possible mechanisms linking Th2-mediated inflammation and neutrophilia using an equine model of chronic asthma (equine heaves). This spontaneously-occurring airway disease of horses shares many similarities with human chronic asthma, including the development of airway obstruction following inhalational challenge with organic dust from poor quality hay and the barn environment (53). Both allergen-specific and non-specific (e.g. bacterial LPS) components of this challenge have been shown to synergistically contribute to heaves' pathophysiological features (47, 48). Importantly, airway neutrophilic inflammation has been associated with Th2-type cytokine overexpression in airway inflammatory cells (15, 35), making this model suitable for the study of the interaction between neutrophils and Th2 cytokines. We previously reported that primary pulmonary artery endothelial cells from normal horses express adhesion molecules and release chemotactic factors for neutrophils when stimulated with IL-4 (32).

Human and equine neutrophils are known to express receptors for Th2 cytokines (1, 20, 26). More specifically, human neutrophils were shown to respond to IL-4 through the type I receptor (IL-4R $\alpha$  and  $\gamma$ c (CD132) heterodimer) (50), leading to STAT6 and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) ERK, JNK and p38 phosphorylation. However, the consequences of Th2 cytokines on neutrophil behavior remain unclear, as reports have described IL-4 and other Th2

cytokines either as activators (9, 10, 26) or inhibitors (41, 42, 46, 51) of neutrophil effector functions. The aim of this study was therefore to further explore the direct effects of IL-4 on the regulation of cytokine expression by equine peripheral blood neutrophils. We also compared the response of neutrophils isolated from animals affected with chronic airway inflammation and healthy controls before and after allergen exposure, since disease-associated modulation of Th2 cytokine receptors expression has been reported both in humans (58) and horses (20).

Our results reveal that IL-4-activated equine neutrophils share features described for human neutrophils, suggesting that they behave similarly in a Th2-biased inflammatory milieu. Furthermore, we describe a mixed inflammatory response with both increases (IL-8, TNF- $\alpha$ ) and decreases (IL-1 $\beta$ ) in pro-inflammatory cytokine expression by IL-4 stimulated neutrophils. We also demonstrate that peripheral blood neutrophils from both healthy and asthmatic horses are primed after chronic antigenic challenge and exhibit enhanced responsiveness to IL-4.

## METHODS

### *Animals*

Ten mixed breed horses consisting of four control horses ( $495 \pm 42$  kg,  $11 \pm 2.9$  years-old) with no history of respiratory disease and six heaves-affected (asthmatic) horses ( $499 \pm 50$  kg,  $14.2 \pm 3.8$  years-old) from a research herd were studied. The two groups of horses were stabled together during the entire course of the study and were regularly vaccinated and de-wormed. All animals had been pastured for more than three months before the beginning of the study to ensure complete reversal of airway obstruction in asthmatic horses (remission). Antigenic challenge consisted of stabling the horses for 30 days in a barn with reduced ventilation where they were bedded on straw and fed hay and sweet feed twice a day. Blood was collected during clinical remission and after antigenic challenge. All experimental procedures were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council for Animal Care and were approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal.

### *Respiratory function tests*

Respiratory mechanics were performed before and after the 30-day challenge as previously described (15). Briefly, pulmonary pressure was measured using a transducer attached to a balloon-tipped catheter inserted in the distal third of the esophagus and to a mask placed on the horse's nose. Flow rates were obtained using a heated pneumotachograph fitted to the mask. Values of elastance ( $E_L$ ) and resistance ( $R_L$ ) were calculated using dedicated computer software (RHTInfodat, Montreal, Que., Canada) by multiple regression analysis for the single compartment model of the lung (8).

### *Neutrophil isolation*

Blood was drawn from the jugular vein into heparinized sterile tubes (BD Vacutainer). Two different methods were used to isolate neutrophils from the blood.

1) Density gradient. The polymorphonuclear-rich cell layer was harvested following centrifugation of whole blood on a density gradient solution composed of sodium metrizoate and

Dextran 500 (Lympholyte-poly®, Cedarlane Laboratory Limited). The remaining red blood cells were lysed by hypotonic treatment.

2) Immunomagnetic selection (MACS). This technique was used in order to achieve optimal levels of cell purity and repeatability as reported previously (34). Briefly, after sedimentation of blood for 1h at room temperature, neutrophils were retrieved from the leukocyte-rich supernatant by sequential incubation with primary monoclonal antibody (#DH24A, VMRD Inc.) and secondary rat anti-mouse IgM antibody conjugated to paramagnetic microbeads (MACS, Miltenyi Biotec) before being loaded on a ferromagnetic LS separation column (MACS, Miltenyi Biotec).

Cytospin slides were prepared (Cytospin2, Shandon) and stained with Protocol Hema 3 (Fisher Scientific) for differential counting of >400 cells to assess neutrophil purity. Viability was determined by trypan blue exclusion. The purity and viability of neutrophils were  $98.3 \pm 0.2\%$  and  $98.0 \pm 0.5\%$ , respectively, when isolated using MACS and  $95.8 \pm 0.5\%$  and  $98.3 \pm 0.5\%$  respectively using density gradient.

#### *Cell culture*

Neutrophils were suspended at  $5 \times 10^6$  cells/mL in culture medium RPMI 1640 supplemented with 10% heat inactivated low-endotoxin FBS (GIBCO), 4mM L-glutamine (GIBCO), 100U/mL penicillin and 100 $\mu$ g/mL streptomycin (GIBCO) and incubated in suspension cell culture plastic plates (Ultident, Canada) for 5 or 18 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> with different doses of recombinant equine (req)IL-4 (4, 40, 400 units (U)/mL) or with its vehicle as a negative control. This recombinant protein is produced by an insect cell line as described earlier (59) and has been previously shown to have biological activity on equine lymphocytes and monocytes. The vehicle consists of supernatant collected from non-transfected insect cells. Where indicated, a commercial source of reqIL-4 from *E.coli* was used for comparison purposes (R&D Systems Inc.). A positive control for neutrophil activation consisted of incubating the cells with 100ng/mL LPS (from *E. coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich) and 10nM fMLP (Sigma-Aldrich). The viability of agonist-stimulated cells was assessed. Photographs (Leica DFC320) of the cells were taken using a phase-contrast inverted microscope (Leica DM IRM). Neutrophils were centrifuged at 5600g (Eppendorf 5415C) for 5 min at 4°C. Culture supernatants were collected and frozen for further analysis (-80°C). Ten million

neutrophils were homogenized in TRIzol® Reagent (Invitrogen) and immediately frozen at -80°C for RNA extraction.

*RNA extraction and reverse transcription (RT)*

RNA extraction was performed according to the manufacturer's instructions using 3 steps nucleic acid precipitation with 0.2 volume chloroform and 1 volume isopropanol and 75% ethanol (TRIzol® Reagent, Invitrogen). RNA pellets were air-dried and total RNA concentration and purity were evaluated by spectrophotometry (GeneQuantpro, Biochrom).

Five hundred nanograms of total RNA in 9 µL of RNase-DNase free water (GIBCO) was heated at 70°C for 5 minutes (Standard Heatblock, VWR) for reverse-transcription. One microliter of Oligo(dT)-12,18 (Invitrogen) primers was added and the mixture was heated for 10 minutes at 70°C. Samples were incubated at 50°C for 1h (MDL 5 liters, Fisher Scientific, Pittsburg, PA) after adding 20µL of a mastermix containing 0.01M dithiothreitol (Invitrogen), 1.6mM dNTPs (Invitrogen), 2U/µL of RNA Inhibitor (Porcine) (Amersham Biosciences) and 1.2U/µL AMV reverse transcriptase (Roche). The reaction was stopped by heating the samples at 100°C for 1 min. Samples were stored at -20°C.

*Real-time polymerase chain reaction (PCR)*

Real-time PCR was performed using QuantiTect®SYBR® Green PCR kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions with minor modifications on the Rotor-Gene Real-Time Centrifugal DNA Amplification System (Corbett Research). Briefly, 1 µL of cDNA was used in 20 µL final PCR volume containing 0.5µM of each sense and anti-sense primers and 2.75mM MgCl<sub>2</sub>. Primers pairs were as following (5'→3'): CD23.S (Sens) CCAGAACGTCTCTCAGGTTTCC and CD23.AS (Anti-Sens) CATTCTGTTCTGCTCATCTTGGA; IL-1β.S GACTGACAAGATACCTGTGGCCT and IL-1β.AS AGACAACAGTGAAGTGCAGCCT; IL-4Rα.S CAGCTC-CGTCTGCCTACCAG and IL-4Rα.AS CACGCACACTTCATCTTCTCTGT; IL-8.S CTTTCTGCAGCTCTGTGTGAAG and IL-8.AS GCAGACCTCAGCTCCGTTGAC; TLR4.S TGGGACTCTGATCCCAGCCAT and TLR4.AS AGGTCC-AGTTCCTTGTTGATGTG; TNF-α.S CTTGTGCCTCAGCCTCTTCTCCTTC and TNF-α.AS TCTTGATGGCAGAGAGGAGGTTGAC; GAPDH.S AAGTGGATATTGTCGCCATCAAT and GAPDH.AS AACTTGCCATGGGTGGAATC. Primers were design to span exon-intron boundaries in order to

prevent amplification of genomic DNA. Amplification conditions included a denaturation step of 10 min at 95°C followed by 40 cycles of denaturation, annealing and elongation steps. For each gene, a serial dilution (10X) of known concentration of PCR products (QIAquick® Gel Extraction Kit, QIAGEN) was performed and optimized in order to give a reproducible efficiency coefficient (>0.90). Quantification of gene expression was performed using imported standard curves and adjustment to a standard curve reference in the target run. Values were corrected with GAPDH as a housekeeping gene (37).

### *Chemotaxis assays*

PBN from healthy horses were obtained by density gradient centrifugation, as described above. Neutrophils were suspended in PBS containing 0.2M Ca<sup>2+</sup>, 0.265M Mg<sup>2+</sup> and 0.5% BSA to obtain 1.5 x 10<sup>5</sup> neutrophils/55 µl. This volume of cell suspension was added to the upper wells of the 48-well micro chemotaxis chamber (Neuro Probe, Inc). Supernatants (30.5 µl) retrieved from reqIL-4 or vehicle-treated neutrophils were added to the lower wells in triplicate or quadruplicate. CXC chemokines receptor (CXCR)-2 antagonists were used to evaluate the role of CXC chemokines in the chemotactic activity of culture supernatants. Dose-response assays monitoring the inhibition of equine neutrophil migration were firstly performed with SB225002 (Tocris, 10<sup>-5</sup>M to 10<sup>-8</sup>M in DMSO) and SB265610 (Tocris, 10<sup>-6</sup>M to 10<sup>-9</sup>M in DMSO) toward reqIL-8 (Endogen®, Thermo Fisher Scientific), a prototypical CXCR2 ligand. SB225002 and SB265610 are non-peptide allosteric antagonists of the diarylurea class (18) shown to have multi-species cross-reactivity. Briefly, neutrophils were pre-treated on ice with the CXCR2 antagonists for 30 min (final concentration of DMSO 0.1%) prior to migration toward reqIL-8 (10ng/mL in PBS containing Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> and BSA). Dose titration studies were performed to determine doses of drugs required for inhibition of neutrophil migration toward supernatants from IL-4-stimulated neutrophils (40U/mL, 5h). In addition, the contribution of the protein fraction to neutrophil chemotaxis was evaluated by heating the supernatants for 30 min at 100°C (denaturation of proteins *versus* lipids). Negative control for chemotaxis consisted of PBS alone. Neutrophils were allowed to migrate through an 8 µm pore size cellulose nitrate filter (Neuro Probe, Inc.) placed between the upper and lower chambers for 1h at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Following incubation, filters were removed and fixed using mercuric chloride (Fluka) then stained with Harris's Hematoxylin (VWR) and chromotrope 2R

(Sigma). Chemotactic activity was determined by counting the number of neutrophils on the lower side of the filter, by light microscopy. Five random fields per well were counted at high magnification (400X).

#### *Immunocytochemistry (ICC)*

For the detection of TNF $\alpha$ , purified equine neutrophils were cultured in the presence of reqlL-4 (500ng/mL, R&D Systems Inc.) and brefeldin A (10ug/mL, Readymade solution, Sigma-Aldrich) for 5 h in supplemented RPMI medium (n = 2). As a positive control for TNF $\alpha$  detection, total blood leukocytes ( $5 \times 10^6$ /mL) were concurrently cultured for 5h with ionophore A23187 (500ng/mL, Sigma-Adrich) and brefeldin A. Cells were then washed two times in PBS, and cytopspins were prepared using 70  $\mu$ L of a  $10^6$  cells/mL suspension. Cells were fixed 15 min in paraformaldehyde 2% (in PBS, pH 7.4), washed twice in PBS and kept overnight in PBS at 4°C before performing ICC according to R&D Systems Enzymatic protocol 2.0. Briefly, slides were washed three times in EBSS (Earls buffered salt solution, KCl 5.33mM, NaHCO<sub>3</sub> 26.19mM, NaCl 117.24mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O 1.01mM, D-Glucose 5.56mM) and incubated in FBS 2% in EBSS for 10 min at 37°C. Slides were further washed in wash buffer (EBSS supplemented with saponin 0.1% w/v, Sigma-Aldrich) and incubated 30 minutes in endogenous peroxidase blocking buffer (3mM NaN<sub>3</sub> and 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in wash buffer). Endogenous biotin activity was blocked using the Biotin-Blocking System (Dako Canada Inc.) supplemented with 0.1% saponin for 30 min. Slides were then incubated with either 5ug/mL of goat polyclonal anti-equine TNF $\alpha$ /TNFSF1A (AF1814, R&D Systems Inc.) or with isotype control antibodies in similar concentrations (goat IgG, Vector Laboratories) for 30 minutes at room temperature. After three washes, slides were incubated with biotin-conjugated donkey anti-goat IgG (1:1000, Jackson Immunoresearch Laboratories) for 30 minutes at room temperature and washed. Slides were further incubated 30 minutes with Vectastain Elite ABC peroxidase (Vector Laboratories) supplemented with saponin 0.1%, washed, subjected to diaminobenzidine (DAB Peroxidase Substrate Kit; Vector laboratories) for 8.5 min, rinsed with deionized H<sub>2</sub>O, counterstained using hematoxylin and lithium carbonate, dehydrated, and mounted in Permount\* Mounting Medium (Fisher Scientific). The expression of IL-1 $\beta$  by neutrophils was similarly ascertained using rat monoclonal anti-equine IL-1 $\beta$  (MAB3340, R&D



Systems Inc.) and Goat anti-rat IgG (1:1000, Vector Laboratories) in total blood leukocytes stimulated for 5h with LPS (5ug/mL) in the presence of brefeldin A.

#### *Flow cytometry*

Intracellular IL-1 $\beta$  expression was evaluated in neutrophils cultured for 5h with reqIL-4 (R&D Systems Inc., 100ng/mL) or its vehicle in the presence of brefeldin A (10ug/mL). Following culture, cells were washed twice in PBS, counted and stained) for extracellular neutrophil marker (15ug/mL DH24A, VMRD) for 30 min ( $10^6$ /100uL). All antibody incubation steps were performed at 4°C. Cells were washed three times in staining buffer (SB: Dubelcco's phosphate buffered saline (Invitrogen), FBS 3% (GIBCO) and 0.09% w/v Sodium Azide (Invitrogen), pH 7.4) and incubated with phycoerythrin-coupled goat anti-mouse IgM antibody (CLCC31505, Cedarlanelabs, 1:100 in wash buffer) for 30 minutes. From this moment, all procedures were performed in the dark. Cells were washed twice with SB and fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde (w/v in PBS, pH 7.4) and permeabilized in wash buffer (SB supplemented with 0.1% saponin) for 15 minutes at 4°C. Cells were incubated with anti-equine IL-1 $\beta$  (5ug/mL) for 30 minutes, washed three times in wash buffer and incubated 30 min with secondary FITC-coupled anti-rat IgG F(ab')<sub>2</sub> antibody (1:1000 in wash buffer, Rockland Inc.). Cells were then washed twice in wash buffer and suspended in 400  $\mu$ L SB before flow cytometry acquisition of 200 000 events and analysis using Cellquest Pro software on a FACScalibur instrument (BD Biosciences). Isotype-matched control antibodies (mouse IgM and rat IgG) as well as single marker stained cells were used to set photomultipliers (PTM) voltage and compensation parameters for fluorescence detection in FL-1 and FL-2 channels.

#### *Western Blot*

An antibody directed against the phosphorylated form of human STAT6 was used to detect the activation of signaling pathways associated with the IL-4 receptor. The equine translated nucleotide sequence surrounding the targeted phosphorylated amino acid Tyr641 shows 100% homology with the human sequence, according to the available equine sequences in NCBI Horse Genome Resources (National Institute Health, Pubmed accession number XM\_001488414). Briefly, neutrophils were isolated using density gradient centrifugation and suspended in Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-

containing PBS supplemented with 10% FBS at  $5 \times 10^6$  cells/mL. They were incubated for 15 minutes at 37°C in a water bath with insect reqIL-4 (40U/mL), *E. coli* reqIL-4 (100ng/mL), LPS (100ng/mL) and fMLP (10nM) or left unstimulated. Stimulation with LPS and fMLP is not typically associated with STAT6 activation and therefore this was used as a reference for antibody specificity. Following incubation, neutrophils were centrifuged at 2500g for 10 min at 4°C. Cell pellets were homogenized in M-PER lysis buffer (PIERCE) supplemented with 1:100 Halt™ Phosphatase Inhibitor Cocktail (PIERCE) using a tuberculin syringe and centrifuged at 14 000g at 4°C for 15 min. Where indicated, a Protease inhibitor cocktail (Sigma, 1:100) was added to the lysis buffer. Protein content of the supernatants was evaluated using the Bradford method (AMRESCO Inc., USA) and BSA as a standard reference. Equal amounts of proteins (25µg/lane) were mixed with loading buffer containing β-mercaptoethanol, heated for 5 min at 100°C, and then subjected to 10% SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred onto PVDF membranes (Amersham Hybond™-P, GE Healthcare) and blotted against phospho-STAT6 (Tyr641) primary antibody (CellSignaling Technology®, 1:1000 in 1X TBS, 0.1% Tween-20 with 5% w/v nonfat dry milk) overnight at 4°C with gentle agitation. Membranes were washed with 0.1% (v/v) Tween 20 in TBS (pH 7.5) and incubated with a 1:2000 dilution of HRP-conjugated secondary antibodies (CellSignaling Technology®) for 2h at room temperature. Protein bands were visualized using ECL Plus™ Western Blotting Detection system (Amersham, GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. Digitalized images were obtained by scanning the membrane under blue light (Storm 840, Molecular Dynamics).

#### *Inhibition of IL-4-induced gene transcription using pharmacological inhibitors*

In separate experiments, MAPK and PI3-K inhibitors were used to identify the signaling pathways involved in IL-4-induced mRNA regulation. SB203580 (10µM) (Invivogen, Medicorp, Montreal, Québec, Canada), SP600125 (5 µM) and U0126 (2.5 µM) (Biosource, Medicorp, Montreal, Québec, Canada) were used to block p38 MAPK, c-Jun N-terminal kinase (JNK) and MEK1/2 respectively. Additively, AS602868 (10 µM), a specific inhibitor of the upstream regulator of NF-κB, IKK2, was used (Serono Laboratories, Basel, Switzerland, (24)). Wortmannin (50nM) and LY294002 (10 µM) were used to block PI3-K (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada). Effective doses of MAPK inhibitors were selected according to their ability to inhibit IL-8 mRNA upregulation by total

equine blood leukocytes stimulated with LPS (100ng/mL) and fMLP (10nM) (not shown). Wortmannin and LY294002 doses were chosen according to the manufacturer's recommendation and concentrations previously reported to suppress equine neutrophil activation by immune complexes (33).

Briefly, PBN were isolated from healthy horses by immunomagnetic separation as described above. Purified neutrophils were suspended in RPMI culture media ( $5 \times 10^6$ /mL) supplemented with polymyxin B sulfate (PMB) (10 $\mu$ g/mL) (Summit Veterinary Pharmacy inc., Aurora, Canada). Neutrophils were pre-treated with the inhibitors or DMSO (negative control, 0.1% final concentration) for 1h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> before adding reqIL-4 (40U/ml) to the cultures for an additional 5h. At the end of the incubation period, viability was assessed and neutrophils were homogenized in TRIzol® Reagent for gene expression analysis.

#### *Statistical analysis*

All analyses were carried out using repeated-measures mixed linear models using SAS v.9.1. (Cary, N.C.). Data obtain from PCR experiments were log transformed to normalize the distributions. Graphs show raw data, expressed as mean  $\pm$  SEM. For titration studies, each replicate experiment was treated as a random factor to control for potential similarities between values within each replicate. For differential mRNA expression studies using two groups of horses, time (remission *versus* exacerbation) and treatment (IL-4 *versus* vehicle) were treated as within-subject factors and the group (controls *versus* Heaves) as a between-subject factor. For experiments using pharmacological inhibitors, treatment (8 levels: vehicle, IL-4, LY294002, Wortmannin, U0126, SB203580, SP60012, AS602868) was treated as a within-subject factor. Tukey's *post-hoc* comparisons were used unless otherwise stated. Differences were considered significant when P values were less than 0.05.

## RESULTS

### *IL-4 has biological effects on equine neutrophils*

We monitored the changes in cellular morphology and levels of IL-8 mRNA as markers of neutrophil activation (31). Our previous unpublished PCR experiments showed the presence of IL-4R mRNA in equine neutrophils, suggesting that they could respond to this cytokine. Fig. 1 shows that, indeed, the neutrophils underwent striking morphological changes following culture with reqIL-4 compared to vehicle-treated cells. The IL-4-stimulated cells were elongated and/or exhibited cytoplasmic prolongations characteristic of cellular activation and cytoskeletal reorganization. Furthermore, titration experiments showed a dose and time-dependent effect of reqIL-4 on gene expression by equine neutrophils. Thus, following incubation for 5 h (Fig. 2A), IL-8 transcription in equine neutrophils was significantly enhanced by 40 and 400U/mL req IL-4 and 100ng/mL LPS +  $10^{-8}$ M fMLP ( $p < 0.05$ ; Dunnett's test) ( $n = 4$ ). After 18 h (Fig. 2B), neutrophils showed lower levels of IL-8 transcription, compared to 5h stimulation (10 to 100-fold less) ( $p=0.0008$ ) ( $n = 4$ ). At this time point, only stimulation by bacterial products resulted in a significant increase in IL-8 mRNA expression ( $p=0.035$ ) over negative control (vehicle).

### *IL-4 stimulates the release of CXCR2-ligands from neutrophils in culture supernatants*

As chronic airway inflammation involves the ongoing recruitment to and activation of neutrophils in the airway lumen, we studied whether IL-4 could mediate this phenomenon. As shown in Fig. 3A, there was a qualitative dose-dependent effect of reqIL-4 on the release of chemotactic factors by neutrophils in culture supernatants. Separate experiments indicated that reqIL-4 itself was not responsible for the chemotactic activity of the supernatants, since freshly diluted reqIL-4 in supplemented RPMI, from both insect (40U/mL) and *E. coli* (100ng/mL), failed to induce neutrophil migration relative to their vehicles in similar concentration (Fig. 3B).

We hypothesized that IL-8 release by stimulated neutrophils might be responsible for the chemotactic activity of culture supernatants. As neither blocking antibodies to equine IL-8 nor equine IL-8 receptors was commercially available, we used non-peptide CXCR2 antagonists to evaluate the nature of the chemotactic mediators present in IL-4-stimulated neutrophils culture supernatants. As shown in Figure 3C, SB225002 completely inhibited neutrophil migration toward

reqIL-8 (10ng/mL) at  $10^{-5}$ M whereas  $10^{-6}$ M and  $10^{-7}$ M concentrations were less effective. SB265610 showed a clearer dose-response effect with almost complete inhibition of chemotaxis at  $10^{-6}$ M. Figure 3D shows that both CXCR2 inhibitors as well as heat-treatment of supernatant reduced the number of cells migrating toward IL-4-stimulated neutrophil supernatants suggesting that mainly CXCR2-ligands, including IL-8, are involved.

*IL-4-induced gene expression by neutrophils is modulated by disease state and antigenic exposure*

We next compared gene expression induced by IL-4 in neutrophils from animals affected with chronic airway disease and healthy animals while they were in clinical remission (pasture) and exacerbation (antigen challenge). We sought to determine whether disease-associated alterations could contribute to Th2-driven neutrophilia in heaves-affected horses such as enhanced responsiveness (30) or increased receptor expression (52) to IL-4 and reconcile conflicting ideas surrounding the effect of Th2 cytokines on neutrophils. Respiratory mechanics were performed to compare the degree of airway obstruction. As predicted, no difference in pulmonary resistance ( $R_L$ ) ( $0.62 \pm 0.22$  versus  $0.70 \pm 0.18$  cmH<sub>2</sub>O/L/s; Fig. 4), and elastance ( $E_L$ ) ( $0.71 \pm 0.38$  versus  $0.66 \pm 0.31$  cmH<sub>2</sub>O/L) was observed between control and asthmatic horses during remission. Stabling induced pulmonary obstruction in asthmatic horses as indicated by a significant increase in  $R_L$  ( $0.46 \pm 0.22$  versus  $2.45 \pm 0.18$  cmH<sub>2</sub>O/L/s,  $p = 0.0005$ , Fig. 4) and  $E_L$  ( $0.74 \pm 0.38$  versus  $4.05 \pm 0.31$  cmH<sub>2</sub>O/L,  $p = 0.0007$ ) in asthmatic animals only. There were also other clinical signs of airway disease such as cough, nasal discharge and increased respiratory effort in these horses.

Based on results from our dose and time titration experiments, neutrophils were stimulated with 40U/mL of reqIL-4 for 5h in order to induce a significant signal while avoiding saturation of the response. We studied pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-8 and TNF- $\alpha$ ) as well as receptor gene expression (IL-4R $\alpha$ , the low affinity receptor for IgE (Fc $\epsilon$ RII) CD23 and Toll-like receptor-4; TLR4) by purified neutrophils to evaluate the potential outcomes of IL-4-induced neutrophil activation in a Th2-biased inflammatory context. Fig. 5A shows that IL-8 and TNF- $\alpha$  mRNA expression by neutrophils was up-regulated by reqIL-4 in the two groups of animals ( $p < 0.0001$ ). There was an enhanced expression of IL-8 by IL-4-stimulated neutrophils from asthmatic animals when compared to controls, as indicated by the near significant interaction between group and stimulation ( $p = 0.06$ ). IL-1 $\beta$  expression was inhibited by reqIL-4 ( $p < 0.0001$ ) in the two

animal groups. Interestingly however, IL-1 $\beta$  expression in neutrophils from asthmatic horses was significantly reduced compared to neutrophils from healthy control horses ( $p = 0.03$ ), irrespectively of stimulation or time of sampling. The mRNA expression of CD23 and IL-4R $\alpha$  by neutrophils was up-regulated by reqIL-4 treatment ( $p < 0.0001$ ) similarly in the two animal groups, at each time point (Fig. 5B). ReqIL-4, in contrast to bacterial extracts (not shown, (2)), had no effect on TLR4 expression by equine neutrophils.

Antigenic challenge resulted in an increased expression of both IL-8 ( $p = 0.02$ ) and TNF- $\alpha$  ( $p = 0.001$ ), similarly in the two groups of horses. Also, IL-4-induced IL-8 mRNA expression was greater after antigen challenge than while horses were in remission ( $p = 0.007$ , *post hoc* comparison). A difference between groups was observed regarding IL-4R $\alpha$  expression following challenge (group  $\times$  time statistical interaction,  $p = 0.04$ ). Thus, PBN from asthmatic horses following chronic antigenic challenge expressed lower levels of IL-4R $\alpha$ , compared to neutrophils from control horses exposed to the same environmental conditions. P values from statistical analysis are listed in supplemental Table 1.

ICC allowed detecting for the first time the protein expression of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in equine neutrophils. TNF $\alpha$ <sup>+</sup> neutrophils were found in IL-4 supplemented cultures (Fig. 6C), however they were present in very low numbers. Preliminary experiments using flow cytometry suggest that less than 1% of neutrophils express TNF $\alpha$  (range 0.06 - 0.90%) at both 6 and 18h time points when stimulated with IL-4 ( $n = 1$ , not shown). IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> neutrophils were detected in a mixed leukocytes population following stimulation with LPS (Fig.6E). We next used flow cytometry to evaluate the effect of IL-4 on IL-1 $\beta$  expression by double stained neutrophils. IL-1 $\beta$  was also found to be expressed in a small proportion of neutrophils (0.04-0.08%). Nevertheless, Figure 7 shows that the percentage of IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> neutrophils was approximately 12 fold decreased after stimulation with IL-4 in primary cell cultures from two horses.

#### *Intracellular pathways involved in IL-4-induced gene expression in equine neutrophils*

We used Western blotting to detect the activated form of STAT6 in equine neutrophils using an anti-phospho-STAT6 antibody (Tyr641). This transcription factor is recruited to the cytoplasmic portion of the IL-4R  $\alpha$  subunit where it is phosphorylated through Jak-1 activation and redirected to the nucleus to mediate specific gene transcription (45). Hence the detection of its

phosphorylated form represents the functional consequence of IL-4 binding to its receptor on equine neutrophils. Fig. 8A shows that phospho-STAT6 could only be detected in reqIL-4-stimulated neutrophils (15 min), independently of the source. Furthermore, activated STAT6 was not found in protein extracts from non-stimulated or LPS+fMLP-stimulated neutrophils (15min). In contrast to a previous report (4), detection of phosphorylated STAT6 in neutrophils was unaffected by the absence of protease inhibitors in lysis buffer.

Various kinases are activated in human neutrophils stimulated by IL-4 (50). Here we used pharmacological inhibitors to assess the specific involvement of MAPKs, PI3-K as well as the transcription factor NF- $\kappa$ B in the IL-4-induced regulation of gene expression by neutrophils. Fig. 8B shows that pre-incubation of neutrophils with LY294002, an inhibitor of PI3-K, as well as SB203580 (p38 MAPK inhibitor) significantly inhibited the up-regulation of CD23 mRNA by IL-4 stimulation (5h). Moreover, CD23 mRNA level was significantly lower in LY294002-pre-treated neutrophils compared to negative control neutrophils suggesting that PI3-K plays a role in the regulation of basal CD23 mRNA expression. IL-1 $\beta$  expression is significantly down-regulated by IL-4 stimulation in neutrophils. Only LY294002 pre-treatment of neutrophils significantly reversed this inhibition by IL-4 (LY294002/IL-4 *versus* DMSO/IL-4-treated neutrophils). Here, uncorrected mRNA data are reported since we were unable to find a single housekeeping gene unaffected by all of the inhibitors (GAPDH by LY294002 and AS602868;  $\beta$ -actin by AS602868;  $\beta$ -glucuronidase by SB203580, not shown).

## DISCUSSION

Neutrophils are recruited to the airways of human asthmatics and in animal models of asthma after allergen inhalation (38, 43, 60). Importantly, severe asthma phenotypes are associated with substantial recruitment of neutrophils to the airways (62), suggesting a role of these cells in the pathology. However, the pathways linking neutrophilic inflammation to Th2-mediated allergic responses remain to be clarified.

A considerable amount of published work aiming at characterizing the effects of IL-4 on neutrophils has been performed using neutrophils primed with microbial compounds or pro-inflammatory cytokines (13, 41, 42, 46). In most of these reports, a predominant anti-inflammatory effect was observed questioning whether Th2 cytokines contribute to neutrophils activation during the allergic response. In the present study, we have shown that IL-4 induces a mixed inflammatory profile in unprimed equine neutrophils, with a combination of increased (IL-8, TNF $\alpha$ ) and decreased (IL-1 $\beta$ ) pro-inflammatory cytokine expression. We also found prospective markers of IL-4-activated equine neutrophils as the IL-4R $\alpha$  subunit and CD23 mRNA expression were up-regulated by IL-4. Furthermore, we demonstrated a dose and time dependence of both IL-8 mRNA expression by IL-4-stimulated neutrophils and their release of chemotactic factors in culture supernatants. This suggests that IL-4 may contribute to the recruitment and activation of neutrophils during allergic inflammation. In an attempt to further characterize the pathways involved in IL-4-driven gene transcription in neutrophils, we found that both PI3-K and p38 MAPK were specifically involved in up- and down-regulation of mRNA expression. Finally, although statistical limitations arise from the small sample size in the present study, these preliminary data suggest that antigen challenge altered gene expression by peripheral blood neutrophils in response to IL-4 in both asthmatic and healthy horses.

Our previous findings suggest that the airway neutrophilia occurs concurrently with the expression of Th2 cytokines (15) in equine heaves, a common disease of horses that shares pathophysiologic features with human asthma. Using *in situ* hybridization, we found higher numbers of BAL cells expressing Th2 cytokines mRNA including IL-4 in these horses compared to healthy horses under similar environmental conditions (15). Notably, neutrophilic inflammation also occurs in the airways of healthy horses upon antigen challenge but tends to resolve over time. Based on these observations, we hypothesized that the interaction between Th2-type cytokines



and neutrophils may contribute to the development and/or persistence of airway inflammation in the asthmatic lung. Cytokines of the IL-17 family (IL-17A, IL-17F, IL-22)(61) are potent drivers of neutrophilic recruitment during chronic inflammation and may contribute to the presence of neutrophils in human asthma (12) as well as in equine heaves (19). However, Th17 and Th2 profiles may not be mutually exclusive but rather be sequentially expressed in the airways. Thus, their specific contribution to neutrophil recruitment and activation in these diseases remains to be established. Our first objective was to validate reqIL-4's agonistic activity in equine peripheral blood neutrophils prior to studying its effect in the context of allergic inflammation. We found several features that are commonly induced by IL-4 in both human and equine neutrophils, suggesting that they may share similar behavior in an allergic context. These include cellular polarization, functional activation of STAT6, dose-dependent regulation of IL-8 expression as well as the involvement of similar signaling pathways (MAPK p38 and PI3-K) (26, 50). Other reported effects of IL-4 on human neutrophils include enhanced adherence and survival (26), improved phagocytosis, degranulation and respiratory burst activity (10) as well as enhanced LTB<sub>4</sub> production via increased LTA<sub>4</sub> hydrolase expression and activity (66).

We observed in the present study that equine neutrophils underwent morphologic changes after IL-4 stimulation, together with enhanced mRNA expression of IL-8, a glutamate-leucine-arginine (ELR)+ motif CXC chemokine that has potent chemotactic effects on neutrophils. Moreover, we found that supernatants from IL-4-activated neutrophils, but not IL-4 itself, possessed chemotactic activity toward freshly isolated equine neutrophils. We postulated that an autocrine pathway involving IL-4-induced chemotactic factor release by neutrophils is responsible for the above mentioned changes in cellular shape and migration. This is supported by the fact that IL-13, a Th2 cytokine sharing biological homology with IL-4 (40), does not induce human neutrophil chemotaxis but mediates IL-8 release by these cells (27). Similarly, equine neutrophil migration toward IL-4-treated neutrophil culture supernatants was reversed by CXCR2 antagonists, reinforcing the hypothesis that IL-8, and maybe other CXCR2 ligands such as MIP-2 (34), are rapidly released by neutrophils following activation by IL-4. Our results indicate that priming of peripheral neutrophils by antigen challenge further potentiates IL-4-induced IL-8 mRNA expression by these cells, a phenomenon accentuated in asthmatic horses ( $p = 0.06$ ). Interestingly, IL-8 has been implicated in airway neutrophilia in equine heaves (23) and in severe asthmatic patients (57), in

which neutrophils were shown to be the primary source of IL-8 in sputum samples (25). Taken together, these observations suggest that IL-4 could mediate neutrophilia in the asthmatic lung, i.e. where Th2 cytokines are being expressed, via an indirect pathway involving the secretion of chemotactic factors by neutrophils themselves.

Neutrophils express pro-inflammatory cytokines including IL-1 $\beta$ , IL-8 and TNF $\alpha$  which exert paracrine/autocrine effects on their cellular functions (14) and contribute to promoting ongoing inflammation. We demonstrate here, for the first time, the direct effect of IL-4 on differential modulation of the expression of these cytokines in neutrophils, IL-1 $\beta$  being strongly inhibited while IL-8 and TNF $\alpha$  were significantly up-regulated. This pattern of expression is considerably different from “pro-inflammatory” agonists such as LPS or INF- $\gamma$ , which lead to up-regulation of these three cytokines in both human and equine neutrophils (14, 34). Using immunohistochemistry and available specie-specific antibodies, we also report for the first time that TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  are expressed by equine neutrophils at early time points following culture. Results obtained using flow cytometry suggest that transcriptional changes induced by IL-4 on IL-1 $\beta$  expression are reflected at the protein level, as shown also for IL-8 protein expression in the present study using indirect methods in migration assays (CXCR2 blockers). It remains to be determined whether further post-transcriptional regulatory pathways apply to TNF $\alpha$  production by neutrophils, as the protein expression of this cytokine is tightly regulated in other species (5). In agreement with our results, it had been shown that IL-4 stimulation of human neutrophils leads to IL-1ra production (16), an endogenous antagonist of IL-1 $\beta$ . This effect of IL-4 on neutrophils could represent a protective mechanism against uncontrolled inflammation during immune responses and therefore tend to support the concept of Th2 cytokines having anti-inflammatory effects. Interestingly, we found that PBN from asthmatic horses have a significantly decreased expression of IL-1 $\beta$  compared to controls. This phenomenon has been reported in mononuclear cells of patients with atopic dermatitis (49) thus might be more generally related to Th2-driven chronic inflammation. Such “alternative” phenotype featuring a contrasting inflammatory profile is relevant to immune responses leading to excessive tissue repair. Likewise, neutrophils are increasingly recognized as important components of the Th2-driven immune response elicited during parasitic infections (6) in which the aim of inflammation combines fighting the invading microorganism and preserving tissue integrity.

Recent findings demonstrate that IL-4 also regulates the expression of the high affinity receptor for IgEs (FcεRI) on human neutrophils (3), suggesting that neutrophils could intervene in IgE-mediated inflammatory events. Our finding that CD23, the low affinity IgE receptor is also up-regulated by IL-4 in equine PBN, further support a role of neutrophils in allergic inflammation. This molecule, both in its membrane-bound (mCD23) and soluble form (sCD23), is implicated in the regulation of IgE synthesis, antigen processing by antigen presenting cells and inflammatory cytokines production (54). Interestingly, it has been suggested that neutrophil proteases could mediate cleavage of mCD23 (11). Hence, increased sCD23 level is a general feature of chronic inflammation (7), including asthma (39). Neutrophils are thus likely to contribute to sustaining inflammation through an autoregulatory pathway involving CD23. This is of relevance to heaves as local production of allergen-specific IgE in the airways of heaves-affected horses has been reported (28, 56). In addition, we demonstrate here for the first time that IL-4 induces the up-regulation of its own receptor in neutrophils, perhaps again creating a positive feedback mechanism promoting chronic Th2-driven inflammation. In contrast to our expectations, we observed a slight but significant decrease in the level of IL-4Rα mRNA expression in PBN from asthmatic horses when exposed to allergen. In both human asthmatics and equine heaves, the expression of other Th2 cytokine receptors (IL-5 and IL-9) was shown to be increased on PBN (1, 20). We postulate that there may have been a reduction in a subset of IL-4Rα-expressing neutrophils in peripheral blood of these horses consequent to their recruitment to target organs. Alternatively, inhibitory feedback mechanisms affecting the Jak-STAT pathways such as SOCS proteins (29) could have been initiated following Th2-cytokines stimulation of leukocytes in the systemic compartment of asthmatic horses which decreased IL-4Rα at the mRNA level. Results from the present study allowed to infer biological activity of IL-4 on equine neutrophils and to show an effect of disease and environmental changes on transcriptional regulation of pro-inflammatory cytokines and receptors in these cells.

Identification of novel therapeutic targets to control Th2-driven inflammation is an area of intense research. Recent *in vivo* experiments performed by our group suggest a role for MAPK pathway in Th2-driven neutrophilic airway inflammation, as the administration of a MAPK p38 inhibitor delayed the onset of symptoms and reduced neutrophil recruitment to the airways of asthmatic horses (36). Our *in vitro* experiments support and extend previous studies indicating a

role of the MAP kinases in allergic inflammation by showing that p38 is implicated in the up-regulation of CD23 mRNA expression in equine neutrophils. We did not find however agreement between the two different PI3-K inhibitors LY294002 and wortmannin in our experiments. Other studies have shown divergent effects of PI3-K inhibitors (63) where calcium signaling was inhibited by LY294002 whereas wortmannin had no effect.

In conclusion, the results of these *ex vivo* studies suggest that IL-4, a Th2 cytokine, may contribute to the activation of neutrophils during allergic inflammation. This phenomenon involves the regulation of chemokine and cytokine expression by neutrophils including increased IL-8 and TNF- $\alpha$  expression combined with decreased IL-1 $\beta$ . Hence IL-4 generated a mixed inflammatory profile in equine neutrophils that may correspond to the signature of “alternative activation” in Th2-dominated inflammatory states. Furthermore, using a natural animal model of chronic airway diseases, we have shown that neutrophils are systemically activated following allergen exposure and that they have increased responsiveness to IL-4, one of the cytokines shown to be over-expressed in the airways of affected animals. These preliminary findings direct future work aimed at verifying the *in situ* effects and contribution of IL-4 on airway neutrophils and how the commonly used corticosteroid treatment affects this interaction and contributes to decrease disease severity.

### **Acknowledgments**

We would like to thank Dr Stephane Lajoie-Kadoch and Dr Carla Cesarini for their help with experiments involving pharmacological inhibitors and respiratory function testing, respectively. We are grateful to Emma Hamilton for technical support and Éric Laflamme for contribution in animal care and management. This study was founded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Frederick Banting and Charles Best Canada graduate scholarship (A. Lavoie-Lamoureux).

## REFERENCES

1. **Abdelilah S, Latifa K, Esra N, Cameron L, Bouchaib L, Nicolaidis N, Levitt R, and Hamid Q.** Functional expression of IL-9 receptor by human neutrophils from asthmatic donors: role in IL-8 release. *J Immunol* 166: 2768-2774, 2001.
2. **Ainsworth DM, Wagner B, Franchini M, Grunig G, Erb HN, and Tan JY.** Time-dependent alterations in gene expression of interleukin-8 in the bronchial epithelium of horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res* 67: 669-677, 2006.
3. **Alphonse MP, Saffar AS, Shan L, HayGlass KT, Simons FE, and Gounni AS.** Regulation of the high affinity IgE receptor (Fc epsilonRI) in human neutrophils: role of seasonal allergen exposure and Th-2 cytokines. *PLoS ONE* 3: e1921, 2008.
4. **Amrein PC and Stossel TP.** Prevention of degradation of human polymorphonuclear leukocyte proteins by diisopropylfluorophosphate. *Blood* 56: 442-447, 1980.
5. **Anderson P, Phillips K, Stoecklin G, and Kedersha N.** Post-transcriptional regulation of proinflammatory proteins. *J Leukoc Biol* 76: 42-47, 2004.
6. **Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Jr., Stadecker MJ, and Gause WC.** Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol* 7: 975-987, 2007.
7. **Bansal AS, Ollier W, Marsh MN, Pumphrey RS, and Wilson PB.** Variations in serum sCD23 in conditions with either enhanced humoral or cell-mediated immunity. *Immunology* 79: 285-289, 1993.
8. **Bates JH, Shardonofsky F, and Stewart DE.** The low-frequency dependence of respiratory system resistance and elastance in normal dogs. *Respir Physiol* 78: 369-382, 1989.
9. **Bober LA, Waters TA, Pugliese-Sivo CC, Sullivan LM, Narula SK, and Grace MJ.** IL-4 induces neutrophilic maturation of HL-60 cells and activation of human peripheral blood neutrophils. *Clin Exp Immunol* 99: 129-136, 1995.
10. **Boey H, Rosenbaum R, Castracane J, and Borish L.** Interleukin-4 is a neutrophil activator. *J Allergy Clin Immunol* 83: 978-984, 1989.
11. **Brignone C, Munoz O, Batoz M, Rouquette-Jazdanian A, and Cousin JL.** Proteases produced by activated neutrophils are able to release soluble CD23 fragments endowed with proinflammatory effects. *FASEB J* 15: 2027-2029, 2001.

12. **Bullens DM, Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Hellings PW, Dupont LJ, and Ceuppens JL.** IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir Res* 7: 135, 2006.
13. **Cassatella MA.** Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol* 73: 369-509, 1999.
14. **Cassatella MA.** The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 16: 21-26, 1995.
15. **Cordeau ME, Joubert P, Dewachi O, Hamid Q, and Lavoie JP.** IL-4, IL-5 and IFN-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Vet Immunol Immunopathol* 97: 87-96, 2004.
16. **Crepaldi L, Silveri L, Calzetti F, Pinardi C, and Cassatella MA.** Molecular basis of the synergistic production of IL-1 receptor antagonist by human neutrophils stimulated with IL-4 and IL-10. *Int Immunol* 14: 1145-1153, 2002.
17. **Dahinden CA, Zingg J, Maly FE, and de Weck AL.** Leukotriene production in human neutrophils primed by recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and stimulated with the complement component C5A and FMLP as second signals. *J Exp Med* 167: 1281-1295, 1988.
18. **de Kruijf P, van Heteren J, Lim HD, Conti PG, van der Lee MM, Bosch L, Ho KK, Auld D, Ohlmeyer M, Smit MJ, Wijkmans JC, Zaman GJ, and Leurs R.** Nonpeptidergic allosteric antagonists differentially bind to the CXCR2 chemokine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 329: 783-790, 2009.
19. **Debrue M, Hamilton E, Joubert P, Lajoie-Kadoch S, and Lavoie JP.** Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol* 105: 25-31, 2005.
20. **Dewachi O, Joubert P, Hamid Q, and Lavoie JP.** Expression of interleukin (IL)-5 and IL-9 receptors on neutrophils of horses with heaves. *Vet Immunol Immunopathol* 109: 31-36, 2006.
21. **Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, and Pearce N.** Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax* 57: 643-648, 2002.
22. **Fialkow L, Wang Y, and Downey GP.** Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med* 42: 153-164, 2007.

23. **Franchini M, Gill U, von Fellenberg R, and Bracher VD.** Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay. *Am J Vet Res* 61: 1369-1374, 2000.
24. **Frelin C, Imbert V, Griessinger E, Loubat A, Dreano M, and Peyron JF.** AS602868, a pharmacological inhibitor of IKK2, reveals the apoptotic potential of TNF-alpha in Jurkat leukemic cells. *Oncogene* 22: 8187-8194, 2003.
25. **Gibson PG, Simpson JL, and Saltos N.** Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* 119: 1329-1336, 2001.
26. **Girard D, Paquin R, and Beaulieu AD.** Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem J* 325 ( Pt 1): 147-153, 1997.
27. **Girard D, Paquin R, Naccache PH, and Beaulieu AD.** Effects of interleukin-13 on human neutrophil functions. *J Leukoc Biol* 59: 412-419, 1996.
28. **Halliwell RE, McGorum BC, Irving P, and Dixon PM.** Local and systemic antibody production in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. *Vet Immunol Immunopathol* 38: 201-215, 1993.
29. **Hanada T and Yoshimura A.** Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 413-421, 2002.
30. **Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, and Chatila TA.** The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med* 337: 1720-1725, 1997.
31. **Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, and Kracht M.** Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 72: 847-855, 2002.
32. **Huang H, Lavoie-Lamoureux A, Moran K, and Lavoie JP.** IL-4 stimulates the expression of CXCL-8, E-selectin, VEGF, and inducible nitric oxide synthase mRNA by equine pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L1147-1154, 2007.
33. **Jones SL, Sharief Y, and Chilcoat CD.** Signaling mechanism for equine neutrophil activation by immune complexes. *Vet Immunol Immunopathol* 82: 87-100, 2001.

34. **Joubert P, Silversides DW, and 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* 33: 730-733, 2001.
35. **Lavoie JP, Maghni K, Desnoyers M, Taha R, Martin JG, and Hamid QA.** Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1410-1413, 2001.
36. **Lavoie JP, Thompson D, Hamilton E, Debrue M, David F, and Hickey G.** Effects of a MAPK p38 inhibitor on lung function and airway inflammation in equine recurrent airway obstruction. *Equine Vet J* 40: 577-583, 2008.
37. **Leutenegger CM, von Rechenberg B, Huder JB, Zlinsky K, Mislin C, Akens MK, Auer J, and Lutz H.** Quantitative real-time PCR for equine cytokine mRNA in nondecalcified bone tissue embedded in methyl methacrylate. *Calcif Tissue Int* 65: 378-383, 1999.
38. **Lopuhaa CE, Out TA, Jansen HM, Aalberse RC, and van der Zee JS.** Allergen-induced bronchial inflammation in house dust mite-allergic patients with or without asthma. *Clin Exp Allergy* 32: 1720-1727, 2002.
39. **Lorenzo GD, Mansueto P, Melluso M, Morici G, Cigna D, Candore G, and Caruso C.** Serum levels of total IgE and soluble CD23 in bronchial asthma. *Mediators Inflamm* 5: 43-46, 1996.
40. **Magazin M, Guillemot JC, Vita N, and Ferrara P.** Interleukin-13 is a monocyte chemoattractant. *Eur Cytokine Netw* 5: 397-400, 1994.
41. **Marie C PC, Fitting C, Cavillon J M.** Regulation by anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13 and TGF- $\beta$ ) of interleukin-8 production by LPS- and/or TNF-alpha-activated human polymorphonuclear cells. *Mediators of Inflammation* 334, 1996.
42. **Marie C, Pitton C, Fitting C, and Cavillon JM.** IL-10 and IL-4 synergize with TNF-alpha to induce IL-1ra production by human neutrophils. *Cytokine* 8: 147-151, 1996.
43. **Montefort S, Gratziou C, Goulding D, Polosa R, Haskard DO, Howarth PH, Holgate ST, and Carroll MP.** Bronchial biopsy evidence for leukocyte infiltration and upregulation of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules 6 hours after local allergen challenge of sensitized asthmatic airways. *J Clin Invest* 93: 1411-1421, 1994.

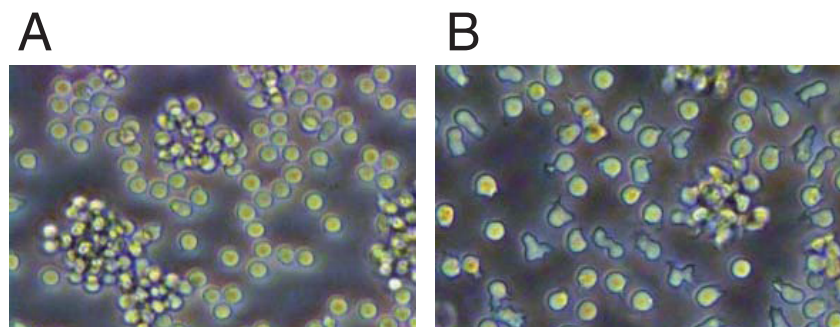


44. **Monteseirin J, Camacho MJ, Gutierrez D, Llamas E, Guardia P, Bonilla I, Sanchez-Monteseirin H, and Conde J.** Neutrophils and allergy. *Allergol Immunopathol (Madr)* 24: 193-200, 1996.
45. **Nelms K, Huang H, Ryan J, Keegan A, and Paul WE.** Interleukin-4 receptor signalling mechanisms and their biological significance. *Adv Exp Med Biol* 452: 37-43, 1998.
46. **Niirio H, Otsuka T, Izuhara K, Yamaoka K, Ohshima K, Tanabe T, Hara S, Nemoto Y, Tanaka Y, Nakashima H, and Niho Y.** Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood* 89: 1621-1628, 1997.
47. **Pirie RS, Collie DD, Dixon PM, and McGorum BC.** Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma). *Clin Exp Allergy* 33: 676-683, 2003.
48. **Pirie RS, Dixon PM, and McGorum BC.** Endotoxin contamination contributes to the pulmonary inflammatory and functional response to *Aspergillus fumigatus* extract inhalation in heaves horses. *Clin Exp Allergy* 33: 1289-1296, 2003.
49. **Rasanen L, Lehto M, Reunala T, Jansen C, and Leinikki P.** Decreased monocyte production of interleukin-1 and impaired lymphocyte proliferation in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 279: 215-218, 1987.
50. **Ratthe C, Pelletier M, Chiasson S, and Girard D.** Molecular mechanisms involved in interleukin-4-induced human neutrophils: expression and regulation of suppressor of cytokine signaling. *J Leukoc Biol* 81: 1287-1296, 2007.
51. **Reglier-Poupet H, Hakim J, Gougerot-Pocidallo MA, and Elbim C.** Absence of regulation of human polymorphonuclear oxidative burst by interleukin-10, interleukin-4, interleukin-13 and transforming growth factor-beta in whole blood. *Eur Cytokine Netw* 9: 633-638, 1998.
52. **Renz H, Jujo K, Bradley KL, Domenico J, Gelfand EW, and Leung DY.** Enhanced IL-4 production and IL-4 receptor expression in atopic dermatitis and their modulation by interferon-gamma. *J Invest Dermatol* 99: 403-408, 1992.
53. **Robinson N.** International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University 16-18 June 2000. *Equine Vet J* 33: 5-19, 2001.
54. **Rosenwasser LJ and Meng J.** Anti-CD23. *Clin Rev Allergy Immunol* 29: 61-72, 2005.

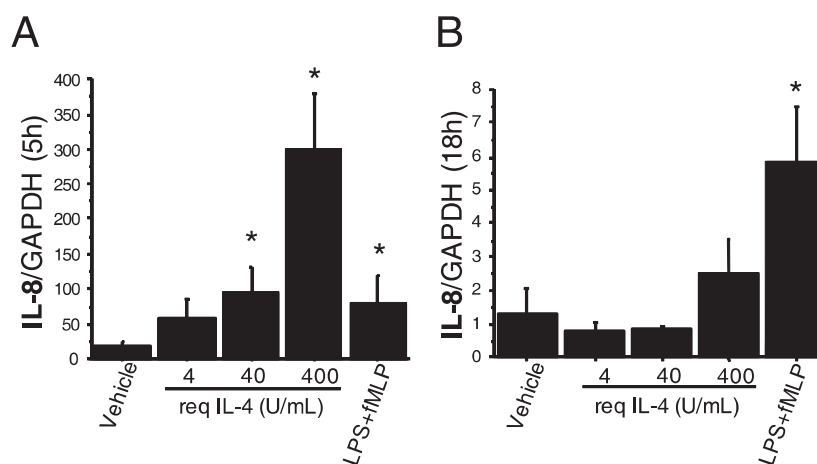
55. **Sampson AP.** The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin Exp Allergy* 30 Suppl 1: 22-27, 2000.
56. **Schmallenbach KH, Rahman I, Sasse HH, Dixon PM, Halliwell RE, McGorum BC, Cramer R, and Miller HR.** Studies on pulmonary and systemic *Aspergillus fumigatus*-specific IgE and IgG antibodies in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Vet Immunol Immunopathol* 66: 245-256, 1998.
57. **Shannon J, Ernst P, Yamauchi Y, Olivenstein R, Lemiere C, Foley S, Cicora L, Ludwig M, Hamid Q, and Martin JG.** Differences in airway cytokine profile in severe asthma compared to moderate asthma. *Chest* 133: 420-426, 2008.
58. **Soussi-Gounni A, Latifa K, Esra N, Cameron L, Bouchaib L, Nicolaides N, Levitt R, and Hamid Q.** Functional expression of IL-9 receptor by human neutrophils from asthmatic donors: role in IL-8 release. *J Immunol* 166: 2768-2774, 2001.
59. **Steinbach F, Stark R, Ibrahim S, Gawad EA, Ludwig H, Walter J, Commandeur U, and Mauel S.** Molecular cloning and characterization of markers and cytokines for equid myeloid cells. *Vet Immunol Immunopathol* 108: 227-236, 2005.
60. **Taube C, Dakhama A, Rha YH, Takeda K, Joetham A, Park JW, Balhorn A, Takai T, Poch KR, Nick JA, and Gelfand EW.** Transient neutrophil infiltration after allergen challenge is dependent on specific antibodies and Fc gamma III receptors. *J Immunol* 170: 4301-4309, 2003.
61. **Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, and Fox DA.** Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 223: 87-113, 2008.
62. **Tillie-Leblond I, Gosset P, and Tonnel AB.** Inflammatory events in severe acute asthma. *Allergy* 60: 23-29, 2005.
63. **Tolloczko B, Turkewitsch P, Al-Chalabi M, and Martin JG.** LY-294002 [2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one] affects calcium signaling in airway smooth muscle cells independently of phosphoinositide 3-kinase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 311: 787-793, 2004.
64. **Wills-Karp M.** Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol* 17: 255-281, 1999.
65. **Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, and Halbwachs-Mecarelli L.** Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80: 617-653, 2000.

66. **Zaitse M, Hamasaki Y, Matsuo M, Kukita A, Tsuji K, Miyazaki M, Hayasaki R, Muro E, Yamamoto S, Kobayashi I, Ichimaru T, Kohashi O, and Miyazaki S.** New induction of leukotriene A(4) hydrolase by interleukin-4 and interleukin-13 in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 96: 601-609, 2000.

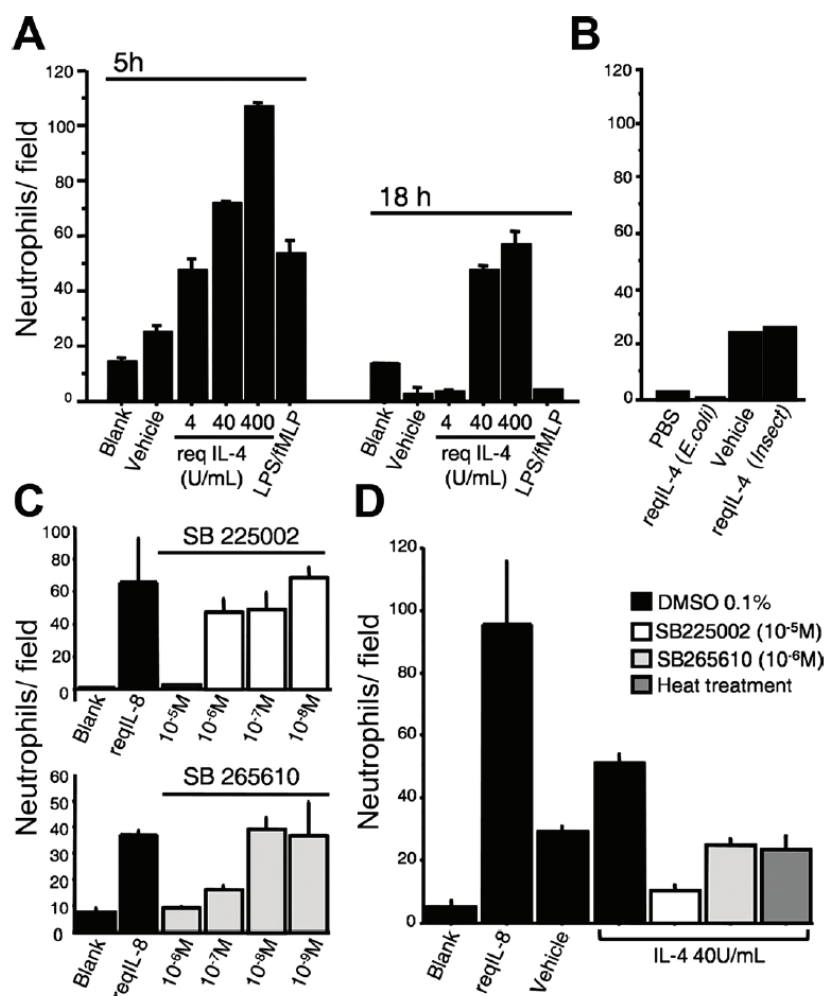
## Tableaux et figures de l'Article #3



**Figure 1.** *IL-4 induces morphologic changes in equine neutrophils.* Representative photographs showing isolated peripheral blood neutrophils cultured for 5 hours in the presence of the vehicle (A) or insect reqIL-4 (40 U/mL) (B). Photographs were taken using a phase-contrast inverted microscope (Leica DM IRM, Wetzlar, Germany).

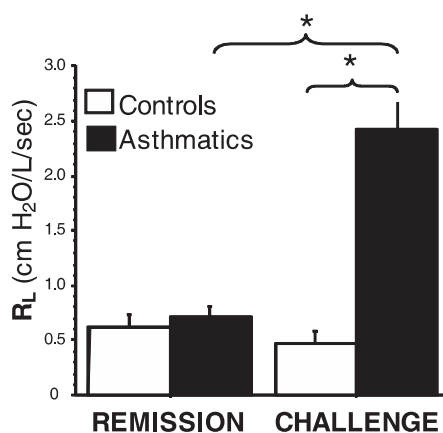


**Figure 2.** *IL-4 induces concentration and time-dependent expression of IL-8 mRNA in equine neutrophils.* Neutrophils were isolated from the blood of healthy horses using density gradient centrifugation and cultured in the presence of the vehicle (volume corresponding to 40U/mL reqIL-4), insect reqIL-4 (4, 40 or 400 U/mL) or bacterial extracts (LPS 100ng/mL + fMLP  $10^{-8}$ M) for 5 (A, n = 4) or 18h (B, n = 4). IL-8 mRNA expression was quantified using real time PCR. Absolute values were corrected relative to GAPDH expression. Ratios are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* Significant effect of treatment (IL-4 or bacterial extracts versus vehicle,  $p < 0.05$ )



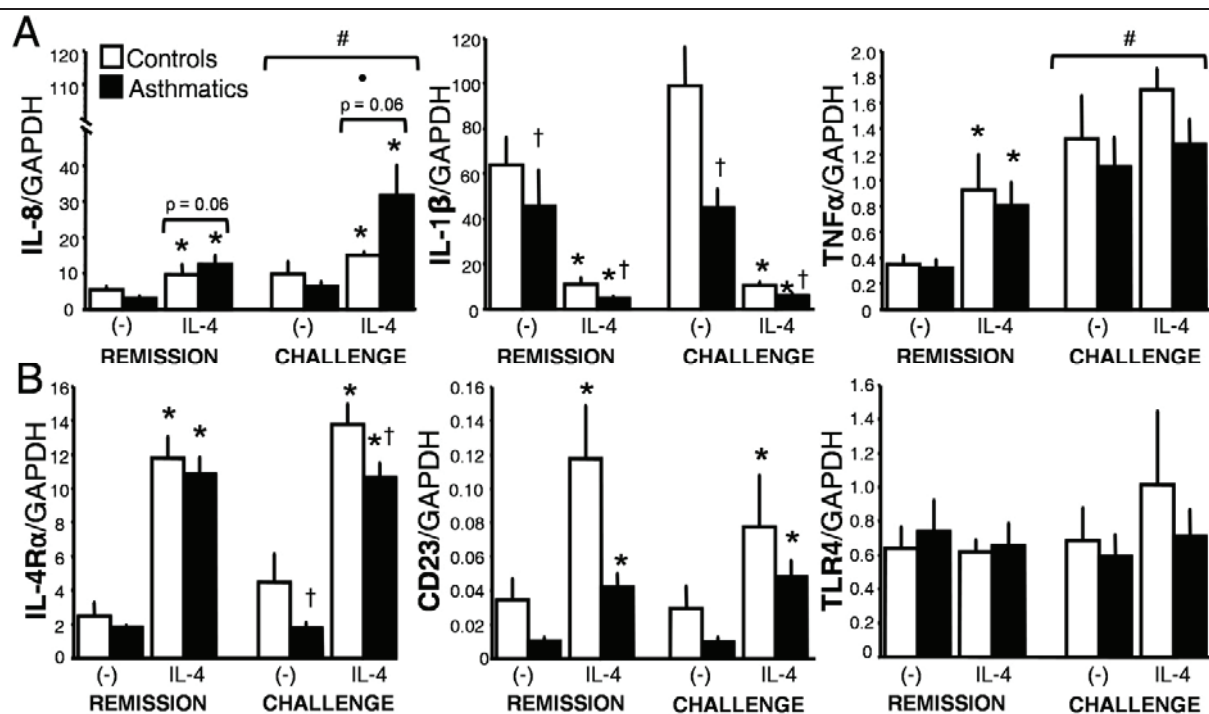
**Figure 3.** IL-4 induces the release of CXC chemokines receptor (CXCR)-2-ligands by equine neutrophils in culture supernatants. A 48-well chemotaxis chamber was used to test the chemotactic activity of culture supernatants derived from dose- and time-titration experiments. **A.** Culture supernatants from vehicle (10 $\mu$ L/mL), reqIL-4 (4, 40, 400 U/mL) or LPS (100ng/mL)+fMLP (10<sup>-8</sup>M)-treated neutrophils derived from two separate experiments performed at each time points –5h (n = 2) and 18h (n = 2)– were thawed on ice and placed in triplicates in the bottom wells of the chamber. **B.** Representative experiment showing the lack of effect of freshly diluted reqIL-4 in supplemented RPMI on neutrophil chemotaxis. *E. coli* reqIL-4 (10 ng/mL in PBS), *Insect* reqIL-4 (40 U/mL, i.e.10 $\mu$ L/mL) and their respective vehicles in similar concentration were placed in the bottom chambers and their chemotactic activity was compared as described above. **C.** Representative results from dose titration assays with the CXCR-2 inhibitors SB225002 and SB265610 performed in triplicates. Briefly, equine neutrophils were incubated on ice for 30 min prior to migration

toward reqIL-8 (10ng/mL), a prototypical CXCR2 ligand. **D.** The effect of pre-treatment with SB 225002 ( $10^{-5}$ M) and SB265610 ( $10^{-6}$ M) or heat-treatment ( $100^{\circ}\text{C}$ , 5 min) of culture supernatants from IL-4-stimulated neutrophils (40U/mL, 5h) on chemotactic activity was assessed in quadruplicates. Blank corresponds to PBS alone. Chemotactic activity of the supernatants is expressed as mean  $\pm$  SEM number of migrated neutrophils per magnification field.



**Figure 4.** Asthmatic horses but not healthy control horses develop airway obstruction following antigenic challenge.

Respiratory mechanics were performed on control ( $n = 4$ ) and asthmatic ( $n = 6$ ) horses to assess pulmonary function while the animals were at pasture (remission) or stabled in the presence of mouldy hay (30-day antigen challenge). Pulmonary resistance ( $R_L$ ) was obtained from measuring airflow rates and transpulmonary pressures. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* Significant differences between the means ( $p < 0.05$ ).

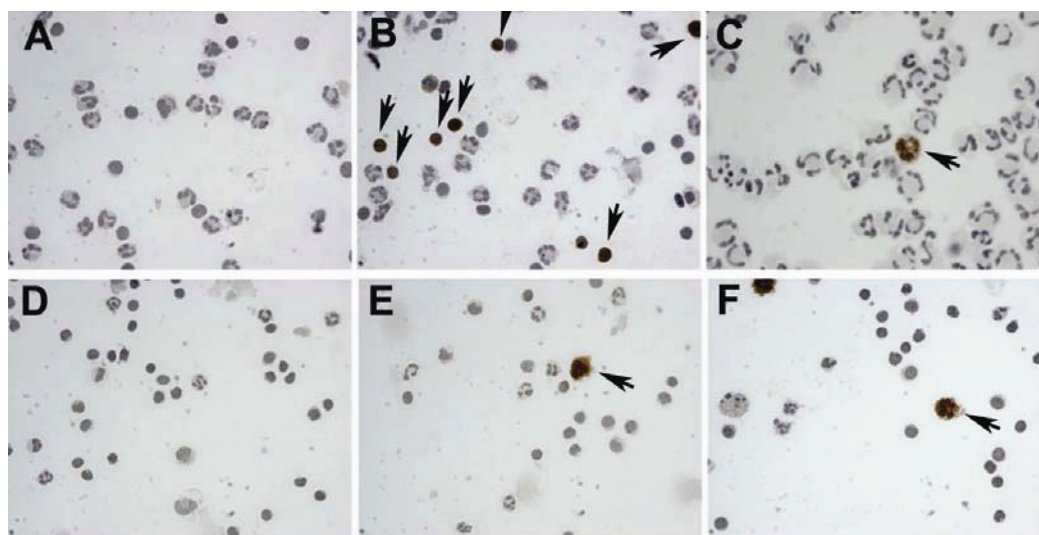


**Figure 5.** Differential mRNA expression in peripheral blood neutrophils from asthmatic and control horses following culture with *reqIL-4* for 5 hours. Peripheral blood from each horse was collected at time of remission and following a 30-day antigenic challenge. Neutrophils were purified using paramagnetic microbeads (MACS) and incubated with the vehicle (-) or insect *reqIL-4* (40 U/mL) for 5 hours at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Following culture, gene expression of (A) pro-inflammatory cytokines (IL-8, IL-1β, TNF-α) and (B) receptors (IL-4Rα, CD23, TLR4) was quantified using real-time PCR and gene-specific primers. Absolute values were corrected relative to GAPDH expression. Ratios are expressed as mean ± SEM. \* Significant effect of IL-4 over vehicle ( $p < 0.05$ ). † Significant difference between groups ( $p < 0.05$ ). # Significant effect of antigen challenge ( $p < 0.05$ ). (○) Outlier value.

**Table 1.** P values corresponding to the effect of treatment with reqIL-4, antigenic challenge and disease on relative gene expression by PBN.

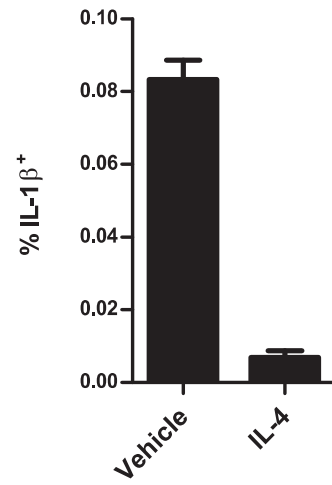
	P values*					
	Tx †	Ag ‡	Gr §	Gr*Tx <sup>a</sup>	Gr*Ag <sup>a</sup>	Tx*Ag <sup>a</sup>
IL-1 $\beta$	<0.001	0.14	0.03	0.99	0.83	0.42
IL-8	<0.001	0.02	0.64	0.06	0.99	0.09
TNF- $\alpha$	<0.001	<0.001	0.38	0.72	0.72	0.002
IL-4R $\alpha$	<0.001	0.07	0.10	0.18	0.04	0.08
CD23	<0.001	0.26	0.13	0.33	0.56	0.56
TLR4	0.41	0.89	0.71	0.64	0.55	0.02

\*Differences were considered significant when  $p < 0.05$ . †(Tx) Treatment of neutrophils with insect reqIL-4, ‡(Ag) Antigen challenge, §(Gr) Group; asthmatic *versus* normal. <sup>a</sup>Statistical interactions between parameters.



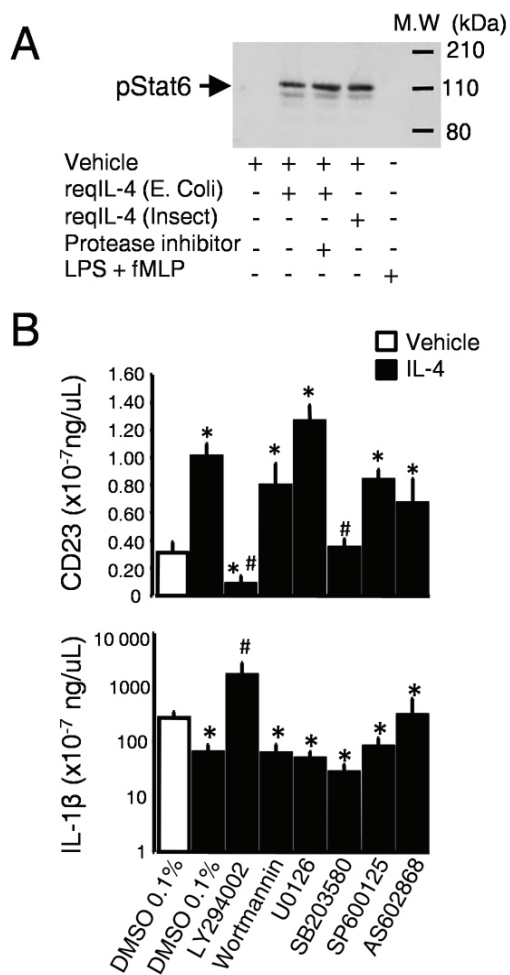
**Figure 6.** Detection of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in equine neutrophil using immunocytochemistry. A23187 (500ng/mL, 5h)-stimulated total blood leukocytes stained using isotype-matched control antibody (A) or goat anti-equine TNF $\alpha$  (5 $\mu$ g/mL, positive control for TNF $\alpha$  staining). Arrows shows that mostly lymphocytes are positives for TNF $\alpha$  (B). C. TNF $\alpha$ <sup>+</sup> equine neutrophil detected in IL-4-supplemented cell cultures (500ng/mL, 5h). Representative of separate experiments performed with neutrophils isolated from two horses. D. Negative control for IL-1 $\beta$  staining using isotype-matched control antibody on total blood leukocytes stimulated with LPS (5 $\mu$ g/mL, 5h). E. Representative positive staining on a monocyte using anti-equine IL-1 $\beta$  antibody. F. IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> neutrophil in LPS-stimulated mixed blood leukocytes.





**Figure 7.** Intracellular detection of IL-1 $\beta$  in IL-4 stimulated neutrophils using flow cytometry. Equine neutrophils were stimulated for 5h with reqIL-4 (100ng/mL) in the presence of brefeldin A (10ug/mL) and double stained for intracellular IL-1 $\beta$  (rat anti-equine IL-1 $\beta$ ) and extracellular equine neutrophil marker (DH24A, mouse IgM). The percentage of double positive cells is represented as mean  $\pm$  SEM (n = 2 horses).

---



**Figure 8.** *STAT-6, PI3-K and p38 MAPK are involved in IL-4 signalling pathway in equine neutrophils.*

**A.** Western blot analysis was performed to verify STAT-6 activation in equine neutrophils following incubation with reqIL-4. Neutrophils were isolated from normal horses using density gradient centrifugation, suspended in PBS supplemented with 10% FBS and stimulated or not with reqIL-4 from commercial source (*E. coli*), non-commercial source (*Insect*) or with bacterial extracts (LPS 100ng/mL + fMLP 10<sup>-8</sup>M). Following incubation, the cells were homogenised in M-PER lysis solution and total proteins were extracted in the presence of phosphatase inhibitor cocktail with or without protease inhibitors. STAT6 activation corresponds to the detection of a 110 KDa band using an anti-phosphoSTAT6 antibody (Tyr641).

**B.** Purified neutrophils from healthy horses were preincubated for 1h with pharmacological inhibitors of PI3-kinase (LY294002, 10μM; wortmannin, 50nM), MAPK p38 (SB203580, 10μM), MEK1/2 (U0126, 2.5μM) for ERK inhibition and JNK (SP600125, 5μM) or with a specific inhibitor of IKK2 (AS602868, 10μM). Pretreated neutrophils were further incubated for 5h in the presence of the vehicle or insect reqIL-4 (40U/mL) and DMSO (0.1% final concentration). Analysis of CD23 and IL-1β mRNA expression, genes that are either up-regulated or down-regulated by IL-4 respectively, was performed using real-time PCR. Absolute values are expressed as mean ± SEM (n = 4-5). \* Significant difference from vehicle/DMSO-treated neutrophils (p < 0.05). # Significant difference from reqIL-4/DMSO-treated neutrophils (p < 0.05)

## Article #4

### *Neutrophilic inflammation and airway obstruction in equine asthma is associated with elevated expression of arginase isoforms 1 and 2.*

#### Sommaire

L'activité de l'arginase peut contribuer à diminuer la production de NO, un bronchodilatateur, et pourrait favoriser le remodelage tissulaire en générant des produits impliqués dans la prolifération cellulaire et la synthèse de collagène.

L'expression d'arginase 1 est induite par les cytokines de type Th2 chez les macrophages et les neutrophiles de souris et contribue aux changements physiopathologiques chez les modèles murins d'asthme allergique.

Chez l'homme, l'arginase 1 est exprimé constitutivement par le neutrophile et a été impliquée dans plusieurs contextes associés à l'inflammation chronique des tissus.

Dans cet article, l'expression et la régulation des deux isoformes de l'arginase par les neutrophiles a été évaluée chez le cheval. Leur expression au niveau pulmonaire a aussi été étudiée chez des chevaux normaux et atteints du souffle.

#### **Contributions originales**

Ma contribution sera de 100% à toutes les manipulations expérimentales sauf pour les procédures cliniques associées aux lavages bronchoalvéolaires (33%), mécaniques respiratoires (10%), extraction d'ARN à partir des biopsies thoraciques et synthèse de cDNA (0%). Je participerai à 80% à la rédaction de l'article.

Article en préparation pour soumission dans *PlosOne*.

**Neutrophilic inflammation and airway obstruction in equine asthma is associated with elevated expression of arginase isoforms 1 and 2.**

**Running head: Arginase expression in neutrophilic inflammation**

Anouk Lavoie-Lamoureux<sup>1</sup>, James G. Martin<sup>2</sup> and Jean-Pierre Lavoie<sup>1§</sup>.

<sup>1</sup> Faculté de médecine vétérinaire, Dép. de sciences cliniques, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Canada.

<sup>2</sup> Meakins-Christie Laboratories, McGill University, Montreal, Canada.

<sup>§</sup>Corresponding author

Jean-Pierre Lavoie

3200 rue Sicotte

St-Hyacinthe, Québec, Canada. J2S 2M2

Fax: [REDACTED]

[REDACTED]

**ABSTRACT**

**Background.** Increased activity of the L-arginine metabolism may contribute to the airway obstruction and remodeling associated with asthma. Species differences in arginase isoform expression suggest that in humans, neutrophils may be the principal leukocytes responsible for arginase expression at sites of inflammation.

**Objectives.** Investigate arginase isoforms expression in neutrophils and in the lungs of horses with neutrophilic asthma-like disease (heaves).

**Methods.** The expression of arginase isoforms was studied in blood, airway neutrophils, and peripheral lung biopsies obtained from horses-affected with heaves or equine asthma (n = 4-6) and compared to normal horses using quantitative PCR, western blot and enzyme activity assay.

**Results.** Equine neutrophils constitutively express the arginase isoform 2 and the polyamines and L-proline catalyzing enzymes ornithine decarboxylase (ODC) and ornithine aminotransferase (OAT), respectively. Arginase activity was detected in these cells and significantly reduced by Nor-Noha (1mM), a specific arginase inhibitor. Arginase 1 mRNA expression was detected in 5 of 6 heaves-affected horses' peripheral lung tissues compared to 1 of 5 control horses. Arginase 2 mRNA levels in peripheral lung was significantly increased in both groups after antigen exposure, however the fold increase was significantly higher in heaves-affected horses compared to controls.

**Conclusions.** The expression of arginase 2, ODC and OAT by equine neutrophils indicates that they may contribute to airway constriction and remodeling associated with heaves. Despite species difference in arginase expression and regulation, the equine model of severe asthma further supports a role of the L-arginine metabolism in the pathogenesis of chronic airway diseases.

**Key words:** arginase, asthma, neutrophils, equine asthma model, ornithine decarboxylase, ornithine aminotransferase, airway remodeling, inflammation, airway hyperreactivity.

## BACKGROUND

Increased L-arginine metabolism is a feature of chronic inflammation in various pathological states including asthma (37) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (57). During chronic inflammation, the L-arginine consumption is augmented by an increased arginase activity by inflammatory and/or structural cells. Recent findings indicate that arginase could contribute to the pathologic changes associated with asthma through cell proliferation and differentiation, and tissue fibrosis (37). Indeed, L-arginine is converted into urea and L-ornithine, the latter being metabolized through the ornithine aminotransferase (OAT) and ornithine decarboxylase (ODC) pathways into L-proline and polyamines (putrescine, spermidine and spermine) (61), respectively. L-proline is an essential constituent of collagen fibers known to be deposited in elevated amounts during repair processes and lung fibrosis associated with asthma (53). Polyamines are required for cell proliferation and differentiation (48) as they promote histone acetyltransferase (HAT) activity and chromatin hyperacetylation (18). Polyamines have also been recently implicated in angiogenesis (26), another remodeling process occurring in the asthmatic lung (11). Thereby, down-stream products of the L-arginine metabolism may contribute to the proliferation and migration of structural cells including fibroblasts (59), endothelial (26) and smooth muscle cells (19, 34) in addition to promoting fibrosis at site of chronic inflammation. Moreover, arginase competes with constitutive (cNOS, NOS1) and endothelial (eNOS, NOS3) nitric oxide synthase for cellular uptake of L-arginine (41). Thus, increased arginase activity limits the production of nitric oxide (NO), an important endogenous bronchodilator (52) that also possesses anti-inflammatory properties (8). Indeed, eNOS-derived NO was shown to inhibit NF- $\kappa$ B activity through S-nitrosylation of the DNA-interacting p50 subunit (39) and suppression of I $\kappa$ B phosphorylation and degradation (10).

The two arginase isoforms, arginase 1 and 2, are encoded by different genes (9). Arginase 1 is cytosolic and is highly expressed in the liver, but is also present in other cell types. Arginase 2 is localized to the mitochondria and is constitutively expressed in many tissues, with high expression in the kidneys. Both enzymes exert similar metabolic functions as they share 100% sequence homology in amino acid areas critical for enzymatic function (9). In the human lung, arginase 1 is expressed by epithelial cells (7, 57, 62), fibroblasts (7), endothelial cells (57), smooth muscle cells (7, 57), and inflammatory cells (57) including granulocytes (62).

Studies performed in rodents have suggested an important role of L-arginine metabolism in asthma (22, 38, 46, 62). Zimmermann *et al* (62) have shown that arginase 1 up-regulation in the mouse lungs is induced by allergen challenges (ovalbumin and *Aspergillus fumigatus*), and can be mimicked by T helper type 2 (Th2) cytokines (IL-4 transgenic mice, intranasal IL-13 administration) to the lungs. This phenomenon was shown to be STAT6-dependant. Arginase 1 expression by rat and mouse macrophages is up-regulated by Th2 cytokines (35, 43), and this gene is part of the transcriptome signature of *alternatively activated macrophages* (AAM $\phi$ ) of murine origin (14, 15). Hence, enhanced expression of arginase 1 is believed to be associated with Th2 cytokine-driven allergic inflammation. However, while macrophages were found to be major cell types responsible for the increased arginase 1 expression in murine asthma models (46, 62), human AAM $\phi$  do not up-regulate arginase 1 expression following IL-4 or IL-13 stimulation (50). In fact, human neutrophils are the principal leukocytes responsible for arginase 1 expression at the site of inflammation in several chronic conditions including parasitic infection, ulcers, pregnancy and cancer (23, 25, 45, 54). Chépoki *et al* demonstrated that arginase 1 expression by murine leukocytes (macrophages and neutrophils) is induced by, and dependent on, Th2 cytokines (and STAT6 activation), whereas it is constitutive and restricted to neutrophils in humans (44). Hence, extrapolations from findings in rodents may not be appropriate when studying the contribution of arginase metabolism to human asthma.

As neutrophilic inflammation is common in severe asthma (47), and as neutrophils may be responsible for arginase expression at sites of inflammation in humans, we postulated that the release of arginase 1 by neutrophils may possibly amplify the airway obstruction and participate lung tissue remodeling. We first explored the expression of arginase isoforms by equine neutrophils. This species was chosen as horses are affected by heaves, a natural asthma-like condition characterized by lower airway obstruction, neutrophilic inflammation, and a Th2-type cytokines expression (12, 28). Remodeling of the airways is a prominent feature of equine asthma and includes increased smooth muscle mass (17) and possibly, increased collagen deposition (55). Therefore, we also explored arginase isoforms expression in peripheral lung biopsies of control and heaves-affected horses before and after a 30-day antigen challenge and its association with lung function.

## **METHODS**

### **Subjects**

Heaves-affected horses (n = 4-6) and control healthy horses were studied (n = 4-5). Diagnosis of heaves was based on history of reversible airway obstruction and neutrophilic inflammation upon antigenic exposure with hay dust. Samples were collected while heaves-affected horses were in clinical exacerbation of the disease ( $\geq 3$  weeks antigenic exposure with moldy hay and straw) and during clinical remission, i.e. while maintained in low dusts environment (pasture  $> 3$  months). All experimental procedures were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council for Animal Care and were approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal. Peripheral blood samples collected from 2 healthy human volunteers served as control for the methodological procedures. The use of human samples was approved by the Research Ethic Committee of the Faculty of Medicine of the Université de Montréal.

### **Neutrophil isolation and culture conditions.**

Centrifugation on a density gradient of Lympholyte-poly® (sodium metrizoate and Dextran 500, Cedarlane Laboratory Limited) was used to isolate equine and human peripheral blood neutrophils. Briefly, blood was drawn into sterile heparinized tubes (BD Vacutainer) and the polymorphonuclear-rich cell layer was harvested following centrifugation of whole blood according to manufacturer's instructions. The remaining red blood cells were lysed by hypotonic treatment. In some experiments, immunomagnetic selection of equine neutrophils was used (MACS) in order to achieve optimal levels of cell purity, as reported previously (21). After sedimentation of blood for 1h at room temperature, neutrophils were retrieved from the leukocyte-rich supernatant by sequential incubation with primary monoclonal antibody (#DH24A, VMRD Inc.) and secondary rat anti-mouse IgM antibody conjugated to paramagnetic microbeads (MACS, Miltenyi Biotec) before being loaded on a ferromagnetic LS separation column (MACS, Miltenyi Biotec).

Cytospin slides were prepared (Cytospin2, Shandon) and stained with Protocol Hema 3 (Fisher Scientific) for differential counting of  $\geq 400$  cells to assess neutrophil purity. Viability was determined by trypan blue exclusion. The purity and viability of neutrophils were  $98.1 \pm 0.2\%$  and



97.8 ± 0.7%, respectively, when isolated using MACS and 93.5 ± 1.1% and 98.3 ± 0.4% (mean ± SEM) respectively using density gradient.

### **Lung biopsy, bronchoalveolar lavage (BAL) and respiratory mechanics**

The lung samples were acquired in the course of another study that has been published elsewhere (29). Briefly, peripheral lung biopsies (caudodorsal) were obtained by thoracoscopy (51). Samples were maintained in ice-cold saline while dissected and lung pieces were immediately snap-frozen in liquid nitrogen. Bronchoalveolar lavages (BAL) was performed on sedated horses as described previously (28) using two 250-mL boluses of isotonic saline instilled into a main bronchus using a videoendoscope. Recovered fluid was kept on ice until processed (within 1 hour). Respiratory mechanics were performed as previously described (12). Briefly, pleural pressure measured using a esophageal catheter and flow rates obtained using a heated pneumotachograph served to calculate values of elastance and resistance (single compartment model)(5).

### **qPCR**

RNA extraction from Trizol® Reagent and reverse transcription was performed as described elsewhere (27) using 0.5 – 2 µg of total RNA. Frozen peripheral lung biopsies were homogenized in lysis buffer (4 M guanidium isothiocyanate, 0.5% Na-N-laurylsarcosine, 25mM Na-citrate, pH7, 0.1 M 2β-mercaptoethanol) using a tissue homogenizer. Total RNA was extracted on a cesium chloride cushion (6). SMART PCR cDNA synthesis technology (BD Biosciences Clontech) was used to generate cDNAs from 1 µg of total RNA (30).

Real-time PCR was performed using QuantiTect® SYBR® Green PCR kit (QIAGEN) (27) on the Rotor-Gene Real-Time Centrifugal DNA Amplification System (Corbett Research). Primers pairs were as following (5'→3'): arginase 1.S (Sense) TCCACCCGGATCTCTGTGTCATTT and arginase 1.AS (Anti-Sense) TTTGGCAGATAGGCAGGGAGTCAT; arginase 2.S GCTGTAAGAGAAGCTGGCTTGATG and arginase 2.AS CCCACTGAGCGAGGATTCAT ; ODC. S CTGCCAAGGACATTCTGGACCAAA and ODC.AS TTCAGTCTTGCTGGCACAGTCA; OAT.S ACCGCTTGCAAATTGCTCGTA and OAT.AS GAATGCGGCAACATTTGGATCCTG; GAPDH.S AAGTGGATATTGTCGCCATCAAT and GAPDH.AS AACTTGCCATGGGTGGAATC. GAPDH was used as a reference gene (31). Quantification of gene expression was performed using gene specific standard curves using a calibrator reference in the

target run. Amplification conditions were as follow: 95°C 10 min followed by 50 (up to 60) cycles of denaturation (95°C, 15 sec), annealing (55°C for arginase 1 and 2, 56°C for ODC and OAT; 25sec) and elongation (72°C, 20 sec). Amplification conditions for GAPDH were similar except for annealing (61°C, 25 sec). Primers were designed to span exon-intron boundaries in order to prevent amplification of genomic DNA.

### **Western blot**

Ten million neutrophils per test were pre-treated with 5mM DFP (2) (diisopropylfluorophosphate, 0.5M stock in isopropanol, Calbiochem) for 10 min on ice then centrifuged at 200g for 5 min. The cell pellet was lysed in 150 µL lysis buffer (25 mM Tris-HCL pH 7.5, 0.5% Triton X-100, Sigma-Aldrich protease inhibitor cocktail 1:100, Pierce Halt™ Phosphatase Inhibitor Cocktail 1:100, 1mM PMSF, 1mM DFP) on ice for 30 min, then centrifuged at 14000g for 15 min at 4°C. Supernatants were immediately frozen and stored at -80°C until analysis. The same protocol was used to extract proteins from snap frozen control tissues (equine kidney and liver, Brown Norway rat kidney) and peripheral lung biopsies, all homogenized in lysis buffer at approximately 0.1g/mL. SDS-PAGE was performed as previously described (27) using equal amounts of proteins (50µg/lane for neutrophils and control tissues, 150 µg/lane for lung samples). After electrophoresis, proteins were transferred onto PVDF membranes at 20V for 6.5 min using the iBlot® Dry Blotting System, Invitrogen. Western blotting was performed as described (27). Membranes were blotted overnight at 4°C with gentle agitation against anti-human/rat arginase 1 (sc-18351 or sc-20150, 1:1000 in blocking solution containing 1X TBS, 0.1% Tween-20 with 5% w/v nonfat dry milk) or anti-human/rat arginase 2 (sc-20151, 1:1000). Anti-β-actin (sc-47778, 1:50 000) was used as a loading control (incubation at room temperature for 45 min). All antibodies were from Santa Cruz®Biotechnology. Membranes were washed with 0.1% (v/v) Tween 20 in TBS (pH 7.5) and incubated with a 1:2000 dilution of goat anti-rabbit IgG-HRP IgG Abs (#7074, CellSignaling Technology®) or HRP-conjugated donkey anti-goat IgG-HRP Abs (sc-2020, Santa Cruz®Biotechnology) for 2h at room temperature.

### **Arginase activity**

Arginase activity was assessed in protein samples extracted from cells and tissues as described for western blotting using the Quatichrom™ Arginase assay kit from BioAssay Systems (CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 40  $\mu$ L of protein samples were incubated with L-arginine and manganese-containing buffer for 2h at 37°C. The conversion of L-arginine into urea by arginase was obtained by reading the optical density of samples at 520nm 20 minutes after adding the urea reagent. In some experiments, the specific activity of arginase was assessed in the presence of the arginase inhibitor nor-Noha (N<sup>ω</sup>-hydroxy-nor-arginine, 25mM stock in DMSO, Cayman Chemicals, MI, USA) in concentrations ranging from 0.01mM to 1mM (final DMSO 4%, v/v). Calculation of arginase activity considers the OD of each samples incubated without L-arginine (blank) as well as water OD (protein diluent) and refers to the OD of urea standard (1mM) included in each test. Arginase activity is expressed as units per liter (U/L) or units per g of protein (U/g). One unit of arginase converts 1  $\mu$ mole of L-arginine to ornithine and urea per minute at pH 9.5 and 37°C. Serial dilutions of protein extracts from the different tissues were first assayed to determine the range of arginase activity in each of them. An equal amount of protein was afterwards compared between treatments (arginase inhibition assay) or between animals (neutrophils, lung biopsies). Recombinant human arginase 1 (rhArg1, Alexis Biochemicals, AXXORA, CA, USA) was used as a positive control. All protein samples were diluted in order to generate an enzymatic activity between 1 and 40 u/L.

### **Statistics**

Statistical analysis was done using Graphpad Prism 5 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Student paired *t*-tests were used to assess the effect of nor-Noha on arginase activity in protein extracts from equine neutrophils and to compare normalized arginase 2 expression in peripheral blood neutrophils between time of sampling in a group (before and after antigen challenge). Unpaired *t*-tests were used to compare neutrophil gene expression between control and heaves-affected horses or between BAL cells and peripheral blood neutrophils from heaves-affected horses. The mean fold increases in arginase 2 expression between control and heaves-affected horses was compared using an unpaired *t*-test with Welch's correction. Gene expression in peripheral lung tissues was evaluated on log transformed data using a repeated measures two-way ANOVA with group and time as main effects. Linear regression analysis was performed to

assess associations between lung mechanics and arginase 2 mRNA expression in peripheral lung biopsies. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

### **Arginase 1 and 2 expression by equine neutrophils**

In horses, Arg1 and Arg2 have been located by computational analysis on chromosomes 10 [NCBI Reference Sequence: XM\_001503285] and 24 [XM\_001499892], respectively. Their expression in equine neutrophils was explored using real-time PCR and compared to positive control tissues, i.e. equine liver and kidney for arginase 1 and 2, respectively. Also, cDNA samples from the lung of a horse euthanized because of severe heaves symptoms were investigated. Arginase 1 could be detected in normal horse liver and lungs of a horse affected with heaves but not in normal equine neutrophils (Figure 1A) or those from diseased animal (not shown). Messenger RNA for Arginase 1 was not found in mononuclear nor in polymorphonuclear cells isolated from a normal horse bone marrow aspirate (sternum) using gradient centrifugation on Lympholyte®-poly (not shown). This finding contrast with the strong expression of arginase 1 by human bone marrow neutrophil precursors (20). In mice, arginase 1 expression was shown to be induced by Th2 cytokines (44) and to be STAT6-dependent. Incubation of normal equine neutrophils with recombinant equine IL-4 up to 18h at a dose shown to activate STAT6 in these cells (40u/mL)(27) failed to induce arginase 1 expression (Figure 1B). However, arginase 2 was strongly expressed by normal equine neutrophils when compared to kidney extracts (approx. 100 fold, Figure 1A) and was also found in the equine asthmatic lung. The mRNA expression of arginase isoforms was confirmed at the protein level using Western blot (Figure 2). The validation of our technical procedures was confirmed by demonstrating the expression of arginase 1 in human neutrophils (Figure 2). The presence of two bands around 40KDa in equine kidney extract is likely to represent the detection of the precursor and mature form of arginase 2, as the putative NH<sub>2</sub>-terminal mitochondria-targeting presequence is processed upon importation into mitochondria (16) or may correspond to a non-specific detection. Alternatively, this may correspond to forms of arginase homotrimers with different subunits properties (49).

### **Equine neutrophils express both ornithine decarboxylase (ODC) and ornithine aminotransferase (OAT) enzymes**

ODC and OAT were found to be transcribed in highly purified normal equine neutrophils. Figure 3 shows PCR products electrophoresis after 40 amplification cycles. Quantitative analysis

revealed a strong absolute (gene concentration per ug of reverse-transcribed mRNA) and relative (gene expression corrected for GAPDH expression) gene expression of both enzymes by equine neutrophils. Thus, the absolute OAT expression in neutrophils was 37.8 and 69.9 fold higher than liver and kidney, respectively, and the absolute ODC expression in neutrophils was 5.5 and 9.2 fold higher than liver and kidney, respectively.

### **Arginase activity in equine neutrophils**

We confirmed the presence of arginase in normal equine neutrophils using a quantitative colorimetric arginase activity assay. Arginase activity was detected in protein extracts (10 µg) of neutrophils isolated from 4 horses ( $61.94 \pm 28.46$  U/g, range 12.00 – 110.60 U/g). This activity was 2 fold greater than that detected in equine kidney tissue ( $26.48 \pm 3.41$  U/g, n = 3 independent experiments). Arginase activity in liver ( $1089.00 \pm 88.66$  U/g, n = 3 independent experiments) and in human neutrophils ( $741.20 \pm 112.9$  U/g, n = 2 healthy volunteers) were comparable or higher than previously reported (1, 44). The specificity of enzymatic activity detected in neutrophils was tested using nor-Noha, a specific inhibitor of arginase. A dose-dependent inhibition effect of nor-Noha was observed on rhArg1 at 0.1mM ( $71.69 \pm 10.06$  %) and 1 mM ( $18.84 \pm 3.95$  %), respectively, compared to control samples containing 4% final concentration DMSO (v/v) (Figure 4A). From these experiments, 1mM nor-Noha was chosen to assess equine neutrophil protein samples. Figure 4B shows the significant inhibitory effect of nor-Noha on enzymatic activity detected in equine neutrophils (n = 4, p = 0.01), confirming the presence and activity of arginase in these cells.

### **Arginase expression in heaves: peripheral lung biopsies**

Arginase 1 mRNA was detected in duplicate samples of 6 peripheral lung biopsies over 22 (Figure 5A), preferentially in horses affected with heaves (5 of 6 heaves-affected horses and 1 of 5 controls). Only the lungs of one horse with heaves were positive for arginase 1 both before and after antigenic challenge. Arginase 2 was detected in all lung biopsies and was significantly up-regulated by antigenic stimulation (p = 0.004; Figure 5B), with a significant interaction between group and challenge (p = 0.046). Indeed, the amplitude of arginase 2 up-regulation was significantly higher in heaves-affected horses' biopsies (p = 0.004, Figure 5C). Moreover, arginase

2 expression in the peripheral lung of horses with heaves after antigenic challenge was associated with lung elastance ( $r^2 = 0.65$ ,  $p = 0.053$ , **Figure 5D**) and surprisingly, tightly associated with respiratory frequency ( $r^2 = 0.92$ ,  $p = 0.003$ , **Figure 5D**). No association between arginase 2 expression and lung resistance or transpulmonary pressure swings was found (not shown). The protein expression of arginase 1 and 2, and arginase enzymatic activity were detected in peripheral lung from 2 controls and 3 heaves-affected for which peripheral biopsies were available for protein extraction (**Figure 6**). These preliminary results support the mRNA expression data and suggest that higher arginase expression and activity may be associated with chronic airway inflammation and obstruction in horses.

## DISCUSSION

This is, to our knowledge, the first study exploring the role of arginase in a large animal model of chronic asthma. Heaves is a naturally occurring disease of horses presenting pathologic features commonly associated with increased arginase activity, i.e. exaggerated inflammation, tissue remodeling including increased smooth muscle mass (17) and fibrosis (55) as well as airway hyperresponsiveness and bronchoconstriction following allergen challenge. The inflammation in heaves is characterized by the recruitment of neutrophils into the airway lumen, which may possibly contribute to airway damage and increased airway sensitivity through their release of various inflammatory mediators, including proteases, oxidants and cytokines. Neutrophilic airway inflammation in heaves is concomitant with the expression of Th2 cytokines by other BAL inflammatory cells (12, 28), suggesting that these cytokines may be responsible for their ongoing recruitment and activation. Indeed, IL-4 directly activates equine neutrophils *ex vivo* and modulates their expression of cytokines, chemokine and receptors, in a way reminiscent of the alternative activation phenotype (27). We hypothesized that the horses affected with heaves may model severe asthma in which neutrophils are predominantly recruited, and that these cells could contribute to the disease pathogenesis through the expression of arginase and the regulation of the L-arginine metabolism. The equine model was also attractive because both the up-regulation of arginase 1 by Th2 cytokines (as in murine models) and the constitutive arginase 1 expression and release at the site of inflammation (as in humans) could be expected and tested in natural conditions.

The expression of arginase isoforms by equine neutrophils has not previously been reported. The results obtained in the present study demonstrate further differences between species regarding arginase isoform expression by neutrophils, as we found constitutive expression of arginase 2 in these cells but no arginase 1, even at sites of allergic inflammation, i.e. in BAL fluid samples, or after *ex vivo* culture with IL-4, a Th2 cytokine previously shown to induce STAT6 activation in equine neutrophils (27). Hence, equine neutrophils differ from murine neutrophils, which up-regulate arginase 1 expression after IL-4 stimulation, and from human neutrophils which constitutively express arginase 1 in their granules (20, 44). Also, we (not shown) and others (13, 36) found that human neutrophils do not constitutively express arginase 2. Conversely, results from Corraliza *et al* (13) imply that human neutrophils may express arginase 2 in disease states at



sites of inflammation, as observed in patients with rheumatoid arthritis. Nonetheless, we found a significant specific activity of arginase in equine neutrophils, as well as transcripts for the enzymes ODC and OAT, suggesting that equine neutrophils could generate catabolic products of L-arginine metabolism such as L-proline and polyamines from L-ornithine.

Arginase 1 and 2 are both involved in polyamines, proline and glutamate synthesis as well as L-arginine up-take, urea formation and NO inhibition when transfected in mammalian endothelial cells (32). This suggests that neutrophil arginase, either the isoenzyme 1 or 2, may lead to similar biological outcomes in different species. In humans, constitutively expressed neutrophil arginase was proposed to have antifungal properties (44) and to contribute to the extracellular cytotoxicity in immune responses to parasitic infections (23). This is in agreement with the beneficial role of murine macrophages expressing arginase 1 during helminthic infections (56). Moreover, a high concentration of ornithine markedly increased hydrogen peroxide generation and myeloperoxidase activity in neutrophils (42). Thus L-ornithine formation through the L-arginine metabolism may enhance neutrophils effector functions and improve the host's immune response to infection. On the other hand, human neutrophil arginase released in the extracellular milieu by neutrophils following cell death was reported to have immunosuppressive effects on T cells by down-regulating TCR- $\zeta$  expression (25, 45, 54). This phenomenon is thought to constitute a "beneficial feedback response to terminate acute inflammation ... while persistent Ag stimulus is present" (4). Indeed, the TCR- $\zeta$  chain is downregulated in a number of chronic inflammatory diseases including many types of cancers, autoimmune diseases (rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus) and infectious diseases (HIV, leprosy) (reviewed in (4)). Arginase 2 expressed by murine renal cell carcinoma cell lines was reported to also have immunomodulating effects on the T cell (58), suggesting that the arginase 2 present in equine neutrophils may exert similar biological function. Taken together, these observations suggest that neutrophils could participate in both pro- and anti-inflammatory events associated with chronic inflammation in asthma. The mechanisms involved may be reminiscent of those associated with neutrophil recruitment and activation during parasitic infections since the two pathologies share several inflammatory and remodeling features (3). Interestingly, recent findings suggest that eosinophils, i.e. the granulocytes recruited in the airways of patients with mild-moderate asthma phenotypes, from both peripheral blood and BALF after allergen challenge do not express arginase 1 or

arginase 2 (36). The same authors report no arginase activity in BALF macrophages, suggesting that neutrophils may be the main leucocytes responsible for generating L-arginine catabolic products in the human asthmatic airways.

Arginase 2 is the predominant arginase isoenzyme expressed in the equine model of asthma. It was detected in the lungs and peripheral blood neutrophils of all horses, as opposed to arginase 1 which was detected in a few lung samples and remained undetectable in equine leukocytes using a sensitive technique such as quantitative PCR. Interestingly, arginase 1 was preferentially expressed in animals affected with chronic airway disease, both before and after antigenic exposure. Cell types responsible for arginase 1 expression in the horse's lung periphery are currently unknown although preliminary experiments performed using bronchial biopsies suggest that, similarly to humans, epithelial and smooth muscle cells may be sources (personal communication, Dr D. Jean). Interestingly, the 3 horses with detectable arginase 1 mRNA expression also had the highest values of pulmonary elastance, transpulmonary pressures and breathing frequency (not shown). We found in preliminary experiments that arginase 1 mRNA was not detectable in equine leukocytes retrieved at inflammatory sites (BAL cells), which only expressed the type 2 isoenzyme. Arginase 2 transcripts were increased in the lungs of horses from both groups, suggesting that increased arginase 2 expression may be a normal response to environmental dust. Of note, the barn environment and the experimental conditions used to exacerbate symptoms in heaves-affected horses is known to contain high amounts of bacterial lipopolysaccharide (LPS) (40) which up-regulate arginase 2 expression *in vitro* in both humans and in the mouse (13, 24). Further experiments are required to elucidate whether the inhalation of endotoxins is responsible for arginase 2 up-regulation in equine pulmonary cells. Nonetheless, arginase 2 expression was associated with parameters of pulmonary obstruction in horses with heaves, particularly with lung elastance and breathing frequency. This is in accordance with the hypothesis that down-stream products of L-arginine metabolism may contribute to peripheral airway remodeling and thus affect the lung elasticity. This is in contrast with lung resistance which is more related to large airway obstruction and that was not significantly associated with arginase 2 expression. In studies related to arginase expression in lung samples from asthmatic patients, either the expression of arginase 2 was not investigated (62) or no changes in its expression were found in macroscopically dissected airways (46), although in the latter study, the severity and

chronicity of symptoms were not clearly described. In the lungs of COPD patients, the expression of arginase 1 is albeit significantly correlated to arginase 2 (57). Polymorphisms in the arginase 1 and arginase 2 genes have been identified and linked to childhood asthma and atopy (33) as well as adult asthma (60). In children, arginase 1 was found to be associated with the degree of atopy, but not with asthma whereas arginase 2 was mainly associated with asthma and asthma severity. Similarly in adults, SNPs in arginase 2, but not arginase 1, have been associated with asthma. However, SNPs in both arginase 1 and 2 were associated with AHR in asthmatic patients, as well as with responsiveness to  $\beta$ 2-agonists and efficacy of corticosteroid treatment (60).

## **CONCLUSION**

In conclusion, an increased expression of arginases is associated with a natural asthma-like disease of the horse, reinforcing the possible role of the L-arginine metabolism in asthma and other chronic obstructive lung diseases. In this model, we found that neutrophils possess high expression of arginase 2, ornithine decarboxylase (ODC) and aminotransferase (OAT) and therefore may contribute to generate polyamines and L-proline at site of inflammation. The equine neutrophil arginase expression profile contrasts with the constitutive expression of arginase 1 by human neutrophils and the up-regulation of arginase 1 after Th2 cytokines stimulation in murine neutrophils. However, as the 2 isoforms exert similar metabolic functions, the catabolic products they generate may favor the proliferation of airway structural cells as well as collagen deposition in these species.

## **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

## **Acknowledgements**

The authors would like to thank Mathilde Leclere and Josiane Lefebvre-Lavoie for their contribution in tissue collection and processing, animal manipulation and help in preparing this manuscript. This study was founded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Frederick Banting and Charles Best Canada graduate studentship (A.L.-L.).

## REFERENCES

1. **Aminlari M, and Vaseghi T.** Arginase distribution in tissues of domestic animals. *Comp Biochem Physiol B* 103: 385-389, 1992.
2. **Amrein PC, and Stossel TP.** Prevention of degradation of human polymorphonuclear leukocyte proteins by diisopropylfluorophosphate. *Blood* 56: 442-447, 1980.
3. **Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Jr., Stadercker MJ, and Gause WC.** Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol* 7: 975-987, 2007.
4. **Baniyash M.** TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol* 4: 675-687, 2004.
5. **Bates JH, Shardonofsky F, and Stewart DE.** The low-frequency dependence of respiratory system resistance and elastance in normal dogs. *Respir Physiol* 78: 369-382, 1989.
6. **Bedard J, Brule S, Price CA, Silversides DW, and Lussier JG.** Serine protease inhibitor-E2 (SERPINE2) is differentially expressed in granulosa cells of dominant follicle in cattle. *Mol Reprod Dev* 64: 152-165, 2003.
7. **Bergeron C, Boulet LP, Page N, Laviolette M, Zimmermann N, Rothenberg ME, and Hamid Q.** Influence of cigarette smoke on the arginine pathway in asthmatic airways: increased expression of arginase I. *J Allergy Clin Immunol* 119: 391-397, 2007.
8. **Bogdan C.** Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2: 907-916, 2001.
9. **Cederbaum SD, Yu H, Grody WW, Kern RM, Yoo P, and Iyer RK.** Arginases I and II: do their functions overlap? *Mol Genet Metab* 81 Suppl 1: S38-44, 2004.
10. **Chang K, Lee SJ, Cheong I, Billiar TR, Chung HT, Han JA, Kwon YG, Ha KS, and Kim YM.** Nitric oxide suppresses inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting post-translational modification of I $\kappa$ B. *Exp Mol Med* 36: 311-324, 2004.
11. **Chetta A, Zanini A, Torre O, and Olivieri D.** Vascular remodelling and angiogenesis in asthma: morphological aspects and pharmacological modulation. *Inflamm Allergy Drug Targets* 6: 41-45, 2007.
12. **Cordeau ME, Joubert P, Dewachi O, Hamid Q, and Lavoie JP.** IL-4, IL-5 and IFN-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Vet Immunol Immunopathol* 97: 87-96, 2004.

13. **Corraliza I, and Moncada S.** Increased expression of arginase II in patients with different forms of arthritis. Implications of the regulation of nitric oxide. *J Rheumatol* 29: 2261-2265, 2002.
14. **Goerdts S, and Orfanos CE.** Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity* 10: 137-142, 1999.
15. **Gordon S.** Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23-35, 2003.
16. **Gotoh T, Sonoki T, Nagasaki A, Terada K, Takiguchi M, and Mori M.** Molecular cloning of cDNA for nonhepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line. *FEBS Lett* 395: 119-122, 1996.
17. **Herszberg B, Ramos-Barbon D, Tamaoka M, Martin JG, and Lavoie JP.** Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 118: 382-388, 2006.
18. **Hobbs CA, and Gilmour SK.** High levels of intracellular polyamines promote histone acetyltransferase activity resulting in chromatin hyperacetylation. *J Cell Biochem* 77: 345-360, 2000.
19. **Ignarro LJ, Buga GM, Wei LH, Bauer PM, Wu G, and del Soldato P.** Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4202-4208, 2001.
20. **Jacobsen LC, Theilgaard-Monch K, Christensen EI, and Borregaard N.** Arginase 1 is expressed in myelocytes/metamyelocytes and localized in gelatinase granules of human neutrophils. *Blood* 109: 3084-3087, 2007.
21. **Joubert P, Silversides DW, and 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* 33: 730-733, 2001.
22. **Kenyon NJ, Bratt JM, Linderholm AL, Last MS, and Last JA.** Arginases I and II in lungs of ovalbumin-sensitized mice exposed to ovalbumin: sources and consequences. *Toxicol Appl Pharmacol* 230: 269-275, 2008.
23. **King CH, Spagnuolo PJ, and Ellner JJ.** Differential contribution of chemotaxins and opsonins to neutrophil-mediated killing of *Schistosoma mansoni* larvae. *Infect Immun* 52: 748-755, 1986.

24. **Klasen S, Hammermann R, Fuhrmann M, Lindemann D, Beck KF, Pfeilschifter J, and Racke K.** Glucocorticoids inhibit lipopolysaccharide-induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages. *Br J Pharmacol* 132: 1349-1357, 2001.
25. **Kropf P, Baud D, Marshall SE, Munder M, Mosley A, Fuentes JM, Bangham CR, Taylor GP, Herath S, Choi BS, Soler G, Teoh T, Modolell M, and Muller I.** Arginase activity mediates reversible T cell hyporesponsiveness in human pregnancy. *Eur J Immunol* 37: 935-945, 2007.
26. **Kucharzewska P, Welch JE, Svensson KJ, and Belting M.** Ornithine decarboxylase and extracellular polyamines regulate microvascular sprouting and actin cytoskeleton dynamics in endothelial cells. *Exp Cell Res.*
27. **Lavoie-Lamoureux A, Moran K, Beauchamp G, Muel S, Steinbach F, Lefebvre-Lavoie J, Martin JG, and Lavoie JP.** IL-4 activates equine neutrophils and induces a mixed inflammatory cytokine expression profile with enhanced neutrophil-chemotactic mediator release ex vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* In Press: 2010.
28. **Lavoie JP, Maghni K, Desnoyers M, Taha R, Martin JG, and Hamid QA.** Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1410-1413, 2001.
29. **Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Gelinias-Lymburner E, David F, Martin JG, and Lavoie JP.** Effect of Antigen Exposure on Airway Smooth Muscle Remodeling in an Equine Model of Chronic Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* In press.
30. **Lefebvre-Lavoie J, Lussier JG, and Theoret CL.** Profiling of differentially expressed genes in wound margin biopsies of horses using suppression subtractive hybridization. *Physiol Genomics* 22: 157-170, 2005.
31. **Leutenegger CM, von Rechenberg B, Huder JB, Zlinsky K, Mislin C, Akens MK, Auer J, and Lutz H.** Quantitative real-time PCR for equine cytokine mRNA in nondecalcified bone tissue embedded in methyl methacrylate. *Calcif Tissue Int* 65: 378-383, 1999.
32. **Li H, Meininger CJ, Hawker JR, Jr., Haynes TE, Kepka-Lenhart D, Mistry SK, Morris SM, Jr., and Wu G.** Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E75-82, 2001.

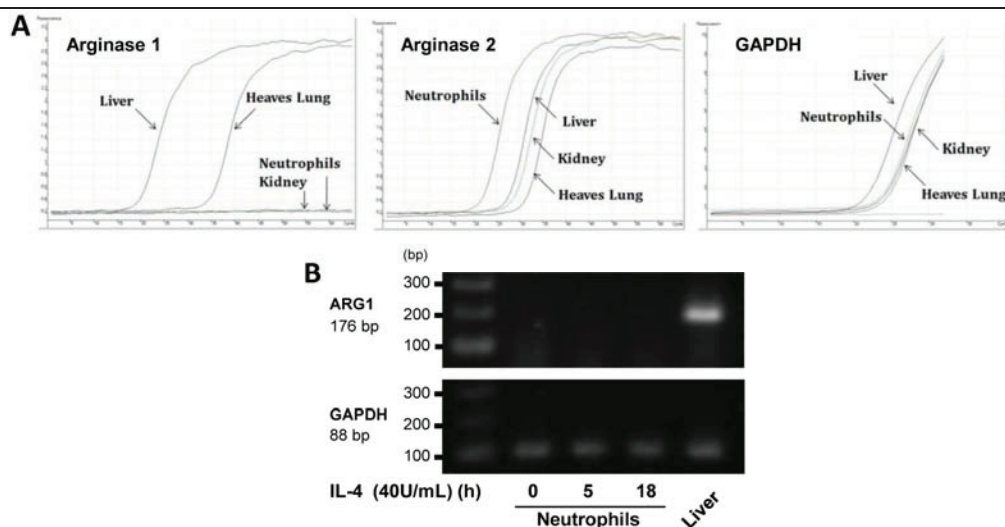
33. **Li H, Romieu I, Sienra-Monge JJ, Ramirez-Aguilar M, Estela Del Rio-Navarro B, Kistner EO, Gjessing HK, Lara-Sanchez Idel C, Chiu GY, and London SJ.** Genetic polymorphisms in arginase I and II and childhood asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol* 117: 119-126, 2006.
34. **Liang M, Ekblad E, Hellstrand P, and Nilsson BO.** Polyamine synthesis inhibition attenuates vascular smooth muscle cell migration. *J Vasc Res* 41: 141-147, 2004.
35. **Louis CA, Mody V, Henry WL, Jr., Reichner JS, and Albina JE.** Regulation of arginase isoforms I and II by IL-4 in cultured murine peritoneal macrophages. *Am J Physiol* 276: R237-242, 1999.
36. **Luckner-Minden C, Fischer I, Langhans CD, Schiller M, Kropf P, Muller I, Hohlfeld JM, Ho AD, and Munder M.** Human eosinophil granulocytes do not express the enzyme arginase. *J Leukoc Biol* 87: 1125-1132.
37. **Maarsingh H, Zaagsma J, and Meurs H.** Arginase: a key enzyme in the pathophysiology of allergic asthma opening novel therapeutic perspectives. *Br J Pharmacol* 158: 652-664, 2009.
38. **Maarsingh H, Zuidhof AB, Bos IS, van Duin M, Boucher JL, Zaagsma J, and Meurs H.** Arginase inhibition protects against allergen-induced airway obstruction, hyperresponsiveness, and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 178: 565-573, 2008.
39. **Marshall HE, and Stamler JS.** Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation. *Biochemistry* 40: 1688-1693, 2001.
40. **McGorum BC, Ellison J, and Cullen RT.** Total and respirable airborne dust endotoxin concentrations in three equine management systems. *Equine Vet J* 30: 430-434, 1998.
41. **Meurs H, Hamer MA, Pethe S, Vadon-Le Goff S, Boucher JL, and Zaagsma J.** Modulation of cholinergic airway reactivity and nitric oxide production by endogenous arginase activity. *Br J Pharmacol* 130: 1793-1798, 2000.
42. **Muhling J, Fuchs M, Campos M, Gonter J, Sablotzki A, Engel J, Welters ID, Wolff M, Matejec R, Dehne MG, Menges T, Krull M, and Hempelmann G.** Effects of ornithine on neutrophil (PMN) free amino acid and alpha-keto acid profiles and immune functions in vitro. *Amino Acids* 27: 313-319, 2004.
43. **Munder M, Eichmann K, Moran JM, Centeno F, Soler G, and Modolell M.** Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 163: 3771-3777, 1999.

44. **Munder M, Mollinedo F, Calafat J, Canchado J, Gil-Lamaignere C, Fuentes JM, Luckner C, Doschko G, Soler G, Eichmann K, Muller FM, Ho AD, Goerner M, and Modolell M.** Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood* 105: 2549-2556, 2005.
45. **Munder M, Schneider H, Luckner C, Giese T, Langhans CD, Fuentes JM, Kropf P, Mueller I, Kolb A, Modolell M, and Ho AD.** Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. *Blood* 108: 1627-1634, 2006.
46. **North ML, Khanna N, Marsden PA, Grasemann H, and Scott JA.** Functionally important role for arginase 1 in the airway hyperresponsiveness of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296: L911-920, 2009.
47. **Ordonez CL, Shaughnessy TE, Matthay MA, and 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* 161: 1185-1190, 2000.
48. **Pegg AE.** Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem J* 234: 249-262, 1986.
49. **Poremska Z.** Different species of arginase in animal tissues. *Enzyme* 15: 198-209, 1973.
50. **Raes G, Van den Bergh R, De Baetselier P, Ghassabeh GH, Scotton C, Locati M, Mantovani A, and Sozzani S.** Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells. *J Immunol* 174: 6561; author reply 6561-6562, 2005.
51. **Relave F, David F, Leclere M, Alexander K, Bussieres G, Lavoie JP, and Marcoux M.** Evaluation of a thoracoscopic technique using ligating loops to obtain large lung biopsies in standing healthy and heaves-affected horses. *Vet Surg* 37: 232-240, 2008.
52. **Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, and Folkerts G.** Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 84: 731-765, 2004.
53. **Roche WR, Beasley R, Williams JH, and Holgate ST.** Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1: 520-524, 1989.
54. **Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R, and Ochoa AC.** Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res* 69: 1553-1560, 2009.



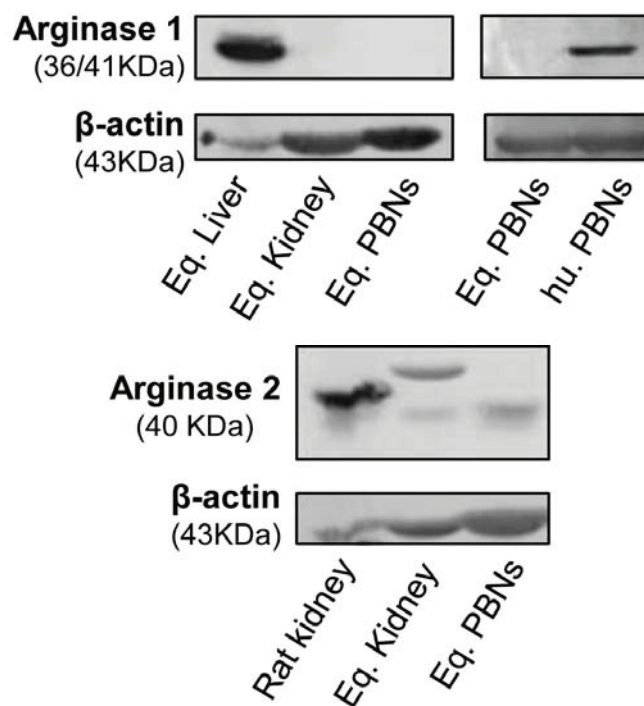
55. **Setlakwe E. L. LM, Lavoie J.P.** . Sub-Epithelial Fibrosis Is Present in the Peripheral Airways of Heaves-Affected Horses, an Equine Model for Asthma. In: *American Thoracic Society International Conference*. San Diego Convention Center, San Diego, California: Am J Respir Crit Care Med 179;2009:A5058 2009.
56. **Stempin CC, Dulgerian LR, Garrido VV, and Cerban FM.** Arginase in parasitic infections: macrophage activation, immunosuppression, and intracellular signals. *J Biomed Biotechnol* ID 683485, 2010.
57. **Tadie JM, Henno P, Leroy I, Danel C, Naline E, Faisy C, Riquet M, Levy M, Israel-Biet D, and Delclaux C.** Role of nitric oxide synthase/arginase balance in bronchial reactivity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L489-497, 2008.
58. **Tate DJ, Jr., Vonderhaar DJ, Caldas YA, Metoyer T, Patterson JRt, Aviles DH, and Zea AH.** Effect of arginase II on L-arginine depletion and cell growth in murine cell lines of renal cell carcinoma. *J Hematol Oncol* 1: 14, 2008.
59. **Vaubourdolle M, Salvucci M, Coudray-Lucas C, Agneray J, Cynober L, and Ekindjian OG.** Action of ornithine alpha ketoglutarate on DNA synthesis by human fibroblasts. *In Vitro Cell Dev Biol* 26: 187-192, 1990.
60. **Vonk JM, Postma DS, Maarsingh H, Bruinenberg M, Koppelman GH, and Meurs H.** Arginase 1 and arginase 2 variations associate with asthma, asthma severity and beta2 agonist and steroid response. *Pharmacogenet Genomics* 20: 179-186.
61. **Wu G, and Morris SM, Jr.** Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336 ( Pt 1): 1-17, 1998.
62. **Zimmermann N, King NE, Laporte J, Yang M, Mishra A, Pope SM, Muntel EE, Witte DP, Pegg AA, Foster PS, Hamid Q, and Rothenberg ME.** Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. *J Clin Invest* 111: 1863-1874, 2003.

## Figures Article #4



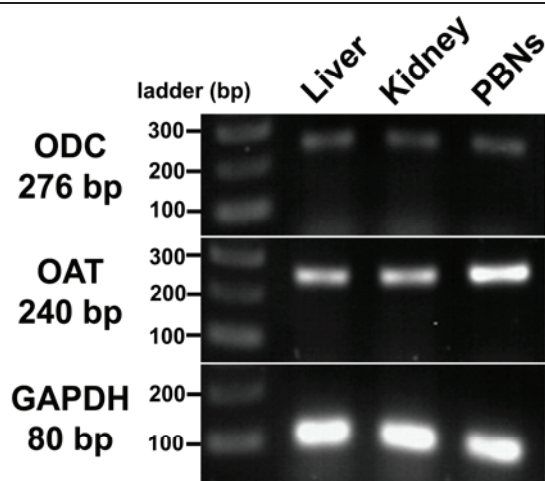
**Figure 1- Arginase isoforms expression by equine neutrophils and control tissues using qPCR.**

**A.** Representative qPCR amplification cycling for arginase 1, arginase 2 and GAPDH using cDNA samples from normal horse peripheral blood neutrophil, control tissues (equine liver and kidney) and heaves-affected lung tissues. **B.** Neutrophils isolated from normal horses were incubated with recombinant equine IL-4 (40 U/ml), a Th2 cytokine which proved to activate STAT6 in equine neutrophils, in order to induce arginase 1 mRNA expression as reported for murine neutrophils. IL-4 stimulation of equine neutrophils for up to 18h failed to up-regulate arginase 1 expression (representative of n = 3 separate experiments). Equine liver was used as positive control for arginase 1 expression and GAPDH as a reference gene.



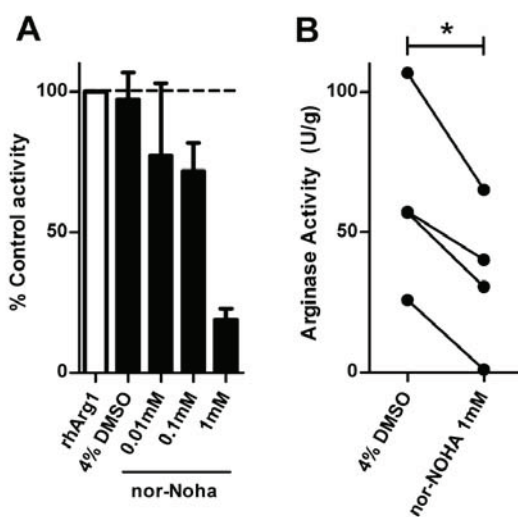
**Figure 2 - Detection of arginase 1 and 2 in equine peripheral blood neutrophils (PBNs) and control tissues using Western blotting.**

PBNs were isolated using gradient centrifugation from normal animals (eq. PBNs). Cells were pre-treated with serine protease inhibitor DFP (5mM, 10 min on ice), homogenized in 25 mM Tris-HCL containing 0.5% TritonX-100 and protease inhibitors and submitted to 10% SDS-PAGE (50 $\mu$ g/lane). Proteins were similarly extracted from equine liver (control for arginase 1) and rat or equine kidneys (control for arginase 2). In separate experiments, human neutrophils (hu. PMNs) were isolated from the blood of healthy individuals and isolated in parallel with equine neutrophils to control for technical bias for arginase 1 detection. The presence of arginase 1 and 2 corresponds to the detection of a ~40 KDa band using an anti-human/rat arginase 1 or 2 antibody (1:1000 in TBST 5% w/v nonfat dry milk, Santa-Cruz Biotech) combined with HRP-secondary antibody. The presence of two bands surrounding 40KDa in equine kidney extracts may represent the detection of the precursor and mature form of mitochondrial arginase 2.  $\beta$ -actin blotting served as loading control.



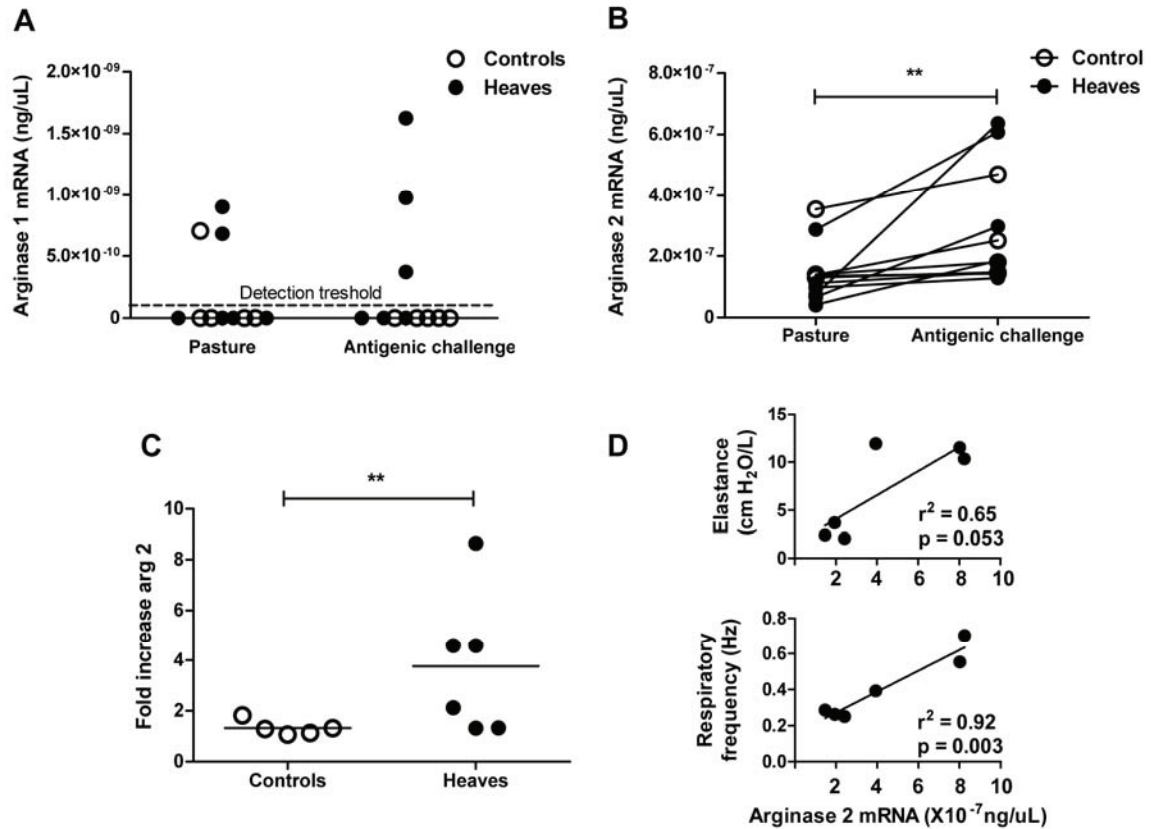
**Figure 3- Expression of ornithine decarboxylase (ODC) and ornithine aminotransferase (OAT) by equine neutrophils.**

The transcripts for ODC and OAT were detected by qPCR using cDNA samples from normal equine peripheral blood neutrophils (PBNs) and compared to control tissues. Figure shows electrophoresis of PCR products after 40 amplification cycles on a 1.5% agarose gel. GAPDH was used as reference gene.



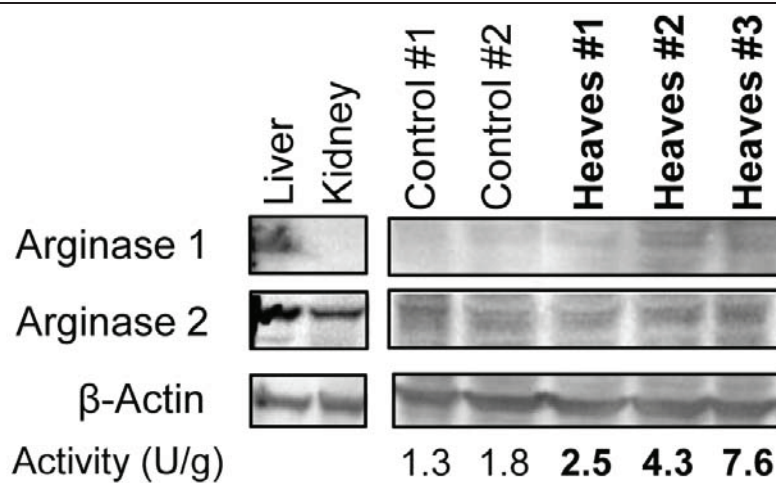
**Figure 4 - Arginase activity in equine neutrophils.**

**A.** The efficacy of nor-Noha, an inhibitor of arginase, was first tested on recombinant human arginase 1 (rhArg1) using 0.01 to 1 mM. Equivalent concentration of DMSO (vehicle) was added to positive control. The effect of nor-Noha is expressed as % inhibition over control activity (rhArg1 + 4% DMSO). n = 2 independent experiments. **B.** Nor-Noha (1 mM) was used to assess the specific activity of arginase in protein extracts from normal equine neutrophils (50µg). Equivalent concentration of vehicle was added to all samples (4% DMSO). n = 4 horses, \* p < 0.05.



**Figure 5- Characterization of arginase isoforms expression in heaves and relationship with respiratory mechanics.**

Quantitative expression of arginase 1 (A) and 2 (B) mRNA expression in peripheral lung biopsies from healthy control (n = 5) and heaves-affected horses (n = 6) before and following a 30d antigenic challenge. Arginase 1 mRNA expression was detected in some lung samples only (reproducible duplicates), preferentially in heaves-affected horses. Arginase 2 was detected in all lung samples and significantly up-regulated by antigenic challenge in the two groups. \* p < 0.05. C. The fold increase in arginase 2 expression after antigenic challenge was significantly higher in lung biopsies from horses affected with heaves compared to controls. Horizontal bars represent means, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01. D. Significant or near significant association between breathing parameters (lung elastance and breathing frequency) and arginase 2 mRNA expression in heaves-affected horses after antigenic challenge.



**Figure 6- Arginase 1 and 2 protein expression and enzymatic activity in peripheral lung biopsies from heaves-affected and control horses following antigenic challenge.**

Proteins were extracted from snap-frozen peripheral lung biopsies obtained under thoracoscopic guidance on sedated horses as described in *Material and methods* section. Western blot was performed to detect arginase 1 and 2 in lung samples (150  $\mu$ g/lane) and control tissues (equine liver and kidney, 50 $\mu$ g/lane).  $\beta$ -actin was used as loading control. Arginase activity was assessed in the same protein extracts and is presented as units per g of protein.

## Discussion générale

Cette thèse tend à exposer le rôle polyvalent des neutrophiles dans la réponse allergique, qui intègre à la fois les réponses innée et acquise qui lui sont associées. Les travaux qui y sont présentés révèlent différents mécanismes par lesquels les neutrophiles pourraient contribuer à l'inflammation pathologique chez les chevaux atteints du souffle, et potentiellement, à la pathogénie de l'asthme chez l'homme.

### **Le rôle du neutrophile dans la réponse innée associée à l'allergie**

Nos travaux nous ont permis de détecter un défaut de la réponse innée associé au souffle. Les leucocytes périphériques des chevaux susceptibles, en rémission clinique, possèdent une réponse exagérée au LPS et aux peptides formylés, des produits dérivés de bactéries, par rapport à aux leucocytes de chevaux sains partageant le même environnement (Article #1). Cette réponse aberrante s'exprime en terme de régulation de l'expression génique de cytokines pro-inflammatoires, à la fois dans les populations de neutrophiles et de mononucléaires. Une conséquence possible de cette réponse exagérée par les neutrophiles est leur stimulation autocrine et/ou paracrine et le délai de leur apoptose spontanée via l'expression de TNF (nos résultats) et possiblement d'IL-1 $\beta$ , aussi surrégulé par les neutrophiles des chevaux atteints du souffle. Nos observations se supportent le retard de l'apoptose spontanée causé par l'effet autocrine de l'IL-1 $\beta$  et du TNF observé chez les neutrophiles pulmonaires des chevaux atteints de souffle exposés aux poussières environnementales [150].

*Une inflammation systémique est présente en phase de rémission et d'exacerbation clinique du souffle*

Nos résultats suggèrent qu'une inflammation systémique persistante est responsable du conditionnement périphérique des leucocytes chez les chevaux atteints du souffle. La concentration de TNF, dont l'expression génique basale était surrégulée dans les mononucléaires sanguins isolés des chevaux atteints de souffle, est aussi augmentée dans le sang des patients asthmatiques [324, 326]. À l'aide d'un ELISA spécifique à l'espèce que nous avons optimisé pour permettre l'évaluation des échantillons sériques (Article #2), nous avons détecté des concentrations élevées de TNF dans le sérum de chevaux atteints de souffle en rémission (Article #1) et en exacerbation clinique (Article #2), par rapport à des chevaux normaux gardés dans les mêmes conditions environnementales. Ces résultats se sont avérés confirmés par des tests



effectués sur un autre groupe de chevaux à l'aide de marqueurs de l'inflammation systémique différents (haptoglobine et la protéine amyloïde A sérique (SAA); *manuscrit en préparation*). Dans cette étude, l'inflammation systémique était présente alors que la cytologie du LBA et les paramètres de fonction respiratoire étaient normaux chez les chevaux asymptomatiques. Les mêmes molécules sont aussi présentes en quantité élevée dans le sang des patients atteints d'asthme [334-336]. Ces données prises ensemble constituent le premier rapport de la présence persistante de marqueurs de l'inflammation systémique chez les chevaux en rémission clinique du souffle. L'inflammation systémique représente une autre caractéristique physiopathologique commune à l'asthme et au souffle.

#### *Réponse innée exagérée des leucocytes dans le souffle*

La présence d'inflammation systémique pourrait sans contredit contribuer à conditionner les leucocytes périphériques chez les chevaux atteints de souffle et justifier nos résultats. Des expériences dans lesquelles des cellules de chevaux normaux seraient mises en présence de sérum provenant des chevaux atteints de souffle pourraient confirmer cette hypothèse. Il est à noter que des neutrophiles humains conditionnés, puis activés par des cytokines présentes au site de l'inflammation montrent une réponse différente de celle de neutrophiles fraîchement isolés et activés directement [431]. Parmi les cytokines, le TNF contribuerait particulièrement au changement de phénotype des neutrophiles et à leur expression de molécules immunorégulatrices telles le CCL2 (marque l'activation « alternative » des neutrophiles) et même l'indole 2,3-dioxygénase (IDO).

Dans l'alternative, un niveau accru d'expression des récepteurs pourrait contribuer à augmenter la sensibilité des cellules aux agonistes bactériens chez les chevaux atteints du souffle. Par contre nous avons observés des niveaux similaires d'ARNm codant le TLR4 (et le TLR2, données non-montrées) dans les leucocytes provenant des deux groupes de chevaux. Ces résultats requièrent toutefois une confirmation au niveau protéique. De plus, l'étude de l'expression des corécepteurs du TLR4, le CD14 et le MD-2, s'avère également requise car ces molécules sont transcrites suivant une stimulation avec des agonistes pro-inflammatoires et ont le pouvoir d'amplifier la réponse au LPS [432, 433]. D'après les travaux de Lekeux et son équipe, la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B est constamment activée dans le souffle à cause de l'expression accrue du

TNF et de l'IL-1 $\beta$  par les granulocytes pulmonaires. Ces cytokines contribuent à dégrader perpétuellement l'inhibiteur du NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B- $\beta$ , et donc à bloquer la rétroaction négative de la voie NF- $\kappa$ B dans les granulocytes et les cellules épithéliales pulmonaires (effet paracrine), justifiant la perpétuation de l'inflammation jusqu'à 21 jours suivant le retrait de l'antigène chez les chevaux atteints de souffle [150, 407, 434]. Il reste à déterminer si le LPS+fMLP induit aussi une hyperactivité du NF- $\kappa$ B chez les neutrophiles et les mononucléaires sanguins des chevaux atteints du souffle. Tel que mentionné par Bureau et ses collègues [150], l'effet de l'expression prédominante de l'isoforme  $\alpha$  du I $\kappa$ B par les cellules sanguines et de son *shift* pour l'isoforme  $\beta$  au niveau pulmonaire reste à considérer dans cette analyse.

L'expression des récepteurs au fMLP n'a pas été évaluée dans la présente étude. L'hétérogénéité des sous-populations de neutrophiles se caractérise par différents taux d'expression du récepteur au fMLP chez l'homme [435]. Il est possible que la réponse amplifiée que nous avons observée soit reliée à une plus grande proportion de neutrophiles exprimant le FPR à des taux plus élevés. Il est à noter que le TNF est un puissant stimulateur de l'expression des récepteurs au fMLP par le neutrophile équin [119] et que cette cytokine est présente dans le sang des chevaux atteints du souffle en rémission clinique. Des indices de la présence d'une sous-population « active ou *transdifférenciée* » de neutrophiles périphériques chez ces chevaux ont été apportés par l'étude de Marr et collègues, dans laquelle l'adhérence basale des neutrophiles des chevaux asymptomatiques était augmentée par rapport aux chevaux normaux [422] et celle de Dewachi et collègues, en lien avec l'expression différentielle de récepteurs pour les cytokines de types Th2 [396]. Alternativement, le FPR est un RCPG qui peut avoir un effet inhibiteur sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, possiblement via la relâche d'AMPc [118]. Aussi, les voies de PI3-K et ERK, communes aux RCPGs, pourraient contribuer à inhiber l'expression de cytokines pro-inflammatoires par les leucocytes, tel que démontré pour le C5a [436], un médiateur associé à l'immunité innée qui s'est avéré impliqué dans la pathogénie de l'asthme murin [437]. Un défaut dans cette rétroaction négative associée aux RCPGs pourrait contribuer à la réponse exagérée aux LPS et fMLP combinés dans le souffle. Bref, la perspective d'évaluer la réponse des leucocytes périphériques au LPS et au fMLP indépendamment (dose-réponse et cinétique) est certainement de mise afin de mieux disséquer les mécanismes impliqués dans la réponse inflammatoire aberrante observée.

*Causes et conséquences de l'inflammation systémique*

Quant aux autres causes et conséquences de l'inflammation systémique associées à l'asthme et au souffle, encore peu d'informations sont disponibles dans la littérature pour postuler à ce sujet. Certaines études rapportent que les taux de CRP sont plus élevés dans le sang des patients asthmatiques non-allergiques, indépendamment du type d'inflammation locale. Par contre, la présence d'obésité est associée aux taux élevés de CRP chez les patients asthmatiques allergiques [330, 438]. On a aussi associé une augmentation de la concentration sérique d'arginase 1 à l'asthme intrinsèque seulement (les auteurs n'ont malheureusement pas évalué le type d'inflammation associé) [265]. L'asthme allergique est quand même considérée comme une « maladie systémique » étant donnée la présence concomitante de manifestations cutanées et de rhinite chez certains patients [439]. Ces dernières observations ne s'appliquent pas au cheval atteint du souffle qui ne présente pas de tels symptômes ni d'IgEs sériques particulièrement abondants, bien que la présence de rhinite n'ait pas encore été évaluée. La présence de comorbidités comme la colite ulcéreuse, le diabète de type 2, les néphropathies, les cancers et les maladies cardiovasculaires sont considérées comme des conséquences de l'inflammation systémique associées à l'asthme (revu dans [439] et [335]). Des résultats d'endoscopie et de tests d'absorption du glucose suggèrent que les chevaux atteints de souffle ne présentent pas plus d'ulcères gastriques ni de résistance à l'insuline que les chevaux normaux [440, 441]. Les concentrations de TNF sériques associées au souffle dans nos études ne sont pas corrélées avec le poids des chevaux (données non-montrées). Il est à noter que l'évaluation de l'index de masse corporelle a permis d'établir une association entre le TNF sérique et l'adiposité des chevaux dans une autre étude [442]. L'étude de Wu et collègues rapporte chez les asthmatiques stables des concentrations élevée d'IL-6, de CRP et de SAA, en association avec la présence élevée de molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1 et E-Sélectine), de microalbuminurie (perméabilité néphrique) et de marqueurs de stress oxydatifs (3NT, 3-nitrotyrosine) [335]. Une autre étude a montré une concentration sérique supérieure de TNF et d'IL-8 chez les asthmatiques sévères par rapport aux légers, et supérieure chez les patients légers par rapport aux contrôles, en période de stabilité symptomatique [326]. La concentration sérique de TNF était plus fortement corrélée au déclin de la fonction respiratoire que celle d'IL-8. Les auteurs discutent de l'inefficacité possible des corticostéroïdes à contrôler la production de cytokines au niveau pulmonaire et commentent

l'utilité de bloqueurs du TNF comme traitement alternatif. Comme pour les chevaux atteints de souffle, ces résultats suggèrent que chez les asthmatiques, l'inflammation perdure entre les exacerbations.

Il est possible que de faibles niveaux de poussières inhalées entretiennent l'inflammation pulmonaire chez les chevaux atteints du souffle et que cette inflammation locale déborde vers la circulation systémique. L'inhalation de LPS a le potentiel de causer en elle-même une inflammation systémique (marqueurs utilisés : haptoglobine et CRP) [443]. Nos résultats combinés à ceux de Pirie et collègues démontrant une sensibilité accrue des chevaux atteints du souffle à développer l'inflammation et la bronchoconstriction en réponse au LPS inhalé [404], et de ceux de Lann et collègues qui ont observé une réponse pro-inflammatoire exagérée au LPS par les macrophages pulmonaires isolés des chevaux non-symptomatiques [444], supportent que cette hypothèse soit vraisemblable chez les chevaux atteints de souffle. Inversement, il a été suggéré récemment que ce serait l'inflammation systémique qui serait responsable du déclin de la fonction respiratoire [445]. Autrement, le remodelage tissulaire qui s'opère au niveau des voies respiratoires semble être un processus constant dans le souffle [446] et pourrait générer des médiateurs inflammatoires en dehors des périodes d'exacerbations cliniques.

### **Le rôle du neutrophile dans la réponse acquise associée à la réponse allergique**

La réponse immunitaire acquise, spécifique à l'antigène, est fondamentale dans le concept de l'allergie. La sensibilisation allergique, résultat de la capture, de l'apprêtement, et de la présentation d'un antigène inhalé aux lymphocytes par les CPA, en est la première étape. S'en suit la prolifération et la polarisation des lymphocytes T spécifiques à cet antigène et leur production de cytokines de type Th2 centrales aux événements clés de la réponse allergique : 1) la production par les lymphocytes B d'IgEs spécifiques à l'allergène; 2) la relâche d'histamine par les cellules métachromatiques suivant une exposition ultérieure à cet antigène et l'agrégation de leurs récepteurs aux IgE ; 3) le recrutement de granulocytes et; 4) les changements fonctionnels et architecturaux tissulaires (production de mucus, contractilité et masse du muscle lisse, fibrose).

Encore récemment, et contrairement aux éosinophiles, le neutrophile n'était pas considéré comme une cellule effectrice de la réponse allergique. En ce sens, leur recrutement aux sites d'inflammation allergique est mentionné dans certains manuels de références [11, 447], mais pas

tous [13, 448]. En effet les neutrophiles sont communément catalogués comme des cellules sentinelles aux fonctions et à la demi-vie limitées, recrutées dès les premiers signes d'insultes ou d'infection tissulaires et donc, surtout comme cellules effectrices de l'inflammation aiguë. Pourtant, on rapporte depuis plus d'une décennie l'activation périphérique et le recrutement spécifique des neutrophiles dans les voies respiratoires des patients asthmatiques [329, 350]. Ces cellules se sont montrées également aptes à répondre de manière spécifique à l'allergène, par l'activation de plusieurs de leurs fonctions cellulaires [166, 351-353]. De plus, l'emphase récente mise sur la caractérisation des phénotypes cliniques d'asthme a soulevé considérablement d'intérêt pour les mécanismes associés à la présence des neutrophiles dans les voies respiratoires des patients asthmatiques.

Nous avons utilisé le cheval atteint du souffle comme modèle pour l'étude du neutrophile comme cellule effectrice de la réponse acquise dans l'allergie pulmonaire. Ce modèle naturel d'asthme présente les quatre critères de définition de l'hypersensibilité de type I énumérés ci-haut. Cela suggère l'implication d'une réponse immunitaire spécifique s'associant à une neutrophilie persistante des voies respiratoires. En plus de ces caractéristiques, le souffle partage avec l'asthme des symptômes et des traitements similaires, suggérant que des mécanismes analogues pourraient être impliqués chez les deux espèces. Nous avons postulé que l'interaction des neutrophiles avec les cytokines de type Th2 exprimées au site de l'inflammation pourrait, à la manière de la relation entre les cytokines de type Th2 et du recrutement d'éosinophiles, contribuer à la pathogénie du souffle en activant les neutrophiles équins. En ce sens, une étude effectuée dans notre laboratoire a montré que l'IL-4 recombinante équine stimule l'expression génique d'IL-8 et de molécules d'adhésions par les cellules endothéliales artérielles pulmonaires en culture (**Annexe 3**) [357]. Ainsi, nous avons évalué ici l'influence directe du contexte allergique sur les fonctions immunorégulatrices du neutrophile et la contribution possible de ces cellules comme régulateur de l'inflammation.

*Nos résultats montrent que l'IL-4, une cytokine centrale de la réponse de type Th2, peut induire la polarisation des neutrophiles équins ex vivo, activer STAT6, un facteur de transcription typiquement associé à son récepteur, réguler leur expression de cytokines et de chimiokines ainsi que de récepteurs impliqués dans la réponse allergique.*

### *Ligands des CXCR2 induits par l'IL-4*

L'IL-4 pourrait contribuer à favoriser la neutrophilie pulmonaire puisqu'elle stimule la relâche de ligands des récepteurs CXCR2 par les neutrophiles. Nous avons observé que l'IL-4 active de manière précoce (5h) la transcription d'IL-8 par les neutrophiles équins. Ces données sont similaires à celles rapportées pour le neutrophile humain [360]. Malgré l'inaccessibilité à un anticorps spécifique pour la détection de l'IL-8 au niveau protéique dans les surnageants de culture, l'utilisation de bloqueurs des CXCR2 (SB 225002 et SB 265610) a confirmé la présence de chimiokines de type CXC ELR+ dans les surnageants des neutrophiles équins stimulés avec l'IL-4. Les ligands des récepteurs CXCR2 incluent les chimiokines CXCL1 à 8, excluant le CXCL4 qui se lie au CXCR3B (**Annexe 1**). Nous savons que le CXCL2 (MIP-2 $\alpha$ ) et le l'CXCL8 (IL-8) sont exprimés rapidement par les neutrophiles équins [148] et que le CXCL1 est exprimé par les neutrophiles humains [34]. Une étude récente indique que PI3K est impliquée dans la régulation post-traductionnelle de l'IL-8 mais pas dans sa transcription [449]. Ceci est contraire à la régulation de deux autres chimiokines exprimées par les neutrophiles humains, CCL3 et CCL4, dont la transcription et la sécrétion sont tous deux sous le contrôle de PI3K. Nos résultats suggèrent l'implication de PI3K et p38 MPK dans la régulation des gènes IL-1 $\beta$  (sous-régulé) et CD23 (induit) par l'IL-4. Il reste à déterminer si des mécanismes spécifiques sont impliqués dans la régulation de l'expression d'IL-8 dans les neutrophiles équins et si ces mécanismes sont similaires à ceux décrits pour l'humain.

### *Récepteurs induits par l'IL-4*

Nous n'avons pas trouvé de différence dans l'expression basale ou induite du récepteur à l'IL-4 entre les neutrophiles isolés de chevaux normaux et atteints de souffle, contrairement à notre hypothèse de départ. D'autres récepteurs associés à la réponse allergique sont surrégulés par les neutrophiles de patients asthmatiques (IL-9 [364]) et des chevaux atteints du souffle (IL-5 et IL-9 [396]). Un gain de fonction évident du récepteur n'a pas non plus été démontré dans notre étude, malgré la forte tendance ( $p=0.06$ ) des neutrophiles provenant des chevaux atteints du souffle à exprimer des niveaux d'IL-8 plus élevés en réponse à l'IL-4 que ceux des neutrophiles isolés de chevaux normaux. Nos résultats suggèrent que l'IL-4R $\alpha$  est exprimé constitutivement par les neutrophiles équins, à un niveau relativement élevé par rapport au TLR4 (~10 fois) et au CD23

(~100 fois) et similaire à celui détecté chez les autres leucocytes sanguins (résultats non-montrés). De plus, nous avons observés lors d'études préliminaires que l'expression de l'IL-4R $\alpha$  était accrue en fonction du % de neutrophiles présents dans une population mixte de leucocytes du LBA. Ces résultats suggèrent que l'IL-4R $\alpha$  est aussi exprimé par les neutrophiles pulmonaires. Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer si l'IL-4 a un effet similaire sur les neutrophiles pulmonaires des chevaux atteints du souffle.

L'inflammation des voies respiratoires pourrait également être entretenue par l'effet rétroactif positif de l'IL-4 sur l'expression génique d'une sous-unité de son propre récepteur, l'IL-4R $\alpha$ , constituant avec la chaîne commune  $\gamma$ c (CD132) et IL-13R $\alpha$ 1 les récepteurs de Type I et de type II à l'IL-4, respectivement. Chez l'homme, on a démontré que les neutrophiles exprimaient uniquement le récepteur de type I [450], spécifique à l'IL-4, alors que les sous-unités IL-13R $\alpha$ 1 et IL-13R $\alpha$ 2 demeuraient indétectables sur leur surface. Cela est surprenant étant donné que les mêmes auteurs ont démontré un effet biologique de l'IL-13 sur les neutrophiles humains, dix années plus tôt [361]. Il reste donc à identifier le(s) récepteur(s) impliqué(s) dans la réponse à l'IL-4 par les neutrophiles équins.

Nos travaux montrent pour la première fois que l'expression du CD23 est induite par l'IL-4 chez les neutrophiles équins. Comme mentionné dans le paragraphe précédent, les niveaux de base d'ARNm détecté étaient inférieurs dans les extraits de neutrophiles sanguins par rapport à ceux des leucocytes totaux. Ces résultats sont en accord avec le fait que les mononucléaires expriment constitutivement l'ARNm du CD23, tel que rapporté par Jackson et ses collègues [451]. Néanmoins, nous avons noté qu'en comparaison avec des populations mixtes de leucocytes sanguins ou pulmonaires (LBA), le ratio d'augmentation de l'expression du CD23 était au moins doublé chez les neutrophiles après stimulation avec l'IL-4 pendant 5h. Ces observations suggèrent une cinétique et des effets spécifiques de l'IL-4 pour chacune de ses populations cellulaires.

Le CD23 est un récepteur de faible affinité pour les IgEs qui est exprimé constitutivement chez l'homme par les lymphocytes B, monocytes, éosinophiles et plaquettes circulants [452]. En accord avec nos observations chez le cheval, le CD23 n'est pas exprimé de manière constitutive par les neutrophiles humains provenant de sujets normaux [453-455]. Par contre, son expression est induite sur les neutrophiles isolés du sang de patients atteints d'arthrite rhumatoïde en phase

active [456]. Bien que les conséquences biologiques de l'expression du CD23 par les neutrophiles ne soient pas bien décrites, la littérature confirme qu'il peut lier les IgEs et qu'il est fréquemment co-exprimé par les neutrophiles avec un autre récepteur pour les IgEs, le MAC-2/εBP [453]. Contrairement à nos résultats, l'IL-4 seule n'a aucun effet sur l'expression du CD23 par les neutrophiles humains [453, 456, 457], ce qui constitue une différence inter-espèce à considérer quant à l'extrapolation des mécanismes impliqués chez le cheval vers l'homme. Le GM-CSF s'est avéré stimuler l'expression génique et protéique du CD23 par les neutrophiles humains [453] mais de manière inconsistante [456, 457].

Un fait intéressant est que l'expression de CD23 soluble (CD23s) est augmentée dans la circulation des patients atteints d'asthme extrinsèque [458] et intrinsèque [459], et que dans ce dernier cas, les taux de CD23s sont indépendants du taux d'IgEs circulants. Ces données suggèrent que la présence de CD23 n'est pas attribuable à l'atopie *per se* mais à la présence d'inflammation chronique. Dans ce sens, l'augmentation de CD23s est également associée à l'arthrite rhumatoïde, à la thyroïdite auto-immune, à la myasthénie et au diabète de type I [460, 461], sans toutefois être un marqueur de l'inflammation systémique (n'est pas associé aux niveaux de CRP [460]). Qui plus est, on a démontré que les neutrophiles activés étaient responsables du clivage du CD23 membranaire exprimés par des lymphocytes B dans un système de co-culture via la relâche d'élastase et de cathepsine G [462]. Ce mode de clivage est différent de la génération spontanée de CD23s qui est effectuée par des métalloprotéinases. Enfin, cela suggère que l'inflammation neutrophilique chronique favorise l'apparition de taux élevé de CD23s. Cette molécule se lie aux intégrines  $\beta 2$  des monocytes (CD11b et CD11c), active les MAPKs et le NF- $\kappa$ B, et stimule leur production de médiateurs pro-inflammatoires (NO, flambée oxydative, TNF, IL-6 et IL-1 $\beta$ ) [462, 463] et de chimiokines pour les neutrophiles (IL-8) et monocytes (CCL2 et 3)[464]. Il est tentant de postuler qu'une rétroaction positive pourrait s'effectuer au site de l'inflammation dans le souffle, où l'IL-4 favoriserait l'expression du CD23 par les neutrophiles et les macrophages [451], lequel serait clivé par l'élastase également présente au site de l'inflammation [200], pour ensuite activer la production de chimiokines et médiateurs pro-inflammatoires par les cellules exprimant ses ligands. Le niveau de sCD23 est inversement corrélé à la fonction respiratoire chez les asthmatiques [458] et l'inhibition (souris CD23 KO) ou le blocage du CD23 par l'utilisation d'anticorps renverse la bronchoconstriction chez un modèle murin d'asthme [465]. En ce sens,



l'étude de la contribution du CD23 dans le souffle représente une perspective intéressante dans l'optique de mieux comprendre le rôle des neutrophiles dans la réponse allergique et s'avère envisageable compte tenu du développement récent d'un anticorps détectant la forme équine du CD23 [466].

*Nos résultats suggèrent que l'expression d'IL-4R $\alpha$  et de CD23 pourrait constituer des marqueurs d'activation des neutrophiles par les cytokines de type Th2 si ces récepteurs s'avéraient régulés de la même manière par l'IL-4 au niveau pulmonaire.*

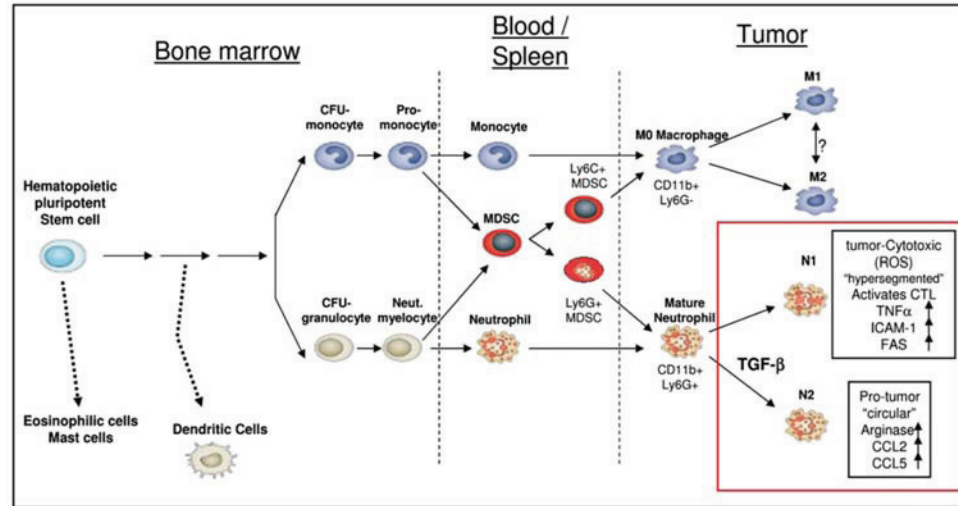
#### *Phénotype d'activation induit par l'IL-4 et concept de sous-populations*

L'IL-4 a des effets spécifiques sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires par le neutrophile. Nos résultats montrent un effet inhibiteur puissant de l'IL-4 sur l'expression d'IL-1 $\beta$  (4 à 20 fois réduit) contrairement à une augmentation de l'IL-8 et du TNF. Ce profil d'expression diffère de celui des neutrophiles stimulés avec des extraits bactériens ([148] et Article #1) ou de l'INF $\gamma$  [34] : ces agonistes ont pour leur part l'effet d'augmenter l'expression de toutes ces cytokines. En guise de comparaison, les extraits bactériens (100 ng/ml LPS, 10<sup>-8</sup>M fMLP) augmentent l'expression de TNF par les neutrophiles de 3 à 25 fois par rapport aux niveaux de base, selon les chevaux, alors que l'amplitude de l'augmentation est de 1 à 4 fois avec l'IL-4 (40 U/ml). Quant à l'IL-8, les ratios d'expression varient de 1,5 à 5 pour les extraits bactériens et de 1 à 4,5 pour l'IL-4, respectivement. Donc, l'IL-4 est comparable aux extraits bactériens (aux concentrations utilisées) pour induire l'expression d'IL-8 mais est beaucoup moins puissante pour stimuler l'expression de TNF. D'ailleurs, la stimulation bactérienne induit l'expression du TLR4, mais pas l'IL-4R $\alpha$ , et inversement, l'IL-4 favorise l'expression de l'IL-4R $\alpha$  et du CD23, mais pas du TLR4. Chacun de ces agonistes semblent donc induire un phénotype d'activation spécifique chez le neutrophile équin. L'étude de l'effet combiné du LPS et de l'IL-4 constitue une perspective intéressante compte tenu du fait que ces agonistes sont probablement réunis dans l'environnement pulmonaire chez une proportion considérable d'individus souffrant d'inflammation chronique des voies respiratoires, et particulièrement chez les chevaux atteints du souffle. La dose de ces agonistes et la séquence de leur interaction pourraient influencer le profil et le niveau d'activation des neutrophiles, tel que suggéré par des études *in vivo* utilisant des modèles murins ([233] et revu dans [467]).

D'ailleurs, différents phénotypes d'activation des neutrophiles ont été identifiés dans des modèles murins. Une étude a mis en évidence chez les souris beiges SCID (*severe combined immunodeficient*) infectées avec une souche de *Staphylococcus aureus* méthicilline-résistante (MRSA) l'existence de neutrophiles possédant différents phénotypes. Ceux-ci exprimaient des profils de cytokines, chimiokines et récepteurs différents et des fonctionnalités variantes [468]. Les souches de souris résistantes à l'infection présentaient des neutrophiles sanguins (PMN I) exprimant les cytokines et chimiokines CXCL1, CCL3, IL-12, TNF et IL-1 $\beta$ , les récepteurs TLR2, TLR4, TLR8 et CD49b, et avaient un métabolisme oxydatif actif et un pouvoir de *killing* élevé. Les neutrophiles des souches de souris susceptibles (PMNs II) exprimaient le CXCL1, CCL2, IL-4, IL-10, TNF IL-1 $\beta$ , les récepteurs TLR2, TLR4, TLR7, TLR9 et CD11b et présentaient un métabolisme oxydatif et un pouvoir de *killing* similaire aux PMNs I. Les neutrophiles des souris normales (taux de survie intermédiaire) n'exprimaient que le TNF, l'IL-1 $\beta$  et de faibles taux de CXCL1 et les récepteurs TL2, TLR4 et TLR9, sans activité bactéricide. Les PMNs I et II étaient associés à la présence de macrophages présentant un profil d'activation classique (CCL5, iNOS) et alternatif (CCL17, récepteur du mannose), responsables de la résistance ou de la susceptibilité des souris à l'infection, respectivement. Le transfert adoptif des PMNs I et II conférait aux souris beiges SCID dépouillées de neutrophiles la résistance ou la susceptibilité, respectivement, à l'infection avec MRSA. En 2009, un même genre de classification a été proposé pour les neutrophiles associés aux tumeurs chez la souris, soit N1 ou N2, à la manière des macrophages M1 et M2 chez la souris (**Figure 26**) [469]. Dans cette étude, le TGF $\beta$  sécrété par la tumeur favorisait la polarisation des neutrophiles en N2, exprimant le CCL2, CCL5, VEGF et l'arginase 1 alors que son inhibition recrutait des populations de neutrophiles N1 exprimant le TNF, CCL3 et ICAM-1. Les N1 avaient une activité antitumorale alors que les N2 étaient pro-oncogènes, encore une fois en association avec des macrophages activés de manière classique ou alternative, respectivement.

Chez l'homme, Gallin reconnaissait déjà en 1984, l'hétérogénéité des neutrophiles circulants [435]. Celle-ci s'exprimait par des densités cellulaires et des aptitudes de locomotion, de phagocytose et d'activation du métabolisme oxydatif différentes ainsi que par l'expression différentielle des récepteurs pour le fMLP et les Igs. De plus, on a reconnu récemment que les neutrophiles humains pouvaient être « reprogrammés » par les cytokines, une propriété essentielle des cellules appartenant à l'immunité acquise, tel que décrit par Chakravarti [470].

Ainsi, cet auteur a étudié la reprogrammation des neutrophiles stimulés avec un cocktail de cytokines constitué de GM-CSF, TNF et IL-4. Ces cytokines sont communes à plusieurs conditions pathologiques impliquant l'inflammation chronique des tissus incluant l'arthrite, l'asthme (revu dans [470]) et le souffle [395, 399, 426]. Une faible population (8-17%) de neutrophiles stimulés avec ce cocktail cytokinique survivait plus de 3 jours en culture. Ces derniers exprimaient des marqueurs typiques des neutrophiles matures (CD11b, CD18 et CD32) avec une néo-expression de molécules d'adhésion CD49d (intégrines  $\alpha 4$ ) et ICAM-1, ainsi que des molécules associées à la présentation d'antigènes HLA-DR (CMHII) et CD80. Ces neutrophiles présentaient également une augmentation de leur pouvoir oxydatif en réponse au fMLP (augmentation du nombre de récepteurs), de production de leucotriènes (association de la 5-LO à la membrane nucléaire) et d'efficacité de phagocytose associés à une diminution de leur capacité de locomotion et de dégranulation. De plus, leur production spontanée d'IL-8, IL-1 $\beta$  et IL-1RA était accrue et certaines molécules associées à des voies de signalisation spécifiques étaient phosphorylées (p38 $\delta$  MAPK, GSK (*glycogen synthase kinase*)-3 $\alpha/\beta$ , RSK (*ribosomal protein S6 kinase*)-1, AKT 1 et 2). Ces neutrophiles démontraient finalement une adhérence accrue à des lignées de cellules structurelles (fibroblastes et ostéoclastes) en co-culture. Dans une autre étude, on a démontré que les neutrophiles conditionnés par un milieu riche en cytokines exprimait tardivement le CCL2, chimiokine exprimées par les neutrophiles polarisés PMN II et N2 décrits par Tsuda [468] et Fridlender [469] chez la souris (cités précédemment). Le TNF contenu dans le milieu conditionné s'avérait contribuer significativement à la reprogrammation phénotypique des neutrophiles.



**Figure 26.** Origine et différenciation des cellules suppressives d'origine myéloïde associées aux tumeurs (MDSC, myeloid-derived suppressor cells). Tiré de Fridlender et al, 2009 [469].

Enfin, *in vivo*, on a retrouvé un phénotype similaire chez les neutrophiles isolés des voies respiratoires de patients atteints de fibrose kystique [128] ou présents dans le liquide synovial (SF) de patients atteints d'arthrite rhumatoïde [471]. Dans le premier cas, ils présentaient les caractéristiques observées chez les neutrophiles activés *in vitro* (CD80, CMHII, RSK (*ribosomal protein S6 kinase*)-1, métabolisme oxydatif activé), et de plus, un marqueur associé à l'activation alternative des macrophages, le CD294 ou récepteur des prostanoides DP<sub>2</sub>. Les neutrophiles isolés des patients atteints d'arthrite rhumatoïde présentaient quant à eux, une augmentation de récepteurs impliqués dans la phagocytose (CD14, FcγRI) et la présentation d'antigènes (CMHII, CD83) [471]. Les cytokines présentes dans le SF incluait le GM-CSF, TNF et IL-4, comme celles utilisés par Chakravarti dans son étude *in vitro*, par contre l'inhibition de l'INFγ principalement, aussi présent dans le SF et sécrété par les lymphocytes T en co-culture, s'avérait renverser la « transdifférenciation » des neutrophiles.

Nos résultats confirment l'existence de sous-populations de neutrophiles exprimant les cytokines régulées par l'IL-4 chez le cheval. Jusqu'à récemment, la piètre disponibilité d'anticorps spécifiques à l'espèce a restreint les chercheurs à étudier l'expression génique des cytokines chez le cheval. Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse ont permis pour la première fois de montrer l'expression protéique de cytokines exprimées par les neutrophiles équinés à l'aide

d'anticorps spécifiques pour l'IL-1 $\beta$  et le TNF utilisés en immunohistochimie (ICC), en cytométrie de flux (Article #3) ou en ELISA (Article #2). Le pourcentage de neutrophiles exprimant l'IL-1 $\beta$  (Article #3, double marquage par cytométrie de flux) et le TNF (expériences préliminaires en cytométrie et ICC) se situait autour de 0.1%. En guise de comparaison, environ 4-12% des cellules mononucléaires était positifs pour ces cytokines, pour le même type de stimulation. D'ailleurs, à l'ELISA, les concentrations de TNF dans les surnageants de cultures de neutrophiles étaient nettement inférieures, sinon indétectables, par rapport aux mononucléaires (Article #1). Les résultats des études sur le changement phénotypique des neutrophiles humains stimulés *in vitro* montrent que similairement, les marqueurs associés à la présentation de l'antigène ne sont exprimés que par une très petite sous-population de neutrophiles au final (ex. 0.39% HLA-DR<sup>+</sup> et 0.037% CD86<sup>+</sup>), considérant que seulement 13% des cellules initialement mises en culture ont été analysées. De même, 10% des neutrophiles présentant une demi-vie prolongée au site de l'inflammation exprimaient les marqueurs d'intérêt chez les patients atteints de fibrose cystique.

En résumé, les cytokines peuvent induire une reprogrammation du phénotype chez une sous-population de neutrophiles et en quelque sorte transformer leur statut de cellule *circulante* à celui de cellule *résidente*, défiant les croyances usuelles concernant les fonctions du neutrophile. Ce phénotype peut être associé à différents types de réponses immunitaires, plus ou moins bénéfique pour l'hôte. Dans notre étude, l'IL-4 a induit un phénotype distinctif chez le neutrophile équin. Il sera intéressant de connaître l'effet de l'IL-4, combinée ou non à d'autres cytokines exprimées au site de l'inflammation dans le souffle, sur le phénotype des neutrophiles équins stimulés plus longuement. Une comparaison subséquente de ce profil avec celui de neutrophiles récupérés au site de l'inflammation chez les chevaux sains et atteints du souffle permettra de mieux comprendre les causes et les mécanismes de l'inflammation chronique chez les chevaux susceptibles. La perspective selon laquelle le neutrophile puisse jouer un rôle centrale lors de la réponse inflammatoire associée au souffle, comme c'est le cas dans le modèle d'infection chez la souris beige SCID [468], ou alors dans la réponse acquise via l'expression de molécules de co-stimulation et de présentation de l'antigène, est envisageable. Il est à noter qu'une étude récente effectuée dans notre laboratoire a démontré que le gène du CD294 (DP<sub>2</sub>) est surrégulé dans les tissus pulmonaires périphériques des chevaux atteints du souffle symptomatiques [472]. Ce récepteur est associé à l'activation alternative des macrophages et est aussi exprimé par les

neutrophiles « transdifférentiés » chez les patients atteints de fibrose cystique ([128], citée précédemment). Également, l'expression du CCL5, une des chimiokines exprimées par les neutrophiles de phénotype N2, décrits dans l'étude de Fridlender et collègues chez la souris [469], fait parti des gènes associés à l'exacerbation clinique du souffle dans cette étude.

### **Les neutrophiles et leur expression de l'arginase dans la réponse allergique**

L'arginase est un marqueur de l'activation alternative des macrophages [473] et des neutrophiles murins [296, 469]. L'IL-4 et l'IL-13 permettent d'induire ce phénotype *in vitro* dans les deux populations cellulaires. L'activation alternative des macrophages a été typiquement associée aux infections parasitaires et à la réponse allergique chez les modèles expérimentaux (Tableau VI). Ces cellules sont aussi présentes dans d'autres contextes d'inflammation chronique incluant les cancers [469] et certaines infections [468]. L'activité de l'arginase et ses produits dérivés pourraient être impliqués dans certains des événements majeurs associés à la réponse allergique incluant la contraction du muscle lisse bronchique (diminution de la production de NO), la prolifération des cellules structurelles (polyamines) et la fibrose (L-proline).

Chez l'homme, l'arginase 1 est exprimé constitutivement par les neutrophiles et ne subit pas de régulation par les cytokines de type Th2 [296]. De plus, les macrophages humains stimulés avec l'IL-4 ou l'IL-13 n'expriment pas l'arginase 1 [297]. Ces observations sont contraires à celles obtenues chez la souris. L'expression d'arginase 1 par les neutrophiles humains a été associée à plusieurs conditions où l'inflammation chronique des tissus étaient observées (cancers, infections, ulcères, cicatrisation, arthrite rhumatoïde). L'expression d'arginase par les neutrophiles n'a toutefois pas encore été associée à la pathophysiologie de l'asthme chez l'homme, malgré le fait que l'enzyme soit surrégulée au niveau périphérique et local chez les patients atteints.

Compte tenu du changement phénotypique observé chez le neutrophile équin stimulé avec l'IL-4, nous avons émis l'hypothèse que l'arginase puisse constituer un marqueur de son activation « alternative ». L'expression d'arginase 1 par le neutrophile équin pourrait constituer un lien entre la neutrophilie des voies respiratoires, l'expression de cytokines de type Th2 et les changements physiopathologiques associés au souffle. Nous avons postulé que le cheval pourrait représenter un modèle approprié pour l'étude de la contribution de l'arginase dans la pathogénie de l'asthme advenant que son expression et sa régulation soit similaire entre les deux espèces.

**Tableau VI.** Phénotype et caractéristiques des macrophages activés

<b>CAM<math>\phi</math></b>	<b>AAM<math>\phi</math></b>	<b>RegM<math>\phi</math></b>
<b>Éléments déclencheurs</b>		
INF $\gamma$ avec le TNF ou INF $\beta$ avec agonistes des TLRs Sources : cellules NK (stress ou infection) et/ou Th1, GM-CSF [71]	<b>IL-4, IL-13</b> Sources : basophiles, macrophages [474], mastocytes, neutrophiles [468, 475, 476] et/ou Th2, M-CSF Chitine des champignons et parasites	Glucocorticoïdes (axe HPA) Phase tardive de la réponse immunitaire TLRs + complexes immuns Activation des RCPG Prostaglandines, cellules apoptotiques, IL-10, adénosine, dopamine, histamine, shingosine-1-phosphate, siglec-9
<b>Produits, récepteurs et métabolisme</b>		
Activation de l'IRF5 [71] iNOS Radicaux libres (NO $\cdot$ -, O $_2$ $\cdot$ -) $\uparrow\uparrow$ cytokines pro-inflammatoires (NF- $\kappa$ B) : IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-23 TNF, IL-12, CCL3, CCL22, RANTES [71] CD80, CD86, CMHII CD40, CD1a, CCR7 [71]	Activation de C/EBP $\beta$ et IRF4 [71] IL-10, IGF-1, CCL2, CCL13, M-CSFR and MSR1 [71] <b>Arginase 1<sup>a</sup> et produits</b> dérivés (polyamines, proline), <i>Chitinase-like proteins</i> (Ym-1) <sup>a</sup> , Fizz1 <sup>a</sup> , <b>IL-4R<math>\alpha</math><sup>a</sup></b> Résistines (RELM $\alpha$ ) Composants de la matrice extracellulaire CD206, CD163, CLEC10A [71]	TGF $\beta$ CD80, CD86, CMHII Activation de ERK ratio IL-10/IL-12 $\uparrow\uparrow$ SPHK1
<b>Fonctions immunitaires</b>		
Activité microbicide, anti-tumorales, présentation de l'antigène	Élimination des helminthes et nématodes Dépôt de matrice extracellulaire Pauvre activité de présentation de l'antigène Inhibition de la prolifération des lymphocytes	Freine la réponse inflammatoire Phagocytose des cellules apoptotiques, Associés aux tumeurs (immunosurveillance) Présentation de l'antigène
<b>Pathologies associées</b>		
Maladies autoimmunes : ex. arthrite rhumatoïde, maladies inflammatoires chroniques intestinales	Schistosomiase chronique, <b>asthme expérimentale</b>	Croissance et propagation des pathogènes intracellulaires (ex. tripanosomes, <i>Leishmania</i> spp., <i>Bacillus anthracis</i> ) Progression des néoplasmes

CAM $\phi$  : *classically activated macrophages*, AAM $\phi$  : *alternatively activated macrophages*, Reg $\phi$  : *regulatory macrophages*. <sup>a</sup> chez la souris seulement [297]. CD206, *mannose receptor type C1*, MRC1; CD163, *Hemoglobin Scavenger Receptor*; CLEC10A, *human macrophage galactose-type C-type lectin*; M-CSFR, *macrophage colony stimulating factor receptor*; MSR1, *Macrophage scavenger receptor 1*, CD204; IGF-1, *Insulin growth factor-1*; SPHK1, *sphingosine kinase 1*; *Modifié de l'article [66]*.

Nos résultats suggèrent que des différences inter-espèces existent quant à l'expression des isoformes de l'arginase par les neutrophiles humains, murins et équins (Article #4). En effet, nous n'avons trouvé aucune trace d'expression génique ou protéique de l'arginase 1 dans des extraits provenant de neutrophiles périphériques ou pulmonaires de chevaux sains ou atteints de souffle, ni dans les cellules isolées de la moelle osseuse (résultats non montrés). L'IL-4 utilisée pour stimuler les neutrophiles sanguins jusqu'à 18h s'est avérée inapte à induire chez eux l'expression d'ARNm de l'arginase 1. À l'opposé, l'arginase 2 était constitutivement détectée au niveau génique et protéique dans les neutrophiles équins. Ces résultats montrent que les neutrophiles équins diffèrent à la fois des neutrophiles de souris et d'humain (**Tableau VII**).

**Tableau VII.** Comparaison inter-espèce de l'expression des isoformes de l'arginase par les neutrophiles

	Homme	Souris	Cheval
<b>Arginase 1</b>			
ARNm	+ : précurseurs myéloïdes - : neutrophiles matures	+ : Induit par IL-4/IL-13	-
Protéine	+ : constitutive, neutrophiles matures	+ : Induit par IL-4/IL-13	-
<b>Arginase 2</b>			
ARNm	- : neutrophiles matures + : neutrophiles du SF de patients arthritiques [477]	Possible [478]	+ : neutrophiles matures
Protéine	- : neutrophiles matures + : neutrophiles présents dans les cicatrices cutanées [304]	?	+ : neutrophiles matures

– : non-exprimé. + : exprimé. ? : aucune donnée répertoriée.

Nous avons discuté précédemment du fait que le phénotype des neutrophiles induit par l'IL-4 chez le cheval ne correspondait pas en tous points aux effets de l'IL-4 sur les neutrophiles humains (ex. expression du CD23). Il est possible, compte tenu de ces apparentes différences inter-espèce, que d'autres cytokines puissent induire l'expression d'arginase 1 par les neutrophiles équins (ex. GM-CSF, IL-13, TNF, TGF $\beta$ , ensemble ou indépendamment), ou alors que des temps d'incubation plus longs soient requis pour finaliser leur « *transdifférentiation* » *in vitro* avec l'IL-4 (en référence à l'étude de Chakravarti [470]).



Nous avons utilisé un test d'activité enzymatique pour confirmer la fonctionnalité de l'isoforme 2 de l'arginase exprimée par les neutrophiles équins. La faible activité détectée par rapport à celle obtenue pour les neutrophiles humains (approx. 60 *versus* 750 U/g de protéines) s'est tout de même avérée spécifiquement inhibée par la nor-NOHA. Cette différence d'activité pourrait s'expliquer simplement par le fait que la concentration des isoformes 1 de l'arginase présentes dans le neutrophile humain soit supérieure à celle des isoformes 2 chez le neutrophile équin. Alternativement, les différences relatives aux propriétés physico-chimiques des deux isoformes et de leurs sous-unités pourraient faire en sorte d'affecter leur potentiel enzymatique dans les conditions du test suggérées par le fabricant [479]. Celles-ci peuvent varier également en fonction des espèces [480].

Le rôle biologique de l'arginase 2 et ses mécanismes de régulation sont certes moins bien décrits que ceux de l'arginase 1, plus particulièrement en ce qui concerne les neutrophiles. Les informations dérivant des études faites chez l'homme, la souris et le rat suggèrent une certaine similarité entre les deux isoformes quant à leurs produits métaboliques et leurs effets globaux. Chez l'homme, les deux isoenzymes sont homologues à 100% au niveau de la séquence qui code la portion responsable de leur activité enzymatique [481]. Les séquences de l'arginase 2 chez le cheval, la souris et le rat sont homologues à 91%, 88,7% et 86,7% à la séquence humaine, respectivement (NCBI UniGene # Eca.3103, Mm.3506 et Rn.11055). Ainsi, lorsque des cellules endothéliales sont transfectées pour surexprimer l'arginase 1 ou 2, on observe que, malgré une activité enzymatique inférieure détectée chez les cellules transfectées avec le gène de l'arginase 2 (25% de l'arginase 1), l'effet des deux isoformes sur l'inhibition de la synthèse de NO et sur la production de polyamines (putrescine et spermidine) est le même. Les cellules surexprimant l'arginase 2 consomment également plus d'arginine (33%) et synthétisent plus de proline (40%) et de glutamate (68%) par rapport aux cellules non-transfectées mais de manière inférieures à celles qui expriment l'arginase 1 (efficacité par rapport à l'arginase 1 exprimée en %)[482]. La prolifération des cellules endothéliales est augmentée de manière équivalente par l'arginase 1 et 2 [483]. Les cellules qui n'expriment que l'arginase 2 au niveau mitochondrial semblent utiliser un pool intracellulaire de L-arginine pour réguler la production de NO, contrairement à l'arginase 1 cytosolique qui utilise la L-arginine extracellulaire et ses transporteurs (CAT-1) [484]. Des rôles comparables de l'arginase 1 et 2 ont été rapportés quant à 1) la régulation de la contraction de

l'endomètre et des niveaux de GMPc et d'endothéline-1, aussi impliqués dans la contraction du muscle, chez le rat [485]; 2) la régulation de la synthèse de NO par les macrophages humain et murin [477, 486] et 3) la cicatrisation normale de la peau [304]. Enfin, l'arginase 2 est responsable de la dysfonction érectile chez les patients atteints de diabète de type I [487]. Les taux élevés d'arginase 1 dans le sang des patients asthmatiques [264, 265] pourrait similairement contribuer à causer cette même condition, récemment associée à l'asthme [488].

Une étude récente effectuée sur des fibroblastes et macrophages pulmonaires de rat et d'humain questionne la prémisse d'une activité biologique similaire des deux isoformes de l'arginase chez les différentes espèces animales. Warnken et ses collègues ont démontré que les fibroblastes et les macrophages humains expriment majoritairement l'arginase 2, contrairement aux mêmes types cellulaires de rat dont l'arginase 1 était l'isoenzyme principale [489]. L'activité enzymatique détectée était supérieure chez le rat, malgré une quantité de collagène synthétisée égale (fibroblastes). La nor-NOHA et le BEC, deux inhibiteurs de l'arginase, avait peu d'effet sur la synthèse de collagène chez l'homme, mais s'avérait efficace chez le rat. Ces auteurs suggèrent qu'une voie alternative, celle de la L-glutamine, soit responsable de générer la L-proline et la synthèse de collagène chez l'homme.

Globalement, ces observations suggèrent que le neutrophile équin exprimant l'isoforme 2 de l'arginase pourrait réguler la production de NO, de polyamines et de L-proline, en agissant respectivement sur la contraction du muscle lisse, la prolifération cellulaire et la synthèse de collagène. La détection de l'expression des enzymes ornithine aminotransférase (OAT) et ornithine décarboxylase (ODC) par le neutrophile équin supporte d'ailleurs cette hypothèse. Il reste à déterminer si des différences significatives existent dans la fonction des isoformes de l'arginase chez le cheval et l'impact concret de l'expression d'arginase 2 sur l'environnement du neutrophile équin. Néanmoins, le modèle équin d'asthme, comme celui du rat [490], de la souris [262, 263, 491-495] et du cobaye [294, 295, 496], suggère que la surrégulation des arginases soit associée à la pathologie des maladies respiratoires. L'augmentation de l'expression d'arginase 2 dans les poumons périphériques des chevaux atteints du souffle après une provocation antigénique et la fréquence plus élevée de l'expression d'arginase 1 au niveau génique semblent être associés à une activité enzymatique éminente de cette enzyme chez les chevaux malades par rapport aux contrôles. Plusieurs questions subsistent quant à la source et à l'importance de

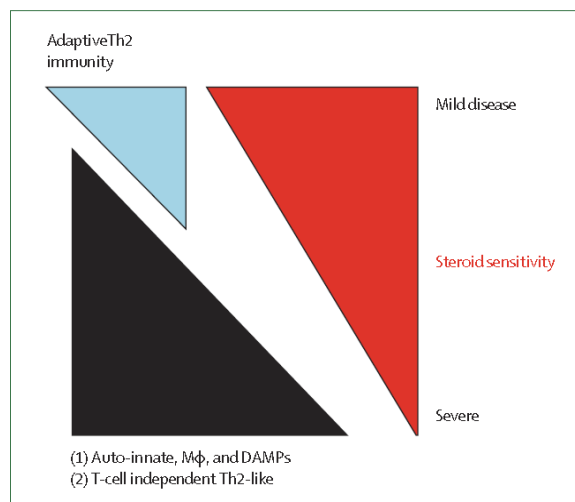
l'expression des arginases dans le souffle. Par exemple, est-ce que l'arginase 2 est un marqueur du recrutement des leucocytes qui expriment principalement cet isoforme? Des corrélations effectuées entre les pourcentages de neutrophiles et l'expression d'arginase 2 dans le poumon périphérique suggèrent que non (résultats non-montrés). L'effet de l'environnement, riche en endotoxines, et des cytokines exprimées au site de l'inflammation reste également à être démontré.

### **Le lien entre la réponse innée et acquise dans le souffle**

L'asthme est une condition pathologique regroupant plusieurs endotypes cliniques définis par des mécanismes moléculaires et des réponses aux traitements spécifiques [208]. Le souffle chez le cheval est probablement plus homogène comme pathologie puisque, tel que défini, il s'associe à un seul type d'inflammation (neutrophilique) et à une réponse aux traitements relativement uniforme. La liste croissante des points communs entre les deux pathologies suggère que l'étude du souffle peut s'avérer utile à la compréhension des mécanismes sous-jacents à certains endotypes asthmatiques, et inversement. Par l'entremise de l'étude du neutrophile en tant que cellule effectrice de l'inflammation chronique, les résultats des recherches effectuées dans ce projet de thèse montrent l'interconnexion vraisemblable entre des branches immunitaires innée et acquise dans la pathogénie du souffle.

Les études découlant de l'énonciation de l'*hypothèse de l'hygiène* suggèrent qu'un défaut de la maturation du système immunitaire inné soit responsable de la sensibilisation allergique chez certains individus. Une telle hypothèse est à considérer également pour le cheval atteint du souffle, maladie associée à la domestication des chevaux et donc au changement d'alimentation, d'environnement ainsi qu'à l'utilisation de vermifuges et de vaccins réduisant le risque d'infections [497]. Nos résultats suggèrent qu'un défaut de la réponse innée est également associé au souffle, mais il reste à déterminer si ce défaut est 1) une caractéristique intrinsèque aux animaux susceptibles, soit génétique ou représentative d'un défaut de maturation du système immunitaire; ou 2) la conséquence de l'inflammation chronique systémique présente chez les animaux malades. Dans tous les cas, le neutrophile recruté en réponse à une offensive tissulaire a le potentiel de favoriser la sensibilisation allergique par la production de produits signalant le « danger » et influençant la maturation des cellules dendritiques pulmonaires ayant capturé un antigène.

La production de cytokines de type Th2 est associée au souffle et nous pouvons aujourd'hui postuler que ces cytokines influencent le phénotype des neutrophiles et leur production de chimiokines favorisant l'inflammation neutrophilique. Les cytokines de type Th2 peuvent être produites lors d'une réponse immunitaire indépendante des cellules T (donc innée) et ce genre de réponse a été proposé récemment comme mécanisme sous-jacent à une proportion considérable d'endotypes d'asthme (**Figure 27**) [208]. L'« *inflammation de type Th2* » est associée de manière générale à l'inflammation chronique des tissus et expliquerait l'activation alternative des neutrophiles et macrophages associée à plusieurs pathologies. Il convient de rappeler que la réponse de type Th2 est le résultat d'une évolution du génome pour combattre les infections parasitaires et donc se veut combattive sans causer de dommages collatéraux aux tissus infectés [417].

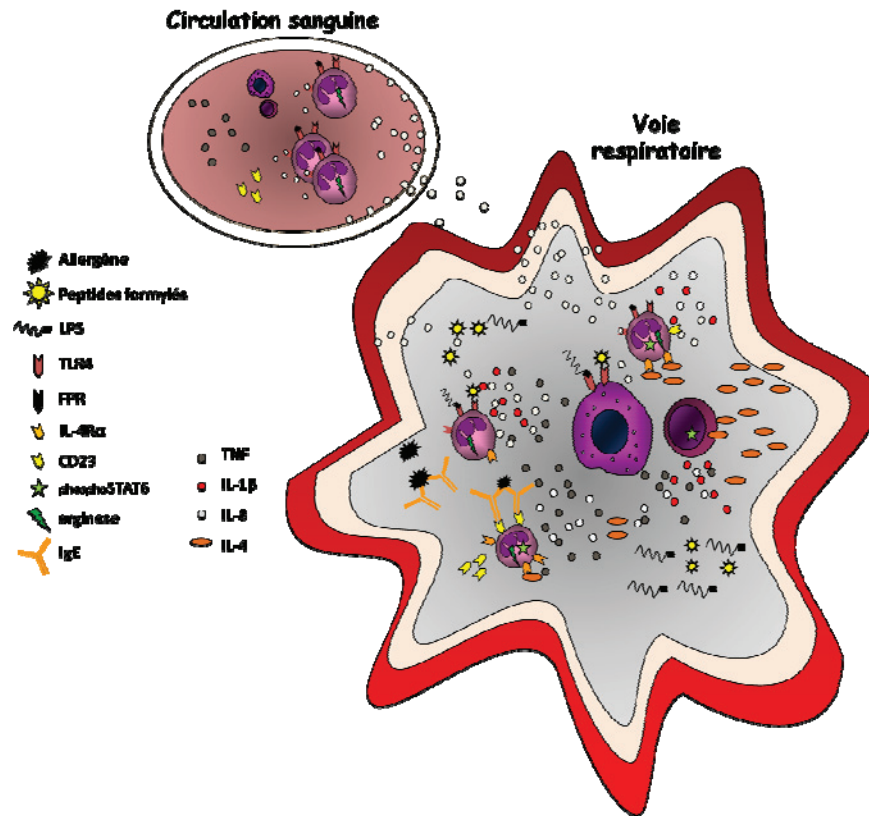


**Figure 27.** Diagramme représentant l'importance inattendue de l'immunité innée et de la réponse de type Th2 indépendante des cellules T comme mécanismes impliqués dans l'asthme.

*Tiré de Anderson et al, 2008 [208]*

Cette perspective élargit encore davantage le spectre des actions potentielles du neutrophile dans la réponse asthmatique: il pourrait 1) constituer une source de cytokines de type Th2, en particulier d'IL-4 [468, 475, 476] et biaiser la réponse inflammatoire en ce sens; 2) épouser

un phénotype relatif aux cellules présentatrices de l'antigène et contribuer à l'activation spécifique de lymphocytes et ce, au-delà du site de l'inflammation (revu dans [498]); 3) adopter un phénotype « N2 » et diriger la réponse inflammatoire par son expression de multiples cytokines, chimiokines et autres produits aux propriétés immunomodulatrices. De cette façon, le neutrophile pourrait participer à l'initiation et à la perpétuation de la réponse inflammatoire chronique. Par contre il peut aussi agir de manière à freiner l'inflammation excessive, puisqu'il a été identifié comme une des « cellules myéloïdes suppressives » effectuant l'immunosurveillance associée à l'inflammation chronique des tissus [300, 303, 308, 309]. Il sera donc primordial de définir les fonctions pro- et anti-inflammatoires du neutrophiles dans le contexte « *inflammallergique* » du souffle et de l'asthme (**Figure 28**).



**Figure 28.** Le souffle comme modèle naturel d'asthme neutrophilique : une maladie « *inflammallergique* ».

Les neutrophiles expriment les récepteurs de l'immunité innée **TLR4** et **FPR** liant les produits dérivés de bactéries **LPS** et **peptides formylés**, respectivement. Ces produits sont présents en concentration considérable dans l'environnement qui déclenche les symptômes du souffle chez les chevaux susceptibles. Les neutrophiles périphériques des chevaux atteints de cette maladie, de même que leur leucocytes mononucléaires, présentent *ex vivo* une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires **IL-1 $\beta$** , **IL-8** et **TNF** exagérée en réponse à ces agonistes. Ces cytokines pro-inflammatoires pourraient contribuer au recrutement, à l'activation et à la survie des neutrophiles dans les voies respiratoires des chevaux atteints de souffle si un phénomène similaire s'observait au niveau pulmonaire. Le TNF sérique, présent en concentration élevée chez ces chevaux, pourrait conditionner les leucocytes périphériques à répondre fortement aux agonistes des récepteurs de l'immunité innée. L'**IL-4**, une cytokine de type Th2 exprimée par les lymphocytes présents au site de l'inflammation et associée à la réponse allergique, active également les neutrophiles équins. Elle induit un profil d'activation caractérisé par l'activation de facteur de transcription (**phospho-STAT6**) et l'expression de récepteurs (**IL-4 $\alpha$** , **CD23**) et de cytokines pro-inflammatoires (IL-8, TNF) qui permettraient aux neutrophiles de participer à la réponse aux **allergènes** (immunité acquise) à titre de modulateur de l'inflammation neutrophilique et de **IgE-dépendante**. Enfin, l'expression d'une isoforme fonctionnelle de l'arginase (**arginase 2**) par les neutrophiles équins suggère que ces granulocytes peuvent contribuer au phénotype asthmatique via le métabolisme de la L-arginine.

## **Conclusions générales et Perspectives**

## Conclusions Générales

Nos résultats suggèrent que :

- φ La réponse innée des leucocytes sanguins des chevaux atteints du souffle est altérée : les neutrophiles et les mononucléaires expriment plus l'IL-1 $\beta$ , d'IL-8 et/ou de TNF en réponse à des produits dérivés de bactéries (LPS et fMLP). La surexpression de TNF par les neutrophiles pourrait favoriser le délai de leur apoptose spontanée.
- φ L'exacerbation clinique du souffle est associée à une inflammation systémique caractérisée par des concentrations élevées de TNF sérique qui perdure en dépit du retrait de la stimulation antigénique chez ces chevaux.
- φ Les neutrophiles équins sont activés en réponse à l'IL-4, une cytokine de type Th2 centrale dans la réponse allergique. Cette interaction induit un phénotype d'activation distinct chez les neutrophiles qui est caractérisé par l'expression accrue de cytokines pro-inflammatoires (IL-8 et TNF) et de récepteurs impliqués dans la réponse allergique (IL-4R $\alpha$  et CD23), combinée à la répression de l'expression d'IL-1 $\beta$ .
- φ L'IL-4 stimule chez les neutrophiles équins la sécrétion de chimiokines pouvant favoriser le recrutement de neutrophiles, suggérant un rôle de l'IL-4 dans la neutrophilie pulmonaire associée au souffle.
- φ Chez le cheval, l'arginase 1 n'est pas un marqueur de l'activation alternative des neutrophiles induite par l'IL-4, contrairement aux neutrophiles murins. De plus, en contraste avec le neutrophile humain qui exprime constitutivement l'arginase 1, le neutrophile équin exprime uniquement l'isoforme 2 de l'arginase.
- φ L'expression des arginase 1 et 2 est associée au souffle et à son exacerbation clinique, suggérant un rôle de ces enzymes dans cette pathologie.



**Perspectives :**

- ⌋ Déterminer si des différences au niveau de l'expression des récepteurs associés à la réponse immunitaire innée sont responsables de la réponse inflammatoire excessive par les neutrophiles et les mononucléaires chez les chevaux atteints du souffle.
- ⌋ Évaluer séparément le rôle du LPS et du fMLP sur la réponse inflammatoires des leucocytes isolés de chevaux atteints du souffle et contrôles, avec une attention particulière aux voies de signalisation impliquées dans cette réponse (ex. activation du NF-κB).
- ⌋ Distinguer l'effet de l'inflammation systémique et d'un défaut intrinsèque de la réponse innée chez les chevaux atteints du souffle
- ⌋ Identifier le phénotype des neutrophiles pulmonaires chez les chevaux atteints du souffle et évaluer l'implication des cytokines de type Th2 dans ce phénotype.
- ⌋ Déterminer *ex vivo* le potentiel immunomodulateur du neutrophile équin en termes de production de cytokines, chimiokines et molécules susceptibles d'influencer la réponse immunitaire innée et acquise. Évaluer l'expression de ces facteurs au site de l'inflammation dans le souffle.
- ⌋ Évaluer l'effet de l'arginase 2 exprimée par les neutrophiles équins sur la contraction du muscle lisse, la prolifération des cellules structurelles et leur synthèse de collagène et d'agonistes tels que le LPS sur ces processus.
- ⌋ Déterminer les aspects néfastes et bénéfiques, s'il y a lieu, de l'inflammation neutrophilique dans le souffle afin d'identifier les points de contrôles de l'inflammation et les cibles d'éventuelles thérapeutiques.

## Bibliographie

1. Jonsson, F., et al., *Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis*. J Clin Invest, 2011.
2. Fraser, R.S., *Histology and gross anatomy of the respiratory tract*, in *Physiologic basis of respiratory disease*, Q. Hamid, J. Shannon, and J. Martin, Editors. 2005, B.C. Decker: Hamilton, Ont. p. 1-26.
3. Robinson, N.E. and P.W. Furlow, *Anatomy of the respiratory system*, in *Equine respiratory medicine and surgery*, B.C. McGorum, Editor. 2007, Saunders: Edinburgh. p. 3-17.
4. West, J.B., *Respiratory physiology : the essentials*. 3rd ed. 1985, Baltimore: Williams & Wilkins. x, 183 p.
5. Thacker, E.L., *Lung inflammatory responses*. Vet Res, 2006. 37(3): p. 469-86.
6. Tschernig, T. and R. Pabst, *What is the clinical relevance of different lung compartments?* BMC Pulm Med, 2009. 9: p. 39.
7. Cheetham, J., et al., *Role of the hypoglossal nerve in equine nasopharyngeal stability*. J Appl Physiol, 2009. 107(2): p. 471-7.
8. Hall, J.E. and A.C. Guyton, *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. 12th ed. 2011, Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier. xix, 1,091 p.
9. Sorenson, P.R. and N.E. Robinson, *Postural effects on lung volumes and asynchronous ventilation in anesthetized horses*. J Appl Physiol, 1980. 48(1): p. 97-103.
10. Marlin, D.J. and C.M. Deaton, *Pulmonary function testing*, in *Equine respiratory medicine and surgery*, P.M.D. Bruce C McGorum, N Edward Robinson, Jim Schumacher, Editor. 2007, Saunders: Edinburgh. p. 211-233.
11. Goldsby, R.A., et al., *Immunologie : le cours de Janis Kuby : avec questions de révision*. Sciences sup. 2003, Paris: Dunod. xxvii, 660.

12. Hilty, M., et al., *Disordered microbial communities in asthmatic airways*. PLoS ONE, 2010. 5(1): p. e8578.
13. Tizard, I.R., *Veterinary immunology : an introduction*. 7th ed. 2004, Philadelphia: Saunders. xvi, 494.
14. Varelle, M., et al., *The Airway Epithelium: Soldier in the Fight against Respiratory Viruses*. Clin Microbiol Rev, 2011. 24(1): p. 210-29.
15. King, M., *Mucus and its role in airway clearance and cytoprotection in Physiologic basis of respiratory disease*, Q. Hamid, J. Shannon, and J. Martin, Editors. 2005, B.C. Decker: Hamilton, Ont. p. 409-416.
16. Korner, H., et al., *The role of TNF in parasitic diseases: still more questions than answers*. Int J Parasitol, 2010. 40(8): p. 879-88.
17. Price, S.R., T. Olivecrona, and P.H. Pekala, *Regulation of lipoprotein lipase synthesis in 3T3-L1 adipocytes by cachectin. Further proof for identity with tumour necrosis factor*. Biochem J, 1986. 240(2): p. 601-4.
18. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. Nat Rev Immunol, 2003. 3(9): p. 745-56.
19. Black, R.A., et al., *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells*. Nature, 1997. 385(6618): p. 729-33.
20. Pham, C.T., *Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation*. Nat Rev Immunol, 2006. 6(7): p. 541-50.
21. Abe, Y., et al., *The functional role of 55- and 75-kDa tumour necrosis factor receptors in human polymorphonuclear cells in vitro*. Cytokine, 1995. 7(1): p. 39-49.
22. Gon, S., T. Gatanaga, and F. Sendo, *Involvement of two types of TNF receptor in TNF-alpha induced neutrophil apoptosis*. Microbiol Immunol, 1996. 40(6): p. 463-5.

23. Della Bianca, V., et al., *Role of 55- and 75-kDa TNF receptors in the potentiation of Fc-mediated phagocytosis in human neutrophils*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. 214(1): p. 44-50.
24. Murray, J., et al., *Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro*. *Blood*, 1997. 90(7): p. 2772-83.
25. Barnes, P.J., *Cytokine-directed therapies for the treatment of chronic airway diseases*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003. 14(6): p. 511-22.
26. Apte, R.N. and E. Voronov, *Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy?* *Immunol Rev*, 2008. 222: p. 222-41.
27. Schroder, K. and J. Tschopp, *The inflammasomes*. *Cell*, 2010. 140(6): p. 821-32.
28. Johnson, V.J., B. Yucesoy, and M.I. Luster, *Prevention of IL-1 signaling attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma*. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. 116(4): p. 851-8.
29. Nakae, S., et al., *IL-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response*. *Int Immunol*, 2003. 15(4): p. 483-90.
30. Thelen, M., *Dancing to the tune of chemokines*. *Nat Immunol*, 2001. 2(2): p. 129-34.
31. Thelen, M., et al., *Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist*. *Faseb J*, 1988. 2(11): p. 2702-6.
32. Mukaida, N., *Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003. 284(4): p. L566-77.
33. Hoffmann, E., et al., *Multiple control of interleukin-8 gene expression*. *J Leukoc Biol*, 2002. 72(5): p. 847-55.

34. Cassatella, M.A., *Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound*. Adv Immunol, 1999. 73: p. 369-509.
35. Ohashi, K., et al., *Possible identity of IL-8 converting enzyme in human fibroblasts as a cysteine protease*. Int Immunopharmacol, 2003. 3(4): p. 609-14.
36. Yue, T.L., et al., *Interleukin-8. A mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 1994. 75(1): p. 1-7.
37. Govindaraju, V., et al., *Interleukin-8: novel roles in human airway smooth muscle cell contraction and migration*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. 291(5): p. C957-65.
38. Ferrandon, D., J.L. Imler, and J.A. Hoffmann, *Sensing infection in Drosophila: Toll and beyond*. Semin Immunol, 2004. 16(1): p. 43-53.
39. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. 5(10): p. 987-95.
40. Medzhitov, R., *Toll-like receptors and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2001. 1(2): p. 135-45.
41. Drexler, S.K. and B.M. Foxwell, *The role of toll-like receptors in chronic inflammation*. Int J Biochem Cell Biol. 42(4): p. 506-18.
42. Saraiva, M. and A. O'Garra, *The regulation of IL-10 production by immune cells*. Nat Rev Immunol, 2010. 10(3): p. 170-81.
43. Tamassia, N., et al., *The MyD88-independent pathway is not mobilized in human neutrophils stimulated via TLR4*. J Immunol, 2007. 178(11): p. 7344-56.
44. Kozak, M., *Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles*. Microbiol Rev, 1983. 47(1): p. 1-45.
45. Schiffmann, E., B.A. Corcoran, and S.M. Wahl, *N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. 72(3): p. 1059-62.

46. Le, Y., P.M. Murphy, and J.M. Wang, *Formyl-peptide receptors revisited*. Trends Immunol, 2002. 23(11): p. 541-8.
47. Fabbri, E., et al., *Studies on fMLP-receptor interaction and signal transduction pathway by means of fMLP-OMe selective analogues*. Cell Signal, 2000. 12(6): p. 391-8.
48. Le, Y., et al., *Novel pathophysiological role of classical chemotactic peptide receptors and their communications with chemokine receptors*. Immunol Rev, 2000. 177: p. 185-94.
49. Berthiaume, Y., *Epithelial function in lung injury*, in *Physiologic basis of respiratory disease*, Q. Hamid, J. Shannon, and J. Martin, Editors. 2005, B.C. Decker: Hamilton, Ont. p. 439-451.
50. Wright, J.R., *Immunomodulatory functions of surfactant*. Physiol Rev, 1997. 77(4): p. 931-62.
51. Sano, H. and Y. Kuroki, *The lung collectins, SP-A and SP-D, modulate pulmonary innate immunity*. Mol Immunol, 2005. 42(3): p. 279-87.
52. Rada, B. and T.L. Leto, *Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases*. Contrib Microbiol, 2008. 15: p. 164-87.
53. Conner, G.E., M. Salathe, and R. Forteza, *Lactoperoxidase and hydrogen peroxide metabolism in the airway*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. 166(12 Pt 2): p. S57-61.
54. Chen, G., et al., *NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease*. Annu Rev Pathol, 2009. 4: p. 365-98.
55. Nathan, A.T., et al., *Innate immune responses of airway epithelium to house dust mite are mediated through beta-glucan-dependent pathways*. J Allergy Clin Immunol, 2009. 123(3): p. 612-8.
56. Muir, A., et al., *Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. 30(6): p. 777-83.
57. Stadnyk, A.W., *Cytokine production by epithelial cells*. Faseb J, 1994. 8(13): p. 1041-7.

58. Ritter, M., et al., *Characterization of Toll-like receptors in primary lung epithelial cells: strong impact of the TLR3 ligand poly(I:C) on the regulation of Toll-like receptors, adaptor proteins and inflammatory response*. J Inflamm (Lond), 2005. 2: p. 16.
59. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation*. Lancet, 2010. 376(9743): p. 835-43.
60. Hammad, H. and B.N. Lambrecht, *Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma*. Nat Rev Immunol, 2008. 8(3): p. 193-204.
61. Vermaelen, K. and R. Pauwels, *Pulmonary dendritic cells*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. 172(5): p. 530-51.
62. Lehnert, B.E., *Pulmonary and thoracic macrophage subpopulations and clearance of particles from the lung*. Environ Health Perspect, 1992. 97: p. 17-46.
63. Holt, P.G., et al., *Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages*. J Exp Med, 1993. 177(2): p. 397-407.
64. Parra, S.C., et al., *Zonal distribution of alveolar macrophages, type II pneumonocytes, and alveolar septal connective tissue gaps in adult human lungs*. Am Rev Respir Dis, 1986. 133(5): p. 908-12.
65. Bedoret, D., et al., *Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice*. J Clin Invest, 2009. 119(12): p. 3723-38.
66. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. 8(12): p. 958-69.
67. Careau, E. and E.Y. Bissonnette, *Adoptive transfer of alveolar macrophages abrogates bronchial hyperresponsiveness*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. 31(1): p. 22-7.

68. Hoppstadter, J., et al., *Differential cell reaction upon Toll-like receptor 4 and 9 activation in human alveolar and lung interstitial macrophages*. *Respir Res*, 2010. 11: p. 124.
69. Day, J., A. Friedman, and L.S. Schlesinger, *Modeling the immune rheostat of macrophages in the lung in response to infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(27): p. 11246-51.
70. Beharka, A.A., et al., *Pulmonary surfactant protein A up-regulates activity of the mannose receptor, a pattern recognition receptor expressed on human macrophages*. *J Immunol*, 2002. 169(7): p. 3565-73.
71. Krausgruber, T., et al., *IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and T(H)1-T(H)17 responses*. *Nat Immunol*, 2011.
72. Miller, H.R. and A.D. Pemberton, *Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut*. *Immunology*, 2002. 105(4): p. 375-90.
73. Abraham, S.N. and A.L. St John, *Mast cell-orchestrated immunity to pathogens*. *Nat Rev Immunol*, 2010. 10(6): p. 440-52.
74. Oskeritzian, C.A., et al., *Surface CD88 functionally distinguishes the MCTC from the MCT type of human lung mast cell*. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. 115(6): p. 1162-8.
75. Balzar, S., et al., *Relationship of small airway chymase-positive mast cells and lung function in severe asthma*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. 171(5): p. 431-9.
76. Hodgson, J.L. and D.R. Hodgson, *Inflammatory Airway Disease*, in *Equine Respiratory Diseases*, P. Lekeux, Editor. 2007, International Veterinary Information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)), : Ithaca, New York, USA.
77. van der Haegen, A., et al., *Mast cells and IgE-bearing cells in lungs of RAO-affected horses*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005. 108(3-4): p. 325-34.



78. Dacre, K.J., et al., *Organic dust exposure increases mast cell tryptase in bronchoalveolar lavage fluid and airway epithelium of heaves horses*. Clin Exp Allergy, 2007. 37(12): p. 1809-18.
79. Kawakami, T. and S.J. Galli, *Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE*. Nat Rev Immunol, 2002. 2(10): p. 773-86.
80. Gauvreau, G.M., et al., *Increased numbers of both airway basophils and mast cells in sputum after allergen inhalation challenge of atopic asthmatics*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. 161(5): p. 1473-8.
81. Kobayashi, Y., *The role of chemokines in neutrophil biology*. Front Biosci, 2008. 13: p. 2400-7.
82. Rankin, S.M., *The bone marrow: a site of neutrophil clearance*. J Leukoc Biol, 2010. 88(2): p. 241-51.
83. Skokowa, J. and K. Welte, *LEF-1 is a decisive transcription factor in neutrophil granulopoiesis*. Ann N Y Acad Sci, 2007. 1106: p. 143-51.
84. Elghetany, M.T., *Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review*. Blood Cells Mol Dis, 2002. 28(2): p. 260-74.
85. Faurischou, M. and N. Borregaard, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation*. Microbes Infect, 2003. 5(14): p. 1317-27.
86. Preece, G., G. Murphy, and A. Ager, *Metalloproteinase-mediated regulation of L-selectin levels on leucocytes*. J Biol Chem, 1996. 271(20): p. 11634-40.
87. Hawinkels, L.J., et al., *VEGF release by MMP-9 mediated heparan sulphate cleavage induces colorectal cancer angiogenesis*. Eur J Cancer, 2008. 44(13): p. 1904-13.

88. Laskay, T., G. van Zandbergen, and W. Solbach, *Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor*. Immunobiology, 2008. 213(3-4): p. 183-91.
89. Wolf, M., S. Albrecht, and C. Marki, *Proteolytic processing of chemokines: implications in physiological and pathological conditions*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. 40(6-7): p. 1185-98.
90. Khandaker, M.H., et al., *Metalloproteinases are involved in lipopolysaccharide- and tumor necrosis factor-alpha-mediated regulation of CXCR1 and CXCR2 chemokine receptor expression*. Blood, 1999. 93(7): p. 2173-85.
91. Teclé, T., S. Tripathi, and K.L. Hartshorn, *Review: Defensins and cathelicidins in lung immunity*. Innate Immun, 2010. 16(3): p. 151-9.
92. Quinn, K., et al., *Human neutrophil peptides: a novel potential mediator of inflammatory cardiovascular diseases*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. 295(5): p. H1817-24.
93. McDonald, J.A., *The yin and yang of fibrin in the airways*. N Engl J Med, 1990. 322(13): p. 929-31.
94. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. 303(5663): p. 1532-5.
95. Wagner, J.G. and R.A. Roth, *Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature*. Pharmacol Rev, 2000. 52(3): p. 349-74.
96. Kadono, T., et al., *Leukocyte rolling velocities and migration are optimized by cooperative L-selectin and intercellular adhesion molecule-1 functions*. J Immunol, 2002. 169(8): p. 4542-50.
97. Douglas A Steeber, H.S., Jamison J. Grailer, Rochelle M. Conway and Traci J.Storey *L-selectin-mediated leukocyte adhesion and migration*, in *Adhesion molecules function and*

- inhibition*, K. Ley and SpringerLink (Service en ligne), Editors. 2007, Birkhauser: Basel ; Boston. p. 27-70.
98. Videm, V. and E. Strand, *Changes in neutrophil surface-receptor expression after stimulation with FMLP, endotoxin, interleukin-8 and activated complement compared to degranulation*. Scand J Immunol, 2004. 59(1): p. 25-33.
99. Jagels, M.A., et al., *Mechanisms and regulation of polymorphonuclear leukocyte and eosinophil adherence to human airway epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. 21(3): p. 418-27.
100. Kishimoto, T.K., et al., *Antibodies against human neutrophil LECAM-1 (LAM-1/Leu-8/DREG-56 antigen) and endothelial cell ELAM-1 inhibit a common CD18-independent adhesion pathway in vitro*. Blood, 1991. 78(3): p. 805-11.
101. Nakada, M.T., et al., *Antibodies against the first Ig-like domain of human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) that inhibit PECAM-1-dependent homophilic adhesion block in vivo neutrophil recruitment*. J Immunol, 2000. 164(1): p. 452-62.
102. Wegmann, F., et al., *ESAM supports neutrophil extravasation, activation of Rho, and VEGF-induced vascular permeability*. J Exp Med, 2006. 203(7): p. 1671-7.
103. Bradfield, P.F., et al., *JAM family and related proteins in leukocyte migration (Vestweber series)*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. 27(10): p. 2104-12.
104. Carman, C.V. and T.A. Springer, *A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them*. J Cell Biol, 2004. 167(2): p. 377-88.
105. Atkinson, J.J. and S.D. Shapiro, *Neutrophil-mediated eosinophil transmigration: parting the Red Sea or leaving bread crumbs*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. 34(6): p. 645-6.
106. Niggli, V., *Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. 35(12): p. 1619-38.

107. Smith, L.A., et al., *Neutrophil traction stresses are concentrated in the uropod during migration*. *Biophys J*, 2007. 92(7): p. L58-60.
108. Sallusto, F. and M. Baggiolini, *Chemokines and leukocyte traffic*. *Nat Immunol*, 2008. 9(9): p. 949-52.
109. Baggiolini, M., *Chemokines and leukocyte traffic*. *Nature*, 1998. 392(6676): p. 565-8.
110. Viola, A. and A.D. Luster, *Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2008. 48: p. 171-97.
111. Kindzelskii, A.L., R.G. Sitrin, and H.R. Petty, *Cutting edge: optical microspectrophotometry supports the existence of gel phase lipid rafts at the lamellipodium of neutrophils: apparent role in calcium signaling*. *J Immunol*, 2004. 172(8): p. 4681-5.
112. Li, F., X. Zhang, and J.R. Gordon, *CXCL8((3-73))K11R/G31P antagonizes ligand binding to the neutrophil CXCR1 and CXCR2 receptors and cellular responses to CXCL8/IL-8*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 293(3): p. 939-44.
113. Khandaker, M.H., et al., *CXCR1 and CXCR2 are rapidly down-modulated by bacterial endotoxin through a unique agonist-independent, tyrosine kinase-dependent mechanism*. *J Immunol*, 1998. 161(4): p. 1930-8.
114. Bizzarri, C., et al., *ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets*. *Pharmacol Ther*, 2006. 112(1): p. 139-49.
115. Nagase, H., et al., *Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand*. *J Immunol*, 2003. 171(8): p. 3977-82.
116. Hayashi, F., T.K. Means, and A.D. Luster, *Toll-like receptors stimulate human neutrophil function*. *Blood*, 2003. 102(7): p. 2660-9.

117. O'Mahony, D.S., et al., *Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages*. Int J Med Sci, 2008. 5(1): p. 1-8.
118. Vulcano, M., et al., *N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) inhibits tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human neutrophils*. Clin Exp Immunol, 1998. 113(1): p. 39-47.
119. Brazil, T.J., et al., *Priming induces functional coupling of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine receptors in equine neutrophils*. J Leukoc Biol, 1998. 63(3): p. 380-8.
120. Brooks, A.C., K.J. Rickards, and F.M. Cunningham, *CXCL8 attenuates chemoattractant-induced equine neutrophil migration*. Vet Immunol Immunopathol, 2010.
121. Weiss, D.J. and O.A. Evanson, *Evaluation of lipopolysaccharide-induced activation of equine neutrophils*. Am J Vet Res, 2002. 63(6): p. 811-5.
122. Lecoq, L., et al., *Genomic and non-genomic effects of dexamethasone on equine peripheral blood neutrophils*. Vet Immunol Immunopathol, 2009. 128(1-3): p. 126-31.
123. Ainsworth, D.M., et al., *Time-dependent alterations in gene expression of interleukin-8 in the bronchial epithelium of horses with recurrent airway obstruction*. Am J Vet Res, 2006. 67(4): p. 669-77.
124. Liu, M., et al., *Activation of foal neutrophils at different ages by CpG oligodeoxynucleotides and Rhodococcus equi*. Cytokine, 2009. 48(3): p. 280-9.
125. Eckert, R.E., Y. Sharief, and S.L. Jones, *p38 mitogen-activated kinase (MAPK) is essential for equine neutrophil migration*. Vet Immunol Immunopathol, 2009. 129(3-4): p. 181-91.
126. Tandon, R., R.I. Sha'afi, and R.S. Thrall, *Neutrophil beta2-integrin upregulation is blocked by a p38 MAP kinase inhibitor*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 270(3): p. 858-62.

127. Seely, A.J., J.L. Pascual, and N.V. Christou, *Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance*. Crit Care, 2003. 7(4): p. 291-307.
128. Tirouvanziam, R., et al., *Profound functional and signaling changes in viable inflammatory neutrophils homing to cystic fibrosis airways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(11): p. 4335-9.
129. Coldren, C.D., et al., *Functional and genomic changes induced by alveolar transmigration in human neutrophils*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. 291(6): p. L1267-76.
130. Buckley, C.D., 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): p. 303-11.
131. Cassatella, M.A., *The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils*. Immunol Today, 1995. 16(1): p. 21-6.
132. Dubravec, D.B., et al., *Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor alpha*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(17): p. 6758-61.
133. Djeu, J.Y., D. Serbousek, and D.K. Blanchard, *Release of tumor necrosis factor by human polymorphonuclear leukocytes*. Blood, 1990. 76(7): p. 1405-9.
134. Iannone, M.A., G. Wolberg, and T.P. Zimmerman, *Chemotactic peptide induces cAMP elevation in human neutrophils by amplification of the adenylate cyclase response to endogenously produced adenosine*. J Biol Chem, 1989. 264(34): p. 20177-80.
135. Dri, P., et al., *TNF-Induced shedding of TNF receptors in human polymorphonuclear leukocytes: role of the 55-kDa TNF receptor and involvement of a membrane-bound and non-matrix metalloproteinase*. J Immunol, 2000. 165(4): p. 2165-72.
136. Engelberts, I., et al., *Evidence for different effects of soluble TNF-receptors on various TNF measurements in human biological fluids*. Lancet, 1991. 338(8765): p. 515-6.

137. Van Dervort, A.L., et al., *Nitric oxide regulates endotoxin-induced TNF-alpha production by human neutrophils*. J Immunol, 1994. 152(8): p. 4102-9.
138. Lord, P.C., et al., *Expression of interleukin-1 alpha and beta genes by human blood polymorphonuclear leukocytes*. J Clin Invest, 1991. 87(4): p. 1312-21.
139. Roberge, C.J., et al., *Crystal-induced neutrophil activation. V. Differential production of biologically active IL-1 and IL-1 receptor antagonist*. J Immunol, 1994. 152(11): p. 5485-94.
140. Brooks, C.J., et al., *IL-1 beta production by human polymorphonuclear leucocytes stimulated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies: relevance to systemic vasculitis*. Clin Exp Immunol, 1996. 106(2): p. 273-9.
141. Takeichi, O., et al., *Human polymorphonuclear leukocytes derived from chronically inflamed tissue express inflammatory cytokines in vivo*. Cell Immunol, 1994. 156(2): p. 296-309.
142. Nikolaus, S., et al., *Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation*. Gut, 1998. 42(4): p. 470-6.
143. Guma, M., et al., *Caspase 1-independent activation of interleukin-1beta in neutrophil-predominant inflammation*. Arthritis Rheum, 2009. 60(12): p. 3642-50.
144. Cassatella, M.A., et al., *IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. The chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces the gene expression and release of IL-8 through a pertussis toxin-sensitive pathway*. J Immunol, 1992. 148(10): p. 3216-20.
145. Gibson, P.G., J.L. Simpson, and N. Saltos, *Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8*. Chest, 2001. 119(5): p. 1329-36.

146. Hatanaka, E., et al., *Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes*. Clin Exp Immunol, 2006. 146(3): p. 443-7.
147. Joubert, P., et al., *Cytokine expression by peripheral blood neutrophils from heaves-affected horses before and after allergen challenge*. Vet J, 2008. 178(2): p. 227-32.
148. Joubert, P., D.W. Silversides, and J.P. Lavoie, *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): p. 730-3.
149. Nerren, J.R., et al., *Cytokine expression by neutrophils of adult horses stimulated with virulent and avirulent Rhodococcus equi in vitro*. Vet Immunol Immunopathol, 2009. 127(1-2): p. 135-43.
150. Bureau, F., et al., *Mechanisms of persistent NF-kappa B activity in the bronchi of an animal model of asthma*. J Immunol, 2000. 165(10): p. 5822-30.
151. Luo, H.R. and F. Loison, *Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation*. Am J Hematol, 2008. 83(4): p. 288-95.
152. Berker, E., et al., *Effect of neutrophil apoptosis on monocytic cytokine response to Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide*. J Periodontol, 2005. 76(6): p. 964-71.
153. Hannah, S., et al., *Constitutive neutrophil apoptosis in culture is modulated by cell density independently of beta2 integrin-mediated adhesion*. FEBS Lett, 1998. 421(2): p. 141-6.
154. Turina, M., et al., *Endotoxin inhibits apoptosis but induces primary necrosis in neutrophils*. Inflammation, 2005. 29(1): p. 55-63.
155. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2007. 176(2): p. 231-41.
156. Scheel-Toellner, D., et al., *Early events in spontaneous neutrophil apoptosis*. Biochem Soc Trans, 2004. 32(Pt3): p. 461-4.



157. Santos-Beneit, A.M. and F. Mollinedo, *Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells*. J Leukoc Biol, 2000. 67(5): p. 712-24.
158. Zauli, G. and P. Secchiero, *The role of the TRAIL/TRAIL receptors system in hematopoiesis and endothelial cell biology*. Cytokine Growth Factor Rev, 2006. 17(4): p. 245-57.
159. Moulding, D.A., et al., *Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival*. Blood, 1998. 92(7): p. 2495-502.
160. Epling-Burnette, P.K., et al., *Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils*. J Immunol, 2001. 166(12): p. 7486-95.
161. Akgul, C., D.A. Moulding, and S.W. Edwards, *Molecular control of neutrophil apoptosis*. FEBS Lett, 2001. 487(3): p. 318-22.
162. Kettritz, R., et al., *Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis of human neutrophils*. Kidney Int, 1998. 53(1): p. 84-91.
163. Kasahara, Y., et al., *Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils*. Blood, 1997. 89(5): p. 1748-53.
164. Kilpatrick, L.E., et al., *Regulation of TNF mediated antiapoptotic signaling in human neutrophils: role of delta-PKC and ERK1/2*. J Leukoc Biol, 2006. 80(6): p. 1512-21.
165. Cowburn, A.S., et al., *The survival effect of TNF-alpha in human neutrophils is mediated via NF-kappa B-dependent IL-8 release*. Eur J Immunol, 2004. 34(6): p. 1733-43.
166. Saffar, A.S., et al., *IgE modulates neutrophil survival in asthma: role of mitochondrial pathway*. J Immunol, 2007. 178(4): p. 2535-41.
167. von Gunten, S. and H.U. Simon, *Autophagic-like cell death in neutrophils induced by autoantibodies*. Autophagy, 2007. 3(1): p. 67-8.

168. Vicencio, J.M., et al., *Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review*. *Gerontology*, 2008. 54(2): p. 92-9.
169. von Gunten, S., et al., *Siglec-9 transduces apoptotic and nonapoptotic death signals into neutrophils depending on the proinflammatory cytokine environment*. *Blood*, 2005. 106(4): p. 1423-31.
170. Bachem, A., et al., *Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells*. *J Exp Med*, 2010. 207(6): p. 1273-81.
171. Hammad, H., et al., *House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells*. *Nat Med*, 2009. 15(4): p. 410-6.
172. Jakubzick, C., et al., *Modulation of dendritic cell trafficking to and from the airways*. *J Immunol*, 2006. 176(6): p. 3578-84.
173. de Heer, H.J., et al., *Dendritic cell subsets and immune regulation in the lung*. *Semin Immunol*, 2005. 17(4): p. 295-303.
174. Fallarino, F., et al., *The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells*. *J Immunol*, 2006. 176(11): p. 6752-61.
175. al-Tamemi, S. and B. Mazer, *Immunoglobulins and the lung in Physiologic basis of respiratory disease*
- Q. Hamid, J. Shannon, and J. Martin, Editors. 2005, B.C. Decker: Hamilton, Ont. p. 399-407.
176. Wagner, B., *Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse*. *Dev Comp Immunol*, 2006. 30(1-2): p. 155-64.

177. Lewis, M.J., B. Wagner, and J.M. Woof, *The different effector function capabilities of the seven equine IgG subclasses have implications for vaccine strategies*. Mol Immunol, 2008. 45(3): p. 818-27.
178. Wagner, B., et al., *IgE and IgG antibodies in skin allergy of the horse*. Vet Res, 2006. 37(6): p. 813-25.
179. Curtis, J.L., *Cell-mediated adaptive immune defense of the lungs*. Proc Am Thorac Soc, 2005. 2(5): p. 412-6.
180. Meraviglia, S., et al., *gammadelta T cells cross-link innate and adaptive immunity in Mycobacterium tuberculosis infection*. Clin Dev Immunol, 2011. 2011: p. 587315.
181. Ferrick, D.A., et al., *Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo*. Nature, 1995. 373(6511): p. 255-7.
182. Vock, C., H.P. Hauber, and M. Wegmann, *The other T helper cells in asthma pathogenesis*. J Allergy (Cairo), 2010. 2010: p. 519298.
183. Lloyd, C.M. and E.M. Hessel, *Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells*. Nat Rev Immunol, 2010. 10(12): p. 838-48.
184. Anthony, R.M., et al., *Protective immune mechanisms in helminth infection*. Nat Rev Immunol, 2007. 7(12): p. 975-87.
185. Chen, H. and W.E. Paul, *Cultured NK1.1+ CD4+ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1*. J Immunol, 1997. 159(5): p. 2240-9.
186. Zuany-Amorim, C., et al., *Requirement for gammadelta T cells in allergic airway inflammation*. Science, 1998. 280(5367): p. 1265-7.
187. Isogai, S., et al., *Resident CD8+ T cells suppress CD4+ T cell-dependent late allergic airway responses*. J Allergy Clin Immunol, 2005. 115(3): p. 521-6.

188. Koya, T., et al., *CD8+ T cell-mediated airway hyperresponsiveness and inflammation is dependent on CD4+IL-4+ T cells*. J Immunol, 2007. 179(5): p. 2787-96.
189. Shortman, K. and W.R. Heath, *The CD8+ dendritic cell subset*. Immunol Rev, 2010. 234(1): p. 18-31.
190. Alcorn, J.F., C.R. Crowe, and J.K. Kolls, *TH17 cells in asthma and COPD*. Annu Rev Physiol, 2010. 72: p. 495-516.
191. Tanaka, J., et al., *Human TSLP and TLR3 ligands promote differentiation of Th17 cells with a central memory phenotype under Th2-polarizing conditions*. Clin Exp Allergy, 2009. 39(1): p. 89-100.
192. Wakashin, H., et al., *IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. 178(10): p. 1023-32.
193. Robinson, D.S., *Regulatory T cells and asthma*. Clin Exp Allergy, 2009. 39(9): p. 1314-23.
194. Lewkowicz, P., et al., *Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death*. J Immunol, 2006. 177(10): p. 7155-63.
195. Uller, L., C.G. Persson, and J.S. Erjefalt, *Resolution of airway disease: removal of inflammatory cells through apoptosis, egression or both?* Trends Pharmacol Sci, 2006. 27(9): p. 461-6.
196. Erjefalt, J.S., et al., *Acute allergic responses induce a prompt luminal entry of airway tissue eosinophils*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. 29(4): p. 439-48.
197. Franchini, M., et al., *Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay*. Am J Vet Res, 2000. 61(11): p. 1369-74.

198. Ordonez, C.L., et al., *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): p. 1185-90.
199. Feltis, B.N., et al., *BAL eotaxin and IL-5 in asthma, and the effects of inhaled corticosteroid and beta2 agonist*. Respirology, 2004. 9(4): p. 507-13.
200. Brazil, T.J., et al., *Kinetics of pulmonary neutrophil recruitment and clearance in a natural and spontaneously resolving model of airway inflammation*. Clin Exp Allergy, 2005. 35(7): p. 854-65.
201. Knight, D., *Epithelium-fibroblast interactions in response to airway inflammation*. Immunol Cell Biol, 2001. 79(2): p. 160-4.
202. Meneghin, A. and C.M. Hogaboam, *Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis*. J Clin Invest, 2007. 117(3): p. 530-8.
203. Wynn, T.A., *Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases*. J Clin Invest, 2007. 117(3): p. 524-9.
204. Bergeron, C., et al., *Regulation of procollagen I (alpha1) by interleukin-4 in human bronchial fibroblasts: a possible role in airway remodelling in asthma*. Clin Exp Allergy, 2003. 33(10): p. 1389-97.
205. Halwani, R., S. Al-Muhsen, and Q. Hamid, *Airway remodeling in asthma*. Curr Opin Pharmacol, 2010. 10(3): p. 236-45.
206. Galli, S.J., M. Tsai, and A.M. Piliponsky, *The development of allergic inflammation*. Nature, 2008. 454(7203): p. 445-54.
207. Bel, E.H., *Clinical phenotypes of asthma*. Curr Opin Pulm Med, 2004. 10(1): p. 44-50.
208. Anderson, G.P., *Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease*. Lancet, 2008. 372(9643): p. 1107-19.

209. Pavord, I.D. and A.J. Wardlaw, *The A to E of airway disease*. Clin Exp Allergy, 2010. 40(1): p. 62-7.
210. Wenzel, S.E., *Asthma: defining of the persistent adult phenotypes*. Lancet, 2006. 368(9537): p. 804-13.
211. Barnes, P.J., *Intrinsic asthma: not so different from allergic asthma but driven by superantigens?* Clin Exp Allergy, 2009. 39(8): p. 1145-51.
212. Johansson, S.G., et al., *Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003*. J Allergy Clin Immunol, 2004. 113(5): p. 832-6.
213. Busse, W.W. and R.F. Lemanske, Jr., *Asthma*. N Engl J Med, 2001. 344(5): p. 350-62.
214. El Biaze, M., et al., *T cell activation, from atopy to asthma: more a paradox than a paradigm*. Allergy, 2003. 58(9): p. 844-53.
215. Magnan, A.O., et al., *Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. Increased IFN-gamma-producing CD8(+) T cells in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. 161(6): p. 1790-6.
216. Bettiol, J., et al., *Cytokine production from peripheral whole blood in atopic and nonatopic asthmatics: relationship with blood and sputum eosinophilia and serum IgE levels*. Allergy, 2000. 55(12): p. 1134-41.
217. Powe, D.G., A.J. Bonnin, and N.S. Jones, *'Entropy': local allergy paradigm*. Clin Exp Allergy, 2010. 40(7): p. 987-97.
218. Herz, U., et al., *Airway exposure to bacterial superantigen (SEB) induces lymphocyte-dependent airway inflammation associated with increased airway responsiveness--a model for non-allergic asthma*. Eur J Immunol, 1999. 29(3): p. 1021-31.

219. Cartier, A., *Occupational asthma: what have we learned?* J Allergy Clin Immunol, 1998. 102(5): p. S90-5.
220. Malo, J.L., *Future advances in work-related asthma and the impact on occupational health.* Occup Med (Lond), 2005. 55(8): p. 606-11.
221. Lemiere, C., et al., *Airway inflammation and functional changes after exposure to different concentrations of isocyanates.* J Allergy Clin Immunol, 2002. 110(4): p. 641-6.
222. Zietkowski, Z., et al., *Eotaxin-1 in exhaled breath condensate of stable and unstable asthma patients.* Respir Res, 2010. 11: p. 110.
223. Barnes, P.J. and I.M. Adcock, *Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases.* Lancet, 2009. 373(9678): p. 1905-17.
224. Cox, G., *Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes.* J Immunol, 1995. 154(9): p. 4719-25.
225. Strickland, I., et al., *High constitutive glucocorticoid receptor beta in human neutrophils enables them to reduce their spontaneous rate of cell death in response to corticosteroids.* J Exp Med, 2001. 193(5): p. 585-93.
226. Gibson, P.G., *Inflammatory phenotypes in adult asthma: clinical applications.* Clin Respir J, 2009. 3(4): p. 198-206.
227. Green, R.H., et al., *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): p. 875-9.
228. Berry, M., et al., *Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and non-eosinophilic asthma.* Thorax, 2007. 62(12): p. 1043-9.
229. Strachan, D.P., *Hay fever, hygiene, and household size.* BMJ, 1989. 299(6710): p. 1259-60.

230. Strachan, D.P., *Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis"*. *Thorax*, 2000. 55 Suppl 1: p. S2-10.
231. Ege, M.J., et al., *Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma*. *N Engl J Med*, 2011. 364(8): p. 701-9.
232. Piggott, D.A., et al., *MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen*. *J Clin Invest*, 2005. 115(2): p. 459-67.
233. Eisenbarth, S.C., et al., *Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen*. *J Exp Med*, 2002. 196(12): p. 1645-51.
234. Dabbagh, K., et al., *Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells*. *J Immunol*, 2002. 168(9): p. 4524-30.
235. Dittrich, A.M., et al., *A new mechanism for inhalational priming: IL-4 bypasses innate immune signals*. *J Immunol*, 2008. 181(10): p. 7307-15.
236. Ritz, S.A., et al., *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor-driven respiratory mucosal sensitization induces Th2 differentiation and function independently of interleukin-4*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002. 27(4): p. 428-35.
237. Eder, W., et al., *Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. 113(3): p. 482-8.
238. Chun, E., et al., *Toll-like receptor expression on peripheral blood mononuclear cells in asthmatics; implications for asthma management*. *J Clin Immunol*, 2010. 30(3): p. 459-64.
239. Schaub, B., R. Lauener, and E. von Mutius, *The many faces of the hygiene hypothesis*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. 117(5): p. 969-77; quiz 978.
240. Wills-Karp, M., et al., *New insights into innate immune mechanisms underlying allergenicity*. *Mucosal Immunol*, 2010. 3(2): p. 104-10.



241. Prescott, S.L., et al., *Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile*. J Immunol, 1998. 160(10): p. 4730-7.
242. Boyd, N.K., et al., *Temporal changes in cytokine expression of foals during the first month of life*. Vet Immunol Immunopathol, 2003. 92(1-2): p. 75-85.
243. Lee, H.H., et al., *Delayed maturation of an IL-12-producing dendritic cell subset explains the early Th2 bias in neonatal immunity*. J Exp Med, 2008. 205(10): p. 2269-80.
244. Zaghouani, H., C.M. Hoeman, and B. Adkins, *Neonatal immunity: faulty T-helpers and the shortcomings of dendritic cells*. Trends Immunol, 2009. 30(12): p. 585-91.
245. Okada, H., et al., *The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update*. Clin Exp Immunol, 2010. 160(1): p. 1-9.
246. Hartl, D., et al., *Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2007. 119(5): p. 1258-66.
247. Lim, R.H., L. Kobzik, and M. Dahl, *Risk for asthma in offspring of asthmatic mothers versus fathers: a meta-analysis*. PLoS ONE, 2010. 5(4): p. e10134.
248. Litonjua, A.A., et al., *Parental history and the risk for childhood asthma. Does mother confer more risk than father?* Am J Respir Crit Care Med, 1998. 158(1): p. 176-81.
249. Tariq, S.M., et al., *The prevalence of and risk factors for atopy in early childhood: a whole population birth cohort study*. J Allergy Clin Immunol, 1998. 101(5): p. 587-93.
250. Steinke, J.W., S.S. Rich, and L. Borish, *5. Genetics of allergic disease*. J Allergy Clin Immunol, 2008. 121(2 Suppl): p. S384-7; quiz S416.
251. Rosa-Rosa, L., et al., *The R576 IL-4 receptor alpha allele correlates with asthma severity*. J Allergy Clin Immunol, 1999. 104(5): p. 1008-14.

252. Hershey, G.K., et al., *The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor*. *N Engl J Med*, 1997. 337(24): p. 1720-5.
253. Mitsuyasu, H., et al., *Ile50Val variant of IL4R alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma*. *Nat Genet*, 1998. 19(2): p. 119-20.
254. Knutsen, A.P., et al., *Increased sensitivity to IL-4 in cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis*. *Allergy*, 2004. 59(1): p. 81-7.
255. Baldini, M., et al., *A Polymorphism\* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999. 20(5): p. 976-83.
256. Simpson, A., et al., *Endotoxin exposure, CD14, and allergic disease: an interaction between genes and the environment*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. 174(4): p. 386-92.
257. Kabesch, M., *A glitch in the switch? Of endotoxin, CD14, and allergy*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. 174(4): p. 365-6.
258. Fageras Bottcher, M., et al., *A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. 114(3): p. 561-7.
259. Werner, M., et al., *TLR4 gene variants modify endotoxin effects on asthma*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. 112(2): p. 323-30.
260. Lachheb, J., et al., *Toll-like receptors and CD14 genes polymorphisms and susceptibility to asthma in Tunisian children*. *Tissue Antigens*, 2008. 71(5): p. 417-25.
261. Adjers, K., et al., *Epistatic effect of TLR4 and IL4 genes on the risk of asthma in females*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2005. 138(3): p. 251-6.
262. Zimmermann, N., et al., *Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis*. *J Clin Invest*, 2003. 111(12): p. 1863-74.

263. North, M.L., et al., *Functionally important role for arginase 1 in the airway hyperresponsiveness of asthma*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009. 296(6): p. L911-20.
264. Morris, C.R., et al., *Decreased arginine bioavailability and increased serum arginase activity in asthma*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004. 170(2): p. 148-53.
265. Ogino, K., et al., *High serum arginase I levels in asthma: its correlation with high-sensitivity C-reactive protein*. *J Asthma*, 2011. 48(1): p. 1-7.
266. Li, H., et al., *Genetic polymorphisms in arginase I and II and childhood asthma and atopy*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. 117(1): p. 119-26.
267. Salam, M.T., et al., *Roles of arginase variants, atopy, and ozone in childhood asthma*. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. 123(3): p. 596-602, 602 e1-8.
268. Vonk, J.M., et al., *Arginase 1 and arginase 2 variations associate with asthma, asthma severity and beta2 agonist and steroid response*. *Pharmacogenet Genomics*, 2010. 20(3): p. 179-86.
269. Maarsingh, H., J. Zaagsma, and H. Meurs, *Arginine homeostasis in allergic asthma*. *Eur J Pharmacol*, 2008. 585(2-3): p. 375-84.
270. Ricciardolo, F.L., et al., *Nitric oxide in health and disease of the respiratory system*. *Physiol Rev*, 2004. 84(3): p. 731-65.
271. Reczkowski, R.S. and D.E. Ash, *Rat liver arginase: kinetic mechanism, alternate substrates, and inhibitors*. *Arch Biochem Biophys*, 1994. 312(1): p. 31-7.
272. Griffith, O.W. and D.J. Stuehr, *Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism*. *Annu Rev Physiol*, 1995. 57: p. 707-36.

273. Maarsingh, H., et al., *Arginase attenuates inhibitory nonadrenergic noncholinergic nerve-induced nitric oxide generation and airway smooth muscle relaxation*. *Respir Res*, 2005. 6: p. 23.
274. Ten Broeke, R., et al., *Overexpression of endothelial nitric oxide synthase suppresses features of allergic asthma in mice*. *Respir Res*, 2006. 7: p. 58.
275. Connelly, L., et al., *Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide*. *J Immunol*, 2001. 166(6): p. 3873-81.
276. Thomassen, M.J., et al., *Nitric oxide inhibits inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997. 17(3): p. 279-83.
277. Ying, L. and L.J. Hofseth, *An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer*. *Cancer Res*, 2007. 67(4): p. 1407-10.
278. Porsbjerg, C., et al., *Inflammatory subtypes in asthma are related to airway hyperresponsiveness to mannitol and exhaled NO*. *J Asthma*, 2009. 46(6): p. 606-12.
279. Berry, M.A., et al., *The use of exhaled nitric oxide concentration to identify eosinophilic airway inflammation: an observational study in adults with asthma*. *Clin Exp Allergy*, 2005. 35(9): p. 1175-9.
280. Hastie, A.T., et al., *Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. 125(5): p. 1028-1036 e13.
281. Ho, L.P., et al., *Atopy influences exhaled nitric oxide levels in adult asthmatics*. *Chest*, 2000. 118(5): p. 1327-31.
282. Mahut, B., et al., *Multicentre trial evaluating alveolar NO fraction as a marker of asthma control and severity*. *Allergy*, 2010. 65(5): p. 636-44.

283. Szeffler, S.J., et al., *Management of asthma based on exhaled nitric oxide in addition to guideline-based treatment for inner-city adolescents and young adults: a randomised controlled trial*. *Lancet*, 2008. 372(9643): p. 1065-72.
284. Munder, M., *Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system*. *Br J Pharmacol*, 2009. 158(3): p. 638-51.
285. Hesse, M., et al., *Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism*. *J Immunol*, 2001. 167(11): p. 6533-44.
286. Endo, M., et al., *Induction of arginase I and II in bleomycin-induced fibrosis of mouse lung*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003. 285(2): p. L313-21.
287. Chang, C.I., J.C. Liao, and L. Kuo, *Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity*. *Cancer Res*, 2001. 61(3): p. 1100-6.
288. Pegg, A.E., *Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes*. *Biochem J*, 1986. 234(2): p. 249-62.
289. Hobbs, C.A. and S.K. Gilmour, *High levels of intracellular polyamines promote histone acetyltransferase activity resulting in chromatin hyperacetylation*. *J Cell Biochem*, 2000. 77(3): p. 345-60.
290. Vaubourdolle, M., et al., *Action of ornithine alpha ketoglutarate on DNA synthesis by human fibroblasts*. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1990. 26(2): p. 187-92.
291. Kucharzewska, P., et al., *Ornithine decarboxylase and extracellular polyamines regulate microvascular sprouting and actin cytoskeleton dynamics in endothelial cells*. *Exp Cell Res*.
292. Ignarro, L.J., et al., *Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(7): p. 4202-8.

293. Liang, M., et al., *Polyamine synthesis inhibition attenuates vascular smooth muscle cell migration*. *J Vasc Res*, 2004. 41(2): p. 141-7.
294. Maarsingh, H., et al., *Increased arginase activity contributes to airway remodelling in chronic allergic asthma*. *Eur Respir J*, 2011.
295. Maarsingh, H., et al., *Arginase inhibition protects against allergen-induced airway obstruction, hyperresponsiveness, and inflammation*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008. 178(6): p. 565-73.
296. Munder, M., et al., *Arginase 1 is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity*. *Blood*, 2005. 105(6): p. 2549-56.
297. Raes, G., et al., *Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells*. *J Immunol*, 2005. 174(11): p. 6561; author reply 6561-2.
298. Luckner-Minden, C., et al., *Human eosinophil granulocytes do not express the enzyme arginase*. *J Leukoc Biol*, 2010. 87(6): p. 1125-32.
299. Jacobsen, L.C., et al., *Arginase 1 is expressed in myelocytes/metamyelocytes and localized in gelatinase granules of human neutrophils*. *Blood*, 2007. 109(7): p. 3084-7.
300. Rodriguez, P.C., et al., *Arginase 1-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes*. *Cancer Res*, 2009. 69(4): p. 1553-60.
301. Rotondo, R., et al., *IL-8 induces exocytosis of arginase 1 by neutrophil polymorphonuclears in nonsmall cell lung cancer*. *Int J Cancer*, 2009. 125(4): p. 887-93.
302. King, C.H., P.J. Spagnuolo, and J.J. Ellner, *Differential contribution of chemotaxins and opsonins to neutrophil-mediated killing of *Schistosoma mansoni* larvae*. *Infect Immun*, 1986. 52(3): p. 748-55.

303. Munder, M., et al., *Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase*. *Blood*, 2006. 108(5): p. 1627-34.
304. Debats, I.B., et al., *Role of arginine in superficial wound healing in man*. *Nitric Oxide*, 2009. 21(3-4): p. 175-83.
305. Rotondo, R., et al., *Exocytosis of azurophil and arginase 1-containing granules by activated polymorphonuclear neutrophils is required to inhibit T lymphocyte proliferation*. *J Leukoc Biol*, 2011.
306. Kropf, P., et al., *Arginase activity mediates reversible T cell hyporesponsiveness in human pregnancy*. *Eur J Immunol*, 2007. 37(4): p. 935-45.
307. Rubin-Bejerano, I., et al., *Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(19): p. 11007-12.
308. Baniyash, M., *TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response*. *Nat Rev Immunol*, 2004. 4(9): p. 675-87.
309. Bronte, V. and P. Zanovello, *Regulation of immune responses by L-arginine metabolism*. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(8): p. 641-54.
310. Bogdan, C., *Nitric oxide and the immune response*. *Nat Immunol*, 2001. 2(10): p. 907-16.
311. Padgett, E.L. and S.B. Pruetz, *Rat, mouse and human neutrophils stimulated by a variety of activating agents produce much less nitrite than rodent macrophages*. *Immunology*, 1995. 84(1): p. 135-41.
312. Holm, P., et al., *No detectable NO synthesis from L-arginine or N(G)-hydroxy-L-arginine in fMLP-stimulated human blood neutrophils despite production of nitrite, nitrate, and citrulline from N(G)-hydroxy-L-arginine*. *J Leukoc Biol*, 1999. 66(1): p. 127-34.

313. Ramesh, G., et al., *Increased nitric oxide production by neutrophils in bronchial asthma*. Eur Respir J, 2001. 17(5): p. 868-71.
314. Chen, L.Y. and J.L. Mehta, *Variable effects of L-arginine analogs on L-arginine-nitric oxide pathway in human neutrophils and platelets may relate to different nitric oxide synthase isoforms*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. 276(1): p. 253-7.
315. Wheeler, M.A., et al., *Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils*. J Clin Invest, 1997. 99(1): p. 110-6.
316. Cedergren, J., et al., *Inducible nitric oxide synthase (NOS II) is constitutive in human neutrophils*. Apmis, 2003. 111(10): p. 963-8.
317. Singer, II, et al., *Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 1996. 111(4): p. 871-85.
318. Takeichi, O., et al., *Cytokine regulation on the synthesis of nitric oxide in vivo by chronically infected human polymorphonuclear leucocytes*. Immunology, 1998. 93(2): p. 275-80.
319. Lapointe Corriveau, C., *Évaluation quantitative de l'oxyde nitrique produit par les neutrophiles sanguins de chevaux sains*, in *Département de sciences cliniques*. 2004, Université de Montréal: Montréal. p. xx, 103 f.
320. Bienkowska-Haba, M., J. Liebhart, and M. Cembrzynska-Nowak, *Nitric oxide production by pulmonary leukocytes from induced sputum in patients with asthma and its effect on epithelial cell viability*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2006. 54(3): p. 201-7.
321. Skoner, D.P., et al., *Plasma elevations of histamine and a prostaglandin metabolite in acute asthma*. Am Rev Respir Dis, 1988. 137(5): p. 1009-14.
322. Taylor, G.W., et al., *Urinary leukotriene E4 after antigen challenge and in acute asthma and allergic rhinitis*. Lancet, 1989. 1(8638): p. 584-8.



323. Lee, Y.C., et al., *Serum levels of interleukins (IL)-4, IL-5, IL-13, and interferon-gamma in acute asthma*. J Asthma, 2001. 38(8): p. 665-71.
324. Higashimoto, Y., et al., *Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and asthma: Similarities and differences*. Respirology, 2008. 13(1): p. 128-33.
325. Kato, M., et al., *Serum eosinophil cationic protein and 27 cytokines/chemokines in acute exacerbation of childhood asthma*. Int Arch Allergy Immunol, 2010. 152 Suppl 1: p. 62-6.
326. Silvestri, M., et al., *High serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-8 in severe asthma: markers of systemic inflammation?* Clin Exp Allergy, 2006. 36(11): p. 1373-81.
327. Lopuhaa, C.E., et al., *Allergen-induced bronchial inflammation in house dust mite-allergic patients with or without asthma*. Clin Exp Allergy, 2002. 32(12): p. 1720-7.
328. Nordman, S.A. and P.W. Nyberg, *Whole blood chemiluminescence as a systemic inflammatory parameter in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 1994. 94(5): p. 853-60.
329. Leckie, M.J., et al., *Automated quantitation of circulating neutrophil and eosinophil activation in asthmatic patients*. Thorax, 2000. 55(6): p. 471-7.
330. Olafsdottir, I.S., et al., *C reactive protein levels are increased in non-allergic but not allergic asthma: a multicentre epidemiological study*. Thorax, 2005. 60(6): p. 451-4.
331. Sahoo, R.C., et al., *A study of high-sensitivity C-reactive protein in bronchial asthma*. Indian J Chest Dis Allied Sci, 2009. 51(4): p. 213-6.
332. Kasayama, S., et al., *Asthma is an independent risk for elevation of plasma C-reactive protein levels*. Clin Chim Acta, 2009. 399(1-2): p. 79-82.
333. Jousilahti, P., et al., *The association of sensitive systemic inflammation markers with bronchial asthma*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2002. 89(4): p. 381-5.

334. Koh, Y.Y., et al., *A comparison of serum haptoglobin levels between acute exacerbation and clinical remission in asthma*. Clin Exp Allergy, 1996. 26(10): p. 1202-9.
335. Wu, T.L., et al., *A panel of multiple markers associated with chronic systemic inflammation and the risk of atherogenesis is detectable in asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. J Clin Lab Anal, 2007. 21(6): p. 367-71.
336. Ozseker, F., et al., *Serum amyloid A (SAA) in induced sputum of asthmatics: a new look to an old marker*. Int Immunopharmacol, 2006. 6(10): p. 1569-76.
337. Wouters, E.F., et al., *Systemic and local inflammation in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: is there a connection?* Proc Am Thorac Soc, 2009. 6(8): p. 638-47.
338. Qiu, Y., et al., *Bronchial mucosal inflammation and upregulation of CXC chemoattractants and receptors in severe exacerbations of asthma*. Thorax, 2007. 62(6): p. 475-82.
339. Tillie-Leblond, I., P. Gosset, and A.B. Tonnel, *Inflammatory events in severe acute asthma*. Allergy, 2005. 60(1): p. 23-9.
340. Simpson, J.L., et al., *Clarithromycin targets neutrophilic airway inflammation in refractory asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. 177(2): p. 148-55.
341. Abraham, E., *Neutrophils and acute lung injury*. Crit Care Med, 2003. 31(4 Suppl): p. S195-9.
342. Barnes, P.J., *New molecular targets for the treatment of neutrophilic diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2007. 119(5): p. 1055-62; quiz 1063-4.
343. Singh, A.M. and W.W. Busse, *Asthma exacerbations. 2: aetiology*. Thorax, 2006. 61(9): p. 809-16.
344. Kamath, A.V., et al., *Is the neutrophil the key effector cell in severe asthma?* Thorax, 2005. 60(7): p. 529-30.

345. Douwes, J., et al., *Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms*. Thorax, 2002. 57(7): p. 643-8.
346. Schneider, T., et al., *Kinetics and quantitation of eosinophil and neutrophil recruitment to allergic lung inflammation in a brown Norway rat model*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. 17(6): p. 702-12.
347. Bowles, K.S., et al., *A novel model for equine recurrent airway obstruction*. Vet Immunol Immunopathol, 2002. 87(3-4): p. 385-9.
348. Danahay, H., et al., *Temporal relationships between leukocytes, IL-5 and IL-8 in guinea pig lungs, plasma cortisol and airway function after antigen challenge*. Inflamm Res, 1999. 48(1): p. 41-7.
349. Fujimoto, K., et al., *Neutrophil elastase inhibitor reduces asthmatic responses in allergic sheep*. Respir Physiol, 1995. 100(1): p. 91-100.
350. Montefort, S., et al., *Bronchial biopsy evidence for leukocyte infiltration and upregulation of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules 6 hours after local allergen challenge of sensitized asthmatic airways*. J Clin Invest, 1994. 93(4): p. 1411-21.
351. Monteseirin, J., et al., *L-selectin expression on neutrophils from allergic patients*. Clin Exp Allergy, 2005. 35(9): p. 1204-13.
352. Monteseirin, J., et al., *Human neutrophils synthesize IL-8 in an IgE-mediated activation*. J Leukoc Biol, 2004. 76(3): p. 692-700.
353. Monteseirin, J., et al., *Enhancement of Antigen-specific functional responses by neutrophils from allergic patients*. J Exp Med, 1996. 183(6): p. 2571-9.
354. Ratthe, C., et al., *Interleukin (IL)-4 induces leukocyte infiltration in vivo by an indirect mechanism*. Mediators Inflamm, 2009. 2009: p. 193970.

355. Gilleece, M.H., et al., *Recombinant human interleukin 4 (IL-4) given as daily subcutaneous injections--a phase I dose toxicity trial*. Br J Cancer, 1992. 66(1): p. 204-10.
356. Striz, I., et al., *IL-4 and IL-13 stimulate human bronchial epithelial cells to release IL-8*. Inflammation, 1999. 23(6): p. 545-55.
357. Huang, H., et al., *IL-4 stimulates the expression of CXCL-8, E-selectin, VEGF, and inducible nitric oxide synthase mRNA by equine pulmonary artery endothelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. 292(5): p. L1147-54.
358. Buckley, M.G., et al., *IL-4 enhances IL-3 and IL-8 gene expression in a human leukemic mast cell line*. Immunology, 1995. 84(3): p. 410-5.
359. Bober, L.A., et al., *IL-4 induces neutrophilic maturation of HL-60 cells and activation of human peripheral blood neutrophils*. Clin Exp Immunol, 1995. 99(1): p. 129-36.
360. Girard, D., R. Paquin, and A.D. Beaulieu, *Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis*. Biochem J, 1997. 325 ( Pt 1): p. 147-53.
361. Girard, D., et al., *Effects of interleukin-13 on human neutrophil functions*. J Leukoc Biol, 1996. 59(3): p. 412-9.
362. Boey, H., et al., *Interleukin-4 is a neutrophil activator*. J Allergy Clin Immunol, 1989. 83(5): p. 978-84.
363. Shimbara, A., et al., *IL-9 and its receptor in allergic and nonallergic lung disease: increased expression in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2000. 105(1 Pt 1): p. 108-15.
364. Soussi-Gounni, A., et al., *Functional expression of IL-9 receptor by human neutrophils from asthmatic donors: role in IL-8 release*. J Immunol, 2001. 166(4): p. 2768-74.
365. Niiro, H., et al., *Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils*. Blood, 1997. 89(5): p. 1621-8.

366. Marie, C., et al., *IL-10 and IL-4 synergize with TNF-alpha to induce IL-1ra production by human neutrophils*. Cytokine, 1996. 8(2): p. 147-51.
367. Marie C, P.C., Fitting C, Cavaillon J M., *Regulation by anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13 and TGF- $\beta$ ) of interleukin-8 production by LPS- and/or TNF-alpha-activated human polymorphonuclear cells*. Mediators of Inflammation 1996: p. 334.
368. Reglier-Poupet, H., et al., *Absence of regulation of human polymorphonuclear oxidative burst by interleukin-10, interleukin-4, interleukin-13 and transforming growth factor-beta in whole blood*. Eur Cytokine Netw, 1998. 9(4): p. 633-8.
369. Simpson, J.L., et al., *Innate immune activation in neutrophilic asthma and bronchiectasis*. Thorax, 2007. 62(3): p. 211-8.
370. Michel, O., J. Duchateau, and R. Sergysels, *Effect of inhaled endotoxin on bronchial reactivity in asthmatic and normal subjects*. J Appl Physiol, 1989. 66(3): p. 1059-64.
371. Hotchkiss, J.W., S.W. Reid, and R.M. Christley, *A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: Risk factors for recurrent airway obstruction*. Equine Vet J, 2007. 39(4): p. 301-8.
372. Degueurce, C. *Les traitements de la pousse par nos anciens*. in *11th Geneva Congress on equine Medicine and Surgery*. 2009. Geneva.
373. Bouley, H., in *Nouveau dictionnaire lexicographique et descriptif des sciences médicales et vétérinaires*, M.M. Raige-Delorme, et al., Editors. 1863, Asselin: Paris. p. 1073-1074.
374. Robinson, N., *International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University 16-18 June 2000*. Equine Vet J, 2001. 33(1): p. 5-19.
375. Lavoie, J.-P., *Recurrent airway obstruction (Heaves) and Summer-pasture-associated Obstructive Pulmonary Disease*, in *Equine respiratory medicine and surgery*, B.C. McGorum, et al., Editors. 2007, Saunders: Edinburgh. p. 565-589.

376. Seahorn, T.L., et al., *Chronic obstructive pulmonary disease in horses in Louisiana*. J Am Vet Med Assoc, 1996. 208(2): p. 248-51.
377. Seahorn, T.L. and R.E. Beadle, *Summer pasture-associated obstructive pulmonary disease in horses: 21 cases (1983-1991)*. J Am Vet Med Assoc, 1993. 202(5): p. 779-82.
378. Costa, L.R., et al., *Temporal clinical exacerbation of summer pasture-associated recurrent airway obstruction and relationship with climate and aeroallergens in horses*. Am J Vet Res, 2006. 67(9): p. 1635-42.
379. Robinson, N.E., et al., *Relationship between clinical signs and lung function in horses with recurrent airway obstruction (heaves) during a bronchodilator trial*. Equine Vet J, 2000. 32(5): p. 393-400.
380. Alexis, N.E., et al., *Induced sputum derives from the central airways: confirmation using a radiolabeled aerosol bolus delivery technique*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. 164(10 Pt 1): p. 1964-70.
381. Setlakwe, E.L., M. Leclere, and J.-P. Lavoie. *Sub-Epithelial Fibrosis Is Present in the Peripheral Airways of Heaves-Affected Horses, an Equine Model for Asthma*. in *American Thoracic Society International Conference*. 2009. San Diego Convention Center, San Diego, California: Am J Respir Crit Care Med 179;2009:A5058
382. Herszberg, B., et al., *Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling*. J Allergy Clin Immunol, 2006. 118(2): p. 382-8.
383. Hodgson, J.L. and D.R. Hodson, *Equine respiratory medicine and surgery*, in *Collection and analysis of respiratory tract samples*, B.C. McGorum, Editor. 2007, Saunders: Edinburgh. p. 119-150.
384. Jean, D., et al., *Monthly and lung site variations of bronchoalveolar lavage fluid analysis in heaves-affected horses* Am J Vet Res, Sous presse.

385. Leclere, M., et al., *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): p. 316-21.
386. McGorum, B.C., P.M. Dixon, and R.E. Halliwell, *Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens*. Equine Vet J, 1993. 25(4): p. 261-7.
387. McGorum, B.C., P.M. Dixon, and R.E. Halliwell, *Evaluation of intradermal mould antigen testing in the diagnosis of equine chronic obstructive pulmonary disease*. Equine Vet J, 1993. 25(4): p. 273-5.
388. Schmallenbach, K.H., et al., *Studies on pulmonary and systemic Aspergillus fumigatus-specific IgE and IgG antibodies in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease (COPD)*. Vet Immunol Immunopathol, 1998. 66(3-4): p. 245-56.
389. Kunzle, F., et al., *IgE-bearing cells in bronchoalveolar lavage fluid and allergen-specific IgE levels in sera from RAO-affected horses*. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med, 2007. 54(1): p. 40-7.
390. Eder, C., et al., *Influence of environmental and genetic factors on allergen-specific immunoglobulin-E levels in sera from Lipizzan horses*. Equine Vet J, 2001. 33(7): p. 714-20.
391. Deaton, C.M., et al., *Early onset airway obstruction in response to organic dust in the horse*. J Appl Physiol, 2007. 102(3): p. 1071-7.
392. Hare, J.E., et al., *In vitro allergen-induced degranulation of pulmonary mast cells from horses with recurrent airway obstruction (heaves)*. Am J Vet Res, 1999. 60(7): p. 841-7.
393. McGorum, B.C., P.M. Dixon, and R.E. Halliwell, *Quantification of histamine in plasma and pulmonary fluids from horses with chronic obstructive pulmonary disease, before and after 'natural (hay and straw) challenges'*. Vet Immunol Immunopathol, 1993. 36(3): p. 223-37.

394. Cordeau, M.E., et al., *IL-4, IL-5 and IFN-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2004. 97(1-2): p. 87-96.
395. Lavoie, J.P., et al., *Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. 164(8 Pt 1): p. 1410-3.
396. Dewachi, O., et al., *Expression of interleukin (IL)-5 and IL-9 receptors on neutrophils of horses with heaves*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006. 109(1-2): p. 31-6.
397. Kleiber, C., et al., *Cytokine profiles of peripheral blood and airway CD4 and CD8 T lymphocytes in horses with recurrent airway obstruction*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005. 104(1-2): p. 91-7.
398. Beadle, R.E., D.W. Horohov, and S.D. Gaunt, *Interleukin-4 and interferon-gamma gene expression in summer pasture-associated obstructive pulmonary disease affected horses*. *Equine Vet J*, 2002. 34(4): p. 389-94.
399. Giguere, S., et al., *Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2002. 85(3-4): p. 147-58.
400. Ainsworth, D.M., et al., *Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN-gamma and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2003. 96(1-2): p. 83-91.
401. Horohov, D.W., et al., *Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005. 108(1-2): p. 237-45.
402. Debrue, M., et al., *Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005. 105(1-2): p. 25-31.
403. McGorum, B.C., J. Ellison, and R.T. Cullen, *Total and respirable airborne dust endotoxin concentrations in three equine management systems*. *Equine Vet J*, 1998. 30(5): p. 430-4.



404. Pirie, R.S., et al., *Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses*. Equine Vet J, 2001. 33(3): p. 311-8.
405. Pirie, R.S., et al., *Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma)*. Clin Exp Allergy, 2003. 33(5): p. 676-83.
406. Pirie, R.S., P.M. Dixon, and B.C. McGorum, *Endotoxin contamination contributes to the pulmonary inflammatory and functional response to Aspergillus fumigatus extract inhalation in heaves horses*. Clin Exp Allergy, 2003. 33(9): p. 1289-96.
407. Sandersen, C., et al., *p65 Homodimer activity in distal airway cells determines lung dysfunction in equine heaves*. Vet Immunol Immunopathol, 2001. 80(3-4): p. 315-26.
408. Werners, A.H., et al., *Genotyping of Toll-like receptor 4, myeloid differentiation factor 2 and CD-14 in the horse: an investigation into the influence of genetic polymorphisms on the LPS induced TNF-alpha response in equine whole blood*. Vet Immunol Immunopathol, 2006. 111(3-4): p. 165-73.
409. Pirie, R.S., G. McLachlan, and B.C. McGorum, *Evaluation of nebulised hay dust suspensions (HDS) for the diagnosis and investigation of heaves. 1: Preparation and composition of HDS*. Equine Vet J, 2002. 34(4): p. 332-6.
410. Marti, E., et al., *The genetic basis of equine allergic diseases. 1. Chronic hypersensitivity bronchitis*. Equine Vet J, 1991. 23(6): p. 457-60.
411. Couetil, L.L. and M.P. Ward, *Analysis of risk factors for recurrent airway obstruction in North American horses: 1,444 cases (1990-1999)*. J Am Vet Med Assoc, 2003. 223(11): p. 1645-50.
412. Vychodilova-Krenkova, L., J. Matiasovic, and P. Horin, *Single nucleotide polymorphisms in four functionally related immune response genes in the horse: CD14,TLR4, Cepsilon, and Fepsilon R1 alpha*. Int J Immunogenet, 2005. 32(5): p. 277-83.

413. Solberg, O.D., et al., *Genomic characterization of equine interleukin-4 receptor alpha-chain (IL4R)*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2004. 97(3-4): p. 187-94.
414. Jost, U., et al., *A region on equine chromosome 13 is linked to recurrent airway obstruction in horses*. *Equine Vet J*, 2007. 39(3): p. 236-41.
415. Gerber, V., et al., *Mixed inheritance of equine recurrent airway obstruction*. *J Vet Intern Med*, 2009. 23(3): p. 626-30.
416. Neuhaus, S., et al., *Increased parasite resistance and recurrent airway obstruction in horses of a high-prevalence family*. *J Vet Intern Med*, 2010. 24(2): p. 407-13.
417. Barnes, K.C., A.V. Grant, and P. Gao, *A review of the genetic epidemiology of resistance to parasitic disease and atopic asthma: common variants for common phenotypes?* *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2005. 5(5): p. 379-85.
418. Fairbairn, S.M., et al., *Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure*. *Clin Exp Allergy*, 1993. 23(10): p. 821-8.
419. Marr, K.A., et al., *Effect of the 5-lipoxygenase inhibitor, fenleuton, on antigen-induced neutrophil accumulation and lung function changes in horses with chronic obstructive pulmonary disease*. *J Vet Pharmacol Ther*, 1998. 21(3): p. 241-6.
420. Tremblay, G.M., et al., *Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses*. *Equine Vet J*, 1993. 25(3): p. 194-7.
421. Marr, K.A., et al., *Effect of antigen challenge on the activation of peripheral blood neutrophils from horses with chronic obstructive pulmonary disease*. *Res Vet Sci*, 1997. 62(3): p. 253-60.
422. Marr, K.A., P. Lees, and F.M. Cunningham, *Antigen challenge increases adherence of circulating neutrophils in horses with chronic obstructive pulmonary disease*. *Equine Vet J*, 2002. 34(1): p. 65-70.

423. Olszewski, M.A., et al., *Mediators of anaphylaxis but not activated neutrophils augment cholinergic responses of equine small airways*. Am J Physiol, 1999. 276(3 Pt 1): p. L522-9.
424. Lindberg, A., et al., *Assessment of leukotriene B4 production in leukocytes from horses with recurrent airway obstruction*. Am J Vet Res, 2004. 65(3): p. 289-95.
425. Nevalainen, M., et al., *Inhalation of organic dusts and lipopolysaccharide increases gelatinolytic matrix metalloproteinases (MMPs) in the lungs of heaves horses*. Equine Vet J, 2002. 34(2): p. 150-5.
426. Turlej, R.K., et al., *Enhanced survival of lung granulocytes in an animal model of asthma: evidence for a role of GM-CSF activated STAT5 signalling pathway*. Thorax, 2001. 56(9): p. 696-702.
427. Art, T., et al., *Indices of oxidative stress in blood and pulmonary epithelium lining fluid in horses suffering from recurrent airway obstruction*. Equine Vet J, 1999. 31(5): p. 397-401.
428. Robinson, N., D. Boehler, and C. Berney. *Failure of a FLAP antagonist to prevent airway obstruction in heaves-susceptible horses*. in *World Equine Airway Symposium*. 1998. Guelph, Canada.
429. Lavoie, J.P., 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): p. 579-85.
430. Marr, K.A., et al., *A study of the effect of a platelet activating factor (PAF) receptor antagonist on antigen challenge of horses with chronic obstructive pulmonary disease*. J Vet Pharmacol Ther, 1996. 19(3): p. 233-7.
431. Yamashiro, S., et al., *Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses*. J Leukoc Biol, 2001. 69(5): p. 698-704.

432. Jia, H.P., et al., *Endotoxin responsiveness of human airway epithelia is limited by low expression of MD-2*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. 287(2): p. L428-37.
433. Takakuwa, T., et al., *Induction of CD14 expression in Lpsn, Lpsd and tumor necrosis factor receptor-deficient mice*. *Eur J Immunol*, 1996. 26(11): p. 2686-92.
434. Bureau, F., et al., *Correlation between nuclear factor-kappaB activity in bronchial brushing samples and lung dysfunction in an animal model of asthma*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. 161(4 Pt 1): p. 1314-21.
435. Gallin, J.I., *Human neutrophil heterogeneity exists, but is it meaningful?* *Blood*, 1984. 63(5): p. 977-83.
436. Hawlisch, H., et al., *C5a negatively regulates toll-like receptor 4-induced immune responses*. *Immunity*, 2005. 22(4): p. 415-26.
437. Kohl, J., et al., *A regulatory role for the C5a anaphylatoxin in type 2 immunity in asthma*. *J Clin Invest*, 2006. 116(3): p. 783-96.
438. Magnussen, H. and H. Watz, *Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and asthma: relation with comorbidities*. *Proc Am Thorac Soc*, 2009. 6(8): p. 648-51.
439. Bjermer, L., *Time for a paradigm shift in asthma treatment: from relieving bronchospasm to controlling systemic inflammation*. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. 120(6): p. 1269-75.
440. Diaz, T.T.M., *Étude des effets secondaires associés à un traitement prolongé de fluticasone inhalée chez les chevaux atteints de souffle (asthme équin)*, in *Département de sciences cliniques*. 2009, Université de Montréal: St-Hyacinthe. p. 84 p.
441. Moreau, P., et al. *Study of the variability of endoscopic duodenal biopsies in healthy horses and in heaves-affected horses fed with different diets* in *ACVIM*. 2009 Montreal, Qc, Canada.

442. Vick, M.M., et al., *Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse*. J Anim Sci, 2007. 85(5): p. 1144-55.
443. Michel, O., et al., *Effect of anti-asthmatic drugs on the response to inhaled endotoxin*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2000. 85(4): p. 305-10.
444. Laan, T.T., et al., *The role of alveolar macrophages in the pathogenesis of recurrent airway obstruction in horses*. J Vet Intern Med, 2006. 20(1): p. 167-74.
445. Kalhan, R., et al., *Systemic inflammation in young adults is associated with abnormal lung function in middle age*. PLoS ONE, 2010. 5(7): p. e11431.
446. Leclere, M., et al., *Effect of Antigen Exposure on Airway Smooth Muscle Remodeling in an Equine Model of Chronic Asthma*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010.
447. Coico, R. and G. Sunshine, *Immunology: A Short Course*. Sixth Edition ed, ed. Wiley-Blackwell. 2009.
448. Reed, S.M., W.M. Bayly, and D.C. Sellon, *Equine internal medicine*. 2nd ed. 2004, St. Louis, Mo: Saunders. xvii, 1659.
449. Fortin, C.F., et al., *A class IA PI3K controls inflammatory cytokine production in human neutrophils*. Eur J Immunol, 2011.
450. Ratthe, C., et al., *Molecular mechanisms involved in interleukin-4-induced human neutrophils: expression and regulation of suppressor of cytokine signaling*. J Leukoc Biol, 2007. 81(5): p. 1287-96.
451. Jackson, K.A., et al., *IL-4 induced CD23 (FcepsilonRII) up-regulation in equine peripheral blood mononuclear cells and pulmonary alveolar macrophages*. Vet Immunol Immunopathol, 2004. 101(3-4): p. 243-50.
452. Rosenwasser, L.J. and J. Meng, *Anti-CD23*. Clin Rev Allergy Immunol, 2005. 29(1): p. 61-72.

453. Yamaoka, K.A., et al., *Granulocyte macrophage colony stimulating factor induces Fc epsilon RII/CD23 expression on normal human polymorphonuclear neutrophils*. *Int Immunol*, 1996. 8(4): p. 479-90.
454. Truong, M.J., et al., *Human neutrophils express immunoglobulin E (IgE)-binding proteins (Mac-2/epsilon BP) of the S-type lectin family: role in IgE-dependent activation*. *J Exp Med*, 1993. 177(1): p. 243-8.
455. Barry, S.M., et al., *Determination of bronchoalveolar lavage leukocyte populations by flow cytometry in patients investigated for respiratory disease*. *Cytometry*, 2002. 50(6): p. 291-7.
456. Vella, A., et al., *Expression of FCepsilonRII/CD23 on human neutrophils isolated from rheumatoid arthritis patients*. *Inflammation*, 1999. 23(5): p. 471-9.
457. Benoni, G., et al., *CD23 and CD69 expression on human neutrophils of healthy subjects and patients with peripheral arterial occlusive disease*. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2001. 14(3): p. 161-167.
458. Lorenzo, G.D., et al., *Serum levels of total IgE and soluble CD23 in bronchial asthma*. *Mediators Inflamm*, 1996. 5(1): p. 43-6.
459. Sanchez-Guerrero, I., et al., *Soluble CD23 (sCD23) serum levels and lymphocyte subpopulations in peripheral blood in rhinitis and extrinsic and intrinsic asthma*. *Allergy*, 1994. 49(8): p. 587-92.
460. Bansal, A.S., et al., *Variations in serum sCD23 in conditions with either enhanced humoral or cell-mediated immunity*. *Immunology*, 1993. 79(2): p. 285-9.
461. Avanzini, M.A., et al., *Enhancement of soluble CD23 serum levels and cell-surface CD23-expression in subjects at increased risk of type 1 diabetes mellitus and in diabetic patients*. *Diabet Med*, 1998. 15(4): p. 320-6.

462. Brignone, C., et al., *Proteases produced by activated neutrophils are able to release soluble CD23 fragments endowed with proinflammatory effects*. *Faseb J*, 2001. 15(11): p. 2027-9.
463. Rezzonico, R., et al., *Engagement of CD11b and CD11c beta2 integrin by antibodies or soluble CD23 induces IL-1beta production on primary human monocytes through mitogen-activated protein kinase-dependent pathways*. *Blood*, 2000. 95(12): p. 3868-77.
464. Rezzonico, R., et al., *Ligation of CD11b and CD11c beta(2) integrins by antibodies or soluble CD23 induces macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta production in primary human monocytes through a pathway dependent on nuclear factor-kappaB*. *Blood*, 2001. 97(10): p. 2932-40.
465. Dasic, G., et al., *Critical role of CD23 in allergen-induced bronchoconstriction in a murine model of allergic asthma*. *Eur J Immunol*, 1999. 29(9): p. 2957-67.
466. Wagner, B., et al. *The US Veterinary Immune Reagent Network – update on reagents for the horse*. in *Conference of Research Workers in Animal Diseases*. 2009.
467. Zhu, Z., et al., *Immunomodulating effects of endotoxin in mouse models of allergic asthma*. *Clin Exp Allergy*, 2010. 40(4): p. 536-46.
468. Tsuda, Y., et al., *Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Immunity*, 2004. 21(2): p. 215-26.
469. Fridlender, Z.G., et al., *Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN*. *Cancer Cell*, 2009. 16(3): p. 183-94.
470. Chakravarti, A., et al., *Reprogramming of a subpopulation of human blood neutrophils by prolonged exposure to cytokines*. *Lab Invest*, 2009. 89(10): p. 1084-99.
471. Iking-Konert, C., et al., *Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by T cells*. *Ann Rheum Dis*, 2005. 64(10): p. 1436-42.

472. Lavoie, J.-P., et al., *Profiling of differentially expressed genes using subtractive suppression hybridization in an equine model of chronic asthma* soumis pour publication dans PlosOne.
473. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. 3(1): p. 23-35.
474. Pouliot, P., et al., *Interleukin-4 production by human alveolar macrophages*. Clin Exp Allergy, 2005. 35(6): p. 804-10.
475. Teunissen, M.B., et al., *Ultraviolet B radiation induces a transient appearance of IL-4+ neutrophils, which support the development of Th2 responses*. J Immunol, 2002. 168(8): p. 3732-9.
476. Brandt, E., et al., *IL-4 production by human polymorphonuclear neutrophils*. J Leukoc Biol, 2000. 68(1): p. 125-30.
477. Corraliza, I. and S. Moncada, *Increased expression of arginase II in patients with different forms of arthritis. Implications of the regulation of nitric oxide*. J Rheumatol, 2002. 29(11): p. 2261-5.
478. Mistry, S.K., et al., *Induction of arginases I and II in cornea during herpes simplex virus infection*. Virus Res, 2001. 73(2): p. 177-82.
479. Poremska, Z., *Different species of arginase in animal tissues*. Enzyme, 1973. 15(1): p. 198-209.
480. Hirsch-Kolb, H., et al., *Comparative physical-chemical studies of mammalian arginases*. Comp Biochem Physiol, 1970. 37(3): p. 345-59.
481. Cederbaum, S.D., et al., *Arginases I and II: do their functions overlap?* Mol Genet Metab, 2004. 81 Suppl 1: p. S38-44.
482. Li, H., et al., *Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. 280(1): p. E75-82.



483. Li, H., et al., *Activities of arginase I and II are limiting for endothelial cell proliferation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. 282(1): p. R64-9.
484. Topal, G., et al., *Mitochondrial arginase II modulates nitric-oxide synthesis through nonfreely exchangeable L-arginine pools in human endothelial cells*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. 318(3): p. 1368-74.
485. Hirata, M., et al., *Involvement of arginase in regulating myometrial contractions during gestation in the rat*. Mol Hum Reprod, 2006. 12(8): p. 513-8.
486. Johann, A.M., et al., *Apoptotic cells induce arginase II in macrophages, thereby attenuating NO production*. Faseb J, 2007. 21(11): p. 2704-12.
487. Bivalacqua, T.J., et al., *Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: in diabetic-associated erectile dysfunction*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 283(4): p. 923-7.
488. Chou, K.T., et al., *Asthma and Risk of Erectile Dysfunction-A Nationwide Population-Based Study*. J Sex Med, 2011.
489. Warnken, M., et al., *Species differences in expression pattern of arginase isoenzymes and differential effects of arginase inhibition on collagen synthesis in human and rat pulmonary fibroblasts*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2010. 381(4): p. 297-304.
490. Abe, M., et al., *Effects of inducible nitric oxide synthase inhibitors on asthma depending on administration schedule*. Free Radic Biol Med, 2006. 40(6): p. 1083-95.
491. Takemoto, K., et al., *Transiently, paralleled upregulation of arginase and nitric oxide synthase and the effect of both enzymes on the pathology of asthma*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. 293(6): p. L1419-26.
492. Di Valentin, E., et al., *New asthma biomarkers: lessons from murine models of acute and chronic asthma*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009. 296(2): p. L185-97.

493. Niese, K.A., et al., *Bone marrow cell derived arginase I is the major source of allergen-induced lung arginase but is not required for airway hyperresponsiveness, remodeling and lung inflammatory responses in mice*. BMC Immunol, 2009. 10: p. 33.
494. Kenyon, N.J., et al., *Arginases I and II in lungs of ovalbumin-sensitized mice exposed to ovalbumin: sources and consequences*. Toxicol Appl Pharmacol, 2008. 230(3): p. 269-75.
495. Bratt, J.M., et al., *Arginase inhibition in airways from normal and nitric oxide synthase 2-knockout mice exposed to ovalbumin*. Toxicol Appl Pharmacol, 2010. 242(1): p. 1-8.
496. Maarsingh, H., et al., *L-arginine deficiency causes airway hyperresponsiveness after the late asthmatic reaction*. Eur Respir J, 2009. 34(1): p. 191-9.
497. Hotchkiss, J.W., S.W. Reid, and R.M. Christley, *A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 1: Horse demographic characteristics and management*. Equine Vet J, 2007. 39(4): p. 294-300.
498. Appelberg, R., *Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing*. Trends Microbiol, 2007. 15(2): p. 87-92.
499. Zurier, R.B., S. Hoffstein, and G. Weissmann, *Cytochalasin B: effect on lysosomal enzyme release from human leukocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. 70(3): p. 844-8.
500. Tsai, M.A., R.S. Frank, and R.E. Waugh, *Passive mechanical behavior of human neutrophils: effect of cytochalasin B*. Biophys J, 1994. 66(6): p. 2166-72.
501. LeBlanc, P.H., S.W. Eberhart, and N.E. Robinson, *In vitro effects of alpha 2-adrenergic receptor stimulation on cholinergic contractions of equine distal airways*. Am J Vet Res, 1993. 54(5): p. 788-92.
502. Bates, J.H.T., *Measurement techniques in respiratory mechanics*, in *Physiologic basis of respiratory disease*, Q. Hamid, J. Shannon, and J. Martin, Editors. 2005, B.C. Decker: Hamilton, Ont. p. 623-627.

## Lexique

**Conditionnement** : mise en condition ou sensibilisation d'une cellule à être activée par un agoniste qui aurait autrement un effet moindre ou nul chez une cellule non-conditionnée (au repos).

**Cytochalasine B** : Mycotoxine qui inhibe la formation des microfilaments d'actine, inhibe l'ingestion de particules et augmente la relâche des enzymes dans le milieu extracellulaire en présence d'un agoniste. [499, 500]

**Interaction homophile** : interaction entre deux molécules identiques exprimées par des types cellulaires différents. Par exemple, l'interaction homophile des PECAM-1 exprimées par les neutrophiles et les cellules endothéliales dans le processus de transmigration.

**Interaction hétérophile** : interaction entre deux molécules différentes, par opposition aux interactions homophiles.

**Microréseaux** : Traduction de *microarray* selon TermiumPlus. Un microréseau à base d'ADN permet l'analyse en parallèle de plusieurs gènes sur un seul dispositif.

**Zymosan** : Glucane extraite de la paroi cellulaire des levures.

## Annexe 1

Table de nomenclature des chimiokines et de leurs récepteurs

CC chemokines				
Name	Gene	Other name(s)	Receptor	Uniprot
CCL1	Scya1	I-309, TCA-3	CCR8	
CCL2	Scya2	MCP-1	CCR2	P13500
CCL3	Scya3	MIP-1a	CCR1	P10147
CCL4	Scya4	MIP-1 $\beta$	CCR1, CCR5	P13236
CCL5	Scya5	RANTES	CCR5	P13501
CCL6	Scya6	C10, MRP-2	CCR1	P27784
CCL7	Scya7	MARC, MCP-3	CCR2	P80098
CCL8	Scya8	MCP-2	CCR1, CCR2B, CCR5	P80075
<b>CCL9/CCL10</b>	Scya9	MRP-2, CCF18, MIP-1?	CCR1	P51670
CCL11	Scya11	Eotaxin	CCR2, CCR3, CCR5	P51671
CCL12	Scya12	MCP-5		Q62401
CCL13	Scya13	MCP-4, NCC-1, Ck $\beta$ 10	CCR2, CCR3, CCR5	Q99616
CCL14	Scya14	HCC-1, MCIF, Ck $\beta$ 1, NCC-2, CCL	CCR1	Q16627
CCL15	Scya15	Leukotactin-1, MIP-5, HCC-2, NCC-3	CCR1, CCR3	Q16663
CCL16	Scya16	LEC, NCC-4, LMC, Ck $\beta$ 12	CCR1, CCR2, CCR5, CCR8	O15467
CCL17	Scya17	TARC, dendrokinine, ABCD-2	CCR4	Q92583
CCL18	Scya18	PARC, DC-CK1, AMAC- 1, Ck $\beta$ 7, MIP-4		P55774
CCL19	Scya19	ELC, Exodus-3, Ck $\beta$ 11	CCR7	Q99731
CCL20	Scya20	LARC, Exodus-1, Ck $\beta$ 4	CCR6	P78556
CCL21	Scya21	SLC, 6Ckine, Exodus-2, Ck $\beta$ 9, TCA-4	CCR7	O00585
CCL22	Scya22	MDC, DC/ $\beta$ -CK	CCR4	O00626
CCL23	Scya23	MPIF-1, Ck $\beta$ 8, MIP-3, MPIF-1	CCR1	P55773
CCL24	Scya24	Eotaxin-2, MPIF-2, Ck $\beta$ 6	CCR3	O00175
CCL25	Scya25	TECK, Ck $\beta$ 15	CCR9	O15444
CCL26	Scya26	Eotaxin-3, MIP-4a, IMAC, TSC-1	CCR3	Q9Y258
CCL27	Scya27	CTACK, ILC, Eskine, PESKY, skinkine	CCR10	Q9Y4X3

<b>CCL28</b>	Scya28	MEC	CCR3, CCR10	Q9NRJ3
<b>CXC chemokines</b>				
<b>Name</b>	<b>Gene</b>	<b>Other name(s)</b>	<b>Receptor</b>	<b>Uniprot</b>
<b>CXCL1</b>	Scyb1	Gro-a, GRO1, NAP-3, KC	CXCR2	P09341
<b>CXCL2</b>	Scyb2	Gro- $\beta$ , GRO2, MIP-2a	CXCR2	P19875
<b>CXCL3</b>	Scyb3	Gro- $\gamma$ , GRO3, MIP-2 $\beta$	CXCR2	P19876
<b>CXCL4</b>	Scyb4	PF-4	CXCR3B	P02776
<b>CXCL5</b>	Scyb5	ENA-78	CXCR2	P42830
<b>CXCL6</b>	Scyb6	GCP-2	CXCR1, CXCR2	P80162
<b>CXCL7</b>	Scyb7	NAP-2, CTAPIII, $\beta$ -Ta, PEP	CXCR2	P02775
<b>CXCL8</b>	Scyb8	IL-8, NAP-1, MDNCF, GCP-1	CXCR1, CXCR2	P10145
<b>CXCL9</b>	Scyb9	MIG, CRG-10	CXCR3	Q07325
<b>CXCL10</b>	Scyb10	IP-10, CRG-2	CXCR3	P02778
<b>CXCL11</b>	Scyb11	I-TAC, $\beta$ -R1, IP-9	CXCR3, CXCR7	O14625
<b>CXCL12</b>	Scyb12	SDF-1, PBSF	CXCR4, CXCR7	P48061
<b>CXCL13</b>	Scyb13	BCA-1, BLC	CXCR5	O43927
<b>CXCL14</b>	Scyb14	BRAK, bolekin		O95715
<b>CXCL15</b>	Scyb15	Lungkine, WECH		Q9WVL7
<b>CXCL16</b>	Scyb16	SRPSOX	CXCR6	Q9H2A7
<b>CXCL17</b>	VCC-1	DMC, VCC-1		Q6UXB2
<b>C chemokines</b>				
<b>Name</b>	<b>Gene</b>	<b>Other name(s)</b>	<b>Receptor</b>	<b>Uniprot</b>
<b>XCL1</b>	Scyc1	Lymphotactin $\alpha$ , SCM-1a, ATAC	XCR1	P47992
<b>XCL2</b>	Scyc2	Lymphotactin $\beta$ , SCM-1 $\beta$	XCR1	Q9UBD3
<b>CX3C chemokines</b>				
<b>Name</b>	<b>Gene</b>	<b>Other name(s)</b>	<b>Receptor</b>	<b>Uniprot</b>
<b>CX3CL1</b>	Scyd1	Fractalkine, Neurotactin, ABCD-3	CX3CR1	P78423

Source : <http://en.wikipedia.org/wiki/Chemokine>

## Annexe 2

### Mesure de la fonction respiratoire chez le cheval

La mesure de la fonction respiratoire permet de détecter des changements mécaniques associés à l'inflammation, la bronchoconstriction et au remodelage du tissu pulmonaire. Les paramètres évalués sont décrits en fonction des conditions de la mesure effectuée sur un cheval (**Figure 29**) [10]:

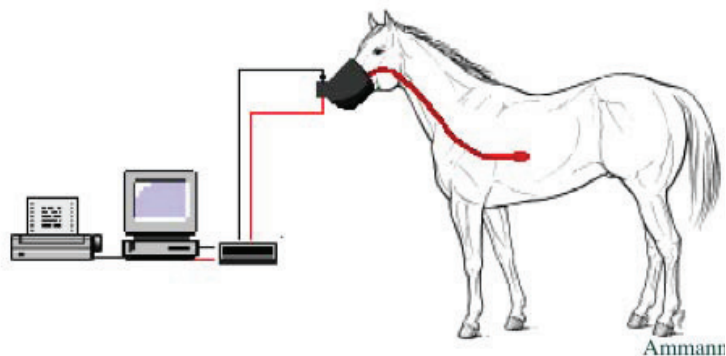
La résistance pulmonaire totale ( $R_L$ ): mesure de l'obstruction des voies respiratoires supérieures et /ou inférieures. L'accumulation de mucus, la bronchoconstriction ou le remodelage des voies respiratoires et la diminution du diamètre luminal causée par l'épaississement de la paroi des voies respiratoires. Il est à noter que la flexion de la tête de l'animal peut provoquer des changements de  $R_L$  causés par l'obstruction des voies respiratoires supérieures.

Le débit respiratoire ( $\dot{V}$ ): mesure du volume d'air inspiré ou expiré par unité de temps au volume courant (L/s). Le volume courant ( $V_T$ ) et la fréquence respiratoire ( $f_R$ ) peuvent être calculés entre autres à partir de la mesure du  $\dot{V}$ . Celle-ci requière l'utilisation d'un masque facial, d'un pneumotacographe relié à un transducteur de pressions différentielles, qui lui est connecté au système d'enregistrement.

L'élastance ( $E_L$ ): mesure des propriétés élastiques du tissu pulmonaire et du niveau d'obstruction des petites voies respiratoires périphériques. Inversement proportionnelle à la compliance dynamique ( $C_{dyn}$ ) qui correspond à la capacité du poumon à s'étirer en fonction des changements de volumes et de la pression requise pour se faire. L'élastance correspond donc à la variation de la pression intra-pulmonaire déterminée par la variation correspondante du volume pulmonaire en  $\text{cmH}_2\text{O/L}$ . Une augmentation de l'élastance peut être associée à la fibrose tissulaire, à l'œdème pulmonaire ou à l'obstruction diffuse des petites voies respiratoires.

La pression œsophagienne ( $P_{pl}$ ): mesurée à l'aide d'un ballon œsophagien inséré au niveau du mi-thorax, entre la pointe du cœur et le diaphragme. Ce ballon est fixé sur l'extrémité d'un cathéter perforé, relié à un transducteur de pression et au système

V  
d'enregistrement. La pression œsophagienne mesurée ainsi estime précisément la pression de la cavité pleurale. Celle-ci permet d'estimer la pression intrapleurale, varie en fonction des changements de volumes du thorax et est influencée par l'obstruction des voies respiratoires et la rigidité du tissu pulmonaire. Le changement maximal de la pression pleurale ( $\Delta P_{pl\ max} = P_{pl}$ ) est la mesure la plus simple des propriétés mécaniques du poumon et est directement proportionnelle à  $R_L$ , à  $E_L$ , au volume courant et à  $F_R$ . Une augmentation du  $\Delta P_{pl\ max}$  n'est donc pas une mesure spécifique à une pathologie particulière mais lorsqu'elle est associée avec des mesures de débit respiratoire, permet d'obtenir les valeurs de résistance pulmonaire totale. La pression transpulmonaire ( $P_{tp}$ ) correspond à la différence entre la pression à l'ouverture des voies respiratoires et la pression pleurale et est obtenue grâce à un transducteur de pression différentielle connecté au cathéter du ballon œsophagien et au masque du cheval.



**Figure 29.** Mesure de la fonction respiratoire chez le cheval.

Le cathéter coiffé d'un ballon œsophagien est illustré en rouge. Le pneumotacographe est connecté au masque du cheval et, comme le cathéter, est relié à un transducteur de pression. L'analyse par régression linéaire multiple permet d'obtenir les paramètres de la fonction respiratoire.

Les paramètres de la fonction respiratoire se réunissent dans une équation simplifiée de la motion, analysée par la technique de régression linéaire multiple selon laquelle:

$$P_{tp} = R_L * \dot{V} + E_L * V_T + K$$

**K** est une constante correspondant à la pression transpulmonaire à la fin de l'expiration. Avec une assistance analytique informatisée, cette équation peut être résolue plusieurs fois tout au long du cycle respiratoire et de cette manière, permettre d'évaluer les différents paramètres à l'expiration ou à l'inspiration. Les mécaniques respiratoires ne s'effectuent pas sous sédation des chevaux car la xylazine, un agoniste des  $\alpha_2$ -adrénorécepteurs, diminue la résistance et l'élastance chez les chevaux atteints du souffle en crise en inhibant la relâche d'acétylcholine par les nerfs cholinergiques bronchiques [501]. D'autres méthodes d'analyse existent et peuvent affecter les valeurs absolues obtenues et la sensibilité de détection des changements mécaniques (revus dans [10]).

Il est à noter que cette équation s'applique au modèle simple à un compartiment du poumon. Celui-ci implique qu'un seul compartiment avec une composante élastique (alvéoles) soit relié à une seule voie respiratoire offrant de la résistivité. Ce modèle assume que les poumons sont ventilés de manière homogène et que la pression alvéolaire est égale à tous points dans le parenchyme pulmonaire, en tout temps. Le modèle à compartiments multiples prend en considération les différences de la fonction mécanique des diverses parties du poumon [502]. La technique d'oscillation forcée, qui applique diverses fréquences de pression sur les poumons afin d'évaluer la mécanique pulmonaire selon le modèle à compartiments multiples, ainsi que la mesure de du volume expiratoire forcé utilisée surtout chez l'homme, ne seront pas abordées dans le cadre de cette thèse.



## Annexe 3

*Cette annexe présente quelques uns des articles rédigés à titre de co-auteur, les plus pertinents au travail présenté dans cette thèse*

**Article #5*****Heaves, an asthma-like disease of horses.***

Leclere M.\*, **Lavoie-Lamoureux A\***. et Lavoie J.-P.

**Contributions originales**

*J'ai participé à 33% à la rédaction de cet article de revue.*

*\*Les auteurs ont contribué également à la rédaction de l'article.*

Publié dans le journal *Respirology*, 2011. **16**(7): p. 1027-46.

INVITED REVIEW SERIES: CUTTING EDGE TECHNOLOGIES  
SERIES EDITOR: DARRYL KNIGHT

## Heaves, an asthma-like disease of horses

MATHILDE LECLERE,\* ANOUK LAVOIE-LAMOUREUX\* AND JEAN-PIERRE LAVOIE

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

### ABSTRACT

Animal models have been developed to investigate specific components of asthmatic airway inflammation, hyper-responsiveness or remodelling. However, all of these aspects are rarely observed in the same animal. Heaves is a naturally occurring disease of horses that combines these features. It is characterized by stable dust-induced inflammation, bronchospasm and remodelling. The evaluation of horses during well-controlled natural antigen exposure and avoidance in experimental settings allows the study of disease mechanisms in the asymptomatic and symptomatic stages, an approach rarely feasible in humans. Also, the disease can be followed over several years to observe the cumulative effect of repeated episodes of clinical exacerbation or to evaluate long-term treatment, contrasting most murine asthma models. This model has shown complex gene and environment interactions, the involvement of both innate and adaptive responses to inflammation, and the contribution of bronchospasm and tissue remodelling to airway obstruction, all occurring in a natural setting. Similarities with the human asthmatic airways are well described and the model is currently being used to evaluate airway remodelling and its reversibility in ways that are not possible in people for ethical reasons. Tools including antibodies, recombinant proteins or gene arrays, as well as methods for sampling tissues and assessing lung function in the horse are constantly evolving to facilitate the study of this animal model. Research perspectives that can be

relevant to asthma include the role of neutrophils in airway inflammation and their response to corticosteroids, systemic response to pulmonary inflammation, and maintaining athletic capacities with early intervention.

**Key words:** animal model, asthma, inflammation, remodelling.

### INTRODUCTION AND DEFINITION

In the past decades, much has been learned on the pathophysiology of asthma from the study of human patients and animal models. Gene and environment interactions, which vary based on the type and duration of antigen exposure as well as other triggering events, have been highlighted. Many of these complex events are difficult to model in rodents. Equine heaves is a spontaneous occurring asthma-like condition affecting a domestic animal species. In this review, we will describe the characteristic features of heaves and highlight novel findings particularly relevant to human asthma.

Heaves is estimated to affect approximately 10–20%<sup>1</sup> of adult horses in the northern hemisphere and other temperate climates. Descriptions of horses with a respiratory disease similar to what is now known as heaves can be found as far as in ancient Greece. In 1893, Bouley described as ‘nervous heaves’ (‘pousse’ in French lay term), a condition of horses associated with marked breathing difficulty, but without obvious macroscopic pathological lung lesions.<sup>2</sup> Perhaps in the first ‘scientific report’ of the disease, Lowel<sup>3</sup> captured the main clinical features of the disease and recognized it as analogous to human asthma.

Similarly to asthma, heaves is a chronic disorder of the airways, which is characterized by variable and recurring airflow obstruction, bronchial hyper-responsiveness and airway inflammation. During disease exacerbation, horses present increased respiratory efforts at rest, coughing and exercise intolerance. Clinical signs are triggered or exacerbated by inhalation of dust particles present in the stables, especially those associated with hay feeding. For these reasons, heaves is regarded as a disease of domestication. Experimentally, stabling susceptible

**The Authors:** Jean-Pierre Lavoie is a professor in equine internal medicine at the University of Montreal. His research is focused on the study of airway inflammation and remodelling and their reversibility in an equine model of asthma. Mathilde Leclere is an equine internist and PhD candidate at the University of Montreal. Her research focuses on airway remodelling in chronic inflammation. Anouk Lavoie-Lamoureux completed her PhD in lung immunology and inflammation at the University of Montreal. Her research focused on the role of neutrophils in innate and adaptive immune responses in the equine asthma model.

\*M.L. and A.L.L. participated equally in manuscript writing.

Correspondence: Jean-Pierre Lavoie, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6. Email: [redacted]

Received 25 May 2011; invited to revise 20 June 2011; revised 23 July 2011; accepted 26 July 2011.

horses in the presence of hay and straw, both sources of antigen-rich organic dust, exacerbates heaves. Pollens and various other antigens found in high levels outdoors in the spring and summer may also be implicated.<sup>4-6</sup> The condition is then identified as 'summer pasture-associated obstructive pulmonary disease (SPAOPD)'. Specific reference to SPAOPD will only be made when of interest to this review.

When stabled, heaves-susceptible horses develop a marked and persistent airway inflammation believed to be a consequence of aberrant innate and adaptive immunity responses, as well as an underlying genetic component. During exacerbation, the major cause of airflow limitation is bronchospasm, as indicated by the rapid and significant (60–70%) improvement in lung function observed following the administration of bronchodilators.<sup>7-9</sup> The relative contribution of mucus, inflammatory cells and airway wall remodelling to airway obstruction during disease exacerbation and to the residual function impairment measured in asymptomatic horses<sup>10</sup> remains speculative.

## NOMENCLATURE IN THE VETERINARIAN LITERATURE

Heaves and Recurrent Airway Obstruction (RAO) are currently used indistinctly in the veterinary literature.<sup>11</sup> The terms 'chronic obstructive pulmonary disease' and 'chronic bronchitis', mainly used in the 1980s and 1990s literature, have been discarded because the human counterparts of these syndromes have different causes, clinical features and pathophysiology. Similarly, 'equine emphysema' is improper as air trapping rather than alveoli wall disruption is responsible for the lung hyperinflation observed in severely affected horses.<sup>12,13</sup>

While asthma describes a clinical syndrome of variable severity, the condition affecting horses with milder respiratory impairment and airway inflammation is referred to as 'inflammatory airway disease (IAD)'. Whereas airway neutrophilia predominates in heaves, neutrophils, metachromatic cells and eosinophils may be present in increased number in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of horses with IAD.<sup>14</sup> Horses with airway eosinophilia tend to be younger, and those with neutrophilia older than controls.<sup>15</sup> These findings are reminiscent of the heterogeneous asthma phenotypes.<sup>16</sup> It is currently unknown which horses with IAD eventually progress to the severe clinical signs observed in heaves.

## AETIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY

### What makes a horse susceptible to heaves

It is generally estimated that 10–20% of adult horses living in cold and temperate climates are affected by heaves, although epidemiological reports are few. Disease prevalence is approximately 14% (95% CI:

10.7–17.4%) in horses aged 5 years or more in the UK, as estimated using an owner-answered, validated questionnaire.<sup>1,17</sup> A strong genetic determinant has been observed in some families of horses with chronic airway inflammation and the prevalence of disease in offsprings born from two affected parents can reach approximately 38–48%, while those born from one affected parent are less at risk (approximately 6–17%).<sup>18</sup> No breed or gender predisposition have been identified.<sup>1,18-20</sup>

As human asthma, heaves likely results from the interactions between multiple genes and environmental factors.<sup>21</sup> Polymorphisms were identified in a region harbouring the *IL4RA* locus on the equine chromosome 13 (ECA13q13)<sup>22</sup> and were associated with heaves in one of two high prevalence families.<sup>23</sup> Similarly, *IL4RA* polymorphisms are associated with phenotypes of asthma and atopy in humans as well as changes in the IL-4 receptor function.<sup>24,25</sup> Recent studies have found an association between heaves and resistance to parasitic infections in two unrelated high prevalence families.<sup>26,27</sup> This association has also been reported in allergic people.<sup>28</sup> The genetic determinants of allergic diseases may therefore confer resistance to certain parasitic infections, particularly Th2-related genes (including the IL-4R $\alpha$  gene), which are directly involved in the host defence against these pathogens.<sup>28</sup> There is little information on early life events that can be linked to the development of heaves. However, in a questionnaire-based survey of 361 owners, Hotchkiss identified early life exposure to hay and reported respiratory infection before the age of 5 years as risk factors for horses with heaves.<sup>1</sup> These findings are also reminiscent of the increased risk of developing asthma in children who experienced viral infection during their first years of life.<sup>29</sup>

### What makes a susceptible horse symptomatic

Exacerbation of heaves is clearly linked to environmental dust exposure. With only a relatively small subset of horses to develop heaves, the weight of evidence suggests that the disease is the result of allergic sensitization to airborne organic particles present in stables. However, the exact antigens responsible for the onset of clinical signs in susceptible animals remain uncertain. Stable dust contain more than 50 types of moulds, mites, bacterial endotoxins and inorganic compounds that may contribute to the disease.<sup>11</sup> Other particles present in the horse environment may also contribute to bronchoconstriction, either because the airways are intrinsically hyper-reactive in heaves or because they become hyper-reactive when inflamed. Air pollution is another possible contributing factor, as urbanized environment has been associated with an increased risk for developing heaves.<sup>1</sup> However, this could be explained by other factors, such as increased antigen load exposure resulting from limited pasture access in these areas.

### Specific response to antigens

Inhalation of soluble mould extracts of *Aspergillus fumigatus* and *Faenia rectivirgula*, but not extracts of *Thermoactinomyces vulgaris*<sup>30</sup> or hay pollen,<sup>3</sup> leads to airway neutrophilia and obstruction in heaves-susceptible horses but not in healthy controls. These observations suggest that sensitization and allergic responses to antigens from these moulds are involved in heaves pathogenesis. However, studies have failed to show disease-specific skin reactivity to barn allergens,<sup>3,31</sup> although higher frequency of positive skin reactions is found in affected horses compared with unaffected horses.<sup>32-34</sup> Higher concentrations or greater frequency of detection of antibodies (IgG and IgE) specific to *A. fumigatus* or *Alternaria alternate* crude extracts or recombinant antigens, respectively, were found in serum samples of heaves-affected compared with control horses in some,<sup>35-39</sup> but not in all studies.<sup>40,41</sup> Nevertheless, the overlapping ranges in specific antibody concentration or skin prick test positivity between normal and heaves-affected horses preclude their use as tools for the diagnosis of heaves. Of note, horses were shown to generally develop serum IgG and IgE antibodies towards common mould antigens in a manner that highly depends on environment, genetic background, gender and age.<sup>37,42</sup> In BALF, significantly higher concentrations of specific IgE, IgG and IgA antibodies against *A. fumigatus* and *Micropolyspora faeni* were found in heaves-affected horses compared with controls, suggesting local production of specific antibodies in affected animals.<sup>40,41</sup> This may be comparable to a recently defined immunological process called 'entropy', which describes a 'local allergy in non-atopic individuals (. . .) which may or may not involve locally produced IgE<sup>43</sup> and/or a local Th2-driven inflammation<sup>44</sup> occurring in asthmatic patients without skin prick test positivity or serum antigen-specific IgEs (intrinsic asthma).<sup>45</sup>

An immediate allergic response is not typically associated with heaves exacerbation and an early phase (10–20 min) histamine release and bronchoconstriction response to inhaled dust does not occur in diseased horses.<sup>46</sup> A significant histamine release and bronchoconstriction is however reported in healthy controls, suggesting that the early phase response may contribute to reduce the amounts of antigens reaching the peripheral airways and therefore be protective.<sup>46</sup> Nevertheless, pulmonary mast cells from heaves-affected horses have a greater *in vitro* histamine release in response to mould extracts (*A. fumigatus*, *M. faeni*, *A. tenius*)<sup>47</sup> and greater histamine concentrations are detected in pulmonary epithelial lining fluid from these horses compared with controls 5 h, but not 30 min, after natural antigenic challenge.<sup>48</sup> In addition, tryptase<sup>49</sup> or chymase<sup>50</sup> mast cells are increased in the epithelium and peribronchial space, respectively, of heaves-affected compared with healthy horses and tryptase is higher in BALF of diseased animals<sup>49</sup> from 1 to 5 days after exposure to a natural antigenic challenge. Taken together, these observations suggest that a typical

Type I hypersensitivity response characterized by both early and late phase responses does not define heaves pathology. Rather, a specific IgE/mast cell-mediated *late phase* inflammation and bronchoconstriction possibly contributes to the disease, although the role of IgE in the pathogenesis of heaves remains controversial.<sup>51</sup> The delayed neutrophilic inflammation following dust inhalation is reminiscent of the type III hypersensitivity observed in allergic pneumonitis (farmer's lung disease). However, alveolar inflammation and granuloma formation combined with fever are not features of heaves pathology in contrast to allergic pneumonitis.<sup>52</sup> Furthermore, precipitins that are used as markers of this disease are not specifically found in the serum or lungs of horses with heaves.<sup>53</sup>

### T cell-derived cytokines associated with heaves (Th1/Th2/Th17)

The cytokine profile associated with heaves exacerbation has been broadly investigated. In agreement with the hypothesis that a local allergy-like response is involved in heaves pathology, a higher frequency of lymphocytes expressing Th2-type cytokines (IL-4, IL-5) and a decreased expression of a Th1-type cytokine (INF $\gamma$ ) was found in BALF of affected horses using *in situ* hybridization.<sup>54,55</sup> Also, in another study INF $\gamma$  was found to be decreased in BALF CD4+ lymphocytes.<sup>56</sup> Using a model of ovalbumin-sensitized and challenged ponies, Bowles and colleagues showed the concomitant development of airway neutrophilia with an increased expression of Th2-type cytokine mRNAs in BALF cells (IL-4, IL-5, IL-13) from ovalbumin-sensitized compared with unsensitized controls, supporting a contribution of these cytokines in driving airway neutrophilia.<sup>57</sup> Contrasting results were found by other teams using PCR on total BALF cells, who found predominant expression of INF $\gamma$  alone<sup>58,59</sup> or combined with Th2 cytokines (IL-4 or IL-13),<sup>60,61</sup> during the exacerbation phase of the disease. Total TGF- $\beta_1$  concentration is not changed in BALF from symptomatic heaves-affected horses although the distinction between active and inactive TGF- $\beta_1$  was not investigated.<sup>62</sup> Finally, increased IL-17A expression in BALF cells from heaves-affected horses during exacerbation has been reported.<sup>63,64</sup>

Several factors may contribute to these conflicting findings. The genetic background of the host could influence its immune response, as is the nature and duration (acute vs chronic) of the natural antigenic exposure. Indeed in asthma, Th1, Th2 and Th17 responses have been reported with different exacerbation triggering factors (virus, allergens) or severity,<sup>65-68</sup> and lymphocytes producing a mixed Th2/Th17 cytokine profile have been recently identified in asthmatic patients.<sup>69</sup> Nevertheless, the local production of specific antibodies and the response of affected horses to inhalation challenge with specific allergens suggest that lymphocyte-driven (adaptive) immune response to allergens is involved in heaves pathophysiology.



### Innate immune responses: contribution of non-specific factors

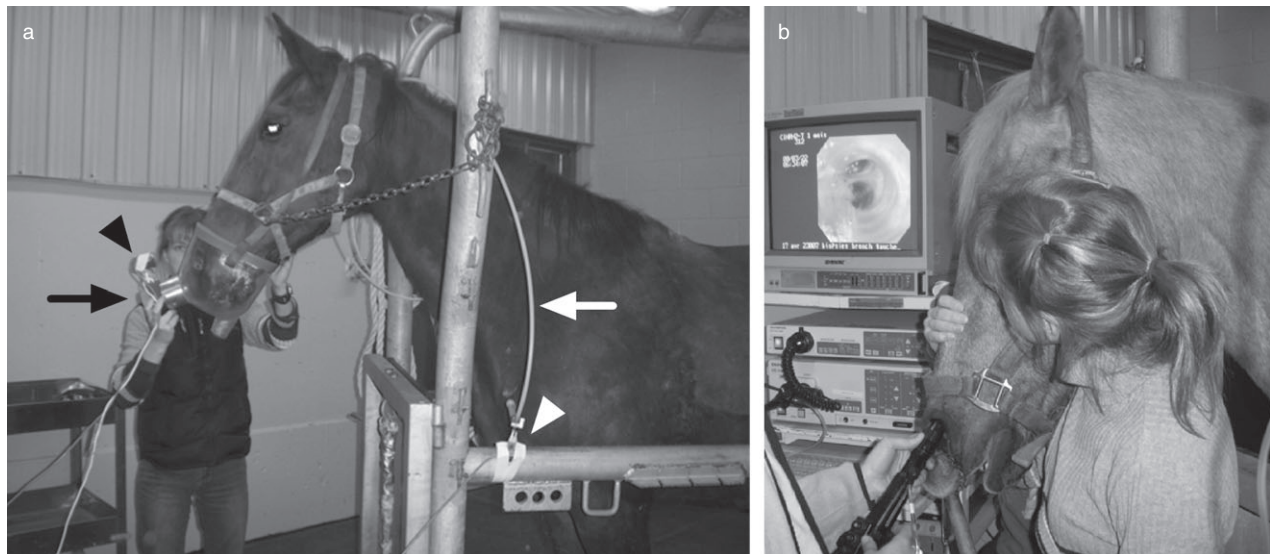
Inhalable endotoxin levels in conventional stables (hay and straw regiment, poorly ventilated) where susceptible horses develop heaves symptoms are 8–15 times higher than in low dust stables (well ventilated, hay pellets and shavings) or pasture where reversal of airway obstruction and inflammation is reached.<sup>70,71</sup> These respirable endotoxin levels (1.7 mg/m<sup>3</sup>) are comparable to those found in certain house dust,<sup>72</sup> and cotton<sup>73</sup> or grain industries<sup>74</sup> linked to chronic airway diseases in humans. Healthy humans develop lung dysfunction following inhalation of 80 µg of endotoxin,<sup>75</sup> whereas the threshold response was found to be lower in asthmatics patients (20 µg). Similarly, it was shown that doses 10 times lower of endotoxin were sufficient enough to induce airway neutrophilia in horses with heaves compared with controls (20 vs 200 µg), and that only affected horses develop lung dysfunction with endotoxin inhalation alone.<sup>76</sup> The concentrations necessary to induce airflow limitation are however considerably greater than those found in stable dust, suggesting that it is not the main driving factor in heaves exacerbation. Synergistic interactions between allergens and non-specific agents may nonetheless be involved as endotoxin depletion experiments showed that it contributed significantly to airway neutrophilia and lung dysfunction in response to either hay dust suspension (HDS) or *A. fumigatus* extracts inhalation.<sup>77,78</sup> As expected with a strong response to endotoxin, NF-κB activity is

higher in the airways and BALF cells of horses with heaves.<sup>79,80</sup> It was hypothesized that activated leukocytes secreting pro-inflammatory cytokines have an autocrine and paracrine effect on NF-κB activation and sustain inflammation of the airways. In addition, TLR4 gene expression was found to be increased in BALF cells of heaves-affected horses during organic-dust exposure,<sup>64</sup> and polymorphisms in TLR4 sequence has been reported in horses.<sup>81</sup> These observations suggest that innate mechanisms also contribute to heaves pathophysiology. Other agents present in stable dust (β-glucans, mites, moulds spores, noxious gas)<sup>82,83</sup> could also enhance immune responses in susceptible horses.

## LUNG FUNCTION

### Means of quantifying respiratory dysfunction in heaves-affected horses

Airway obstruction and its consequences on gas exchange can be measured by different methods in horses. Due to their quiet demeanour, most techniques can be performed on conscious, standing animals, and on multiple occasions, without generating stress artefacts. Conventional lung function measurement with the use of an esophageal catheter and a pneumotachograph (Fig. 1a) reveals increased pulmonary resistance and decreased dynamic compliance during exacerbation of heaves.<sup>84–86</sup> The former is caused mainly by bronchospasm, as shown



**Figure 1** (a) Conventional lung function testing in an unsedated heaves-affected horse. The esophageal catheter (white arrow) is placed through one nostril (on the right here), down to the caudal thoracic esophagus and connected to a pressure transducer (white arrowhead). A low resistance mask is placed over the horse's nose and flow rates are obtained from a heated pneumotachograph (black arrow) and an associated differential pressure transducer (black arrowhead). Signals are passed through a digital/analog converter to a computer equipped with a data acquisition and analysis software. Note that horses are obligate nasal breathers. (b) BAL performed on a standing, sedated horse with heaves.

by a rapid decline in resistance after bronchodilator administration; resistance values commonly decrease by 60–70%<sup>7–9</sup> but remain above those observed on pasture or of healthy controls, suggesting residual airway obstruction by mucus and inflammatory cells, and possibly airway wall remodelling.<sup>87</sup> The decrease in dynamic compliance is less consistently responsive to bronchodilator administration, possibly because of peripheral airways obstruction, uneven distribution of ventilation and parenchymal remodelling.<sup>7,8</sup> Abnormal ventilation distribution has been shown by nitrogen washout,<sup>88</sup> helium-dilution measurements,<sup>89</sup> radiolabelled aerosolized technetium<sup>90</sup> and, indirectly, by volumetric capnography.<sup>91</sup> Ventilation/perfusion (V/Q) mismatch has also been shown to be most important during episodes of clinical exacerbation and to improve without disappearing following treatment.<sup>92,93</sup> Peak expiratory (mostly) and inspiratory flow,<sup>94–96</sup> the work of breathing,<sup>86,97</sup> and the variation in pleural pressure during tidal breathing increase markedly, which give rise to the marked costal excursion and prolonged abdominal contraction observed clinically.<sup>94</sup> Typically, tidal volume is maintained and minute ventilation increases due to a rise in respiratory rate.<sup>94</sup> Figure 2 illustrates the changes in resistance before and after natural antigenic exposure, and following the administration of corticosteroids and a bronchodilator.

Standard respiratory mechanic measurements have proven very useful in discriminating between heaves-affected and healthy controls during stabling and in assessing response to therapy. However, despite evidence of persistent mild respiratory dysfunction (AaDO<sub>2</sub>, V/Q mismatch,<sup>92</sup> lack of normal biphasic inspiration and expiration<sup>96</sup>) during clinical remission, pulmonary resistance and dynamic compliance, values are often similar to those of healthy subjects.<sup>11</sup> By imposing external forces to the respiratory system over a wide range of frequencies, forced oscillation techniques, at least in theory, can detect more subtle function impairment and help to localize the site of the anomaly (large airways, peripheral airways, parenchyma). In horses, forced oscillation techniques are less invasive than standard respiratory mechanics,<sup>99</sup> they correlate well with conventional lung function measurement during histamine bronchoprovocation,<sup>100,101</sup> and they can detect subclinical airway obstruction in heaves and IAD.<sup>102,103</sup> Whole body plethysmography is another non-invasive technique that has been used to evaluate function and response to therapy,<sup>104</sup> but inherent technical difficulties have limited its use. Volumetric capnography and inductance plethysmography portability may prove helpful for the assessment of airway function in field studies.<sup>91,105</sup>

Forced expiration technique is not widely used in horses, as it requires heavy sedation, nasotracheal intubation, mechanical ventilation and the application of a vacuum. However, it detects early onset of pulmonary dysfunction in heaves,<sup>106,107</sup> and persistent airway limitation during clinical remission, even after years of strict environmental control.<sup>10</sup>

## Non-specific airway hyper-responsiveness

Airway hyper-responsiveness (AHR) to non-specific agonists is also present in heaves and is increased when affected horses are exposed to organic dust,<sup>108–111</sup> even before changes in baseline lung function and clinical signs can be observed.<sup>112</sup> While many have shown that AHR subsides when horses are on pasture,<sup>8,110,112–114</sup> some have found that AHR can persist in asymptomatic horses with no exposure to hay.<sup>101</sup> This non-specific hyper-responsiveness could reflect persisting inflammation,<sup>115</sup> airway wall remodelling, intrinsic smooth muscle sensitivity/reactivity, or autonomic dysfunction.

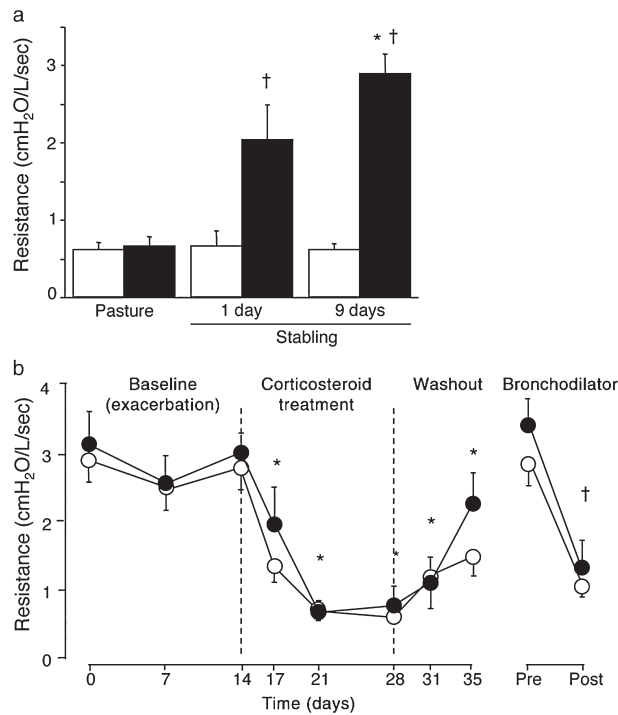
## Gas exchange, ventilation/perfusion and epithelium integrity

Arterial hypoxemia, prolonged nitrogen washout, dead space ventilation and ventilation of high V/Q regions are present in heaves. Arterial blood gas is easily collected in horses and oxygen tension is decreased during exacerbation, however the degree of hypoxemia is poorly correlated with pulmonary mechanics.<sup>116</sup> Prolonged nitrogen washout is consistent with the severity of histological lung changes,<sup>84,117</sup> and bronchiolar epithelial hyperplasia is observed in regions with high V/Q and dead space ventilation.<sup>93</sup> Ventilation/perfusion heterogeneity improves but persists with treatment.<sup>92</sup> Ventilation/perfusion mismatch and alveolar hypoxia can lead to increased pulmonary vascular resistance and pulmonary arterial pressure,<sup>95</sup> and secondary cardiovascular changes. These are not associated with myocardial damage and are reversible with the control of airway obstruction.<sup>118</sup> Finally, alveolar clearance measured by scintigraphy indicates an impaired alveolar epithelium integrity that persists in asymptomatic horses kept in a low dust environment and only return to normal when horses are on pasture.<sup>114</sup>

## AIRWAY INFLAMMATION

### Cytology of the lower airways

Characterization of disease-associated airway inflammation in human asthmatics relies primarily on non-invasive sputum induction. In horses, airway cells are sampled by saline instillation in the trachea, and by BAL. Increased neutrophil percentages in tracheal lavages are not specific for heaves, neither does it correlate with BALF cytology or histological changes.<sup>119–122</sup> Similarly, poor correlations between neutrophil percentages in sputum, BALF and bronchial biopsies are observed in asthma.<sup>123</sup> BAL are the preferred mean to assess the granulocyte populations in horses and are easily performed on standing sedated animals (Fig. 1b). In heaves, neutrophil percentages in BALF are usually 25% or more (Fig. 3b) (normal  $\leq$  5%). Changes in percentages rather than absolute counts are considered as fluid retrieval and dilution amplitude of the initial volume of saline instilled (up to

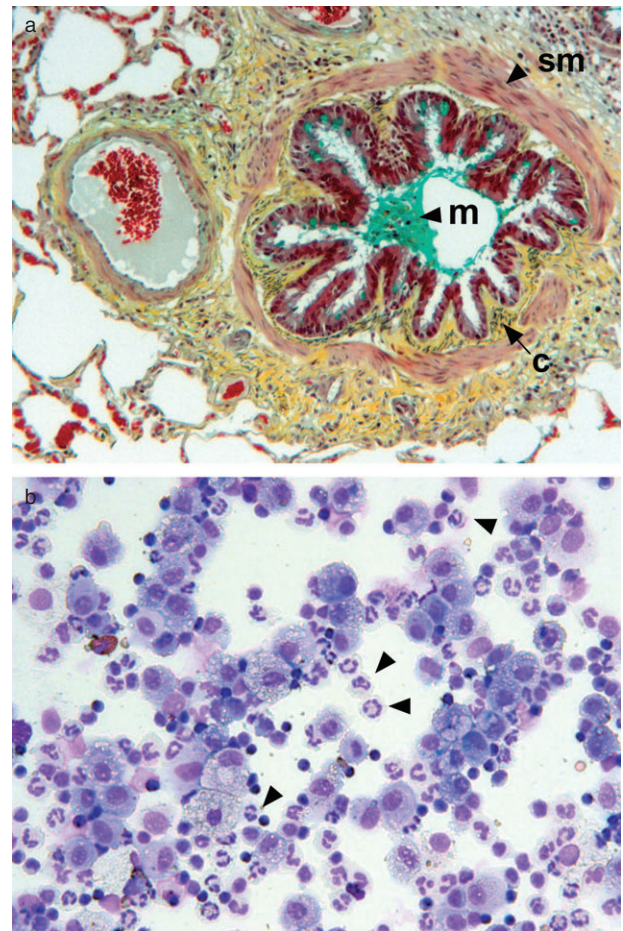


**Figure 2** (a) Pulmonary resistance of horses with heaves ( $n = 6$ ) (black bars) and controls ( $n = 6$ ) (white bars) before (Pasture) and after natural antigen exposure (Stabling and hay feeding) of 1 and 9 days duration. Mean  $\pm$  SEM. \*Different from pasture; †different between groups ( $P < 0.05$ ). Reprinted from Cordeau *et al.*<sup>55</sup> with permission from Elsevier. (b) Changes in pulmonary resistance in horses with heaves before and following treatments with corticosteroids (dexamethasone ( $n = 6$ ), open circles; isoflupredone acetate ( $n = 6$ ), black circles) or a bronchodilator (atropine). Mean  $\pm$  SEM. \*Different from baseline; †different from pre bronchodilator treatment ( $P < 0.05$ ). Reprinted from Picandet *et al.*<sup>98</sup> with permission from Wiley.

500 mL) vary with horses and disease severity.<sup>124</sup> Inconsistent increases in eosinophils and mast cells are also reported (reviewed by Robinson<sup>11</sup>).

## Neutrophils

Airway neutrophils are present in large numbers in the airways of horses with heaves and may contribute to the disease through the release of several inflammatory mediators. They are recruited 3–5 h following the beginning of exposure to stable dust, the process is reversible within 4 days after the cessation of a short exposure (5–7 h),<sup>125–127</sup> and up to 3 weeks or more under more natural conditions.<sup>79</sup> Resolution of airway inflammation coincides with neutrophil apoptosis and phagocytosis by alveolar macrophages.<sup>125</sup> Healthy horses may also develop airway neutrophilia when exposed to the same environment. However, it dissociates from altered lung function, is lesser than in horses with heaves, and usually resolves despite continuous exposure to



**Figure 3** (a) Representative histology of an inflamed bronchiole with mucus plug (m) and surrounding tissue remodelling (sm, smooth muscle; c, subepithelial collagen) in a peripheral lung biopsy obtained by thoracoscopy. Movat pentachrome staining, original magnification 10 $\times$ . Courtesy of Dr Emilie Setlakwe. (b) An example of BALF cytology (modified wright-giemsa staining, original magnification 20 $\times$ , some neutrophils are pointed with arrowheads) from a horse affected with heaves.

stable dust.<sup>55,128,129</sup> In addition, neutrophils are more dense in heaves compared with controls, have delayed spontaneous apoptosis, and release elastase, oxygen metabolites, LTB<sub>4</sub> and probably MMP-9.<sup>125,128,130,131</sup> Equine neutrophils have been shown to express mRNA for cytokines relevant to pulmonary inflammation. Among them, IL-1 $\beta$ , tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , IL-8 and IL-17<sup>58,59,63,64,132</sup> are upregulated in heaves and hence could be derived from recruited neutrophils. NF- $\kappa$ B activity in BALF's neutrophils is increased<sup>79,80</sup> and their release of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  has been proposed to contribute to sustained inflammation through autocrine and paracrine effects.<sup>80</sup> Increased pulmonary oxidative stress indices and hydrogen peroxide in exhaled breath condensate have been associated with BALF neutrophil percentages and tracheal neutrophil counts respectively.<sup>133–135</sup> Taken together, these



results suggest that aberrantly high activation of airway neutrophils may participate to lung pathology in heaves. In addition, IL-4 induces a specific activation phenotype in equine neutrophils (increased expression of IL-4R $\alpha$ , CD23/Fc $\epsilon$ R2, IL-8 and TNF- $\alpha$ ), suggesting that they could contribute actively to allergic inflammation and to its regulation.<sup>136</sup> IL-4 may also participate in the recruitment of neutrophils by stimulating the release of adhesion molecules and chemotactic factors by equine endothelial cells.<sup>137</sup>

### Macrophages

The cellular density of BALF macrophages is increased after exposure to stable dust in horses with heaves compared with controls,<sup>128</sup> suggesting cellular activation. However, alveolar macrophages from both groups of horses have similar upregulated expression of selected pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) and neutrophil-directed chemokines (IL-8 and MIP-2) following stable dust challenge.<sup>138</sup> These results suggest that other mediators secreted by macrophages or different cell types are responsible for the overwhelming neutrophilic inflammation in heaves. Of interest however, percentages of neutrophils in BALF are correlated with IL-1 $\beta$  expression by total BALF cells<sup>15,59</sup> or alveolar macrophages,<sup>138</sup> suggesting that this cytokine contributes to the airway neutrophilia. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  are produced by alveolar macrophages of normal horses stimulated *ex vivo* by *A. fumigatus*, suggesting that molecular patterns of mould antigens may favour cellular activation independently of clinical diagnosis.<sup>139</sup> Conversely, alveolar macrophages isolated from heaves-affected horses after inhalational challenges with endotoxin or HDS were found to have higher expression of TNF- $\alpha$  (HDS), IL-1 $\beta$  and IL-8 (endotoxin) than those of controls.<sup>140</sup> Early IL-17 and MIP-2 expression by pulmonary mononuclear cells in response to *ex vivo* stimulation with soluble hay dust also appears to discriminate between control and heaves-affected horses as reported in another study.<sup>141</sup> The latter suggests that early cytokine expression by resident macrophages might contribute to airway outcome.

### Epithelial cells

Airway epithelial cells are at the interface between the lung and the environment, and thus play a critical role in homeostasis. *In vitro*, IL-8, MIP-2 and IL-1 $\beta$  mRNA is upregulated in epithelial primary cell cultures from horses with heaves and controls in response to HDS or endotoxin.<sup>142</sup> However, only MIP-2 is overexpressed in cells from symptomatic heaves-affected horses compared with controls in response to HDS. There is increased IL-8 expression by epithelial cells in heaves compared with controls from day 14 following an organic dust exposure,<sup>64</sup> but not during acute exacerbation.<sup>143</sup> These observations suggest that epithelial cells may contribute to

the chronic inflammatory response in heaves, but evidence of contribution at an earlier stage is currently lacking. Elevated expression of TLR4 was reported in bronchial brushings<sup>143</sup> in heaves but not in bronchial biopsies.<sup>64</sup> Increased TLR4 expression could lead to exaggerated innate immune response to hay dust endotoxin and contribute to the IL-8 expression associated with the disease.<sup>143</sup> Increased NF- $\kappa$ B activity is found in epithelial cells retrieved from bronchial brushings in heaves-affected horses and correlates with parameters of lung dysfunction and increased ICAM-1 expression by these cells.<sup>80</sup> Epithelial cells could therefore facilitate neutrophil transmigration towards the airway lumen through the upregulation of this adhesion molecule<sup>144</sup> and the expression of IL-17A.<sup>64,141</sup>

## SYSTEMIC INFLAMMATION

Peripheral blood alterations are associated with heaves exacerbation. A rise in haematocrit and fall in sedimentation rate were reported to occur almost 50 years ago.<sup>3</sup> There is a modest but significant increase in peripheral blood neutrophil 7–24 h following the initiation of stable dust exposure.<sup>76,125,126</sup> Blood neutrophils also have an increased active respiratory burst and delayed spontaneous apoptosis 24 h after challenge.<sup>145–147</sup> Increased CD18-dependant adherence is present, even during clinical remission, suggesting a persistent state of neutrophil activation.<sup>145</sup> Lymphocytes (phosphodiesterase (PDE) activity)<sup>148</sup> as well as platelets (decreased responsiveness to platelet-activating factor)<sup>149</sup> are also activated following natural antigenic challenge. In addition, blood concentrations of inflammatory mediators including endothelin,<sup>150</sup> thromboxane A<sub>2</sub><sup>151</sup> and oxidation markers (reduced and total glutathione, GSH/TGSH)<sup>152</sup> are reported to rise with clinical signs.

Increased mRNA expression of IL-8 and TNF- $\alpha$  from both normal and heaves-affected horses' peripheral blood neutrophils has been reported following a 30-day stable dust exposure,<sup>136</sup> but this may not be an early event as no increase was observed at 5 h.<sup>153</sup> Peripheral blood viscoelastic properties and TNF- $\alpha$  protein are increased in symptomatic horses.<sup>154,155</sup> Systemic inflammation may persist during remission of the disease, as revealed by our recent observations that TNF- $\alpha$  remains elevated when horses are kept under low dust conditions (A. Lavoie-Lamoureux, K. Maghni and J.-P. Lavoie, 2009, unpubl. data). Using markers of the acute phase response, we found that haptoglobin and serum amyloid A protein (SAA) were increased following stable dust exposure, and that haptoglobin remains elevated after exposure cessation.<sup>156</sup> These markers are increased in the blood of asthmatic patients.<sup>157–162</sup> This finding is of clinical relevance, as systemic inflammation has been associated with greater decline in lung function in young healthy adults.<sup>163</sup> Heaves may therefore be a useful animal model to investigate the causes and consequences of systemic asthmatic inflammation.

## MUCUS ACCUMULATION

In horses, mucus is primarily produced by cells lining the airways, while mucous glands play a lesser role.<sup>164,165</sup> Using tracheobronchial endoscopy and semi-quantitative scoring systems, tracheal mucoid secretions were shown to correlate with neutrophilic inflammation<sup>166</sup> and cough.<sup>167</sup> It increases during exacerbation of heaves and incompletely resolves with antigen withdrawal.<sup>168</sup> Mucus accumulates in both large and small airways, and plugs in alveoli and bronchioles may be observed (Fig. 4).<sup>169,170</sup> Although poorly described, severe and persistent mucus accumulation may lead to severe airway obstruction which may be refractory to therapy. Mucus glycoprotein composition is modified<sup>171</sup> and viscoelasticity increased<sup>172</sup> in BALF and tracheal secretions, respectively. In asthma, calcium-activated chloride channel-1 (CACLI) and mucin-5AC (MUC5AC) are signalling pathways possibly involved in mucus hypersecretion (reviewed by<sup>173</sup>). They are also overexpressed in heaves, although these findings are inconsistent.<sup>169,174–177</sup> TNF- $\alpha$  may participate to the increased mucus production, as it is increased in heaves and is a potent inducer of MUC5AC by equine epithelial cells.<sup>178</sup> Increased cell survival could be another pathway leading to mucus accumulation and cell metaplasia, as over 40% of mucous cells are Bcl-2-positive in heaves, whereas only 1% are positive in controls.<sup>179</sup>

## NEURONAL AND NEUROENDOCRINE CONTROL OF BRONCHOSPASM

Bronchospasm is a key feature of heaves.<sup>87</sup> As in other species, airway smooth muscle tone is controlled by the autonomic nervous system, both centrally and via local axonal reflex, through activation of receptors via circulating catecholamines and the non-adrenergic non-cholinergic (NANC) system. Bronchospasm in heaves is predominantly mediated via muscarinic (M) receptors<sup>8</sup> but there is no evidence of an exaggerated response of smooth muscle M2 or M3 receptors to acetylcholine stimulation,<sup>180–183</sup> which is similar to what is observed in asthma.<sup>184,185</sup> However, bronchospasm is possibly explained by an alteration of the prejunctional, inhibitory M2 receptors, which provide negative feedback to the release of Ach.<sup>186</sup> In addition, bronchorelaxation is also defective in heaves, due to decreased  $\beta$ -adrenergic receptors density and coupling efficiency to G-protein,<sup>187</sup> as well as altered NANC response.<sup>183</sup> Specifically, there is evidence of inhibitory NANC dysfunction during heaves exacerbation,<sup>181,183</sup> and an upregulation of the neuropeptide neurokinin A receptor at the airway smooth muscle level, increasing its bronchoconstrictive effects.<sup>188</sup>

The effects of acetylcholine are not limited to those of a neurotransmitter, as cholinergic anti-inflammatory pathways have recently been identified.<sup>189</sup> Our group observed that acetylcholine inhibits the expression of E-selectin and vascular endothelial growth factor by equine pulmonary artery endothelial cells stimulated by recombinant

equine IL-4.<sup>190</sup> These findings suggest that the cholinergic anti-inflammatory pathway may modulate pulmonary inflammation and remodelling in heaves. Other mediators increased during heaves exacerbation, including serotonin, endothelin-1, histamine and leukotriene D<sub>4</sub>, potentiate the response of equine smooth muscle cells to acetylcholine, or increase its release. However, while they may contribute to increased cholinergic airway tone, cysteinyl leukotrienes are not believed to be major contributors to bronchospasm as leukotriene antagonists are ineffective for the treatment of heaves.<sup>127,161,191</sup>

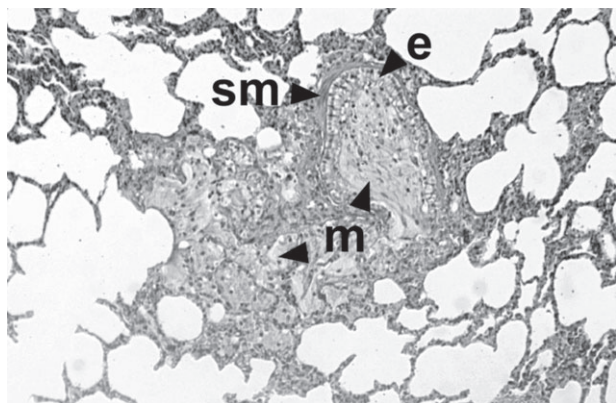
## MICROSCOPIC LESIONS AND AIRWAY REMODELLING

Inflammation and remodelling of the airway wall are characteristic features of heaves. A consequence of airway remodelling is incompletely reversible, or even irreversible airway obstruction, bronchial hyperresponsiveness and an accelerated decline in lung function. The microscopic lesions are mainly characterized by chronic bronchiolitis with predominantly lymphocytic and plasmacytic infiltration in the bronchiolar and peribronchiolar areas.<sup>93,192–194</sup> Mucus, neutrophils and cellular debris are commonly observed within the airway lumen.<sup>143,192</sup> Eosinophilic and mast cell infiltrates, as well as peribronchial fibrosis, are inconsistent findings. Lymphocyte aggregates around the vasculature of the small airways may also be seen.<sup>193</sup> Alveolar hyperinflation due to air trapping is common, while true emphysema is rarely present.<sup>192,195</sup> Changes are not uniform,<sup>164,196</sup> and may account for some variation in the reported microscopic descriptions. Some histological features of heaves, including increased smooth muscle mass and collagen deposition surrounding the airway as well as mucus accumulation in the airway lumen, are illustrated in Figure 3a.

### Epithelium

The main histological lesions in the large conducting airways are the loss of ciliated epithelial cells and occasional abnormal ciliated structures identified by electron microscopy.<sup>197</sup> In the smaller airways, mucous (or goblet) cell hyperplasia and metaplasia have been described<sup>169,170</sup> (and reviewed by Robinson<sup>11</sup>). Semi-quantitative analysis failed however to reveal significant differences in the number of mucous cells in the airways, while finding an association between stored mucosubstances and inflammation.<sup>198</sup> Clara cells that comprise up to 60% of the equine epithelium in distal bronchioles are almost completely depleted of their granules in heaves, and without concurrent observable mucus accumulation.<sup>194</sup> Non-uniformly distributed epithelial progenitor cell hyperplasia has been qualitatively described in studies using light and electron microscopy





**Figure 4** Severe mucus accumulation within the lumen of a terminal bronchiole and surrounding alveoli of a horse with heaves refractory to therapy. m, mucus; e, epithelium; sm, smooth muscle. HE staining, original magnification 20 $\times$ .

(reviewed by<sup>11</sup>). Finally, alveolar clearance remains abnormal during clinical remission in low-dust environment,<sup>114</sup> which suggests persistently impaired epithelial integrity.

### Airway smooth muscle

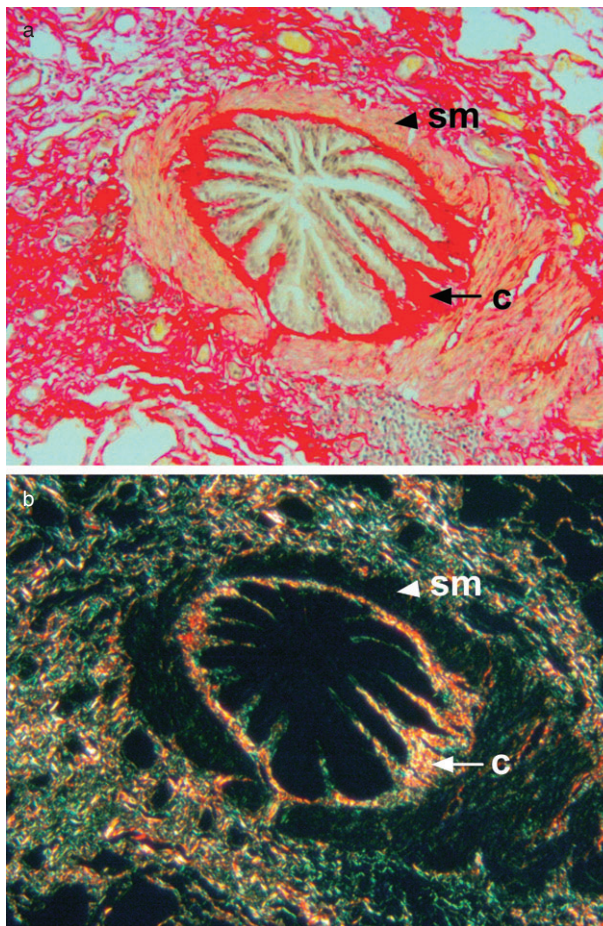
There are several reports in the early veterinary literature of smooth muscle hypertrophy and/or hyperplasia in horses with heaves.<sup>117,170,195</sup> Using morphometric techniques, our group has shown recently that an increase in airway smooth muscle mass is present in the airways of all calibres, but it is most marked in the distal airways (2 to 3 times the amount present in healthy age-matched controls).<sup>129,199</sup> Chronic smooth muscle remodelling appears to reach a plateau, which is possibly maintained in a dynamic equilibrium with an elevated turnover (increased proliferation and apoptosis) of airway myocytes.<sup>129</sup> As in human asthma, it is unknown whether chronic airway smooth muscle remodelling is reversible, although recent findings suggest that a modest but significant decrease in smooth muscle is seen with long-term treatment.<sup>200</sup>

### Collagen

Although not consistently found in the literature, pulmonary fibrosis (illustrated in Fig. 5) has been described in heaves using both light microscopy<sup>12,13,93,193,195,196,201–203</sup> or electron microscopy.<sup>164</sup> However, the collagen types involved in remodelling remain to be elucidated, as no differences in immunolabelled collagen types I and III was identified between healthy and asymptomatic heaves-affected horses in one study.<sup>204</sup>

### Tissue cellular infiltration

Although lymphocytic and plasmacytic infiltration predominates,<sup>93,192–194</sup> other types of cellular infiltra-



**Figure 5** (a) Peripheral equine airway stained with picosirius-red. The subepithelial collagen area is stained red and is discernable from the surrounding smooth muscle layer. (b) Same airway under polarized light. Picosirius-red staining, original magnification 10 $\times$ . sm, smooth muscle; c, subepithelial collagen. Image courtesy of Dr Emily Setlakwe.

tions have been reported, including neutrophil/eosinophil, neutrophil/lymphocyte, eosinophil/lymphocyte or even no cellular infiltration.<sup>50</sup> Of note, some control animals free of clinical signs present similar airway wall inflammation. Mast cells are increased in bronchial and bronchiolar airways in heaves-affected horses after challenge.<sup>49,50</sup> Infiltration with chymase<sup>+</sup> mast cells was associated with tissue fibrosis, neutrophil or lymphocyte but not eosinophil infiltration, independently of clinical diagnosis.<sup>50</sup>

### TREATMENTS

There is no known cure for heaves, that is, susceptible horses recurrently develop airway obstruction and inflammation when exposed to offending environmental conditions. The corner stone of heaves management is thus organic dust avoidance; bronchodilators and corticosteroids are administered

to provide rapid relief of airway obstruction, or when control of the environment is partial or absent.

### Organic dust avoidance: the most effective long-term approach

In heaves, as in allergen-induced asthma, removing the offending antigens is central to the control of the disease.<sup>205,206</sup> Grass pasture leads to alleviation of clinical signs, and normalization of conventional lung function tests and BALF neutrophilia.<sup>129,207,208</sup> Clinical signs subside in days to weeks, depending on age, and severity or duration of the disease.<sup>209</sup> In an indoor low-dust environment, subclinical inflammation and airway obstruction may persist however.<sup>10,114,115</sup> Horses with SPAOPD are conversely controlled by removing affected animals from pasture.<sup>210</sup>

### Medication with strong evidence of efficacy

Corticosteroids, whether administered systemically or by inhalation, are the most effective medication for the control of clinical signs and lung function in heaves<sup>211</sup> (and reviewed by Williamson and Davis<sup>212</sup>) (Fig. 2b). Partial and transient improvement may be observed within a few hours,<sup>213</sup> but the maximal control of airway obstruction usually requires a week or more.<sup>59,191,214</sup> If not combined with organic dust avoidance, only short residual effects are observed after drug administration is discontinued,<sup>215</sup> and control of pulmonary neutrophilia remains modest.<sup>216–218</sup> This is apparently not due to an inherent resistance of neutrophils to corticosteroids, as dexamethasone is very effective in inhibiting their genomic and non-genomic inflammatory responses *in vitro*.<sup>219</sup> In heaves, corticosteroids reduce IL-8 in BALF only if combined with antigen avoidance management,<sup>59,208</sup> and they do not affect NF- $\kappa$ B or AP1 in bronchial epithelial cells during stabling.<sup>218</sup> Thus, the release of neutrophilic chemotactic factors by airway structural and inflammatory cells possibly occur through NF- $\kappa$ B or AP1 signalling pathways, which appear to be resistant to corticosteroids in horses kept in an antigen-rich environment. These findings indicate that improvement in airway function with corticosteroids is likely the result of an anti-inflammatory effect on other cell types present in the equine airways, whether it is by preventing antigen-induced CD4<sup>+</sup> T cells from increasing or by modulating the IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio towards a Th1 response,<sup>59,216</sup> or possibly by directly affecting smooth muscle contractility.<sup>220</sup>

Corticosteroids administered systemically to horses have been associated with some adverse effects (reviewed by Dauvillier *et al.*<sup>221</sup>) also observed with these drugs in human patients. On the immune system, they cause transient peripheral neutrophilia and lymphopenia,<sup>222,223</sup> alter the lymphocyte subpopulations and expression of activation markers,<sup>224</sup> and decrease the antibody response to vaccination.<sup>225</sup>

On the contrary, when corticosteroids are administered by inhalation they have little systemic effects in horses with heaves, as shown by the absence of detectable clinical adverse effects or alteration of lymphocyte subpopulations and function, circulating neutrophil gene expression, and primary and anamnestic immune responses to vaccination after up to one year of inhaled fluticasone administration.<sup>221</sup>

Bronchodilators with demonstrated efficacy in horses with heaves include inhaled and systemic  $\beta_2$ -agonists and anticholinergic drugs. Short- and long-term inhaled  $\beta_2$ -agonist administration results in significant reduction in pulmonary resistance<sup>226,227</sup> (and reviewed by Williamson and Davis<sup>212</sup>). A recent study on *ex vivo* equine bronchial rings showed, however, different effects of the R and S-enantiomers of salbutamol,<sup>228</sup> echoing questions raised in people over the effects of different forms of  $\beta_2$ -agonists.<sup>229,230</sup> Clenbuterol, a systemic  $\beta_2$ -agonist, improves clinical signs in approximately 75% of affected horses,<sup>231</sup> but does not alter histamine-induced bronchoconstriction in healthy ponies.<sup>232</sup> Clinical response increases with higher dosage, as do adverse side-effects.<sup>231</sup> In addition to its bronchodilator effect, clenbuterol also increases mucociliary clearance<sup>233</sup> and possibly has some anti-inflammatory effects.<sup>234,235</sup> Recently, it was shown that corticosteroids can prevent clenbuterol-induced downregulation of  $\beta_2$ -adrenoreceptors on equine lymphocytes.<sup>236</sup> Inhaled anticholinergic drug ipratropium has been less studied but has dose-dependent effects.<sup>9,237</sup> Systemic anticholinergic agents are very effective at relieving airway obstruction (Fig. 2b), but are associated with systemic side-effects limiting their use as therapeutic agents.<sup>238</sup>

### Medication with mitigated or no efficiency in heaves

Methylxanthine derivatives are non-specific PDE inhibitors that have beneficial effects on lung function in horses with heaves but have low therapeutic index.<sup>239–243</sup> The potentiating effects of corticosteroids by low-dose theophylline reported in asthmatics<sup>244</sup> was not observed in horses with heaves after short-term administration.<sup>241</sup> In a recent study, a selective PDE4 inhibitor with potent *in vitro* anti-inflammatory effects on equine leukocytes failed to improve lung function and airway inflammation in heaves-affected horses.<sup>217</sup> Cilomilast, another selective PDE4 inhibitor, does not counteract methacholine-induced constriction in precision-cut lung slices.<sup>245</sup> Cysteinyl leukotrienes (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) are potent bronchoconstrictors derived mainly from mast cells. They may also contribute to airway diseases by increasing airway vascular permeability and mucus production. Leukotriene receptor antagonists are alternative therapy for the treatment of mild persistent asthma.<sup>205</sup> LTD<sub>4</sub> also causes bronchoconstriction both *in vitro* and *in vivo* in horses, and the main receptor for cysteinyl leukotrienes, CystLT1, is present on the equine bronchi.<sup>191,246,247</sup> However, a LTD<sub>4</sub> receptor antagonist, a 5-lipoxygenase (LO) inhibitor and a 5-LO-activating protein antagonist

**Table 1** Similarities and differences between heaves and rodent models of asthma

Characteristics	Equine heaves	Rodent asthma models
Aetiology	Develops naturally Influenced by gene-environment interactions Natural antigens and routes of sensitization/challenge	Antigen-induced Some of the antigens used (e.g. ovalbumin) and routes of sensitization/challenge (e.g. intra-peritoneal/trachea) are irrelevant to human asthma Strongly bias by inbred genetics Animals kept in pathogen-free environments
Pathophysiology		
Non-specific AHR	Present	Present
Inflammation	Persistent Neutrophilic with mixed Th1/Th2/Th17-cytokine profiles	Transient Depends on the antigen (e.g. house dust mite/ovalbumin), adjuvant (e.g. <i>Bordetella pertussis</i> /alum) and mice/rat strain (e.g. BALB/c mice and Brown Norway rats are predisposed to Th2-driven atopic responses)
Tissue remodelling	Persistent, mostly distal airways	Transient, central and distal airways
Clinical signs	Airway obstruction, cough, nasal discharge, wheeze	Usually absent
Research setting		
Genetic manipulation	Not feasible	Knock outs, transgenics, chimera
Reagents availability	Limited	Most current
Availability	Infrequent	High
Handling costs	High	Affordable

were ineffective in heaves,<sup>127,191,248,249</sup> suggesting that cysteinyl leukotrienes are not an important mediator of acute bronchoconstriction in this disease.<sup>191</sup> Cromolyn sodium stabilizes mast cells and interferes with chloride channel function. It is used as alternative medication in mild asthma, and as preventive treatment before unavoidable exposure to known allergens.<sup>205</sup> In heaves, they also prevent clinical exacerbation, although their efficacy is variable.<sup>250,251</sup>

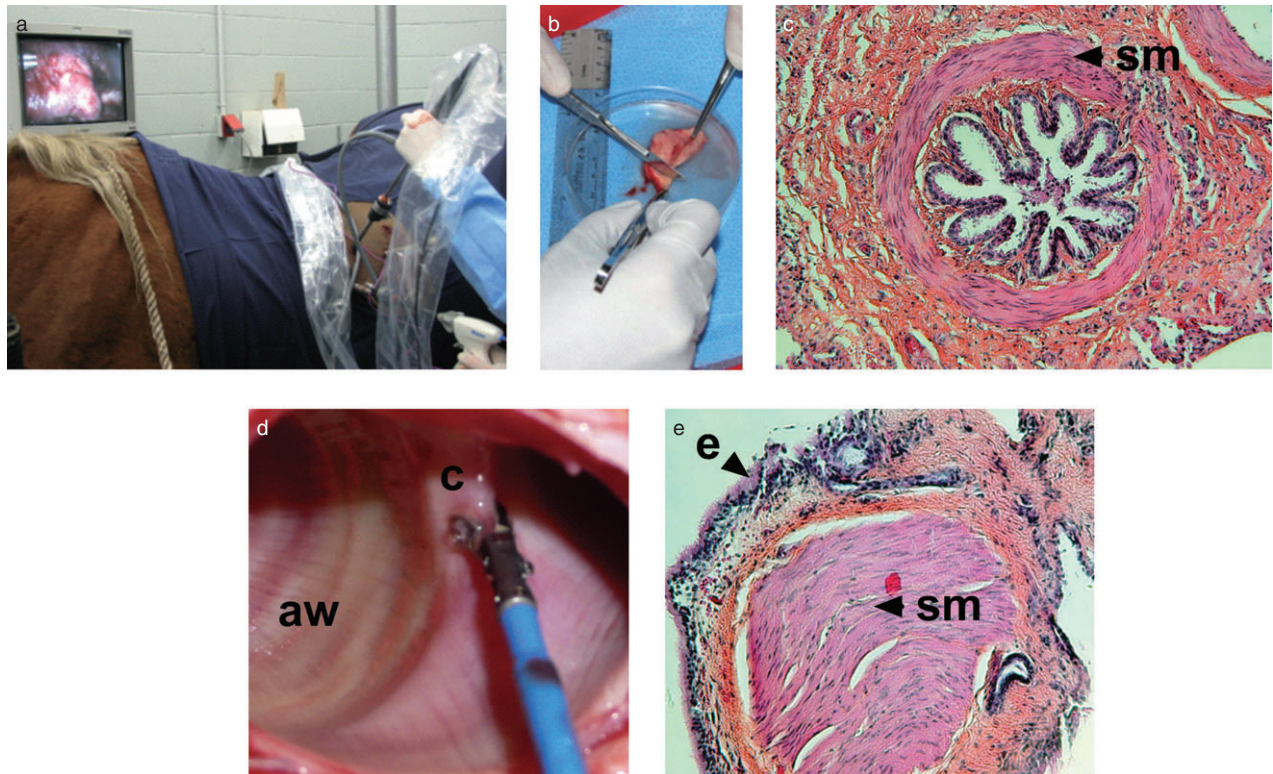
It has been suggested that beneficial effects of corticosteroids are partially mediated through down-regulation of the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. Inhibition of p38 MAPK was partially effective in reducing clinical signs and airway inflammation when administered before clinical exacerbation in heaves.<sup>252</sup> However, they were ineffective when administered during clinical exacerbation, and severe side-effects were observed. Inhibitors of p38 MAPK pathways with a better toxicity profile might nevertheless be effective in the prevention or treatment of heaves, especially since this pathway is essential for equine neutrophils migration.<sup>253</sup>

## ADVANTAGES OF HEAVES AS A MODEL FOR ASTHMA

Equine heaves and feline asthma are perhaps the only naturally occurring asthma-like conditions affecting domestic animal species. They are both associated with inflammation of the airways, coughing and bronchoconstriction.<sup>254</sup> However, the study of feline asthma in a research setting usually requires experimental sensitization with *Ascaris suum* antigens,<sup>255</sup> as induction of natural exacerbation in

affected cats is rarely achievable. In the future, the development of lung function testing, biopsy sampling and molecular tools better adapted to cats might make it a more useful model. Other models in rodents (Table 1), pigs, dogs, ruminants, primates (reviewed by Kirschvink and Reinhold<sup>256</sup> and Bice *et al.*<sup>257</sup>) also require experimental sensitization with an antigen administered systemically or by inhalation. They can be very useful in the study of specific aspects of asthma but rarely result in the development of persistent induced clinical signs and airway obstruction. The naturally occurring nature of heaves, the duration of the disease that can last decades and the long lifespan (30–35 years) of horses make this disease closer to human asthma than any other animal models. This is particularly important for the study of airway wall remodelling that is likely the result of complex immune response and bouts of inflammation and bronchoconstriction occurring over many years. Also pertinent to the study of airway remodelling, the equine and human lungs have similar well-developed bronchial circulation,<sup>258–260</sup> poorly developed lobulation and respiratory bronchioles, thick pleura, and the presence of terminal bronchioles and bronchial artery-pulmonary shunts.<sup>260</sup> Contrarily to small rodents, they have well-developed smooth muscle from the trachea to the alveolar ducts<sup>261</sup> and mast cells are present at all levels of the bronchial tree.<sup>262</sup> An additional strength of this model is that episodes of airway obstruction can be predictably induced in susceptible horses by an exposure to stable dust and reversed by maintaining horses on pasture or by the administration of corticosteroids and bronchodilators.<sup>59,263–265</sup> Because of their calm and malleable demeanour, procedures required for the study of lung pathologies, such as





**Figure 6** (a) to (c) Peripheral lung biopsy obtained under thoracoscopy guidance in a heaves-affected horse. Thoracoscopy can be performed in standing, sedated animals, breathing spontaneously. Biopsies obtained contain numerous airways in cross-section like the one pictured here. sm, smooth muscle. Haematoxylin phloxine saffron staining, original magnification 10 $\times$ . (d) and (e) Endobronchial biopsy obtained at the level of a secondary carina through a bronchoscope. The biopsies obtained sample a portion of the airway wall. c, carina; aw, airway; e, epithelium; sm, smooth muscle. Haematoxylin phloxine saffron staining, original magnification 4 $\times$ .

pulmonary function tests, BAL and endobronchial biopsies (Fig. 6d,e) or brushing, and even large peripheral lung biopsies performed via thoracoscopy (Fig. 6a–c) can also be performed on multiple occasions in standing sedated animals.<sup>266–268</sup> Thus, the prospective study of equine cohorts allows the analysis of disease mechanisms and evolution of remodelling in the asymptomatic and symptomatic stages of disease, an approach difficult in humans. The recent development of owner-assessed respiratory signs questionnaires<sup>17,211,269,270</sup> also allows for conducting large-scale epidemiological studies and field evaluation of treatment efficacy.

The disease has initially been disregarded as an asthma model because neutrophils are the predominant cells in the airway lumen in heaves. Interestingly, it is now recognized that neutrophils infiltrate the airways of nocturnal asthmatics,<sup>271</sup> non-atopic and atopic asthmatics,<sup>272,273</sup> and are the predominant cells in the airway secretions of a significant proportion of asthmatics, ranging from mild to severe.<sup>274–279</sup> Similarly to asthma, there is a genetic susceptibility to heaves<sup>18,20</sup> and an allergic component is supported by the presence of a Th2-type pattern of cytokine expression in the airways<sup>54,55,61</sup> and an IL-4R $\alpha$  gene polymorphism,<sup>23</sup> although, as in asthma,<sup>280</sup> a Th1 cytokine profile has also been reported.<sup>58,59</sup> Hence, heaves also serves as a

model to study the contribution of neutrophils to the asthmatic phenotypes. Furthermore, horses present mild or moderate asthma-type conditions that are associated with different airway inflammatory phenotypes. Lastly, cross-bridging of the human and veterinary researches may benefit our understanding of both diseases. Table 2 summarizes the similarities and differences between asthma and heaves.

## LIMITATIONS OF HEAVES AS A MODEL FOR ASTHMA

Aside from the pathophysiological differences intrinsic to any animal model, heaves comes with unique challenges. The natural nature of heaves and the heterogeneous genetic background of the affected animals make it difficult to reach adequate statistical power when looking at small effects (in genetic studies for example). Also, the long lifespan of horses complicates longitudinal studies on ageing processes. However, these aspects represent advantages compared with rodents when it comes to model human diseases. Their size can be an asset for repeated biopsy sampling and ease of bronchoscopy but limits other procedures such as thoracic computed tomography. Interspecies differences in immune-related

**Table 2** Similarities and differences between asthma and heaves

Pathophysiological features	Asthma	Heaves
Reversible airway obstruction	✓	✓
Airway hyper-responsiveness	✓	✓
Acute phase	✓	
Late phase	✓	✓
Neutrophilic inflammation	✓ <sup>†</sup>	✓
IgE-specific response	✓ <sup>†</sup>	?
Inflammation profile		
Th2 and/or Th1	✓	✓
Th17	✓ <sup>‡</sup>	✓
↑ Endotoxin sensitivity	✓	✓
Inflammation site		
Peripheral airways	✓	✓
Central airways	✓	?
Tissue remodelling		
↑ Smooth muscle mass	✓	✓
Submucosal fibrosis	✓	✓
Basal membrane fibrosis	✓	
Remodelling sites		
Peripheral airways	✓	✓
Central airways	✓	✓
Treatments		
Corticosteroids	✓	✓
β <sub>2</sub> -agonists	✓	✓
Anti-leukotrienes	✓	
Theophylline	✓	✓

? No clear conclusion.

<sup>†</sup> Some phenotypes.

<sup>‡</sup> Associated with severe phenotypes.

mediator or receptor expression as well as dissimilarities in drug and nutrient metabolism may restrain extrapolation to humans. Also, some molecular tools, in particular species-specific antibodies are still lacking despite constant improvement. Lastly, cost, facilities and equipment required for the study of horses has limited in the past the study of heaves as an asthma model. New means of increasing access to resources and collaboration between centres have been developed (see below) and will reduce some of those limitations.

## PERSPECTIVES

Heaves has unique features of interest for asthma research. For example, there are ongoing studies of airway remodelling reversibility that cannot be conducted in rodents or human for technical or ethical reasons.<sup>200</sup> Post-mortem and biopsy tissue availability facilitates *ex vivo* techniques such as precision cut slices,<sup>245</sup> primary smooth muscle culture, myosin purification and respiratory epithelial cell cultured on air-liquid interface.<sup>281</sup> Areas of particular interest include the genetic determinants of heaves,<sup>282</sup> the characterization of T-cell differentiation<sup>283</sup> and regulation,<sup>284</sup> the description of dendritic cell

properties<sup>285</sup> and modulation,<sup>286</sup> the contribution of epithelium to inflammation,<sup>142,143,287</sup> as well as the role of surfactant<sup>288</sup> and Clara cells.<sup>194</sup> Our group and others are also interested in the mechanisms of neutrophil recruitment,<sup>289</sup> their contribution to Th2-derived inflammation,<sup>136</sup> and their responsiveness to corticosteroids.<sup>290</sup> These fields target a better understanding of asthma-like disease aetiology, progression and treatment improvement. Investigating the link between IAD and heaves, as well as how inflammation of the airways in younger horses evolves to heaves' severe neutrophilic inflammation and airflow limitation may help shed light on the biology of human asthma.

Veterinary schools worldwide are studying heaves and IAD as human disease models but also because they are of considerable importance for animal welfare and the equine industry. A multicentre equine respiratory tissue bank (<http://www.btre.ca>, October 2011) is being developed to increase availability of equine lung tissues to other researchers in the field of asthma that do not have the resources and expertise required to study this animal model.

## REFERENCES

- Hotchkiss JW, Reid SW, Christley RM. A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: risk factors for recurrent airway obstruction. *Equine Vet. J.* 2007; **39**: 301–8.
- Bouley H. In: Raige-Delorme MM, Doremberg C, Bouley H *et al.* (eds) *Nouveau dictionnaire lexicographique et descriptif des sciences médicales et vétérinaires*. Asselin, Paris, 1863; 1073–4.
- Lowell FC. Observations on heaves. An asthma-like syndrome in the horse. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1964; **35**: 322–30.
- Seahorn TL, Groves MG, Harrington KS *et al.* Chronic obstructive pulmonary disease in horses in Louisiana. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1996; **208**: 248–51.
- Seahorn TL, Beadle RE. Summer pasture-associated obstructive pulmonary disease in horses: 21 cases (1983–1991). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1993; **202**: 779–82.
- Costa LR, Johnson JR, Baur ME *et al.* Temporal clinical exacerbation of summer pasture-associated recurrent airway obstruction and relationship with climate and aeroallergens in horses. *Am. J. Vet. Res.* 2006; **67**: 1635–42.
- Derksen FJ, Robinson NE, Berney CE. Aerosol pirbuterol: bronchodilator activity and side effects in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Equine Vet. J.* 1992; **24**: 107–12.
- Broadstone RV, Scott JS, Derksen FJ *et al.* Effects of atropine in ponies with recurrent airway obstruction. *J. Appl. Physiol.* 1988; **65**: 2720–5.
- Robinson NE, Derksen FJ, Berney C *et al.* The airway response of horses with recurrent airway obstruction (heaves) to aerosol administration of ipratropium bromide. *Equine Vet. J.* 1993; **25**: 299–303.
- Miskovic M, Couetil LL, Thompson CA. Lung function and airway cytologic profiles in horses with recurrent airway obstruction maintained in low-dust environments. *J. Vet. Intern. Med.* 2007; **21**: 1060–6.
- Robinson NE. International workshop on equine chronic airway disease. Michigan State University 16–18 June 2000. *Equine Vet. J.* 2001; **33**: 5–19.
- Breeze RG. Heaves. The problem of disease definition. *Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract.* 1979; **1**: 219–30.
- McPherson EA, Thomson JR. Chronic obstructive pulmonary disease in the horse. 1: nature of the disease. *Equine Vet. J.* 1983; **15**: 203–6.

- 14 Couetil LL, Hoffman AM, Hodgson J *et al.* Inflammatory airway disease of horses. *J. Vet. Intern. Med.* 2007; **21**: 356–61.
- 15 Lavoie JP, Cesarini C, Lavoie-Lamoureux A *et al.* Bronchoalveolar lavage fluid cytology and cytokine messenger ribonucleic acid expression of racehorses with exercise intolerance and lower airway inflammation. *J. Vet. Intern. Med.* 2011; **25**: 322–9.
- 16 Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet* 2008; **372**: 1107–19.
- 17 Hotchkiss JW, Reid SW, Christley R. Construction and validation of a risk-screening questionnaire for the investigation of recurrent airway obstruction in epidemiological studies of horse populations in Great Britain. *Prev. Vet. Med.* 2006; **75**: 8–21.
- 18 Marti E, Gerber H, Essich G *et al.* The genetic basis of equine allergic diseases. 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. *Equine Vet. J.* 1991; **23**: 457–60.
- 19 McPherson EA, Lawson GH, Murphy JR *et al.* Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): factors influencing the occurrence. *Equine Vet. J.* 1979; **11**: 167–71.
- 20 Ramseyer A, Gaillard C, Burger D *et al.* Effects of genetic and environmental factors on chronic lower airway disease in horses. *J. Vet. Intern. Med.* 2007; **21**: 149–56.
- 21 Ewart SL, Robinson NE. Genes and respiratory disease: a first step on a long journey. *Equine Vet. J.* 2007; **39**: 270–4.
- 22 Solberg OD, Jackson KA, Millon LV *et al.* Genomic characterization of equine interleukin-4 receptor alpha-chain (IL4R). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004; **97**: 187–94.
- 23 Jost U, Klukowska-Rotzler J, Dolf G *et al.* A region on equine chromosome 13 is linked to recurrent airway obstruction in horses. *Equine Vet. J.* 2007; **39**: 236–41.
- 24 Risma KA, Wang N, Andrews RP *et al.* V75R576 IL-4 receptor alpha is associated with allergic asthma and enhanced IL-4 receptor function. *J. Immunol.* 2002; **169**: 1604–10.
- 25 Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA *et al.* The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N. Engl. J. Med.* 1997; **337**: 1720–5.
- 26 Neuhaus S, Bruendler P, Frey CF *et al.* Increased parasite resistance and recurrent airway obstruction in horses of a high-prevalence family. *J. Vet. Intern. Med.* 2010; **24**: 407–13.
- 27 Brundler P, Frey CF, Gottstein B *et al.* Lower shedding of strongylid eggs by Warmblood horses with recurrent airway obstruction compared to unrelated healthy horses. *Vet. J.* 2011; doi: S1090-0233(11)00003-7 [pii] 10.1016/j.tvjl.2010.12.029 (Epub ahead of print).
- 28 Barnes KC, Grant AV, Gao P. A review of the genetic epidemiology of resistance to parasitic disease and atopic asthma: common variants for common phenotypes? *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2005; **5**: 379–85.
- 29 Martinez FD. Respiratory syncytial virus bronchiolitis and the pathogenesis of childhood asthma. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2003; **22**: S76–82.
- 30 McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE. Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens. *Equine Vet. J.* 1993; **25**: 261–7.
- 31 McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE. Evaluation of intradermal mould antigen testing in the diagnosis of equine chronic obstructive pulmonary disease. *Equine Vet. J.* 1993; **25**: 273–5.
- 32 McPherson EA, Lawson GH, Murphy JR *et al.* Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in horses: aetiological studies: responses to intradermal and inhalation antigenic challenge. *Equine Vet. J.* 1979; **11**: 159–66.
- 33 Jose-Cunilleras E, Kohn CW, Hillier A *et al.* Intradermal testing in healthy horses and horses with chronic obstructive pulmonary disease, recurrent urticaria, or allergic dermatitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2001; **219**: 1115–21.
- 34 Tahon L, Baselgia S, Gerber V *et al.* In vitro allergy tests compared to intradermal testing in horses with recurrent airway obstruction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009; **127**: 85–93.
- 35 Eder C, Cramer R, Mayer C *et al.* Allergen-specific IgE levels against crude mould and storage mite extracts and recombinant mould allergens in sera from horses affected with chronic bronchitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2000; **73**: 241–53.
- 36 Kunzle F, Gerber V, Van Der Haegen A *et al.* IgE-bearing cells in bronchoalveolar lavage fluid and allergen-specific IgE levels in sera from RAO-affected horses. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 2007; **54**: 40–7.
- 37 Scharrenberg A, Gerber V, Swinburne JE *et al.* IgE, IgG<sub>a</sub>, IgG<sub>b</sub> and IgG(T) serum antibody levels in offspring of two sires affected with equine recurrent airway obstruction. *Anim. Genet.* 2010; **41**(Suppl. 2): 131–7.
- 38 Moran G, Burgos R, Araya O *et al.* In vitro bioassay to detect reaginic antibodies from the serum of horses affected with recurrent airway obstruction. *Vet. Res. Commun.* 2010; **34**: 91–9.
- 39 Moran G, Folch H, Araya O *et al.* Detection of reaginic antibodies against *Faenia rectivirgula* from the serum of horses affected with Recurrent Airway Obstruction by an in vitro bioassay. *Vet. Res. Commun.* 2010; **34**: 719–26.
- 40 Schmallenbach KH, Rahman I, Sasse HH *et al.* Studies on pulmonary and systemic *Aspergillus fumigatus*-specific IgE and IgG antibodies in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1998; **66**: 245–56.
- 41 Halliwell RE, McGorum BC, Irving P *et al.* Local and systemic antibody production in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1993; **38**: 201–15.
- 42 Eder C, Curik I, Brem G *et al.* Influence of environmental and genetic factors on allergen-specific immunoglobulin-E levels in sera from Lipizzan horses. *Equine Vet. J.* 2001; **33**: 714–20.
- 43 Powe DG, Bonnin AJ, Jones NS. 'Entropy': local allergy paradigm. *Clin. Exp. Allergy* 2010; **40**: 987–97.
- 44 Barnes PJ. Intrinsic asthma: not so different from allergic asthma but driven by superantigens? *Clin. Exp. Allergy* 2009; **39**: 1145–51.
- 45 Mouthuy J, Detry B, Sohy C *et al.* Presence in sputum of functional dust mite-specific IgE antibodies in intrinsic asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011; **184**: 206–14.
- 46 Deaton CM, Deaton L, Jose-Cunilleras E *et al.* Early onset airway obstruction in response to organic dust in the horse. *J. Appl. Physiol.* 2007; **102**: 1071–7.
- 47 Hare JE, Viel L, Conlon PD *et al.* In vitro allergen-induced degranulation of pulmonary mast cells from horses with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. J. Vet. Res.* 1999; **60**: 841–7.
- 48 McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE. Quantification of histamine in plasma and pulmonary fluids from horses with chronic obstructive pulmonary disease, before and after 'natural' (hay and straw) challenges. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1993; **36**: 223–37.
- 49 Dacre KJ, McGorum BC, Marlin DJ *et al.* Organic dust exposure increases mast cell tryptase in bronchoalveolar lavage fluid and airway epithelium of heaves horses. *Clin. Exp. Allergy* 2007; **37**: 1809–18.
- 50 van der Haegen A, Kunzle F, Gerber V *et al.* Mast cells and IgE-bearing cells in lungs of RAO-affected horses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005; **108**: 325–34.
- 51 Wagner B. IgE in horses: occurrence in health and disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009; **132**: 21–30.
- 52 Dales RE, Munt PW. Farmer's lung disease. *Can. Fam. Physician* 1982; **28**: 1817–20.
- 53 Lawson GH, McPherson EA, Murphy JR *et al.* The presence of precipitating antibodies in the sera of horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Equine Vet. J.* 1979; **11**: 172–6.
- 54 Lavoie JP, Maghni K, Desnoyers M *et al.* Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; **164**: 1410–13.



- 55 Cordeau ME, Joubert P, Dewachi O *et al.* IL-4, IL-5 and IFN-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004; **97**: 87–96.
- 56 Kleiber C, McGorum BC, Horohov DW *et al.* Cytokine profiles of peripheral blood and airway CD4 and CD8 T lymphocytes in horses with recurrent airway obstruction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005; **104**: 91–7.
- 57 Bowles KS, Beadle RE, Mouch S *et al.* A novel model for equine recurrent airway obstruction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002; **87**: 385–9.
- 58 Ainsworth DM, Grunig G, Matychak MB *et al.* Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN-gamma and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2003; **96**: 83–91.
- 59 Giguere S, Viel L, Lee E *et al.* Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002; **85**: 147–58.
- 60 Beadle RE, Horohov DW, Gaunt SD. Interleukin-4 and interferon-gamma gene expression in summer pasture-associated obstructive pulmonary disease affected horses. *Equine Vet. J.* 2002; **34**: 389–94.
- 61 Horohov DW, Beadle RE, Mouch S *et al.* Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005; **108**: 237–45.
- 62 Desjardins I, Theoret C, Joubert P *et al.* Comparison of TGF-beta 1 concentrations in bronchoalveolar fluid of horses affected with heaves and of normal controls. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004; **101**: 133–41.
- 63 Debrue M, Hamilton E, Joubert P *et al.* Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005; **105**: 25–31.
- 64 Ainsworth DM, Wagner B, Franchini M *et al.* Time-dependent alterations in gene expression of interleukin-8 in the bronchial epithelium of horses with recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.* 2006; **67**: 669–77.
- 65 El Biaze M, Boniface S, Koscher V *et al.* T cell activation, from atopy to asthma: more a paradox than a paradigm. *Allergy* 2003; **58**: 844–53.
- 66 Magnan AO, Mely LG, Camilla CA *et al.* Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. Increased IFN-gamma-producing CD8(+) T cells in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; **161**: 1790–6.
- 67 Bettiol J, Bartsch P, Louis R *et al.* Cytokine production from peripheral whole blood in atopic and nonatopic asthmatics: relationship with blood and sputum eosinophilia and serum IgE levels. *Allergy* 2000; **55**: 1134–41.
- 68 Al-Ramli W, Prefontaine D, Chouiali F *et al.* T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009; **123**: 1185–7.
- 69 Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V *et al.* Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; **125**: 222–30. e1–4.
- 70 McGorum BC, Ellison J, Cullen RT. Total and respirable airborne dust endotoxin concentrations in three equine management systems. *Equine Vet. J.* 1998; **30**: 430–4.
- 71 Berndt A, Derksen FJ, Edward Robinson N. Endotoxin concentrations within the breathing zone of horses are higher in stables than on pasture. *Vet. J.* 2010; **183**: 54–7.
- 72 Michel O, Kips J, Duchateau J *et al.* Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; **154**: 1641–6.
- 73 Rylander R, Haglund P, Lundholm M. Endotoxin in cotton dust and respiratory function decrement among cotton workers in an experimental cardroom. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1985; **131**: 209–13.
- 74 Olenchok SA, May JJ, Pratt DS *et al.* Occupational exposures to airborne endotoxins in agriculture. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1987; **231**: 475–87.
- 75 Michel O, Duchateau J, Sergysels R. Effect of inhaled endotoxin on bronchial reactivity in asthmatic and normal subjects. *J. Appl. Physiol.* 1989; **66**: 1059–64.
- 76 Pirie RS, Dixon PM, Collie DD *et al.* Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses. *Equine Vet. J.* 2001; **33**: 311–18.
- 77 Pirie RS, Collie DD, Dixon PM *et al.* Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma). *Clin. Exp. Allergy* 2003; **33**: 676–83.
- 78 Pirie RS, Dixon PM, McGorum BC. Endotoxin contamination contributes to the pulmonary inflammatory and functional response to *Aspergillus fumigatus* extract inhalation in heaves horses. *Clin. Exp. Allergy* 2003; **33**: 1289–96.
- 79 Sandersen C, Bureau F, Turlej R *et al.* p65 Homodimer activity in distal airway cells determines lung dysfunction in equine heaves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2001; **80**: 315–26.
- 80 Bureau F, Delhalle S, Bonizzi G *et al.* Mechanisms of persistent NF-kappa B activity in the bronchi of an animal model of asthma. *J. Immunol.* 2000; **165**: 5822–30.
- 81 Werners AH, Bull S, Vendrig JC *et al.* Genotyping of Toll-like receptor 4, myeloid differentiation factor 2 and CD-14 in the horse: an investigation into the influence of genetic polymorphisms on the LPS induced TNF-alpha response in equine whole blood. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006; **111**: 165–73.
- 82 Pirie RS, McLachlan G, McGorum BC. Evaluation of nebulised hay dust suspensions (HDS) for the diagnosis and investigation of heaves. 1: preparation and composition of HDS. *Equine Vet. J.* 2002; **34**: 332–6.
- 83 Lavoie J-P. Recurrent airway obstruction (Heaves) and summer-pasture-associated obstructive pulmonary disease. In: McGorum BC, Dixon PM, Robinson NE *et al.* (eds) *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. Saunders, Edinburgh, 2007; 565–89.
- 84 Willoughby RA, McDonnell WN. Pulmonary function testing in horses. *Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract.* 1979; **1**: 171–96.
- 85 Gillespie JR, Tyler WS, Eberly VE. Pulmonary ventilation and resistance in emphysematous and control horses. *J. Appl. Physiol.* 1966; **21**: 416–22.
- 86 Muylle E, Oyaert W. Lung function tests in obstructive pulmonary disease in horses. *Equine Vet. J.* 1973; **5**: 37–44.
- 87 Robinson NE, Derksen FJ, Olszewski MA *et al.* The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses. *Br. Vet. J.* 1996; **152**: 283–306.
- 88 Gallivan GJ, Viel L, McDonnell WN. An evaluation of the multiple-breath nitrogen washout as a pulmonary function test in horses. *Can. J. Vet. Res.* 1990; **54**: 99–105.
- 89 Denac-Sikirc M. The functional residual capacity and helium mixing time in healthy horses and horses with lung diseases. *Zentralbl. Veterinarmed. A.* 1976; **23**: 193–205.
- 90 Rush BR, Hoskinson JJ, Davis EG *et al.* Pulmonary distribution of aerosolized technetium Tc 99m pentetate after administration of a single dose of aerosolized albuterol sulfate in horses with recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.* 1999; **60**: 764–9.
- 91 Herholz CP, Gerber V, Tschudi P *et al.* Use of volumetric capnography to identify pulmonary dysfunction in horses with and without clinically apparent recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.* 2003; **64**: 338–45.
- 92 Votien D, Ghafir Y, Vandenput S *et al.* Analysis of scintigraphical lung images before and after treatment of horses suffering from chronic pulmonary disease. *Vet. Rec.* 1999; **144**: 232–6.
- 93 Nyman G, Lindberg R, Weckner D *et al.* Pulmonary gas exchange correlated to clinical signs and lung pathology in horses with chronic bronchitis. *Equine Vet. J.* 1991; **23**: 253–60.
- 94 Robinson NE, Olszewski MA, Boehler D *et al.* Relationship between clinical signs and lung function in horses with

- recurrent airway obstruction (heaves) during a bronchodilator trial. *Equine Vet. J.* 2000; **32**: 393–400.
- 95 Robinson NE, Derksen FJ, Olszewski M *et al.* Determinants of the maximal change in pleural pressure during tidal breathing in COPD-affected horses. *Vet. J.* 1999; **157**: 160–5.
- 96 Petsche VM, Derksen FJ, Robinson NE. Tidal breathing flow-volume loops in horses with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. J. Vet. Res.* 1994; **55**: 885–91.
- 97 Mazan MR, Deveney EF, DeWitt S *et al.* Energetic cost of breathing, body composition, and pulmonary function in horses with recurrent airway obstruction. *J. Appl. Physiol.* 2004; **97**: 91–7.
- 98 Picandet V, Leguilette R, Lavoie JP. Comparison of efficacy and tolerability of isoflupredone and dexamethasone in the treatment of horses affected with recurrent airway obstruction ('heaves'). *Equine Vet. J.* 2003; **35**: 419–24.
- 99 Young SS, Tesarowski D, Viel L. Frequency dependence of forced oscillatory respiratory mechanics in horses with heaves. *J. Appl. Physiol.* 1997; **82**: 983–7.
- 100 Mazan MR, Hoffman AM, Manjerovic N. Comparison of forced oscillation with the conventional method for histamine bronchoprovocation testing in horses. *Am. J. Vet. Res.* 1999; **60**: 174–80.
- 101 van Erck E, Votion DM, Kirschvink N *et al.* Use of the impulse oscillometry system for testing pulmonary function during methacholine bronchoprovocation in horses. *Am. J. Vet. Res.* 2003; **64**: 1414–20.
- 102 Van Erck E, Votion D, Art T *et al.* Qualitative and quantitative evaluation of equine respiratory mechanics by impulse oscillometry. *Equine Vet. J.* 2006; **38**: 52–8.
- 103 Richard EA, Fortier GD, Denoix JM *et al.* Influence of subclinical inflammatory airway disease on equine respiratory function evaluated by impulse oscillometry. *Equine Vet. J.* 2009; **41**: 384–9.
- 104 Beadle RE. Experiences with whole-body plethysmography in horses with obstructive pulmonary disease. Lung function and respiratory diseases in the horse International Symposium in Hannover, Germany, June. 1985.
- 105 Hoffman AM, Oura TJ, Riedelberger KJ *et al.* Plethysmographic comparison of breathing pattern in heaves (recurrent airway obstruction) versus experimental bronchoconstriction or hyperpnea in horses. *J. Vet. Intern. Med.* 2007; **21**: 184–92.
- 106 Couetil LL, Rosenthal FS, DeNicola DB *et al.* Clinical signs, evaluation of bronchoalveolar lavage fluid, and assessment of pulmonary function in horses with inflammatory respiratory disease. *Am. J. Vet. Res.* 2001; **62**: 538–46.
- 107 Couetil LL, Rosenthal FS, Simpson CM. Forced expiration: a test for airflow obstruction in horses. *J. Appl. Physiol.* 2000; **88**: 1870–9.
- 108 Doucet MY, Vrins AA, Ford-Hutchinson AW. Histamine inhalation challenge in normal horses and in horses with small airway disease. *Can. J. Vet. Res.* 1991; **55**: 285–93.
- 109 Obel NJ, Schmitterlow CG. The action of histamine and other drugs on the bronchial tone in horses suffering from alveolar emphysema (heaves). *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh)*. 1948; **4**: 71–80.
- 110 Armstrong PJ, Derksen FJ, Slocombe RF *et al.* Airway responses to aerosolized methacholine and citric acid in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. Rev. Respir. Dis.* 1986; **133**: 357–61.
- 111 Derksen FJ, Scott D, Robinson NE *et al.* Intravenous histamine administration in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. J. Vet. Res.* 1985; **46**: 774–7.
- 112 Fairbairn SM, Lees P, Page CP *et al.* Duration of antigen-induced hyperresponsiveness in horses with allergic respiratory disease and possible links with early airway obstruction. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1993; **16**: 469–76.
- 113 Derksen FJ, Robinson NE, Armstrong PJ *et al.* Airway reactivity in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *J. Appl. Physiol.* 1985; **58**: 598–604.
- 114 Votion DM, Vandenput SN, Duvivier DH *et al.* Alveolar clearance in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Vet. Res.* 1999; **60**: 495–500.
- 115 Vandenput S, Votion D, Duvivier DH *et al.* Effect of a set stabled environmental control on pulmonary function and airway reactivity of COPD affected horses. *Vet. J.* 1998; **155**: 189–95.
- 116 Nuytten J, Deprez P, Picavet T *et al.* Comparison of different pulmonary function tests and their prognostic value in horses affected with COPD. *Equine Vet. Sci.* 1988; **8**: 361–4.
- 117 Viel L. Structural-functional correlations of the lung in horses with small airway disease (PhD Thesis). Guelph, ON, Canada: University of Guelph, 1983.
- 118 Johansson AM, Gardner SY, Atkins CE *et al.* Cardiovascular effects of acute pulmonary obstruction in horses with recurrent airway obstruction. *J. Vet. Intern. Med.* 2007; **21**: 302–7.
- 119 Larson VL, Busch RH. Equine tracheobronchial lavage: comparison of lavage cytologic and pulmonary histopathologic findings. *Am. J. Vet. Res.* 1985; **46**: 144–6.
- 120 Derksen FJ, Brown CM, Sonea I *et al.* Comparison of transtracheal aspirate and bronchoalveolar lavage cytology in 50 horses with chronic lung disease. *Equine Vet. J.* 1989; **21**: 23–6.
- 121 Winder NC, Hermann M, Grünig G *et al.* Comparison of bronchoalveolar lavage and respiratory secretion cytology in horses with clinically diagnosed chronic pulmonary disease. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 1990; **132**: 505–10.
- 122 Traub-Dargatz JL, McKinnon AO, Thrall MA *et al.* Evaluation of clinical signs of disease, bronchoalveolar and tracheal wash analysis, and arterial blood gas tensions in 13 horses with chronic obstructive pulmonary disease treated with prednisone, methyl sulfonmethane, and clenbuterol hydrochloride. *Am. J. Vet. Res.* 1992; **53**: 1908–16.
- 123 Grootendorst DC, Sont JK, Willems LN *et al.* Comparison of inflammatory cell counts in asthma: induced sputum vs bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies. *Clin. Exp. Allergy* 1997; **27**: 769–79.
- 124 Jean D, Vrins A, Beauchamp G *et al.* Evaluation variations in bronchoalveolar lavage fluid in horses with recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.* 2011; **72**: 838–42.
- 125 Brazil TJ, Dagleish MP, McGorum BC *et al.* Kinetics of pulmonary neutrophil recruitment and clearance in a natural and spontaneously resolving model of airway inflammation. *Clin. Exp. Allergy* 2005; **35**: 854–65.
- 126 Fairbairn SM, Page CP, Lees P *et al.* Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure. *Clin. Exp. Allergy* 1993; **23**: 821–8.
- 127 Marr KA, Lees P, Page CP *et al.* Effect of the 5-lipoxygenase inhibitor, fenleuton, on antigen-induced neutrophil accumulation and lung function changes in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1998; **21**: 241–6.
- 128 Tremblay GM, Ferland C, Lapointe JM *et al.* Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses. *Equine Vet. J.* 1993; **25**: 194–7.
- 129 Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Gelinat-Lymburner E *et al.* Effect of antigen exposure on airway smooth muscle remodeling in an equine model of chronic asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2011; **45**: 181–7.
- 130 Lindberg A, Robinson NE, Nasman-Glaser B *et al.* Assessment of leukotriene B4 production in leukocytes from horses with recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.* 2004; **65**: 289–95.
- 131 Nevalainen M, Raulo SM, Brazil TJ *et al.* Inhalation of organic dusts and lipopolysaccharide increases gelatinolytic matrix metalloproteinases (MMPs) in the lungs of heaves horses. *Equine Vet. J.* 2002; **34**: 150–5.
- 132 Franchini M, Gill U, von Fellenberg R *et al.* Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay. *Am. J. Vet. Res.* 2000; **61**: 1369–74.
- 133 Art T, Kirschvink N, Smith N *et al.* Indices of oxidative stress in blood and pulmonary epithelium lining fluid in horses

- suffering from recurrent airway obstruction. *Equine Vet. J.* 1999; **31**: 397–401.
- 134 Deaton CM, Marlin DJ, Smith NC *et al.* Breath condensate hydrogen peroxide correlates with both airway cytology and epithelial lining fluid ascorbic acid concentration in the horse. *Free Radic. Res.* 2004; **38**: 201–8.
- 135 Deaton CM, Marlin DJ, Smith NC *et al.* Pulmonary epithelial lining fluid and plasma ascorbic acid concentrations in horses affected by recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.* 2004; **65**: 80–7.
- 136 Lavoie-Lamoureux A, Moran K, Beauchamp G *et al.* IL-4 activates equine neutrophils and induces a mixed inflammatory cytokine expression profile with enhanced neutrophil chemotactic mediator release *ex vivo*. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2010; **299**: L472–82.
- 137 Huang H, Lavoie-Lamoureux A, Moran K *et al.* IL-4 stimulates the expression of CXCL-8, E-selectin, VEGF, and inducible nitric oxide synthase mRNA by equine pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2007; **292**: L1147–54.
- 138 Joubert P, Cordeau ME, Lavoie JP. Cytokine mRNA expression of pulmonary macrophages varies with challenge but not with disease state in horses with heaves or in controls. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2011; **142**: 236–42.
- 139 Laan TT, Bull S, Pirie RS *et al.* Evaluation of cytokine production by equine alveolar macrophages exposed to lipopolysaccharide, *Aspergillus fumigatus*, and a suspension of hay dust. *Am. J. Vet. Res.* 2005; **66**: 1584–9.
- 140 Laan TT, Bull S, Pirie R *et al.* The role of alveolar macrophages in the pathogenesis of recurrent airway obstruction in horses. *J. Vet. Intern. Med.* 2006; **20**: 167–74.
- 141 Ainsworth DM, Wagner B, Erb HN *et al.* Effects of *in vitro* exposure to hay dust on expression of interleukin-17, -23, -8, and -1beta and chemokine (C-X-C motif) ligand 2 by pulmonary mononuclear cells isolated from horses chronically affected with recurrent airway disease. *Am. J. Vet. Res.* 2007; **68**: 1361–9.
- 142 Ainsworth DM, Matychak M, Reyner CL *et al.* Effects of *in vitro* exposure to hay dust on the gene expression of chemokines and cell-surface receptors in primary bronchial epithelial cell cultures established from horses with chronic recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.* 2009; **70**: 365–72.
- 143 Berndt A, Derksen FJ, Venta PJ *et al.* Elevated amount of Toll-like receptor 4 mRNA in bronchial epithelial cells is associated with airway inflammation in horses with recurrent airway obstruction. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2007; **292**: L936–43.
- 144 Jagels MA, Daffern PJ, Zuraw BL *et al.* Mechanisms and regulation of polymorphonuclear leukocyte and eosinophil adherence to human airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1999; **21**: 418–27.
- 145 Marr KA, Foster AP, Lees P *et al.* Effect of antigen challenge on the activation of peripheral blood neutrophils from horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Res. Vet. Sci.* 1997; **62**: 253–60.
- 146 Marr KA, Lees P, Cunningham FM. Antigen challenge increases adherence of circulating neutrophils in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Equine Vet. J.* 2002; **34**: 65–70.
- 147 Olszewski MA, Robinson NE, Zhu FX *et al.* Mediators of anaphylaxis but not activated neutrophils augment cholinergic responses of equine small airways. *Am. J. Physiol.* 1999; **276**: L522–9.
- 148 Rickards KJ, Page CP, Cunningham FM. Allergen challenge alters lymphocyte phosphodiesterase activity in horses with heaves. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2004; **17**: 163–72.
- 149 Ablett JM, Fairbairn SM, Page CP *et al.* Influence of antigen challenge on platelet responsiveness in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Equine Vet. J.* 1997; **29**: 382–6.
- 150 Costa LR, Eades SC, Venugopal CS *et al.* Plasma and pulmonary fluid endothelin in horses with seasonal recurrent airway obstruction. *J. Vet. Intern. Med.* 2009; **23**: 1239–46.
- 151 Gray PR, Derksen FJ, Robinson NE *et al.* The role of cyclooxygenase products in the acute airway obstruction and airway hyperreactivity of ponies with heaves. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989; **140**: 154–60.
- 152 Kirschvink N, Smith N, Fievez L *et al.* Effect of chronic airway inflammation and exercise on pulmonary and systemic antioxidant status of healthy and heaves-affected horses. *Equine Vet. J.* 2002; **34**: 563–71.
- 153 Joubert P, Cordeau ME, Boyer A *et al.* Cytokine expression by peripheral blood neutrophils from heaves-affected horses before and after allergen challenge. *Vet. J.* 2008; **178**: 227–32.
- 154 Lavoie-Lamoureux A, Maghni K, Lavoie JP. Optimization of a procedure to accurately detect equine TNFalpha in serum samples. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010; **138**: 118–23.
- 155 Cortes M-L. Évaluation de l'hémostase chez les chevaux atteints de pousse Créteil: Université de Créteil. 2008.
- 156 Lavoie-Lamoureux A, Leclere M, Lemos KR *et al.* *Systemic inflammation is present in both remission and clinical exacerbation in an equine model of severe asthma.* American Thoracic Society (ATS), Denver, CO, 2011.
- 157 Jousilahti P, Salomaa V, Hakala K *et al.* The association of sensitive systemic inflammation markers with bronchial asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2002; **89**: 381–5.
- 158 Higashimoto Y, Yamagata Y, Taya S *et al.* Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and asthma: similarities and differences. *Respirology* 2008; **13**: 128–33.
- 159 Barnes PJ. Cytokine-directed therapies for the treatment of chronic airway diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; **14**: 511–22.
- 160 Koh YY, Kim YW, Park JD *et al.* A comparison of serum haptoglobin levels between acute exacerbation and clinical remission in asthma. *Clin. Exp. Allergy* 1996; **26**: 1202–9.
- 161 Nadeem A, Chhabra SK, Masood A *et al.* Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; **111**: 72–8.
- 162 Wu TL, Chang PY, Tsao KC *et al.* A panel of multiple markers associated with chronic systemic inflammation and the risk of atrogenesis is detectable in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Lab. Anal.* 2007; **21**: 367–71.
- 163 Kalhan R, Tran BT, Colangelo LA *et al.* Systemic inflammation in young adults is associated with abnormal lung function in middle age. *PLoS ONE* 2010; **5**: e11431.
- 164 Kaup FJ, Drommer W, Damsch S *et al.* Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). II: pathomorphological changes of the terminal airways and the alveolar region. *Equine Vet. J.* 1990; **22**: 349–55.
- 165 Dixon PM. Respiratory mucociliary clearance in the horse in health and disease, and its pharmaceutical modification. *Vet. Rec.* 1992; **131**: 229–35.
- 166 Gerber V, Straub R, Marti E *et al.* Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Vet. J.* 2004; **36**: 576–82.
- 167 Robinson NE, Berney C, Eberhart S *et al.* Coughing, mucus accumulation, airway obstruction, and airway inflammation in control horses and horses affected with recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.* 2003; **64**: 550–7.
- 168 Gerber V, Lindberg A, Berney C *et al.* Airway mucus in recurrent airway obstruction—short-term response to environmental challenge. *J. Vet. Intern. Med.* 2004; **18**: 92–7.
- 169 Range F, Mundhenk L, Gruber AD. A soluble secreted glycoprotein (eCLCA1) is overexpressed due to goblet cell hyperplasia and metaplasia in horses with recurrent airway obstruction. *Vet. Pathol.* 2007; **44**: 901–11.
- 170 Costa LR, Seahorn TL, Moore RM *et al.* Correlation of clinical score, intrapleural pressure, cytologic findings of bronchoalveolar fluid, and histopathologic lesions of pulmonary tissue in horses with summer pasture-associated obstructive pulmonary disease. *Am. J. Vet. Res.* 2000; **61**: 167–73.



- 171 Jefcoat AM, Hotchkiss JA, Gerber V *et al.* Persistent mucin glycoprotein alterations in equine recurrent airway obstruction. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2001; **281**: L704–12.
- 172 Gerber V, King M, Schneider DA *et al.* Tracheobronchial mucus viscoelasticity during environmental challenge in horses with recurrent airway obstruction. *Equine Vet. J.* 2000; **32**: 411–17.
- 173 Shale DJ, Ionescu AA. Mucus hypersecretion: a common symptom, a common mechanism? *Eur. Respir. J.* 2004; **23**: 797–8.
- 174 Anton F, Leverkoehne I, Mundhenk L *et al.* Overexpression of eCLCA1 in small airways of horses with recurrent airway obstruction. *J. Histochem. Cytochem.* 2005; **53**: 1011–21.
- 175 Gerber V, Robinson NE, Venta RJ *et al.* Mucin genes in horse airways: MUC5AC, but not MUC2, may play a role in recurrent airway obstruction. *Equine Vet. J.* 2003; **35**: 252–7.
- 176 Ryhner T, Muller N, Balmer V *et al.* Increased mucus accumulation in horses chronically affected with recurrent airway obstruction is not associated with up-regulation of CLCA1, EGFR, MUC5AC, Bcl-2, IL-13 and INF-gamma expression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2008; **125**: 8–17.
- 177 Gerber V, De Feijter-Rupp H, Wagner J *et al.* Differential association of MUC5AC and CLCA1 expression in small cartilaginous airways of RAO-affected and control horses. *Equine Vet. J.* 2009; **41**: 817–23.
- 178 Oslund KL, Adamson G, Wu R. Evaluation of MUC5AC expression and upregulation in airway epithelial cells of horses. *Am. J. Vet. Res.* 2010; **71**: 690–6.
- 179 Bartner LR, Robinson NE, Kiupel M *et al.* Persistent mucus accumulation: a consequence of delayed bronchial mucous cell apoptosis in RAO-affected horses? *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2006; **291**: L602–9.
- 180 Abraham G, Kottke C, Ungemach FR. Equine recurrent airway obstruction does not alter airway muscarinic acetylcholine receptor expression and subtype distribution. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2007; **30**: 401–9.
- 181 Broadstone RV, LeBlanc PH, Derksen FJ *et al.* In vitro responses of airway smooth muscle from horses with recurrent airway obstruction. *Pulm. Pharmacol.* 1991; **4**: 191–202.
- 182 LeBlanc PH, Broadstone RV, Derksen FJ *et al.* In vitro responses of distal airways in horses with recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.* 1991; **52**: 999–1003.
- 183 Yu MF, Wang ZW, Robinson NE *et al.* Modulation of bronchial smooth muscle function in horses with heaves. *J. Appl. Physiol.* 1994; **77**: 2149–54.
- 184 Coulson FR, Fryer AD. Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacol. Ther.* 2003; **98**: 59–69.
- 185 Fryer AD, Jacoby DB. Muscarinic receptors and control of airway smooth muscle. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; **158**: S154–60.
- 186 Zhang XY, Robinson NE, Zhu FX. Modulation of ACh release from airway cholinergic nerves in horses with recurrent airway obstruction. *Am. J. Physiol.* 1999; **276**: L769–75.
- 187 Abraham G, Kottke C, Dhein S *et al.* Agonist-independent alteration in beta-adrenoceptor-G-protein-adenylate cyclase system in an equine model of recurrent airway obstruction. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2006; **19**: 218–29.
- 188 Venugopal CS, Holmes EP, Polikepahad S *et al.* Neurokinin receptors in recurrent airway obstruction: a comparative study of affected and unaffected horses. *Can. J. Vet. Res.* 2009; **73**: 25–33.
- 189 Rosas-Ballina M, Tracey KJ. Cholinergic control of inflammation. *J. Intern. Med.* 2009; **265**: 663–79.
- 190 Huang H, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP. Cholinergic stimulation attenuates the IL-4 induced expression of E-selectin and vascular endothelial growth factor by equine pulmonary artery endothelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009; **132**: 116–21.
- 191 Lavoie JP, Leguillette R, Pasloske K *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**: 579–85.
- 192 Thurlbeck WM, Lowell FC. Heaves in horses. *Am. J. Respir. Dis.* 1964; **89**: 82–8.
- 193 Winder NC, von Fellenberg R. Chronic small airway disease in horses slaughtered in Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 1987; **129**: 585–93.
- 194 Katavolos P, Ackerley CA, Viel L *et al.* Clara cell secretory protein is reduced in equine recurrent airway obstruction. *Vet. Pathol.* 2009; **46**: 604–13.
- 195 Gerber H. Chronic pulmonary disease in the horse. *Equine Vet. J.* 1973; **5**: 26–33.
- 196 Naylor JM, Clark EG, Clayton HM. Chronic obstructive pulmonary disease: usefulness of clinical signs, bronchoalveolar lavage, and lung biopsy as diagnostic and prognostic aids. *Can. Vet. J.* 1992; **33**: 591–8.
- 197 Kaup FJ, Drommer W, Deegen E. Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). I: alterations of the larger conducting airways. *Equine Vet. J.* 1990; **22**: 343–8.
- 198 Lugo J, Harkema JR, deFeijter-Rupp H *et al.* Airway inflammation is associated with mucous cell metaplasia and increased intraepithelial stored mucosubstances in horses. *Vet. J.* 2006; **172**: 293–301.
- 199 Herszberg B, Ramos-Barbon D, Tamaoka M *et al.* Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; **118**: 382–8.
- 200 Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Martin J *et al.* Inhaled corticosteroids accelerate the reversal of airway smooth muscle remodeling in an equine model of chronic asthma. *American Thoracic Society International Conference*, New Orleans, 2010; A2302.
- 201 McPherson EA, Lawson GH. Some aspects of chronic pulmonary diseases of horses and methods used in their investigation. *Equine Vet. J.* 1974; **6**: 1–6.
- 202 Cook WR. Chronic bronchitis and alveolar emphysema in the horse. *Vet. Rec.* 1976; **99**: 448–51.
- 203 Lanctot-Setlakwe E, Leclère M, Lavoie J. *Sub-Epithelial Fibrosis is Present in the Peripheral Airways of Heaves-Affected Horses, an Equine Model for Asthma*. American Thoracic Society (ATS), San Diego, CA, 2009.
- 204 Furness MC, Bienzle D, Caswell JL *et al.* Immunohistochemical identification of collagen in the equine lung. *Vet. Pathol.* 2010; **47**: 982–90.
- 205 National Heart, Lung, and Blood Institute. *National Asthma Education and Prevention Program Expert Panel Report 3: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma*. National Institutes of Health, Bethesda, MD, 2007.
- 206 Couetil LL, Chilcoat CD, DeNicola DB *et al.* Randomized, controlled study of inhaled fluticasone propionate, oral administration of prednisone, and environmental management of horses with recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.* 2005; **66**: 1665–74.
- 207 Dixon PM, Railton DI, McGorum BC *et al.* Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 4: treatments and re-examination findings. *Equine Vet. J.* 1995; **27**: 436–9.
- 208 DeLuca L, Erb HN, Young JC *et al.* The effect of adding oral dexamethasone to feed alterations on the airway cell inflammatory gene expression in stabled horses affected with recurrent airway obstruction. *J. Vet. Intern. Med.* 2008; **22**: 427–35.
- 209 Thomson JR, McPherson EA. Effects of environmental control on pulmonary function of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. *Equine Vet. J.* 1984; **16**: 35–8.
- 210 Beadle RE. Summer pasture-associated obstructive pulmonary disease. In: Robinson NE (ed.) *Current Therapy in Equine Medicine*. WB Saunders Co, Philadelphia, PA, 1983; 512–16.
- 211 Gerber V, Schott Ii HC, Robinson NE. Owner assessment in judging the efficacy of airway disease treatment. *Equine Vet. J.* 2011; **43**: 153–8.

- 212 Williamson KK, Davis MS. Evidence-based respiratory medicine in horses. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 2007; **23**: 215–27.
- 213 Cornelisse CJ, Robinson NE, Berney CE *et al.* Efficacy of oral and intravenous dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction. *Equine Vet. J.* 2004; **36**: 426–30.
- 214 Leclere M, Lefebvre-Lavoie J, Beauchamp G *et al.* Efficacy of oral prednisolone and dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction in the presence of continuous antigen exposure. *Equine Vet. J.* 2010; **42**: 316–21.
- 215 Rush BR, Raub ES, Rhoads WS *et al.* Pulmonary function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *Am. J. Vet. Res.* 1998; **59**: 1039–43.
- 216 Rush BR, Flaminio MJ, Matson CJ *et al.* 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**: 1033–8.
- 217 Lavoie JP, Pasloske K, Joubert P *et al.* Lack of clinical efficacy of a phosphodiesterase-4 inhibitor for treatment of heaves in horses. *J. Vet. Intern. Med.* 2006; **20**: 175–81.
- 218 Couetil LL, Art T, de Moffarts B *et al.* Effect of beclomethasone dipropionate and dexamethasone isonicotinate on lung function, bronchoalveolar lavage fluid cytology, and transcription factor expression in airways of horses with recurrent airway obstruction. *J. Vet. Intern. Med.* 2006; **20**: 399–406.
- 219 Lecoq L, Vincent P, Lavoie-Lamoureux A *et al.* Genomic and non-genomic effects of dexamethasone on equine peripheral blood neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009; **128**: 126–31.
- 220 Lakser OJ, Dowell ML, Hoyte FL *et al.* Steroids augment relengthening of contracted airway smooth muscle: potential additional mechanism of benefit in asthma. *Eur. Respir. J.* 2008; **32**: 1224–30.
- 221 Dauvillier J, Felipe MJ, Lunn DP *et al.* Effect of long-term fluticasone treatment on immune function in horses with heaves. *J. Vet. Intern. Med.* 2011; **25**: 549–57.
- 222 Burguez PN, Ousey J, Cash RS *et al.* Changes in blood neutrophil and lymphocyte counts following administration of cortisol to horses and foals. *Equine Vet. J.* 1983; **15**: 58–60.
- 223 Targowski SP. Effect of prednisolone on the leukocyte counts of ponies and on the reactivity of lymphocytes in vitro and in vivo. *Infect. Immun.* 1975; **11**: 252–6.
- 224 Flaminio MJBF, Tallmadge RL, Secor E *et al.* The effect of glucocorticoid therapy in the immune system of the horse. Proceedings and abstracts of the 8th International Veterinary Immunology Symposium, August 15–19, 2007, Ouro Preto, Brazil. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009; **128**: 1–347.
- 225 Slack J, Risdahl JM, Valberg SJ *et al.* Effects of dexamethasone on development of immunoglobulin G subclass responses following vaccination of horses. *Am. J. Vet. Res.* 2000; **61**: 1530–3.
- 226 Bertin FR, Ivester KM, Couetil LL. Comparative efficacy of inhaled albuterol between two hand-held delivery devices in horses with recurrent airway obstruction. *Equine Vet. J.* 2011; **43**: 393–8.
- 227 Camargo FC, Robinson NE, Berney C *et al.* Trimetoquinol: bronchodilator effects in horses with heaves following aerosolised and oral administration. *Equine Vet. J.* 2007; **39**: 215–20.
- 228 Matera MG, Calzetta L, Rogliani P *et al.* Evaluation of the effects of the R- and S-enantiomers of salbutamol on equine isolated bronchi. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2011; **24**: 221–6.
- 229 Perrin-Fayolle M, Blum PS, Morley J *et al.* Differential responses of asthmatic airways to enantiomers of albuterol. Implications for clinical treatment of asthma. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 1996; **14**: 139–47.
- 230 Wilkinson M, Bulloch B, Garcia-Filion P *et al.* Efficacy of racemic albuterol versus levalbuterol used as a continuous nebulization for the treatment of acute asthma exacerbations: a randomized, double-blind, clinical trial. *J. Asthma* 2011; **48**: 188–93.
- 231 Erichsen DF, Aviad AD, Schultz RH *et al.* Clinical efficacy and safety of clenbuterol HCl when administered to effect in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Equine Vet. J.* 1994; **26**: 331–6.
- 232 Derksen FJ, Scott JS, Slocombe RF *et al.* Effect of clenbuterol on histamine-induced airway obstruction in ponies. *Am. J. Vet. Res.* 1987; **48**: 423–6.
- 233 Kiely RG, Jenkins WL. The effect of clenbuterol chloride on the mucociliary transport rate in horses with a clinical diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Proceedings of the American College of Veterinary Internal Medicine, San Diego, Calif, USA, 1985; 146.
- 234 Laan TT, Bull S, Pirie RS *et al.* The anti-inflammatory effects of IV administered clenbuterol in horses with recurrent airway obstruction. *Vet. J.* 2006; **171**: 429–37.
- 235 van den Hoven R, Duvigneau JC, Hartl RT *et al.* Clenbuterol affects the expression of messenger RNA for interleukin 10 in peripheral leukocytes from horses challenged intrabronchially with lipopolysaccharides. *Vet. Res. Commun.* 2006; **30**: 921–8.
- 236 Abraham G, Brodde OE, Ungemach FR. Regulation of equine lymphocyte beta-adrenoceptors under the influence of clenbuterol and dexamethasone. *Equine Vet. J.* 2002; **34**: 587–93.
- 237 Duvivier DH, Bayly WM, Votion D *et al.* Effects of inhaled dry powder ipratropium bromide on recovery from exercise of horses with COPD. *Equine Vet. J.* 1999; **31**: 20–4.
- 238 Ducharme NG, Fubini SL. Gastrointestinal complications associated with the use of atropine in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1983; **182**: 229–31.
- 239 Pearson EG, Riebold TW. Comparison of bronchodilators in alleviating clinical signs in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1989; **194**: 1287–91.
- 240 McKiernan BC, Koritz GD. Plasma theophylline concentration and lung function in ponies with recurrent obstructive lung disease. *Equine Vet. J.* 1990; **22**: 194–7.
- 241 Cesarini C, Hamilton E, Picandet V *et al.* Theophylline does not potentiate the effects of a low dose of dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction. *Equine Vet. J.* 2006; **38**: 570–3.
- 242 Leguillette R, Desevaux C, Lavoie JP. Effects of pentoxifylline on pulmonary function and results of cytologic examination of bronchoalveolar lavage fluid in horses with recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.* 2002; **63**: 459–63.
- 243 Thomson JR, McPherson EA. Chronic obstructive pulmonary disease in the horse. 2: therapy. *Equine Vet. J.* 1983; **15**: 207–10.
- 244 Barnes PJ. Theophylline: new perspectives for an old drug. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; **167**: 813–18.
- 245 Barton AK, Niedorf F, Gruber AD *et al.* Pharmacological studies of bronchial constriction inhibited by parasympatholytics and cilomilast using equine precision-cut lung slices. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 2010; **123**: 229–35.
- 246 Olszewski MA, Zhang XY, Robinson NE. Pre- and postjunctional effects of inflammatory mediators in horse airways. *Am. J. Physiol.* 1999; **277**: L327–L33.
- 247 Marr KA, Lees P, Page CP *et al.* Inhaled leukotrienes cause bronchoconstriction and neutrophil accumulation in horses. *Res. Vet. Sci.* 1998; **64**: 219–24.
- 248 Robinson NE, Boehler D, Berney C *et al.* Failure of a FLAP antagonist to prevent airway obstruction in heaves-susceptible horses. *World Equine Airway Symposium*, Guelph, Ontario, Canada, 1998; 31.
- 249 Kolm G, Zappe H, Schmid R *et al.* Efficacy of montelukast in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease in five horses. *Vet. Rec.* 2003; **152**: 804–6.
- 250 Thomson JR, McPherson EA. Prophylactic effects of sodium cromoglycate on chronic obstructive pulmonary disease in the horse. *Equine Vet. J.* 1981; **13**: 243–6.
- 251 Soma LR, Beech J, Gerber NH. Effects of cromolyn in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Vet. Sci. Commun.* 1987; **11**: 339–51.

- 252 Lavoie JP, Thompson D, Hamilton E *et al.* Effects of a MAPK p38 inhibitor on lung function and airway inflammation in equine recurrent airway obstruction. *Equine Vet. J.* 2008; **40**: 577–83.
- 253 Eckert RE, Sharief Y, Jones SL. p38 mitogen-activated kinase (MAPK) is essential for equine neutrophil migration. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009; **129**: 181–91.
- 254 Reinero CR. Advances in the understanding of pathogenesis, and diagnostics and therapeutics for feline allergic asthma. *Vet. J.* 2010; doi: S1090-0233(10)00313-8 [pii] 10.1016/j.tvjl.2010.09.022.
- 255 Leemans J, Kirschvink N, Clercx C *et al.* Effect of short-term oral and inhaled corticosteroids on airway inflammation and responsiveness in a feline acute asthma model. *Vet. J.* 2011; doi: S1090-0233(11)00039-6 [pii] 10.1016/j.tvjl.2011.01.020 (Epub ahead of print).
- 256 Kirschvink N, Reinhold P. Use of alternative animals as asthma models. *Curr. Drug Targets* 2008; **9**: 470–84.
- 257 Bice DE, Seagrave J, Green FH. Animal models of asthma: potential usefulness for studying health effects of inhaled particles. *Inhal. Toxicol.* 2000; **12**: 829–62.
- 258 McLaughlin RF Jr. Bronchial artery distribution in various mammals and in humans. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1983; **128**: S57–8.
- 259 Magno M. Comparative anatomy of the tracheobronchial circulation. *Eur. Respir. J. Suppl.* 1990; **12**: 557s–62s. Discussion 62s–63s.
- 260 McLaughlin RF, Tyler WS, Canada RO. Subgross pulmonary anatomy in various mammals and man. *JAMA* 1961; **175**: 694–7.
- 261 Robinson NE. How horses breathe: the respiratory muscles and the airways. In: McGorum BC, Dixon PM, Robinson NE *et al.* (eds) *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, 2007; 19–31.
- 262 Miller HR, Pemberton AD. Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut. *Immunology* 2002; **105**: 375–90.
- 263 Derksen FJ, Olszewski M, Robinson NE *et al.* Use of a handheld, metered-dose aerosol delivery device to administer pirbuterol acetate to horses with 'heaves'. *Equine Vet. J.* 1996; **28**: 306–10.
- 264 Jean D, Vrins A, Lavoie JP. Monthly, daily, and circadian variations of measurements of pulmonary mechanics in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Vet. Res.* 1999; **60**: 1341–6.
- 265 Ammann VJ, Vrins AA, Lavoie JP. Effects of inhaled beclomethasone dipropionate on respiratory function in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Equine Vet. J.* 1998; **30**: 152–7.
- 266 Relave F, David F, Leclere M *et al.* Evaluation of a thoracoscopic technique using ligating loops to obtain large lung biopsies in standing healthy and heaves-affected horses. *Vet. Surg.* 2008; **37**: 232–40.
- 267 Relave F, David F, Leclere M *et al.* Thoracoscopic lung biopsies in heaves-affected horses using a bipolar tissue sealing system. *Vet. Surg.* 2010; **39**: 839–46.
- 268 Lugo J, Stick JA, Peroni J *et al.* Safety and efficacy of a technique for thoracoscopically guided pulmonary wedge resection in horses. *Am. J. Vet. Res.* 2002; **63**: 1232–40.
- 269 Laumen E, Doherr MG, Gerber V. Relationship of horse owner assessed respiratory signs index to characteristics of recurrent airway obstruction in two Warmblood families. *Equine Vet. J.* 2010; **42**: 142–8.
- 270 Wasko AJ, Barkema HW, Nicol J *et al.* Evaluation of a risk-screening questionnaire to detect equine lung inflammation: results of a large field study. *Equine Vet. J.* 2011; **43**: 145–52.
- 271 Martin RJ, Cicutto LC, Smith HR *et al.* Airways inflammation in nocturnal asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; **143**: 351–7.
- 272 Metzger WJ, Zavala D, Richerson HB *et al.* Local allergen challenge and bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic lungs. Description of the model and local airway inflammation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987; **135**: 433–40.
- 273 Amin K, Ludviksdottir D, Janson C *et al.* Inflammation and structural changes in the airways of patients with atopic and nonatopic asthma. BHR Group. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; **162**: 2295–301.
- 274 Asman B, Strand V, Bylin G *et al.* Peripheral neutrophils after allergic asthmatic reactions. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 1997; **27**: 185–8.
- 275 Sur S, Crotty TB, Kephart GM *et al.* Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993; **148**: 713–19.
- 276 Lamblin C, Gosset P, Tillie-Leblond I *et al.* Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; **157**: 394–402.
- 277 Norzila MZ, Fakes K, Henry RL *et al.* Interleukin-8 secretion and neutrophil recruitment accompanies induced sputum eosinophil activation in children with acute asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; **161**: 769–74.
- 278 Turner MO, Hussack P, Sears MR *et al.* Exacerbations of asthma without sputum eosinophilia. *Thorax* 1995; **50**: 1057–61.
- 279 Fahy JV, Kim KW, Liu J *et al.* Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995; **95**: 843–52.
- 280 Abdulmir AS, Hafidh RR, Abubakar F *et al.* Changing survival, memory cell compartment, and T-helper balance of lymphocytes between severe and mild asthma. *BMC Immunol.* 2008; **9**: 73.
- 281 Quintana AM, Landolt GA, Annis KM *et al.* Immunological characterization of the equine airway epithelium and of a primary equine airway epithelial cell culture model. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2011; **140**: 226–36.
- 282 Gerber V, Baleri D, Klukowska-Rotzler J *et al.* Mixed inheritance of equine recurrent airway obstruction. *J. Vet. Intern. Med.* 2009; **23**: 626–30.
- 283 Klukowska-Rotzler J, Marti E, Bugno M *et al.* Molecular cloning and characterization of equine thymic stromal lymphopoietin. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010; **136**: 346–9.
- 284 Wagner B, Hillegas JM, Brinker DR *et al.* Characterization of monoclonal antibodies to equine interleukin-10 and detection of T regulatory 1 cells in horses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2008; **122**: 57–64.
- 285 Mauel S, Steinbach F, Ludwig H. Monocyte-derived dendritic cells from horses differ from dendritic cells of humans and mice. *Immunology* 2006; **117**: 463–73.
- 286 Flaminio MJ, Borges AS, Nydam DV *et al.* The effect of CpG-ODN on antigen presenting cells of the foal. *J. Immune Based Ther. Vaccines* 2007; **5**: 1.
- 287 Couetil LL, Art T, de Moffarts B *et al.* DNA binding activity of transcription factors in bronchial cells of horses with recurrent airway obstruction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006; **113**: 11–20.
- 288 Christmann U, Hite RD, Tan RH *et al.* Surfactant alterations in horses with recurrent airway obstruction at various clinical stages. *Am. J. Vet. Res.* 2010; **71**: 468–75.
- 289 Brooks AC, Rickards KJ, Cunningham FM. CXCL8 attenuates chemoattractant-induced equine neutrophil migration. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2011; **139**: 141–7.
- 290 Hirsch G, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie J-P. Comparison of blood neutrophils and mononuclear cells induced steroid responsiveness. *American Thoracic Society International Conference*, Denver, CO, 2011.

**Article #6*****Effect of Long-Term Fluticasone Treatment on Immune Function in Horses with Heaves***

Dauvillier J, Felipe MJ, Lunn DP, **Lavoie-Lamoureux A.** Leclere, M.  
Beauchamp, G. et Lavoie, J. P.

**Contributions originales**

*J'ai participé à cet article en réalisant des expériences de culture cellulaire et de quantification de l'expression des gènes. J'ai effectué l'analyse statistique des résultats et participé à la rédaction de l'article.*

Publié dans le J Vet Intern Med 2011. **25**(3): p. 549-57.



## Effect of Long-Term Fluticasone Treatment on Immune Function in Horses with Heaves

J. Dauvillier, M.J.B. Felipe, D.P. Lunn, A. Lavoie-Lamoureux, M. Leclère, G. Beauchamp, and J.-P. Lavoie

**Background:** Corticosteroids currently are the most effective pharmacological treatment available to control heaves in horses. Systemically administered corticosteroids have been shown to alter immune response in horses, humans, and other species. Aerosolized administration theoretically minimizes systemic adverse effects, but the effect of inhaled corticosteroids on immune function has not been evaluated in horses.

**Objectives:** To evaluate the effects of prolonged administration of inhaled fluticasone on the immune system of heaves-affected horses.

**Animals:** Heaves-affected horses were treated with inhaled fluticasone (n = 5) for 11 months or received environmental modifications only (n = 5).

**Methods:** Prospective analysis. Clinical parameters and CBC, lymphocyte subpopulations and function, and circulating neutrophil gene expression were sequentially measured. Primary and anamnestic immune responses also were evaluated by measuring antigen-specific antibodies in response to vaccination with bovine viral antigen and tetanus toxoid, respectively.

**Results:** No clinical adverse effects were observed and no differences in immune function were detected between treated and untreated horses.

**Conclusions and Clinical Importance:** The treatment of heaves-affected horses with inhaled fluticasone at therapeutic dosages for 11 months has no significant detectable effect on innate and adaptive (both humoral and cell-mediated) immune parameters studied. These results suggest that prolonged administration of fluticasone would not compromise the systemic immune response to pathogens nor vaccination in adult horses.

**Key words:** Aerosolized; Horse; Inhaled corticosteroids; Recurrent airway obstruction.

Heaves or recurrent airway obstruction is a common disease of horses stabled for extended periods. Susceptible horses develop lower airway obstruction and neutrophilic airway inflammation with inhalation of dust present in hay and bedding.<sup>1</sup> Corticosteroids currently are the most effective pharmacological treatment available for the condition. However, systemic administration of corticosteroids to horses has been associated with several adverse effects, including adrenocortical suppression<sup>2,3</sup> and dysfunction,<sup>4</sup> laminitis,<sup>5,6</sup> hepatopathy,<sup>6,7</sup> muscle wasting,<sup>7</sup> altered bone metabolism,<sup>8</sup> and increased susceptibility to infection.<sup>9-11</sup> Systemic corticosteroids also have been shown to affect the equine immune system by inducing transient peripheral neutrophilia and lymphopenia,<sup>12,13</sup> changes in lymphocyte subpopulations and expression of activation markers,<sup>14</sup> as well as by decreasing the antibody response to vaccination.<sup>15</sup>

Inhaled corticosteroids now are commonly used for the treatment of heaves in horses.<sup>16-20</sup> This approach

*From the Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada (Dauvillier, Lavoie-Lamoureux, Leclère, Beauchamp, Lavoie); College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, NY (Felipe); and the College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Colorado State University, Fort Collins, CO (Lunn). An abstract of this work was presented at the 27th Annual ACVIM Forum in Montreal, QC, Canada, June 2009.*

*Corresponding author: Jean-Pierre Lavoie, Département des Sciences Cliniques, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe J2S 7C6, QC, Canada; e-mail: [REDACTED]*

*Submitted September 23, 2010; Revised February 9, 2011; Accepted February 24, 2011.*

*Copyright © 2011 by the American College of Veterinary Internal Medicine*

*10.1111/j.1939-1676.2011.0717.x*

### Abbreviations:

CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CFSE	carboxyl-fluorescein diacetate, succinimidyl ester
ConA	concanavalin A
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
FACS	fluorescent-activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
GC	glucocorticoides
IgG	immunoglobulin G
IL-8	interleukin-8
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen-1
LPS	lipopolysaccharide
MHC II	major histocompatibility complex class II
PWM	pokeweed mitogen
qRT-PCR	quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor-alpha

aims at achieving maximal concentrations of drug within the airways, while minimizing systemic adverse effects. In people, in whom inhaled corticosteroids are the first-line therapy for treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), prolonged administration of corticosteroids has been associated with adverse effects including reduction in bone density, cataracts, glaucoma, skin bruising,<sup>21</sup> and modulation of cellular immunity at high doses.<sup>22</sup> They also have been shown to induce a dose-dependent suppression of endogenous cortisol in horses<sup>2,23-25</sup> suggesting that systemic effects may occur in this species. Thus, the objective of this study was



to investigate the effects of long-term treatment of heaves-affected horses with inhaled fluticasone on innate and acquired (humoral and cell mediated) immune responses.

## Materials and Methods

### Animals

Ten heaves-affected mixed breed horses (6 mares and 4 geldings) aged 13–23 years (mean  $\pm$  SD, 17.9  $\pm$  2.9 years) weighing 410–535 kg (475  $\pm$  38 kg) were used in this study. Horses were diagnosed with heaves on the basis of history, characteristic clinical presentation and worsening of clinical signs, pulmonary function, and bronchoalveolar lavage cytology after exposure to hay. All horses belonged to the research herd from the Respiratory Cellular and Molecular Biology Laboratory of the Université de Montréal, and were part of a larger study evaluating the reversibility of pulmonary remodeling. They were dewormed routinely and vaccinated annually (tetanus, West Nile, Eastern and Western equine encephalitis, equine herpes virus 1/4, influenza, and rabies vaccines). Horses were managed as a closed herd except for a few days in month 6 when they were hospitalized for thoracoscopy. Physical examination, CBC, and blood biochemistry profiles were performed before the study to exclude concomitant medical disorders. All experimental procedures were performed in accordance with the Canadian Council of Animal Care and approved by the University of Montréal Animal Care Committee.

### Experimental Protocol

Before initiation of the study, all horses were stabled and fed hay for 1–3 months to induce clinical exacerbation of respiratory dis-

ease. They then were assigned to 2 groups with similar severity of airway obstruction based on results of lung function tests (maximal variation in transpulmonary pressure [ $\Delta$ PL], 44  $\pm$  10 cmH<sub>2</sub>O in untreated group; 43  $\pm$  10 cmH<sub>2</sub>O in fluticasone group). The 2 groups also were similar in terms of mean age and sex distribution. After a stabling period necessary to document the bronchoconstriction, horses in the untreated control group (n = 5, age, 17.4  $\pm$  3.6 years; 3 mares, 2 geldings) were kept outside on pasture for the duration of the study and received no medications. They received a complete pelleted feed twice a day to maintain body condition (no hay) and had free access to grass in the summer. Horses in the fluticasone group (n = 5, age, 18.4  $\pm$  2.2 years; 3 mares, 2 geldings) remained stabled and were fed hay for the first 5 months of the study, and then were kept on pasture with the untreated horses (under the same conditions) for the remaining 6 months of the study. They were administered inhaled fluticasone propionate<sup>a</sup> from a metered-dose inhaler via a commercially available mask,<sup>b</sup> at a starting dose of 2,000  $\mu$ g twice a day. The dose then was adjusted as needed to keep the horses asymptomatic (from 2,000  $\mu$ g q24h to 3,000  $\mu$ g q12h), but, from the 6th month of study until the end, all horses in the fluticasone group received inhaled fluticasone at 2,000  $\mu$ g once a day, between 7:00 and 9:00 AM. While stabled, horses were turned out in a paddock 2–4 hours each day. The study was initiated in the springtime and finished in winter of the following year.

The timeline of the study is outlined in Figure 1. Horses were observed daily during the whole study. Blood samples for CBC were collected in ethylenediaminetetraacetic acid tubes, cell counts were performed with an automated analysis system,<sup>c</sup> and blood smears were reviewed by a clinical pathologist. Heparinized blood samples were processed within an hour for gene expression analysis and kept on ice overnight for lymphocyte phenotyping and proliferation assays. Vaccination was done with a tetanus toxoid<sup>d</sup> and the infectious

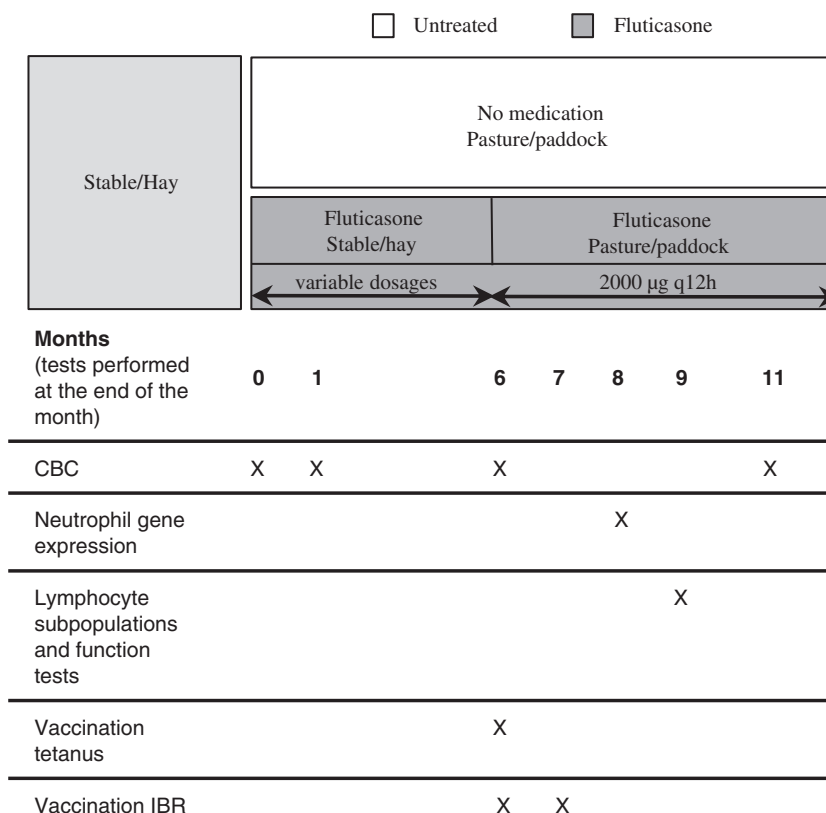


Fig 1. Study time line.

bovine rhinotracheitis (IBR) vaccine, which also contained bovine viral diarrhoea (type I and II), parainfluenza-3 and syncytial bovine virus antigens, combined with an appropriate adjuvant.<sup>c</sup> The experimental vaccination protocol was initiated 2 months after the horses received their last annual vaccine booster injection. Blood samples were collected before the 1st vaccine injection and then sequentially for 4 months. Serum was separated, aliquoted, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. All blood samplings were performed by jugular venipuncture in the morning (before fluticasone administration in the treated group). As part of the larger study evaluating the reversibility of pulmonary remodeling, lung biopsies were performed under thoracoscopic guidance 2 weeks before the beginning of the study, at approximately 6 months, and after the last CBC sampling at the completion of this study. Blood samples were collected either before or at least 1 month after the surgeries to prevent interference with the results.

### ***Lymphocyte Phenotyping, Activation State, and Proliferation Assays***

Peripheral blood mononuclear cells were isolated with Ficoll gradient centrifugation as described previously.<sup>26</sup> Isolated cells were analyzed by flow cytometry (fluorescent activated cell sorting [FACS]) for lymphocyte antigen markers (cluster of differentiation [CD]4 clone HB61A, CD8 clone HT14A, B cell clone cz2.1).<sup>27,28</sup> Cell expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules (clone cz11) and lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) (orCD11a/CD18, clone cz3.2) also were measured as markers of lymphocyte activation. The secondary stage used was fluorescein isothiocyanate-conjugated F(ab') fragment goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) (heavy + light chains) antibody. Samples were analyzed on a FACScalibur flow cytometer equipped with a 488  $\mu\text{m}$  argon laser by Cell Quest Analysis software. Leukocyte subpopulations were displayed in a dot plot and gated according to size based on forward light scatter, and according to granularity based on 90° side light scatter.<sup>29</sup> A region was placed around lymphocytes, and data were collected on 10,000 gated cells. Results indicate percent positive cells and mean fluorescence intensity in the lymphocyte-gated area.

For proliferation assays, lymphocytes were isolated by a combined carbonyl iron and Ficoll method, and labeled with carboxyl-fluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE) as described before.<sup>26</sup> Briefly, cells were resuspended in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) cell culture medium with 10% fetal calf serum (FCS), antibiotics/antimycotics and mercaptoethanol solution. In another set of experiments, medium was prepared with 10% autologous serum instead of FCS. Cell suspensions were incubated with or without addition of pokeweed mitogen (PWM) or concanavalin A (ConA). Cells were harvested at 96 hours and tested for CFSE fluorescence with flow cytometry (FL1). A decrease in CFSE mean fluorescence was considered proportional to the division of fluorescence dye to daughter cells at each cell division. Results were analyzed using the percentage of cells with lower fluorescence than the control nonstimulated cells.

### ***Gene Expression by Peripheral Blood Neutrophils***

**Neutrophil Isolation and Culture Conditions.** Peripheral blood neutrophils were isolated using immunomagnetic selection (magnetic-activated cell sorting) as reported previously.<sup>30</sup> Briefly, neutrophils were retrieved from the leukocyte-rich supernatant by sequential incubation with primary monoclonal antibody<sup>f</sup> and secondary rat anti-mouse IgM antibody conjugated to paramagnetic microbeads<sup>g</sup> before being loaded on a ferromagnetic LS separation column.<sup>g</sup> Cytospin slides were prepared<sup>h</sup> and stained with Protocol

Hema 3<sup>i</sup> for differential counting of  $>400$  cells to assess neutrophil purity. Viability was determined by trypan blue exclusion.

Purified neutrophils were suspended at  $5 \times 10^6$  cells/mL in culture medium RPMI 1640<sup>i</sup> supplemented with 10% heat inactivated low-endotoxin FCS,<sup>j</sup> 4 mM L-glutamine,<sup>j</sup> 100 U/mL penicillin, and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin.<sup>j</sup> The cells were incubated in 6-well suspension plates for 5 hours at  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  in the presence of 100 ng/mL lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* 0111:B<sup>k</sup> and 10 nM fMLP<sup>k</sup> to induce proinflammatory cytokine gene expression.<sup>30</sup> Unstimulated neutrophils were used as control (resting). At the end of incubation time,  $10^6$  cells per test were homogenized in TRIzol Reagent<sup>l</sup> and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until RNA extraction. Complementary DNA (cDNA) samples derived from LPS-stimulated neutrophils with or without dexamethasone ( $10^{-6}\text{M}$ )<sup>31</sup> were used to assess the expression of glucocorticoid (GC)-responsive genes (GC receptor and glutamine synthetase).

**Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR).** RNA extraction, reverse-transcription (500 ng total RNA), and real-time PCR were performed as described previously<sup>32</sup> with the Rotor-Gene Real-Time Centrifugal DNA Amplification System 3000.<sup>m</sup> Primers pairs were as follows (5'→3'): interleukin (IL)-8.S (sens) CTTTCTG CAGCTCTGTGTGAAG and IL-8.AS (anti-sens) GCAGACCT-CAGCTCCGTTGAC; tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).S CTTGTGCCTCAGCCTCTTCTCCTTC and TNF- $\alpha$ .AS TCTT GATGGCAGAGAGGAGGTTGAC; GC receptors (GCR).S TCATTAAGCTCCCCCTGGCAGAGAA and GCR.AS ATT-GAGAGTGAACGGCCTTGGAC; glutamine synthetase (glut. Synt.).S ACTGGATTCCACGAAACCTCCAAC and glut. synt.AS GCTGCAAGTCTAGTCCGCTTAGTT; Ubiquitin.S TAGCAGTTTCTTCGTGTCCGT and Ubiquitin.AS TGTAATCGGAAGAGTGCGG. GCR primers were designed to amplify the precursor (unspliced) transcript encoding both the  $\alpha$  and  $\beta$  GCR isoforms, which are both down-regulated by GC treatment.<sup>33</sup> All primers spanned exon-intron boundaries in order to prevent amplification of genomic DNA. Values were normalized using ubiquitin expression as reference gene.

### ***Dosage of Serum-Specific IgG***

Serum titers of tetanus toxoid antigen-specific IgG<sub>b</sub> were determined by use of ELISAs as described previously.<sup>34</sup> Serum titers of IBR antigen-specific IgG were determined with a commercial ELISA test kit designed for the detection of IBR antibodies in bovine serum,<sup>n</sup> in which a secondary anti-equine monoclonal antibody (CVS39<sup>28</sup>) was substituted to the anti-bovine 1 provided in the kit.

### ***Statistical Analysis***

By a repeated measures analysis of variance (ANOVA) and by a sequential Bonferroni's procedure to adjust comparison-wise  $\alpha$  levels, peripheral blood leukocytes, lymphocytes, neutrophils, eosinophils, basophils, and monocytes were compared at each time points between treated and nontreated horses, and within each group values at each time point were compared with values at baseline. A repeated measures ANOVA was used to analyze log 10 transformed anti-tetanus and anti-IBR IgG<sub>b</sub> titers. Analysis was done by SAS v. 9.2.<sup>o</sup>

Unpaired Student's *t* tests were used to compare proportions of CD4+ and CD8+ peripheral blood T cells, CD4+/CD8+ ratio, expression of LFA-1 and CMH II on lymphocytes and monocytes, and proliferation of lymphocytes after stimulation between the 2 groups at 9 months. Analysis was done by Statview v. 5.0.<sup>o</sup>

For gene expression by peripheral blood neutrophils, data were log 10 transformed to normalize distribution. One-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison posthoc tests were used to

assess the in vitro effect of dexamethasone on GC-sensitive genes in cDNA samples from stimulated neutrophils. Where gene expression by neutrophils isolated from fluticasone-treated and untreated horses was compared, 2-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's posthoc comparisons was used to evaluate the effect of fluticasone treatment and cell stimulation. Analysis was done by Graphpad Prism 5 software.<sup>P</sup>

## Results

### Horses

Inhaled fluticasone administration was well tolerated by all horses, and administration took approximately 4 minutes. Airway obstruction present at baseline was resolved for more than 2 months when immune function parameters were studied. During the 11 months of the study, 3 horses developed clinical disorders, 2 in the fluticasone group and 1 in the untreated group. Approximately 6 months after the beginning of the study, a fluticasone-treated gelding had a suspected episode of postthoracoscopy telogen effluvium diagnosed on the basis of clinical findings and histological examination of skin biopsies. Another treated horse developed a corneal ulcer believed to be traumatic, which resolved with topical antibiotic treatment. Finally, a horse in the untreated group developed a warm and painful swelling of the left front leg, associated with a moderate peripheral blood neutrophilia ( $12.5 \times 10^9/L$ ; reference range,  $5.5\text{--}12.5 \times 10^9/L$ ) and hyperfibrinogenemia ( $5\text{ g/L}$ ; reference range,  $1\text{--}4\text{ g/L}$ ) 5 months after the beginning of the study. The problem resolved with a 5-day course of penicillin and phenylbutazone. The latter episode began 2 weeks before the 6-month CBC and vaccination.

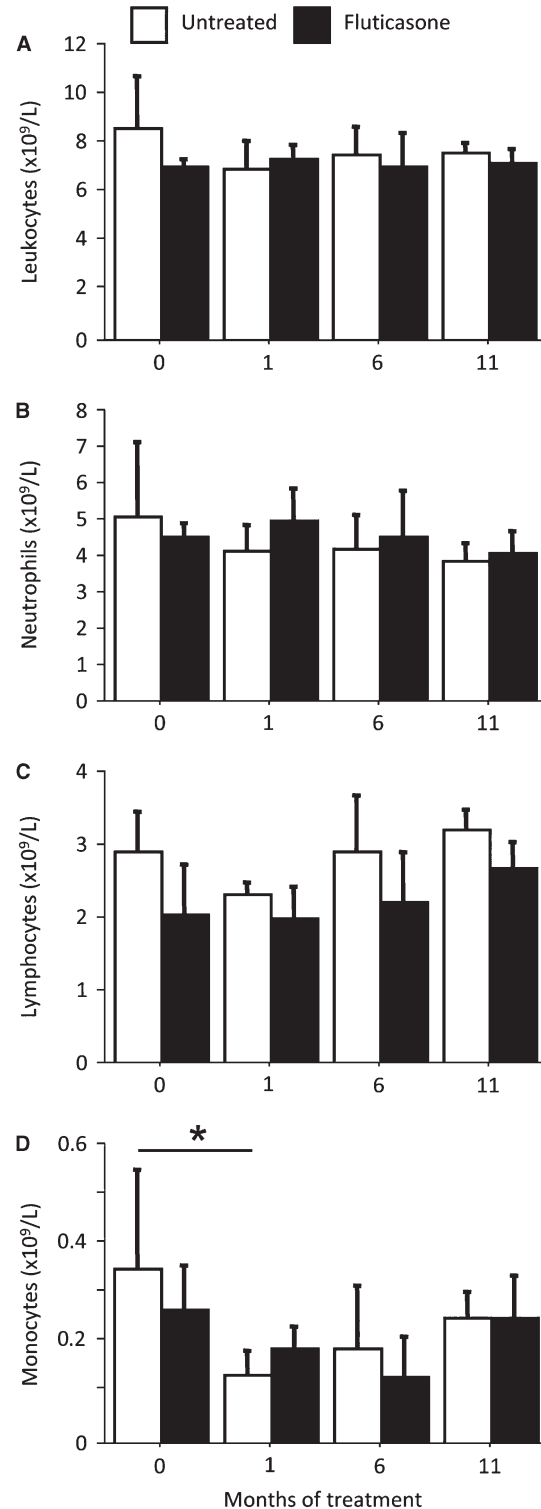
### Differential White Blood Cell Count

All values remained within reference ranges at all time points (Fig 2). The only significant change observed was a decrease in monocyte count in untreated horses between baseline and 1 month ( $P = .0045$ ; Fig 2D).

### Peripheral Blood Lymphocyte Phenotyping, Activation State, and Proliferation Assays

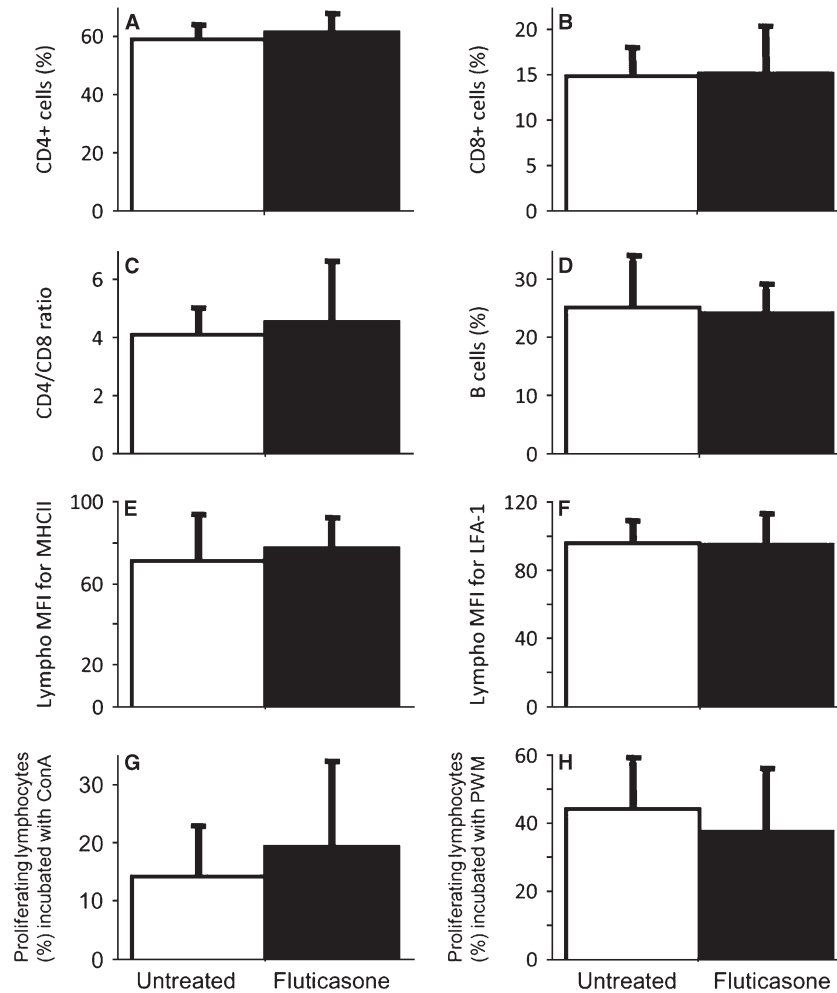
No significant differences between fluticasone and untreated groups were observed in the proportions of CD4+ T cells ( $P = .45$ ), CD8+ T cells ( $P = .89$ ), and B cells ( $P = .83$ ), and in the CD4+/CD8+ T-cell ratio ( $P = .68$ ; Fig 3A–D). There was no significant difference in the proportion of lymphocytes expressing MHC class II molecule ( $90.5 \pm 3.1$  and  $86.3 \pm 6.4\%$  in the fluticasone and untreated group, respectively,  $P = .22$ ) and LFA-1 molecule ( $96.4 \pm 0.7$  and  $95.1 \pm 2.6\%$ ,  $P = .30$ ). The mean fluorescence intensity also was comparable between the 2 groups for MHC class II (Fig 3E) and LFA-1 (Fig 3F).

The lymphocyte proliferation assays revealed no significant difference between fluticasone-treated and untreated horses with either PWM or Con A stimulation



**Fig 2.** Peripheral blood leukocyte (A), segmented neutrophil (B), lymphocyte (C), and monocyte (D) counts from fluticasone-treated (black bars) and untreated (white bars) heaves-affected horses before and after 1, 6, and 11 months of treatment. Mean  $\pm$  SD. \* $P < .05$ .

after 4 days of incubation in the presence of either FCS (Fig 3G and 3H) or autologous serum (results not shown).



**Fig 3.** Peripheral blood CD4+ T lymphocyte (A), CD8+ T lymphocyte (B), CD4/CD8 T lymphocyte ratio (C), and B lymphocyte distributions (D). Expression (mean fluorescence intensity) of major histocompatibility complex (MHC) class II (E) and lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) (CD11a/CD18) (F) molecules on peripheral blood lymphocytes. Percentage of proliferating lymphocytes (lower mean fluorescence than control nonstimulated cells) after 4 days of incubation in vitro with concanavalin A (ConA) (G) or pokeweed mitogen (PWM) (H) and fetal calf serum in the medium; similar results were obtained with autologous serum in the medium. All tests were done in heaves-affected horses after 9 months of inhaled fluticasone treatment (black bars) or no treatment (white bars). Mean  $\pm$  SD.

#### ***Peripheral Blood Neutrophil Gene Expression***

The purity and viability of isolated neutrophils was  $98.96 \pm 0.74$  and  $98.44 \pm 1.15\%$  (mean  $\pm$  SD), respectively. An 8-month treatment period with fluticasone did not cause differences in IL-8 and TNF $\alpha$  mRNA expression in resting and stimulated neutrophils (Fig 4A), nor did it decrease GC receptor mRNA expression or up-regulate glutamine synthetase in resting and stimulated neutrophils when compared with untreated horses (Fig 4B). Conversely, significantly increased glutamine synthetase ( $P < .05$ ) and decreased GCRs expression ( $P < .01$ ) was quantified in cDNA samples from in vitro dexamethasone-treated neutrophils (not shown,  $n = 3$ ), performed as a positive control.

#### ***Serum Anti-Tetanus IgG Titters***

Detectable serum anti-tetanus toxoid IgG titters were present in all horses before vaccination (Fig 5). Booster

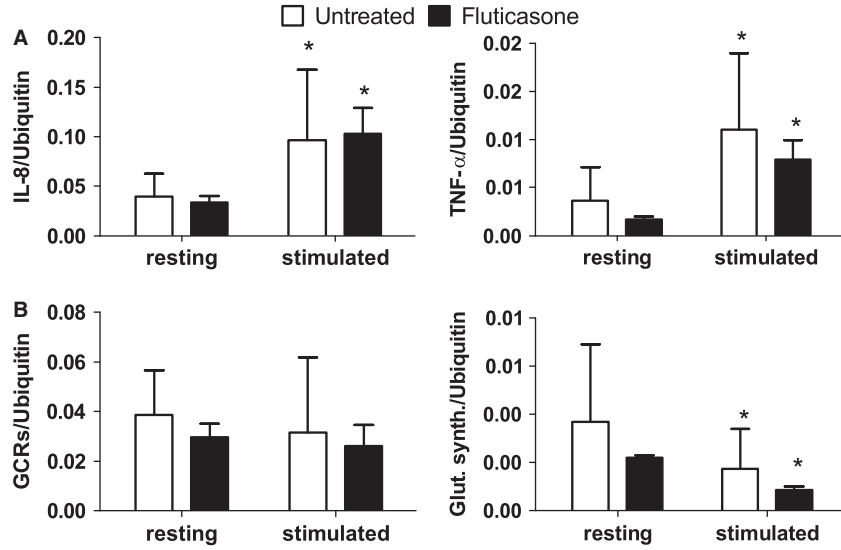
vaccination at 6 months (Time 0 on Fig 5) resulted in development of an antigen-specific IgG response ( $P < .0001$ ) similar in both group of horses ( $P = .66$ ).

#### ***Serum Anti-IBR IgG Titters***

As expected, all horses had negative IBR titers before vaccination. Vaccination with a bovine multivalent vaccine including IBR antigens at 6 and 7 months resulted in development of anti-IBR IgG ( $P < .0001$ ) of a similar magnitude ( $P = .77$ ) in both groups of horses (Fig 6).

### **Discussion**

Prolonged administration of corticosteroids may be required to control airway obstruction in heaves-affected horses when appropriate environmental dust control is not implemented. Because of the adverse effects that have been observed with the oral or injectable use of corticosteroids, treatment duration is usually short, from



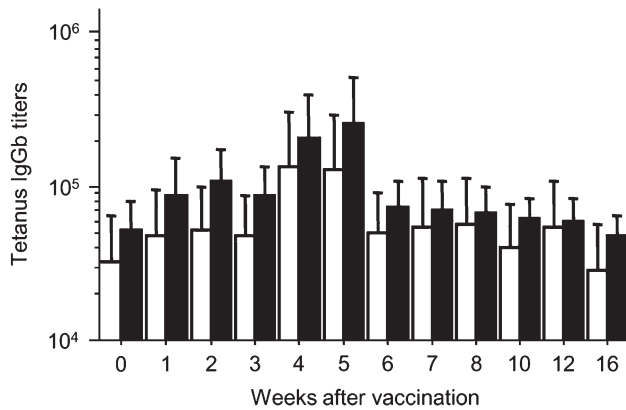
**Fig 4.** Peripheral blood neutrophil gene expression using quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction. Relative gene expression of proinflammatory interleukin (IL)-8 chemokine and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) cytokine (A) and glucocorticoid-responsive genes (glucocorticoid receptor [GCRs]; glutamine synthetase) (B) by resting and stimulated (lipopolysaccharide 100 ng/mL and fMLP 10–8 M) neutrophils isolated from fluticasone-treated and untreated heaves-affected horses. Gene expression was normalized to ubiquitin expression (reference gene). Mean  $\pm$  SD. \* $P < .05$ ; significant difference between resting and stimulated neutrophils within the same group.

days to weeks. Although better tolerated than when systemically administered in human patients, inhaled corticosteroids have nevertheless been associated with adverse effects, including a decrease in the immune response<sup>22</sup> and increased susceptibility to infection when administered over extended periods.<sup>35</sup> The risk of infection was increased especially in elderly patients and in those with severe airway obstruction, 2 key features of heaves in horses. In the present study, no adverse alterations of the immune system or clinical adverse effects were observed over an 11-month period of administration of fluticasone propionate in horses with heaves.

Innate immunity is responsible for the initial response to infectious agents, and it was evaluated here by measuring peripheral blood leukocyte count and neutrophil transcriptional response to bacterial products *ex vivo*

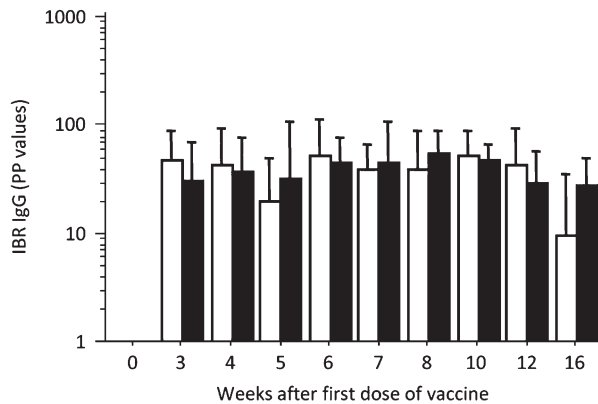
(refer to Fig 1 for measurement timeline). No significant alterations in these parameters were observed with fluticasone treatment. Neutrophil and monocyte counts remained within reference ranges at all time points and did not significantly vary over time in the fluticasone group. These results are in contrast with the transient peripheral blood neutrophilia observed after a single systemic administration of corticosteroids.<sup>12–14,36</sup> However, and in agreement with our findings, inhaled beclomethasone did not alter differential white cell count over a 22-month treatment course in asthmatic children.<sup>37</sup> The decrease in peripheral monocyte count in the untreated group at 1 month was unexplained.

Because factors other than cell number can affect innate immune function, we also investigated possible down regulation of proinflammatory cytokine



**Fig 5.** Tetanus-specific IgGb titers after vaccination with tetanus toxoid (week 0) in fluticasone-treated (dark bars) and untreated (clear bars) heaves-affected horses. Response to vaccination was significantly different at 2 and 4 weeks ( $P < .05$ ) within groups, and similar between groups ( $P > .05$ ). Mean  $\pm$  SD.





**Fig 6.** Infectious bovine rhinotracheitis (IBR)-specific IgG titers after vaccination with inactivated IBR at weeks 0 and 3 in fluticasone-treated (dark bars) and untreated (clear bars) heaves-affected horses. Response to vaccination was significantly different ( $P < .05$ ) within groups at 3 weeks, and similar between groups ( $P > .05$ ). Mean  $\pm$  SD.

production by neutrophils after 8 months of treatment. We found no differences in IL-8 and TNF $\alpha$  mRNA baseline expression, and observed an appropriate response with LPS and fMLP stimulation *in vitro*. These results contrast with the inhibition of equine neutrophil respiratory burst and LPS-induced TNF $\alpha$  and IL-8 gene transcription by dexamethasone observed *in vitro*.<sup>31</sup> Accordingly, neither of the GC-responsive genes assessed (GC receptors and glutamine synthetase) were altered in peripheral blood neutrophils from fluticasone-treated horses in this study. These results support minimal if any exposure of circulating neutrophils to fluticasone and any active metabolite.

To evaluate a possible alteration of the acquired immune system, we first studied the lymphocyte count at 0, 1, 6, and 11 months. In contrast with the transient lymphopenia observed in horses after a single systemic administration of corticosteroids,<sup>12–14,36</sup> no significant changes in lymphocyte counts were observed with fluticasone in the present study. Similar to our findings, no change in lymphocyte counts was observed in beclomethasone-treated children.<sup>37</sup> We further evaluated the peripheral blood lymphocyte subpopulation distribution (CD4+ and CD8+ T cells, and B cells) and the expression of cell surface molecules (MHC class II and LFA-1) after 9 months of fluticasone inhalation, and found no changes in those parameters. Equine lymphocytes constitutively express the MHC class II and the integrin LFA-1 molecules. The function of MHC class II in lymphocytes is unknown, but expression levels have been associated with lymphocyte maturation.<sup>38</sup> The expression of integrins is up-regulated when cells are activated, and they facilitate cell-to-cell interaction for costimulation. Our results contrast with those reported in horses and human subjects after systemic administration of corticosteroids. In horses, for example, a decrease in total lymphocyte count and CD4+/CD8+ ratio and an increase in the expression of LFA-1 in leukocytes was observed for 48 hours after administration of a single

0.025 mg/kg IV dose of dexamethasone.<sup>36</sup> Similarly, in human subjects, prednisolone and dexamethasone (PO or IV) cause a decrease in total lymphocyte, T (CD4+ and CD8+), and B cell counts, with the CD4+ T cell distribution being more severely affected.<sup>39,40</sup> Studies on the effects of administration of inhaled corticosteroids on cell-mediated immunity in human and animal subjects led to conflicting results. A 22-month period inhaled beclomethasone in asthmatic children did not alter lymphocyte subpopulation distributions<sup>37</sup> nor did several weeks of treatment with fluticasone in healthy dogs,<sup>41</sup> or flunisolide in healthy and asthmatic cats.<sup>42</sup> Contrary to the effects observed after administration of a single dose<sup>43,44</sup> and our results, inhaled fluticasone administered for 4 weeks to healthy volunteers caused a decrease in activated CD4+ and CD8+ T cells.<sup>22</sup> Duration of treatment, relatively higher dosage in the study in humans, and health status of the subjects could explain these differences. We further measured the proliferative capacity of lymphocyte in response to mitogens. Proliferation was similar in treated and untreated horses at 9 months, whether lymphocytes were exposed to ConA (T-cell specific) or to PWM (B and T cells). This response was independent of the presence of autologous horse serum, which could have promoted a more sustainable effect comparable to the *in vivo* condition. These results are in agreement with studies in human and animal subjects after inhaled or systemic corticosteroid administration.<sup>13,14,22,37</sup> Only prednisolone PO has been shown to induce a transient (<24 hours) decrease in phytohemagglutinin-induced lymphocyte proliferation.<sup>39</sup>

Humoral immunity was investigated by measuring the primary response to an unknown antigen to horses (IBR antigen) and the anamnestic response to tetanus toxoid. Both groups responded with a similar increase in titers against these 2 antigens, despite 6 months of treatment with fluticasone. This finding contrasts with the almost complete abrogation of IgGa and IgGb response to a bovine viral vaccine observed with dexamethasone (0.2 mg/kg IM, twice a week) in horses.<sup>15</sup> However, these results are in agreement with the normal IgG vaccinal response of COPD and asthma patients when treated with inhaled corticosteroids,<sup>45–47</sup> and after the administration of a single dose of dexamethasone to healthy horses.<sup>36</sup>

To the authors' knowledge, no direct effect of the horse's environment on its systemic immune system has been established. However, from the 6th month of the study, all horses were out in paddocks or pastures. Thus, neutrophil gene expression measurement and lymphocyte function tests were performed when both groups of horses had been out in pasture for 2 and 5 months, respectively. These time points were chosen in order to prevent a possible effect of variable environments on the parameters studied.

In summary, this study shows that long-term treatment of heaves-affected horses with inhaled fluticasone at the therapeutic dosage has no detectable effect on the innate and acquired humoral and cell-mediated-immune parameters studied. These results indicate that this treatment would not preclude the use of vaccines in heaves-affected horses.

---

## Footnotes

- <sup>a</sup> Flovent, Glaxo Wellcome, Mississauga, ON, Canada  
<sup>b</sup> Equine Aeromask, Trudell Medical International, London, ON, Canada  
<sup>c</sup> Advia 120 Hematology System, Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL  
<sup>d</sup> Tetanus Toxoid, Serial No.: 1630104B, Fort Dodge Wyeth Animal Health, IA  
<sup>e</sup> Triangle 4 + Type II BVD, Serial No.: 178191A, Fort Dodge Wyeth Animal Health  
<sup>f</sup> #DH24A, VMRD Inc, Pullman, WA  
<sup>g</sup> MACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA  
<sup>h</sup> Cytospin 2, Shandon, Southern Instruments, Sewickley, PA  
<sup>i</sup> Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada  
<sup>j</sup> GIBCO, Invitrogen, Burlington, ON, Canada  
<sup>k</sup> Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada  
<sup>l</sup> Invitrogen  
<sup>m</sup> Corbett Research, Montreal Biotech, Montreal, QC, Canada  
<sup>n</sup> Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR-Ab) Svanovir, Savnova Biotech Ab, Uppsala, Sweden  
<sup>o</sup> SAS Institute Inc, Cary, NC  
<sup>p</sup> GraphPad Software Inc, La Jolla, CA
- 

## Acknowledgments

The authors thank Josiane Lefebvre-Lavoie for technical assistance.

The study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (208855), Allergen NCE, le Fonds du Centenaire, and the Clinical Research Pfizer Fund.

## References

- Couetil LL, Hoffman AM, Hodgson J, et al. Inflammatory airway disease of horses. *J Vet Intern Med* 2007;21:356–361.
- Rush BR, Worster AA, Flaminio MJ, et al. Alteration in adrenocortical function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *Am J Vet Res* 1998;59:1044–1047.
- Picandet V, Leguilette R, Lavoie JP. Comparison of efficacy and tolerability of isoflupredone and dexamethasone in the treatment of horses affected with recurrent airway obstruction ('heaves'). *Equine Vet J* 2003;35:419–424.
- Dowling PM, Williams MA, Clark TP. Adrenal insufficiency associated with long-term anabolic steroid administration in a horse. *J Am Vet Med Assoc* 1993;203:1166–1169.
- Eustace RA, Redden RR. Iatrogenic laminitis. *Vet Rec* 1990;126:586.
- Ryu SH, Kim BS, Lee CW, et al. Glucocorticoid-induced laminitis with hepatopathy in a Thoroughbred filly. *J Vet Sci* 2004;5:271–274.
- Cohen ND, Carter GK. Steroid hepatopathy in a horse with glucocorticoid-induced hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc* 1992;200:1682–1684.
- Lepage OM, Laverty S, Marcoux M, et al. Serum osteocalcin concentration in horses treated with triamcinolone acetonide. *Am J Vet Res* 1993;54:1209–1212.
- Mair TS. Bacterial pneumonia associated with corticosteroid therapy in three horses. *Vet Rec* 1996;139:205–207.
- Edington N, Bridges CG, Huckle A. Experimental reactivation of equid herpesvirus 1 (EHV 1) following the administration of corticosteroids. *Equine Vet J* 1985;17:369–372.
- Cutler TJ, MacKay RJ, Ginn PE, et al. Immunoconversion against *Sarcocystis neurona* in normal and dexamethasone-treated horses challenged with *S. neurona* sporocysts. *Vet Parasitol* 2001;95:197–210.
- Burguez PN, Ousey J, Cash RS, et al. Changes in blood neutrophil and lymphocyte counts following administration of cortisol to horses and foals. *Equine Vet J* 1983;15:58–60.
- Targowski SP. Effect of prednisolone on the leukocyte counts of ponies and on the reactivity of lymphocytes in vitro and in vivo. *Infect Immun* 1975;11:252–256.
- Flaminio MJ, Tallmadge RL, Secor E, et al. The effect of glucocorticoid therapy in the immune system of the horse. *International Veterinary Immunology Symposium, Ouro Preto, Brazil, 2007*; 144.
- Slack J, Risdahl JM, Valberg SJ, et al. Effects of dexamethasone on development of immunoglobulin G subclass responses following vaccination of horses. *Am J Vet Res* 2000;61:1530–1533.
- Ammann VJ, Vrins AA, Lavoie JP. Effects of inhaled beclomethasone dipropionate on respiratory function in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Equine Vet J* 1998;30:152–157.
- Couetil LL, Chilcoat CD, DeNicola DB, et al. Randomized, controlled study of inhaled fluticasone propionate, oral administration of prednisone, and environmental management of horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res* 2005;66:1665–1674.
- Rush BR, Flaminio MJ, Matson CJ, et al. 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;59:1033–1038.
- Giguere S, Viel L, Lee E, et al. Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;85:147–158.
- Robinson NE, Berney C, Behan A, et al. Fluticasone propionate aerosol is more effective for prevention than treatment of recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med* 2009;23:1247–1253.
- Lipworth BJ. Systemic adverse effects of inhaled corticosteroid therapy: A systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 1999;159:941–955.
- Sharma KC, Stevens D, Casey L, et al. Effects of high-dose inhaled fluticasone propionate via spacer on cell-mediated immunity in healthy volunteers. *Chest* 2000;118:1042–1048.
- Rush BR, Raub ES, Thomsen MM, et al. Pulmonary function and adrenal gland suppression with incremental doses of aerosolized beclomethasone dipropionate in horses with recurrent airway obstruction. *J Am Vet Med Assoc* 2000;217:359–364.
- Rush BR, Trevino IC, Matson CJ, et al. Serum cortisol concentrations in response to incremental doses of inhaled beclomethasone dipropionate. *Equine Vet J* 1999;31:258–261.
- Laan TT, Westermann CM, Dijkstra AV, et al. Biological availability of inhaled fluticasone propionate in horses. *Vet Rec* 2004;155:361–364.
- Flaminio MJ, Antczak DF. Inhibition of lymphocyte proliferation and activation: A mechanism used by equine invasive trophoblast to escape the maternal immune response. *Placenta* 2005;26:148–159.
- Kydd J, Antczak DF, Allen WR, et al. Report of the first international workshop on equine leucocyte antigens, Cambridge, UK, July 1991. *Vet Immunol Immunopathol* 1994;42:3–60.
- Lunn DP, Holmes MA, Antczak DF, et al. Report of the second equine leucocyte antigen workshop, Squaw Valley, California, July 1995. *Vet Immunol Immunopathol* 1998;62:101–143.

29. Flaminio MJ, Rush BR, Shuman W. Peripheral blood lymphocyte subpopulations and immunoglobulin concentrations in healthy foals and foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. *J Vet Intern Med* 1999;13:206–212.
30. 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;33:730–733.
31. Lecoq L, Vincent P, Lavoie-Lamoureux A, et al. Genomic and non-genomic effects of dexamethasone on equine peripheral blood neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol* 2009;128:126–131.
32. Lavoie-Lamoureux A, Moran K, Beauchamp G, et al. IL-4 activates equine neutrophils and induces a mixed inflammatory cytokine expression profile with enhanced neutrophil-chemotactic mediator release ex vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;299:472–482.
33. Pujols L, Mullol J, Torrego A, et al. Glucocorticoid receptors in human airways. *Allergy* 2004;59:1042–1052.
34. Wilson WD, Mihalyi JE, Hussey S, et al. Passive transfer of maternal immunoglobulin isotype antibodies against tetanus and influenza and their effect on the response of foals to vaccination. *Equine Vet J* 2001;33:644–650.
35. Singh S, Loke YK. Risk of pneumonia associated with long-term use of inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease: A critical review and update. *Curr Opin Pulm Med* 2010;16:118–122.
36. Flaminio MJBF, Tallmadge RL, Secor E, et al. The effect of glucocorticoid therapy in the immune system of the horse. *Vet Immunol Immunopathol* 2009;128: 344–345.
37. Levy J, Zalkinder I, Kuperman O, et al. Effect of prolonged use of inhaled steroids on the cellular immunity of children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:806–812.
38. Lunn DP, Holmes MA, Duffus WP. Equine T-lymphocyte MHC II expression: Variation with age and subset. *Vet Immunol Immunopathol* 1993;35:225–238.
39. Cooper DA, Petts V, Luckhurst E, et al. The effect of acute and prolonged administration of prednisolone and ACTH on lymphocyte subpopulations. *Clin Exp Immunol* 1977;28: 467–473.
40. Chiappelli F, Gormley GJ, Gwirstman HE, et al. Effects of intravenous and oral dexamethasone on selected lymphocyte subpopulations in normal subjects. *Psychoneuroendocrinology* 1992; 17:145–152.
41. Cohn LA, DeClue AE, Reinero CR. Endocrine and immunologic effects of inhaled fluticasone propionate in healthy dogs. *J Vet Intern Med* 2008;22:37–43.
42. Reinero CR, Decile KC, Byerly JR, et al. Effects of drug treatment on inflammation and hyperreactivity of airways and on immune variables in cats with experimentally induced asthma. *Am J Vet Res* 2005;66:1121–1127.
43. Fokkens WJ, van de Merwe JP, Braat JP, et al. The effect of intranasal and inhaled corticosteroids in healthy volunteers on the number of circulating lymphocytes and lymphocyte subsets. *Allergy* 1999;54:158–164.
44. Reinero CR, Brownlee L, Decile KC, et al. Inhaled flunisolide suppresses the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis, but has minimal systemic immune effects in healthy cats. *J Vet Intern Med* 2006;20:57–64.
45. de Roux A, Marx A, Burkhardt O, et al. Impact of corticosteroids on the immune response to a MF59-adjuvanted influenza vaccine in elderly COPD-patients. *Vaccine* 2006;24:1537–1542.
46. de Roux A, Schmidt N, Rose M, et al. Immunogenicity of the pneumococcal polysaccharide vaccine in COPD patients. The effect of systemic steroids. *Respir Med* 2004;98:1187–1194.
47. Hanania NA, Sockrider M, Castro M, et al. Immune response to influenza vaccination in children and adults with asthma: Effect of corticosteroid therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:717–724.



**Article #7*****Effect of Antigen Exposure on Airway Smooth Muscle Remodeling in an Equine Model of Chronic Asthma***

Leclere M, **Lavoie-Lamoureux A**, Gelinas-Lymburner E, David F., Martin J. G. et Lavoie, J. P.

**Contributions originales**

*J'ai été impliquée dans le design logistique de cette étude. J'ai participé à la récolte et au traitement des échantillons, j'ai aidé aux procédures cliniques (mécaniques respiratoires et LBA) et j'ai participé à la rédaction de l'article.*

Reprinted with permission of the American Thoracic Society. Copyright © 2011 American Thoracic Society.: Leclere, M., Lavoie-Lamoureux, A., Gelinas-Lymburner, E., David, F., Martin, J.G., Lavoie, J.P., 2011, *Effect of antigenic exposure on airway smooth muscle remodeling in an equine model of chronic asthma*. Am J Respir Cell Mol Biol 45, 181-187. Official Journal of the American Thoracic Society.

# Effect of Antigenic Exposure on Airway Smooth Muscle Remodeling in an Equine Model of Chronic Asthma

Mathilde Leclere<sup>1</sup>, Anouk Lavoie-Lamoureux<sup>1</sup>, Émilie Gélinas-Lymburner<sup>1</sup>, Florent David<sup>1</sup>, James G. Martin<sup>2</sup>, and Jean-Pierre Lavoie<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Département de Sciences Cliniques, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada; and <sup>2</sup>Meakins Christie Laboratories, Department of Medicine, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

Recent studies suggest that airway smooth muscle remodeling is an early event in asthma, but whether it remains a dynamic process late in the course of the disease is unknown. Moreover, little is known about the effects of an antigenic exposure on chronically established smooth muscle remodeling. We measured the effects of antigenic exposure on airway smooth muscle in the central and peripheral airways of horses with heaves, a naturally occurring airway disease that shares similarities with chronic asthma. Heaves-affected horses ( $n = 6$ ) and age-matched control horses ( $n = 5$ ) were kept on pasture before being exposed to indoor antigens for 30 days to induce airway inflammation and bronchoconstriction. Peripheral lung and endobronchial biopsies were collected before and after antigenic exposure by thoracoscopy and bronchoscopy, respectively. Immunohistochemistry and enzymatic labeling were used for morphometric analyses of airway smooth muscle mass and proliferative and apoptotic myocytes. In the peripheral airways, heaves-affected horses had twice as much smooth muscle as control horses. Remodeling was associated with smooth muscle hyperplasia and *in situ* proliferation, without reduced apoptosis. Further antigenic exposure had no effect on the morphometric data. In central airways, proliferating myocytes were increased compared with control horses only after antigenic exposure. Peripheral airway smooth muscle mass is stable in chronically affected animals subjected to antigenic exposure. This increased mass is maintained in a dynamic equilibrium by an elevated cellular turnover, suggesting that targeting smooth muscle proliferation could be effective at decreasing chronic remodeling.

**Keywords:** asthma; animal model; peripheral airways; heaves

Increased airway smooth muscle (ASM) mass is a prominent feature of patients with asthma, and may play a central role in allergen-induced bronchospasms and airway hyperresponsiveness to nonspecific agonists (1). ASM remodeling was demonstrated in the airways of patients with asthma, whether samples were obtained from lung resections or autopsy specimens (2–5), or from endobronchial biopsies (6–9). Although ASM remodeling is considered a target for novel therapies (10, 11), the processes leading to and, to a greater extent, maintaining ASM thickening in chronic disease are unknown. The question is not trivial, because therapeutic approaches targeting established

## CLINICAL RELEVANCE

Recent studies suggest that airway smooth muscle remodeling is an early event in asthma, but whether it remains a dynamic process late in the course of the disease, and how antigenic exposure affects established remodeling, are unknown. We showed that a 30-day antigenic exposure had little effect on established remodeling in diseased animals, despite the development of inflammation and bronchoconstriction. In peripheral airways, airway smooth muscle remodeling appears to be maintained in a dynamic equilibrium by an elevated turnover with *in situ* proliferation, suggesting that targeting airway smooth muscle proliferation may be effective at decreasing its mass.

remodeling would differ if the remodeling was the result of ongoing proliferation or else a decrease in cellular death. This is of particular interest in small airways, where direct therapeutic interventions such as bronchial thermoplasty are not possible (12). Recent studies also highlighted the important contributions of the small airways in asthma, while recognizing the difficulty of sampling and imaging those airways (13, 14). Among the advantages of using large animal models is the possibility of repeated sampling of peripheral airways, along with the possibility of controlling their environment and treatment, but without the genetic homogeneity of inbred colonies.

Heaves is a naturally occurring disease of horses, associated with domestication and hay feeding, that shares similarities with asthma, including reversible antigen-induced bronchoconstriction, the accumulation of mucus, and airway inflammation. Ten to fifteen percent of adult horses are affected by this condition, characterized by episodes of coughing, wheezing, and exercise intolerance that can be controlled by environmental management (i.e., avoiding the offending indoor antigens, usually organic dust from poorly conserved hay), or with corticosteroids and bronchodilators (15). Similar to certain categories of asthma, intraluminal inflammation is predominantly neutrophilic, although it was linked to Th2 cytokines in some studies (16, 17). The features of airway remodeling resemble those of asthma, and include epithelial detachment and regeneration, goblet-cell hyperplasia, and increased bronchial and bronchiolar smooth muscle (18, 19). Although heaves is caused by antigens in moldy hay, it does not resemble extrinsic allergic alveolitis, because interstitial fibrosis, alveolitis, lymphocytic bronchoalveolar lavage inflammation, and restrictive pulmonary dysfunction are not characteristic of the disease (20, 21). As in humans, the reversibility of established ASM remodeling in adult horses has yet to be demonstrated.

In this study, we hypothesized that (1) heaves-affected horses have greater ASM mass than age-matched control horses kept in the same environment; (2) a month-long antigenic exposure would further increase ASM mass in heaves-affected horses; (3) this greater ASM mass would be at least partly attributable to hyperplasia; and (4) similar changes would be

(Received in original form June 15, 2010 and in final form October 1, 2010)

The current address of Florent David is Veterinary Clinical Studies, University College Dublin, Dublin, Ireland.

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research grant MIF79636 and by AllerGen NCE, Inc., a member of the Networks of Centers of Excellence Canada Program.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Jean-Pierre Lavoie, DVM, Département de Sciences Cliniques, Faculté de Médecine Vétérinaire, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, Quebec J2S 7C6, Canada. E-mail: [REDACTED]

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org)

Am J Respir Cell Mol Biol Vol 45, pp 181–187, 2011

Originally Published in Press as DOI: 10.1165/rcmb.2010-0300OC on October 8, 2010  
Internet address: [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org)

evident in the peripheral airways (full-thickness biopsies) and in endobronchial biopsies (partial sampling of airway walls). To test these hypotheses, we exposed heaves-affected horses and control horses to poorly cured hay, and examined ASM in peripheral and endobronchial biopsies, harvested before and after exposure, via morphometric analyses of ASM mass and markers of proliferation and apoptosis.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental Design

Data were collected after horses had been on pasture for more than 3 months (baseline) and after 1 day (pulmonary function and bronchoalveolar lavage only) and 30 days of stabling and exposure to poorly cured hay (antigenic exposure).

### Animals

Six heaves-affected horses and five age-matched control horses were studied. Heaves-affected horses had a well-documented 3–10-year history of reversible airway obstruction and inflammation upon exposure to hay. Horses were deemed otherwise healthy, based on physical examination, blood count, and biochemistry. Animal manipulations were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council for Animal Care.

### Pulmonary Function

In unsedated animals, pulmonary resistance and elastance were calculated from the flow rates obtained from a heated pneumotachograph attached to a mask, and transpulmonary pressure was derived from an esophageal catheter (22).

### Bronchoalveolar Lavage

Two 250-ml boluses of isotonic saline were instilled in the main bronchi through a 2.5-m bronchoscope (Olympus Medical Systems Corp., Tokyo, Japan), as previously described (16). Cytospins were stained with Wright-Giemsa and Toluidine blue. Additional information is available in the online supplement.

### Endobronchial Biopsies

Biopsies were performed in the contralateral lung after bronchoalveolar lavage (BAL), using disposable forceps (Olympus Medical Systems Corp.). Biopsies (median,  $n = 5$ ; range,  $n = 3$ –8) were taken from different branching sites, starting approximately 30 cm distal to the carina and moving cranially.

### Lung Biopsies via Thoracoscopy

Peripheral lung tissue (8–12 cm<sup>3</sup>) was harvested in the caudo-dorsal region of the lung from standing, sedated animals (23). Samples were fixed for 24 hours in 4% formaldehyde and embedded in paraffin.

### Immunostaining and Enzymatic Labeling

Immunohistochemical staining was performed for the colocalization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) with smooth muscle-specific  $\alpha$ -actin (18). Apoptosis was detected using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling (TUNEL) assay. Additional information is available in the online supplement.

### Morphometric Analysis

In peripheral lung biopsies, the ASM area of airways in cross section was measured using Image-Pro Plus software (MediaCybernetics, Carlsbad, CA). The ASM area (median number of airways per animal, 10; range, 5–17), ASM nuclei (median number per animal, 8; range, 4–17), PCNA<sup>+</sup> myocytes (median number per animal, 8; range, 1–17), and TUNEL<sup>+</sup> myocytes (median number per animal, 7; range, 4–7) were corrected by the internal perimeter squared to account for variations in airway size (24). In endobronchial biopsies, the ASM area was measured as a ratio of the biopsy area (5; 3–8), and ASM cells (median number for PCNA<sup>+</sup>, 4; range, 1–5; median number for

TUNEL<sup>+</sup>, 3; range, 1–4) were counted in random fields over  $1\text{--}2 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ . Measurements were performed by one investigator (M.L.) blinded to group and the time point of sample collection.

### Statistical Analysis

Group characteristics (age, weight, and gender) were analyzed according to the Mann-Whitney test, and physiologic data (function and BAL) were analyzed according to repeated-measures ANOVA with *a priori* contrasts. Morphometric data were analyzed according to paired and unpaired two-tailed *t* tests, using an average value for each animal at each time point. Normality was assessed according to the Kolmogorov-Smirnov test and visual inspection of the data. BAL cell counts and mast-cell percentages were transformed (log and arcsine square root, respectively) before analyses. The software SAS version 9.1 (SAS Institute, Cary, NC) was used, and  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

### Animals

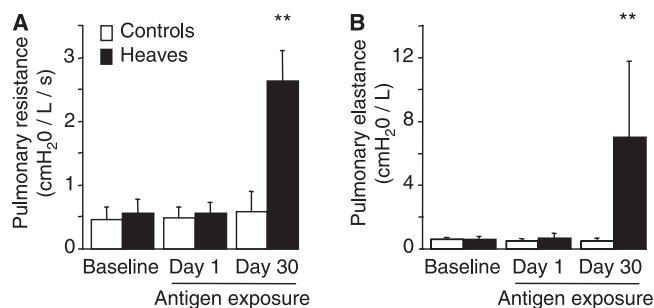
Ages, weights, and proportions of mares in heaves-affected horses were not statistically different from those of control horses (ages for heaves-affected horses: median, 16 years; range, 15–20 years; ages for control horses: median, 14 years; range, 11–17 years; weights of heaves-affected horses: median, 467 kg; range, 444–515 kg; weights of control horses: median, 504 kg; range, 450–555 kg; proportions of mares: four heaves-affected horses, and five control horses).

### Lung Function

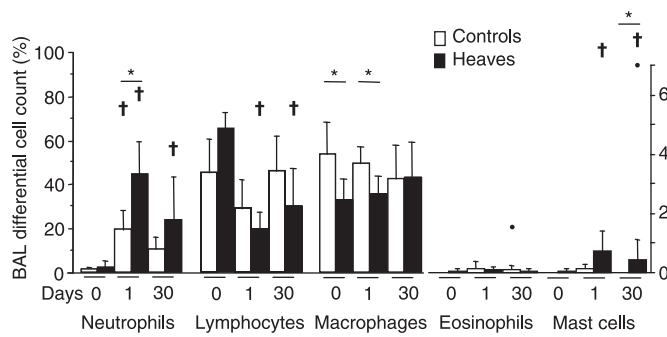
Under conditions of low antigenic exposure, the lung function of heaves-affected horses was not different from that of control horses. Antigenic exposure induced significant airway obstruction only in diseased animals. Figure 1 depicts pulmonary resistance and elastance after 3 months of antigen avoidance (baseline) and after 1 and 30 days of exposure to indoor antigens.

### BAL

Antigenic exposure induced a significant increase in the percentage of neutrophils and mast cells in heaves-affected horses after 1 and 30 days, along with a decrease in the percentage of lymphocytes. In control horses, a transient increase in neutrophils was also present on Day 1 (Figure 2). In absolute cell counts, no significant change was evident over time in the number of total cells, lymphocytes, macrophages, or eosinophils recovered from BAL in either group. An increase from baseline occurred in neutrophils and mast cells in both groups after 1 day and in mast cells after 30 days in heaves-affected horses (Table 1).



**Figure 1.** Pulmonary resistance (A) and elastance (B) after 3 months of antigen avoidance (Baseline) and after 1 and 30 days of antigenic exposure. Heaves-affected horses,  $n = 6$ ; control horses,  $n = 5$ . Mean  $\pm$  SD. \*\*Different from Baseline and Day 1 within the same group, and different from controls at the same time point,  $P < 0.01$ .



**Figure 2.** Differential cell count of bronchoalveolar lavage (BAL) after 3 months of antigen avoidance (baseline = Day 0), and after 1 and 30 days of antigenic exposure. Heaves-affected horses, *n* = 6; control horses, *n* = 5. Mean ± SD. \*Different between groups at one time point. †Different from baseline within the same group, *P* < 0.05. •Outliers.

**Airway Smooth Muscle in Peripheral Airways**

Figure 3A illustrates ASM stained by immunohistochemistry in a peripheral airway. Individual airways of heaves-affected horses exhibited increased ASM mass, which was more pronounced in the most peripheral airways (Figure 4). In horses with heaves, mean ASM mass (Figure 5A) and myocyte nuclei per perimeter length (Figure 5B) were approximately 2-fold greater than in control horses, and were unaffected by a 30-day antigenic exposure. The greater ASM mass observed was not associated with a higher cell density (ASM nuclei per ASM area), but with a significantly lower density (Figure 5C). These findings suggest contributions by both hyperplasia and hypertrophy to ASM remodeling in peripheral airways, with a greater contribution of hyperplasia.

**Proliferation and Apoptosis of Airway Smooth Muscle in Peripheral Airways**

At baseline, both PCNA<sup>+</sup> myocytes and TUNEL<sup>+</sup> myocytes (Figures 3C and 3D) were more numerous in heaves-affected horses than in control horses, which suggests that chronic ASM remodeling is associated with an increased cellular turnover, because both proliferation and apoptosis were increased (Figures 6A and 6B, baseline). This high turnover was unaffected by the 30-day exposure. In contrast, control animals showed an increase in both proliferative and apoptotic cells after antigenic

exposure, compared with baseline (PCNA<sup>+</sup>, 2.1-fold increase, *P* = 0.01; TUNEL<sup>+</sup>, 2.4-fold increase, *P* = 0.06) (Figure 6). This increase remained below the level observed in heaves-affected horses, and was not associated with a change in ASM mass (Figure 5A).

**Airway Smooth Muscle Proliferation and Apoptosis in Endobronchial Biopsies**

At baseline, no difference was evident between groups in terms of ASM area percentage (Figures 3B and 7A), proliferative density (PCNA<sup>+</sup> cells/ASM area) (Figure 7C), and percentage of proliferating airway myocytes (Figure 7D), or in terms of apoptotic density (TUNEL<sup>+</sup> cells/ASM area) (Figure 7E) and percentage of apoptotic myocytes (Figure 7F). Only a modest increase in myocyte density (myocyte nuclei/ASM area) was evident in heaves-affected animals (Figure 7B). After antigenic exposure, the ASM area percentage decreased in heaves-affected horses (i.e., biopsies performed during ongoing bronchospasm), but remained stable in control animals. The proliferative density and percentage of proliferating airway myocytes were significantly greater in heaves-affected horses after antigenic exposure, compared with control horses (Figures 7C and 7D). No significant difference was evident between groups and time in terms of TUNEL<sup>+</sup> myocytes (Figures 7E and 7F). Interestingly, approximately 50% of PCNA<sup>+</sup> ASM cells were found in clusters of three or more cells (data not shown).

**DISCUSSION**

In this study, we examined the effects of antigenic exposure on ASM mass, proliferation, and apoptosis in the peripheral and central airways of mature animals with preexisting ASM remodeling that had been through multiple cycles of antigenic exposure, bronchospasm, and inflammation throughout their lives. After this natural challenge, only heaves-affected horses developed airway obstruction and sustained BAL inflammation. In peripheral airways, ASM remodeling appears to have reached a new dynamic equilibrium, characterized by a high cellular turnover where ASM mass, myocyte number, and markers of proliferation and apoptosis were increased compared with control horses, but were unaffected by an antigenic challenge. Antigenic exposure increased markers of proliferation and apoptosis in control horses without affecting their ASM mass. In the central airways, proliferative myocytes were increased in diseased animals only after challenge, and antigenic exposure

**TABLE 1. CELL COUNTS IN BRONCHOALVEOLAR FLUID**

		Baseline	Antigenic Exposure (1 Day)	Antigenic Exposure (30 Days)
Total cell count (×10 <sup>7</sup> )	C	4.17 (1.45)	7.13 (2.69)	7.97 (0.73)
	H	3.45 (3.59)	8.82 (6.91)	5.91 (13.08)
Neutrophils (×10 <sup>7</sup> )	C	0.04 (0.02)	1.53 (1.16)*	0.80 (0.43)
	H	0.03 (0.06)	4.28 (4.29)*	0.90 (1.80)
Lymphocytes (×10 <sup>7</sup> )	C	2.02 (1.16)	1.95 (0.97)	3.69 (1.40)
	H	2.20 (2.09)	1.48 (0.97)	2.00 (4.50)
Macrophages (×10 <sup>7</sup> )	C	2.11 (0.51)	3.50 (1.32)	3.36 (1.28)
	H	1.21 (1.53)	2.96 (2.00)	3.03 (6.78)
Eosinophils (×10 <sup>5</sup> )	C	0.00 (0.00)	1.09 (1.49)	3.42 (5.56)
	H	0.09 (0.21)	0.95 (1.58)	0.02 (0.06)
Mast cells (×10 <sup>5</sup> )	C	0.00 (0.00)	1.08 (1.17)*	0.00 (0.00)
	H	0.01 (0.01)	5.65 (6.61)*	0.46 (0.73)**

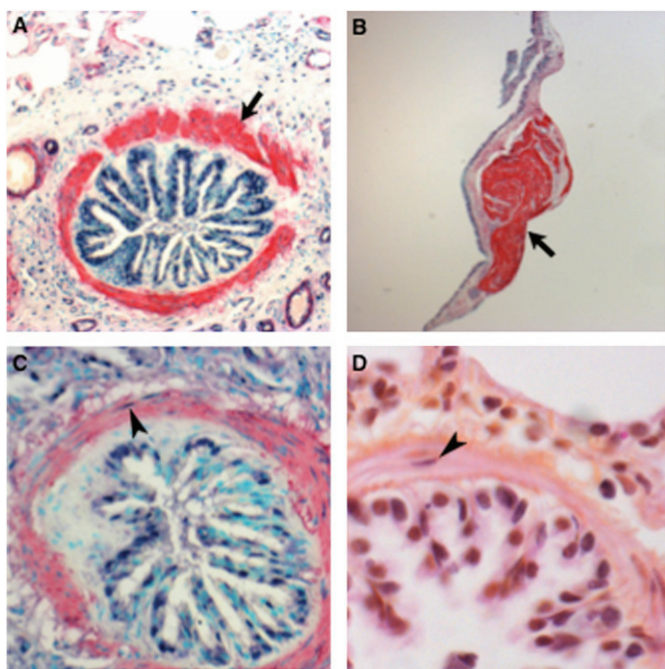
Definition of abbreviations: C, control horses; H, horses with heaves.

Values are presented as mean (SD).

\* Different from baseline within the same group, *P* < 0.05.

† Different between groups at one time point, *P* < 0.05.





**Figure 3.** Airway smooth muscle (arrows) (smooth muscle  $\alpha$ -actin stained by immunohistochemistry) in peripheral lung biopsies (A) and endobronchial biopsies (B). Airway myocytes were positive for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (C) and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling (TUNEL) (D) (arrowheads). Original magnifications:  $\times 10$ ,  $\times 4$ ,  $\times 20$ , and  $\times 40$  for A, B, C, and D, respectively.

exerted no measurable effect on control horses. We confirmed our hypothesis, which stated that heaves-affected horses have greater ASM mass than age-matched control horses, and that this remodeling is maintained in part by hyperplasia. However, a month-long antigenic exposure did not further increase ASM mass, and we could not correlate the changes seen in peripheral airways with the changes in endobronchial biopsies.

#### Inflammation, Bronchoconstriction, and Remodeling

Exposure to indoor antigens induced marked and persistent airway neutrophilia in heaves-affected horses. The neutrophil percentage in BAL, more than in absolute cell counts, has proven useful in monitoring environment-induced airway inflammation in horses (15), but healthy animals can also develop transient inflammation under similar conditions (25). That was the case here, although to a lesser extent than in heaves-affected animals, and without the development of concomitant airflow limitation or increased ASM mass. The present study indicates that the transient inflammation resulting from antigen exposure in healthy animals also leads to an up-regulation of ASM turnover (seen in peripheral airways), without an association with airway obstruction or thickening of the ASM. The inflammation-induced up-regulation of ASM turnover therefore appears to be part of a normal response in healthy subjects. However, we cannot conclude whether ASM remodeling in diseased animals is only the result of a greater and more persistent inflammation, or is the result of factors intrinsic to ASM, as suggested by *in vitro* studies (26, 27).

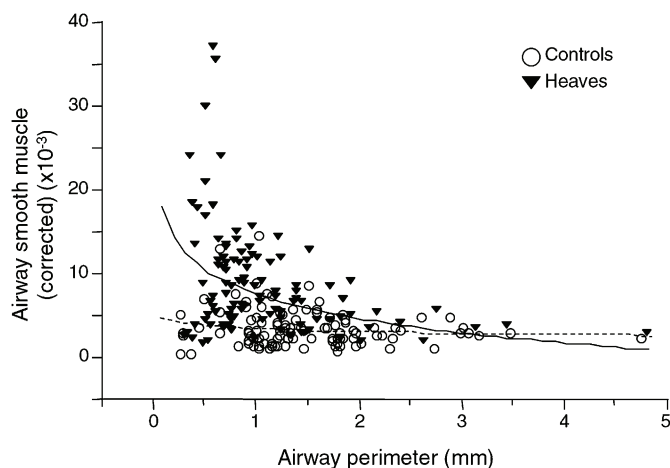
#### ASM Remodeling in Peripheral Airways and Lung Function

Using postmortem lung samples, Herszberg and colleagues (18) showed that horses with heaves manifest more ASM in their medium and small airways than horses without respiratory

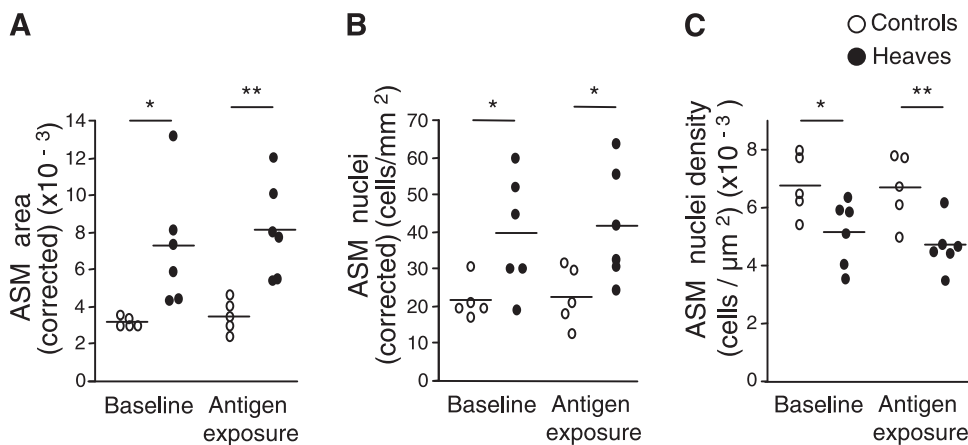
disease. In the present study, we confirmed and extended these findings by housing age-matched control horses in the same environment and by examining the effects of antigenic exposure on parameters of remodeling. Although all the heaves-affected horses had a greater mean peripheral ASM mass than did the control horses, this mass was not correlated with pulmonary resistance or elastance when horses were symptomatic (data not shown). This finding is in agreement with the findings of James and colleagues (5), in which small airway smooth muscle thickness was not correlated with severity of asthma, despite an increase in thickness compared with control samples. In that study of human asthma using postmortem specimens, only ASM in medium and large airways was associated with disease severity. This result is unlikely to mean that ASM remodeling in small airways is irrelevant, but more likely that clinical signs and criteria of severity based on need for therapy (as in James and colleagues [5]) or conventional assessments of pulmonary function correlate better with larger airway bronchospasm. Moreover, when horses were asymptomatic (at baseline), no difference in lung function was detectable, despite the presence of ASM thickening. This finding is in agreement with a mathematical model predicting that ASM thickening without concurrent bronchoconstriction exerts only a mild effect on airway caliber and lung function (28). More refined techniques to assess function, and especially peripheral airway obstruction, may have shown low-grade persistent airflow obstruction.

#### ASM Remodeling in Peripheral Airways: Contribution of Hyperplasia to ASM Remodeling

Horses with heaves have more than twice as much ASM mass and approximately twice as many airway myocytes in their peripheral airways as age-matched control animals. This alteration in ASM is associated with an increase in proliferating airway myocytes, rather than a decrease in apoptosis. These results are consistent with a previous study on postmortem equine lung tissue (18). The relatively greater increase in proliferating myocytes than in ASM mass (4.2-fold versus 2.3-fold at baseline, respectively) suggests that *in situ* proliferation accounts for some of the increase in ASM, even if the percentage of proliferating airway myocytes was not signifi-



**Figure 4.** Airway smooth muscle area corrected for internal perimeter squared in peripheral airways at both time points. The internal perimeter of the airways in cross sections ranged from 0.2–4.8 mm (x-axis). Logarithmic regression lines illustrate trends for diseased animals (solid line) and control horses (dashed line). Control horses,  $n = 108$  airways. Horses with heaves,  $n = 109$  airways.



**Figure 5.** Airway smooth muscle (ASM) area (A) and ASM myocyte nuclei (B) corrected for internal perimeter squared, and (C) myocyte density (ASM nuclei/measured ASM area) after 3 months of antigen avoidance (Baseline) and after 30 days of antigenic exposure. Heaves-affected horses, *n* = 6; control horses, *n* = 5. Horizontal bars represent the mean. \**P* < 0.05, \*\**P* ≤ 0.01.

cantly different in the peripheral airways (data not shown). The differences in myocytes per airway perimeter squared and per measured surface suggest a contribution of both hyperplasia (i.e., increased mass resulting from increased cell number) and cellular hypertrophy. The contribution of cellular hypertrophy is consistent with the increased cell size described in patients with asthma (3, 9, 29), but hypertrophy was not demonstrated in all patients (7, 30). The decrease in myocyte nuclei per unit area could also be attributable to an increase in extracellular matrix deposition within the smooth muscle bundle, because we did not measure cell size directly. Nevertheless, these phenomena are not mutually exclusive, and in asthma, evidence exists of both hypertrophy and hyperplasia (3, 9, 29, 31, 32), along with increased extracellular matrix (33, 34), and with possible regional differences within the bronchial tree (3). Finally, evidence that ASM hyperplasia in chronic ASM remodeling is at least partly attributable to *in situ* proliferation suggests that limiting the proliferative capacity of airway myocytes may be of therapeutic value, even without directly inducing cell death.

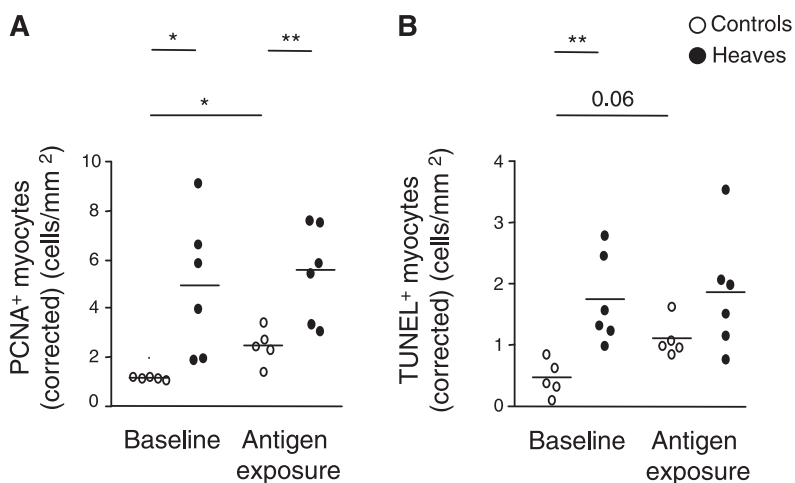
**ASM Remodeling in Peripheral Airways: Limited Effect of Antigenic Exposure in Heaves-Affected Horses**

The parameters of ASM remodeling were not affected by a month-long antigenic exposure in heaves-affected horses. The lack of further increase in ASM mass or cell number suggests that ASM remodeling may reach a plateau after a certain mass is attained. By showing that ASM remodeling can occur early in the natural progression of asthma (35) and that ASM thickening correlates better with severity than with duration, James and

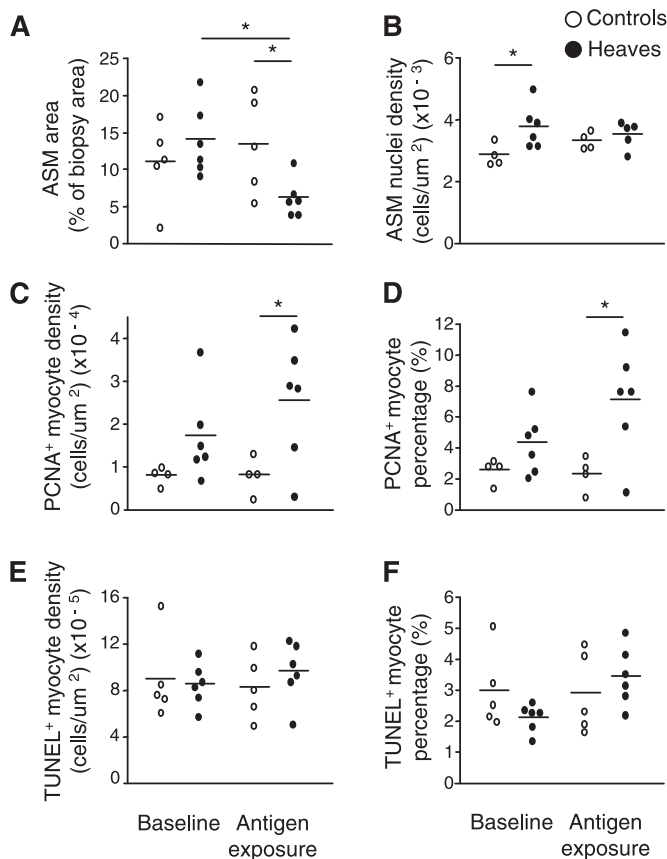
colleagues (5) findings indirectly support this concept of plateau or equilibrium in ASM remodeling. This plateau, or dynamic equilibrium, may prevent complete airway obstruction by ASM (a phenomenon not known to occur in heaves or in fatal asthma). Interestingly, antigenic exposure was associated with a modest but significant rise in proliferative and apoptotic cells only in control animals, which developed transient inflammation without airflow limitation. Taken together, these results suggest that the normal response to a transient inflammatory event is an increase in myocyte proliferation and an appropriate compensatory increase in apoptosis, whereas more pronounced or persistent inflammation leads to an increase in ASM mass in diseased animals. We postulate that after the ASM mass reaches a new dynamic equilibrium, as in the peripheral airways of chronically affected horses, myocytes show an elevated baseline turnover that is no longer affected by antigenic exposure. Ongoing tissue inflammation may also persist in asymptomatic heaves-affected horses, and may contribute to the ongoing proliferation and apoptosis observed at baseline. However, it is difficult to predict whether a longer exposure could have led to an alteration in this dynamic equilibrium in heaves-affected horses. Because the control horses have spent most of their lives exposed to hay, longer exposure would not likely have led to an increase in their ASM mass.

**ASM Remodeling in Central Airways: Bronchospasm Affects ASM Quantification in Equine Endobronchial Biopsies**

At baseline, ASM area percentage in endobronchial biopsies was not significantly increased in heaves-affected horses. Most



**Figure 6.** Proliferation and apoptosis in peripheral airways. PCNA<sup>+</sup> (A) and TUNEL<sup>+</sup> (B) myocytes were corrected for internal perimeter squared after 3 months of antigen avoidance (Baseline) and after 30 days of antigenic exposure. Heaves-affected horses, *n* = 6; control horses, *n* = 5. Horizontal bars represent the mean. \**P* < 0.05, \*\**P* ≤ 0.01.



**Figure 7.** Airway smooth muscle in endobronchial biopsies. (A) Percentage of ASM area (ASM area/biopsy area). (B) Myocyte density (myocyte nuclei/ASM area). (C) PCNA<sup>+</sup> myocyte density (PCNA<sup>+</sup> myocytes/ASM area). (D) Percentage of PCNA<sup>+</sup> airway myocytes. (E) TUNEL<sup>+</sup> myocytes density (TUNEL<sup>+</sup> myocytes/ASM area). (F) Percentage of TUNEL<sup>+</sup> airway myocytes. Biopsies were performed after 3 months of antigen avoidance (Baseline) and after 30 days of antigenic exposure. Heaves-affected horses,  $n = 6$  (except for B, exposure  $n = 5$ ); control horses,  $n = 5$  (except for B–D,  $n = 4$ ). Horizontal bars represent the mean. \* $P < 0.05$ .

studies of human patients found an increase in ASM area (total or percentage) (6, 8, 9, 35), although a few could not demonstrate a difference between groups (36), or else the difference was evident only in patients with severe but not intermittent asthma (9). In the present study, a significant decrease in ASM area percentage was observed after antigenic exposure. Kelly and colleagues (37) noted a similar decrease 24 hours after an allergen challenge in patients with asthma, which they attributed to a dedifferentiation to myofibroblasts. The decrease of ASM ratio after exposure could indeed represent an increase in other subepithelial components, but we also found that sampling during ongoing bronchospasm made the positioning of the biopsy forceps more difficult and the sampling more likely to be superficial, because the carinae thicken with constriction. Alternatively, the lengthening of the airways that may occur during hyperinflation (38) could increase the distance of the ASM from the carinae. Furthermore, two-dimensional morphometric analysis may not be appropriate for the quantification of equine ASM using endobronchial biopsies, regardless of clinical stage, because of the smaller size of the forceps relative to the bronchial carina. Because these results suggest that bronchoconstriction may affect morphometric measurements, a bronchodilator could be used at the time of sampling to avoid this possible confounding factor in the future.

### ASM Remodeling in Central Airways: Evidence of ASM Cell Hyperplasia in Endobronchial Biopsies

Despite the difficulties in quantifying ASM in endobronchial biopsies, data on proliferating and apoptotic myocytes were still obtained. The greater proliferation density and percentage of proliferating airway myocytes in heaves-affected horses after antigenic exposure, without a concurrent increase in apoptosis, are suggestive of *in situ* proliferation, even if no increase in ASM mass was demonstrated in these biopsies. The observation that approximately 50% of proliferating myocytes were found in clusters also supports the presence of *in situ* proliferation, possibly by the autocrine feed-forward mechanism described by Johnson and colleagues (39), or because of a localized source of growth factors. ASM proliferation was only recently shown to play a role in ASM remodeling in patients with severe, long-standing asthma (40). Previously, James and colleagues (41) found a percentage of PCNA<sup>+</sup> myocytes in a range similar to the one detected here (5–8%), but with no difference between patients with asthma and control subjects, whereas others failed to detect proliferation markers (PCNA, Ki67, or cyclin D1) in ASM bundles (9, 42, 43). However, in our study, the difference was significant only after antigenic exposure, and after subjects became symptomatic and had gone untreated for a prolonged period, which is less likely to occur in patients with asthma. The severity of disease (7) or the use of corticosteroids (42) can also account for some variations, but the processes leading to ASM hyperplasia may also differ among species (44).

This equine model of chronic asthma produced evidence of hyperplasia associated with *in situ* proliferation, as well as of possible hypertrophy in remodeled ASM. An antigenic exposure had no effect on morphometric measurements in peripheral airways and little effect on the percentage of proliferating myocytes in endobronchial biopsies in these chronically affected animals. These findings are in agreement with the concept that ASM remodeling is an early event in asthma and remains stable in terms of mass later in life (5, 45). We conclude that in peripheral airways at least, ASM remodeling reaches a new dynamic equilibrium in which the increased mass is maintained with an elevated turnover. This finding also suggests that limiting the proliferative capacities of airway myocytes may have a therapeutic value, even without directly inducing cell death.

**Author Disclosure:** J.-P.L. received lecture fees from AstraZeneca Canada for less than \$1,000, sponsored grants from Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH and the Canadian Institutes of Health Research and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada for more than \$100,001, and sponsored grants from AllerGen NCE, Inc., for \$50,001–\$100,000. J.G.M. received lecture fees from Merck and Novartis for \$1,001–\$5,000 each, and sponsored grants from Merck for \$50,001–\$100,000, and from the National Institutes of Health and the Canadian Institutes of Health Research for more than \$100,001 each. None of the other authors has a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript.

**Acknowledgments:** The authors thank Marcel Marcoux, DVM, and Fabien Relave, DVM, DACVS, for their surgical expertise, and Josiane Lavoie-Lefebvre for technical assistance.

### References

- James AL, Pare PD, Hogg JC. The mechanics of airway narrowing in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:242–246.
- Dunnill MS, Massarella GR, Anderson JA. A comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis, and in emphysema. *Thorax* 1969; 24:176–179.
- Ebina M, Takahashi T, Chiba T, Motomiya M. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma: a 3-D morphometric study. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:720–726.
- Bai TR, Cooper J, Koelmeyer T, Pare PD, Weir TD. The effect of age and duration of disease on airway structure in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:663–669.



5. James AL, Bai TR, Mauad T, Abramson MJ, Dolhnikoff M, McKay KO, Maxwell PS, Elliot JG, Green FH. Airway smooth muscle thickness in asthma is related to severity but not duration of asthma. *Eur Respir J* 2009;34:1040–1045.
6. Kaminska M, Foley S, Maghni K, Storness-Bliss C, Coxson H, Ghezzi H, Lemiere C, Olivenstein R, Ernst P, Hamid Q, Martin JG. Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:45–51.
7. Woodruff PG, Dolganov GM, Ferrando RE, Donnelly S, Hays SR, Solberg OD, Carter R, Wong HH, Cadbury PS, Fahy JV. Hyperplasia of smooth muscle in mild to moderate asthma without changes in cell size or gene expression. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:1001–1006.
8. Pepe C, Foley S, Shannon J, Lemiere C, Olivenstein R, Ernst P, Ludwig MS, Martin JG, Hamid Q. Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:544–549.
9. Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1360–1368.
10. Zuyderduyn S, Sukkar MB, Fust A, Dhaliwal S, Burgess JK. Treating asthma means treating airway smooth muscle cells. *Eur Respir J* 2008;32:265–274.
11. Camoretti-Mercado B. Targeting the airway smooth muscle for asthma treatment. *Transl Res* 2009;154:165–174.
12. Castro M, Rubin AS, Laviolette M, Fiterman J, De Andrade Lima M, Shah PL, Fiss E, Olivenstein R, Thomson NC, Niven RM, et al. Effectiveness and safety of bronchial thermoplasty in the treatment of severe asthma: a multicenter, randomized, double-blind, sham-controlled clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:116–124.
13. Hamid Q, Tulic MK. New insights into the pathophysiology of the small airways in asthma. *Ann Thorac Med* 2007;2:28–33.
14. Contoli M, Bousquet J, Fabbri LM, Magnussen H, Rabe KF, Siafakas NM, Hamid Q, Kraft M. The small airways and distal lung compartment in asthma and COPD: a time for reappraisal. *Allergy* 2010;65:141–151.
15. Robinson NE. International Workshop on Equine Chronic Airway Disease: Michigan State University 16–18 June 2000. *Equine Vet J* 2001;33:5–19.
16. Lavoie JP, Maghni K, Desnoyers M, Taha R, Martin JG, Hamid QA. Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1410–1413.
17. Horohov DW, Beadle RE, Mouch S, Pourciau SS. Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol* 2005;108:237–245.
18. Herszberg B, Ramos-Barbon D, Tamaoka M, Martin JG, Lavoie JP. Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:382–388.
19. Range F, Mundhenk L, Gruber AD. A soluble secreted glycoprotein (eCLCA1) is overexpressed due to goblet cell hyperplasia and metaplasia in horses with recurrent airway obstruction. *Vet Pathol* 2007;44:901–911.
20. Frazer RS, Colman N, Muller NL, Paré PD. Inhalation of organic dust. In: Frazer RS, Paré PD, editors. *Diagnosis of diseases of the chest*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1999. pp. 2361–2385.
21. Lavoie JP. Recurrent airway obstruction (heaves) and summer-pasture-associated obstructive pulmonary disease. In: McGorum B, Dixon, PM, Robinson NE, Schumacher J, editors. *Equine respiratory medicine and surgery*. Philadelphia: Elsevier; 2007. pp. 565–590.
22. Jean D, Vrins A, Lavoie JP. Monthly, daily, and circadian variations of measurements of pulmonary mechanics in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res* 1999;60:1341–1346.
23. Relave F, David F, Leclere M, Alexander K, Bussières G, Lavoie JP, Marcoux M. Evaluation of a thoracoscopic technique using ligating loops to obtain large lung biopsies in standing healthy and heaves-affected horses. *Vet Surg* 2008;37:232–240.
24. James AL, Hogg JC, Dunn LA, Pare PD. The use of the internal perimeter to compare airway size and to calculate smooth muscle shortening. *Am Rev Respir Dis* 1988;138:136–139.
25. Holcombe SJ, Jackson C, Gerber V, Jefcoat A, Berney C, Eberhardt S, Robinson NE. Stabling is associated with airway inflammation in young Arabian horses. *Equine Vet J* 2001;33:244–249.
26. Johnson PR, Roth M, Tamm M, Hughes M, Ge Q, King G, Burgess JK, Black JL. Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:474–477.
27. Zacour ME, Martin JG. Enhanced growth response of airway smooth muscle in inbred rats with airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15:590–599.
28. Lambert RK, Wiggs BR, Kuwano K, Hogg JC, Pare PD. Functional significance of increased airway smooth muscle in asthma and COPD. *J Appl Physiol* 1993;74:2771–2781.
29. Regamey N, Ochs M, Hilliard TN, Muhlfeld C, Cornish N, Fleming L, Saglani S, Alton EW, Bush A, Jeffery PK, Davies JC. Increased airway smooth muscle mass in children with asthma, cystic fibrosis, and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:837–843.
30. Hossain S. Quantitative measurement of bronchial muscle in men with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1973;107:99–109.
31. Munakata M. Airway remodeling and airway smooth muscle in asthma. *Allergol Int* 2006;55:235–243.
32. Hirst SJ, Martin JG, Bonacci JV, Chan V, Fixman ED, Hamid QA, Herszberg B, Lavoie JP, McVicker CG, Moir LM, et al. Proliferative aspects of airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:S2–S17.
33. Pini L, Hamid Q, Shannon J, Lemelin L, Olivenstein R, Ernst P, Lemiere C, Martin JG, Ludwig MS. Differences in proteoglycan deposition in the airways of moderate and severe asthmatics. *Eur Respir J* 2007;29:71–77.
34. James AL. Remodelling of airway smooth muscle in asthma: what sort do you have? *Clin Exp Allergy* 2005;35:703–707.
35. Tillie-Leblond I, de Blic J, Jaubert F, Wallaert B, Scheinmann P, Gosset P. Airway remodeling is correlated with obstruction in children with severe asthma. *Allergy* 2008;63:533–541.
36. Labonte I, Laviolette M, Olivenstein R, Chakir J, Boulet LP, Hamid Q. Quality of bronchial biopsies for morphology study and cell sampling: a comparison of asthmatic and healthy subjects. *Can Respir J* 2008;15:431–435.
37. Kelly MM, O'Connor TM, Leigh R, Otis J, Gwozd C, Gauvreau GM, Gauldie J, O'Byrne PM. Effects of budesonide and formoterol on allergen-induced airway responses, inflammation, and airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:349–356.
38. Sasaki F, Saitoh Y, Verburg L, Okazawa M. Airway wall dimensions during carbachol-induced bronchoconstriction in rabbits. *J Appl Physiol* 1996;81:1578–1583.
39. Johnson PR, Burgess JK, Underwood PA, Au W, Poniris MH, Tamm M, Ge Q, Roth M, Black JL. Extracellular matrix proteins modulate asthmatic airway smooth muscle cell proliferation via an autocrine mechanism. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:690–696.
40. Hassan M, Jo T, Risse PA, Tolloczko B, Lemiere C, Olivenstein R, Hamid Q, Martin JG. Airway smooth muscle remodeling is a dynamic process in severe long-standing asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:1037–1045.
41. James AL, Carroll M, Dromey J, Down K, Elliot J, Mutavdzic S, Carroll N. *In-situ* proliferation of inflammatory cells and smooth muscle cells in patients with and without asthma. *Respirology* 2002;7:A11.
42. Ward JE, Harris T, Bamford T, Mast A, Pain MC, Robertson C, Smallwood D, Tran T, Wilson J, Stewart AG. Proliferation is not increased in airway myofibroblasts isolated from asthmatics. *Eur Respir J* 2008;32:362–371.
43. Bamford TL, Rolland J, Wilson JW, Smallwood DM, Pain MCF, Robertson C, Stewart AG. Cellular localisation of cyclin D1 in non-asthmatic controls and steroid resistant asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:A540.
44. Martin JG, Ramos-Barbon D. Airway smooth muscle growth from the perspective of animal models. *Respir Physiol Neurobiol* 2003;137:251–261.
45. Bai TR. Evidence for airway remodeling in chronic asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010;10:82–86.



**Article #8*****Genomic and non-genomic effects of dexamethasone on equine peripheral blood neutrophils***

Lecoq L, Vincent P, **Lavoie-Lamoureux A**, Beauchamp G et Lavoie J-P.

**Contributions originales**

*J'ai participé à cet article à titre de mentor au laboratoire et dans l'analyse des résultats.  
J'ai aussi participé à la rédaction de l'article.*

Publié dans le *Vet Immunol Immunopathol* 2009;128:126-131.



Contents lists available at ScienceDirect

# Veterinary Immunology and Immunopathology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetimm](http://www.elsevier.com/locate/vetimm)



Research paper

## Genomic and non-genomic effects of dexamethasone on equine peripheral blood neutrophils<sup>☆</sup>

L. Lecoq<sup>a</sup>, P. Vincent<sup>b</sup>, A. Lavoie-Lamoureux<sup>a</sup>, J.-P. Lavoie<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

<sup>b</sup> Department of Biomedicine, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

IL-8  
Glucocorticoids  
RU486  
RT-PCR  
Flow-cytometry

### ABSTRACT

**Background:** Glucocorticoids have potent anti-inflammatory properties and are frequently used for the treatment of domestic animal species, including horses. They induce a down-regulation of multiple inflammatory pathways through both genomic and non-genomic effects. Currently, little is known on the effects of glucocorticoids on equine peripheral blood neutrophils.

**Hypothesis:** Dexamethasone (DEX), a potent synthetic glucocorticoid, inhibits the functions of equine peripheral blood neutrophils through both genomic and non-genomic effects.

**Animals:** Six healthy adult mixed breed female horses.

**Methods:** To assess the genomic effects of DEX, peripheral blood neutrophils were isolated using a gradient technique and incubated 6 h with 100 ng/ml LPS and 10<sup>-6</sup> M DEX alone, or combined with the glucocorticoid receptor (GR) inhibitor RU486 (10<sup>-5</sup> M). Messenger RNA for IL-8, TNF-α and TLR-4 were measured using real-time RT-PCR. The non-genomic effects of DEX were studied in neutrophils incubated with 5 μM dichlorodihydrofluorescein (DCF) and 10<sup>-6</sup> M DEX 5, 10 and 15 min prior to being stimulated with 5 ng/ml phorbol myristate acetate. Neutrophils were similarly co-incubated with DEX (10<sup>-6</sup> M, 15 min) and RU486 (10<sup>-5</sup> M) to evaluate the contribution of the GR to these effects. The oxidation of DCF was studied using flow-cytometry.

**Results:** Neutrophils stimulation with LPS resulted in a significant increase in IL-8, TNF-α and TLR-4 mRNA expressions ( $p < 0.0001$ ); incubation with DEX significantly down-regulated this process ( $p < 0.0001$ ). DEX significantly reduced oxidation of DCF after 10 and 15 min of incubation ( $p < 0.0001$ ). Those effects were mediated through the GRs.

**Conclusion:** DEX exerts anti-inflammatory effects on equine peripheral blood neutrophils through both genomic and non-genomic pathways.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Glucocorticoids (GC) are potent anti-inflammatory drugs used for the treatment of a number of human and

domestic animal diseases. Their anti-inflammatory effects were believed to occur primarily through activation the glucocorticoid receptor (GR) present in the cell cytoplasm, which, after translocation to the nucleus, interferes directly with gene transcription. This pathway is called “genomic” (Bamberger et al., 1996). The effects of GC may also be mediated without involvement of a GR, either through membrane-bound receptors, or as direct alteration of the properties of the cell membranes. Recently, GC have also been shown to inhibit inflammation through non-genomic pathways, which vary according to the cell

<sup>☆</sup> Abstract presented at the 24th Annual ACVIM Forum 2006, Louisville, KY.

\* Corresponding author at: Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6 Canada.

Tel. [REDACTED]

type (Stellato, 2004). Compared to the genomic effects, they are faster and do not require gene interaction. There is still a great controversy on the receptors used in this pathway (Losel et al., 2003).

In horses, GC are commonly used for the treatment of inflammatory diseases such as heaves and osteoarthritis. Even though GC are potent drugs for the control of clinical signs in heaves, airway neutrophilia, a characteristic finding, often persists after drug administration (Cornelisse et al., 2004; Lavoie et al., 2002; Robinson et al., 2002; Rush et al., 1998a,b). It has been suggested that this apparent dissociation between the improvement of clinical signs and persistence of airway neutrophilia may be due to lesser effects of GC on this cell population (Schleimer, 2004). An increase in neutrophil half-life due to reduced apoptosis of neutrophils caused by GC may also contribute to this observation (Cox and Austin, 1997; Schleimer, 2004).

In heaves, dexamethasone (DEX), a potent GC drug, reduces airway obstruction within 3–7 days of drug administration (Picandet et al., 2003; Robinson et al., 2002). This delay of response suggests that GC exert their effects in this condition primarily through inhibition of the genomic pathways. Interestingly, however, Cornelisse et al. (2004) recently demonstrated that DEX causes significant improvement in lung function in heaves affected horses within 2 h of administration. A similar finding as also been observed in a model of allergic asthma in the guinea pig, where inhalation of budesonide before a challenge with ovalbumin attenuated the airway obstruction within 10 min of drug administration. Combined, these results suggest that the non-genomic effects of GC may be relevant to the treatment of airway diseases.

Because a better understanding of the molecular signaling cascade associated with disease may lead to the development of targeted therapies, we evaluated the effects of DEX on genomic and non-genomic pathways on equine peripheral blood neutrophils and we hypothesized that if DEX had an activity on neutrophils, it would be mediated through the classic GR.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

All experimental procedures were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council of Animal Care and were approved by the Animal Care Committee of the Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal. Six healthy adult mixed breed female horses, weighing 400–500 kg (age  $8 \pm 2$  years), were used for the study. The health status of each animal was assessed by a complete physical examination on the day of blood sampling. Medical records were also reviewed for diseases or drug administration within the last 2 weeks.

### 2.2. Sample collection

Peripheral blood was collected by jugular venipuncture into sterile lithium heparin Vacutainers (Becton, Dickinson Vacutainers, CA) and kept at room temperature until processed, within 30 min.

### 2.3. Experiment 1: evaluation of the genomic effects of DEX on equine peripheral blood neutrophils

#### 2.3.1. Neutrophil isolation from blood

Equine peripheral blood neutrophils were isolated using a Ficoll-Hypaque separation technique (Lympholyte-poly, Cedarlane, CA) according to the manufacturer's instructions. The purified neutrophils were then suspended in RPMI 1640 (GIBCO, CA) and supplemented with 10% low endotoxin fetal bovine serum, 2 mmol/l of  $\iota$ -glutamine, 100 U/ml of penicillin and 100  $\mu$ g/ml of streptomycin (Sigma–Aldrich, CA). Total cell counts were determined using a hemocytometer and viability was assessed by the Trypan blue dye exclusion test (Trypan Blue, GIBCO, CA).

Aliquots of  $5 \times 10^6$  neutrophils/ml were incubated at 5% CO<sub>2</sub> and 37 °C with 100 ng/ml of lipopolysaccharides (LPSs from E.coli 0111:B4) (Sigma–Aldrich, CA) and  $10^{-6}$  M DEX (Vetoquinol, CA) alone (Chang et al., 2004; Cox, 1995; Garcia et al., 2003; Wertheim et al., 1993) or combined with  $10^{-5}$  M of the GR inhibitor RU486 (Mifepristone, Sigma–Aldrich, CA). Neutrophils incubated in RPMI alone and neutrophils stimulated with LPS alone were used as negative and positive controls, respectively. After 6 h of stimulation, the cells were harvested, suspended in TriZol<sup>®</sup> Reagent (GIBCO, CA) and stored at  $-80$  °C until further analyses.

#### 2.3.2. Reverse transcription and real-time polymerase chain reaction (PCR)

Total cellular RNA was extracted from TriZol<sup>®</sup> Reagent according to the manufacturer's instructions. The concentration and the purity of RNA were determined by spectrophotometry. Reverse transcription was performed according to the manufacturer instructions. The cDNA strands were generated using oligo(dT) primers (Invitrogen Corporation, CA) and AMV reverse transcriptase (Roche, USA).

Quantitative real-time PCR reactions were performed using 0.5–1  $\mu$ g of total RNA as a template, 10  $\mu$ l Sybergreen (Qiagen, CA) and 5  $\mu$ M of each primer in a 20  $\mu$ l solution using a Rotor-Gene system (Corbett Research). The sequences of the primers used for the amplification of GAPDH were reported previously by Franchini et al. (1998), for TNF- $\alpha$  and IL-8 by Joubert et al. (2001) and for TLR-4 the sequences were, as follows, 5'-TGGGACTCTGATCCCAGC-CAT-3' and 5'-AGGTCCAGTTCCTTGGTTGATGTG-3'. All the primers were designed to amplify across exon–intron boundaries to allow the discrimination of amplified genomic DNA and cDNA sequences. All concentrations of target gene cDNA were calculated relatively to their respective standard curves. GAPDH was used as a house-keeping gene (sequences: 5'-AAGTGGATATTGTCGCCAT-CAAT-3' and 5'-ACTTGCCATGGGTGGAATC-3').

### 2.4. Experiment 2: evaluation of the non-genomic effects of DEX on equine peripheral blood neutrophils

The non-genomic effects were evaluated with observation of the respiratory burst of the equine peripheral blood neutrophils of six healthy horses.

Peripheral blood leukocyte suspension was obtained following lyses of red blood cells by ammonium chloride (Vuorte et al., 2001). Briefly, the blood was left at room temperature for 30 min and the supernatant was collected and centrifuged for 7 min at  $900 \times g$ . Ammonium chloride 0.83% (Sigma–Aldrich, CA) was added to the pelleted cells and vortexed gently at room temperature for 5 min. The procedure was repeated twice. The cells were then centrifuged 15 min at  $200 \times g$ , in order to deplete the platelets from the suspension. The leukocytes were then suspended in BSS<sup>2+</sup> (PBS 1X (GIBCO, CA), 5 mM glucose (GIBCO, CA), 0.3 mM CaCl<sub>2</sub> (Fisher Scientific, CA) and 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Fisher Scientific, CA)). The cells viability was assessed with the Trypan blue exclusion test and total cell counts were determined using a hemocytometer.

For each assay,  $5 \times 10^6$  peripheral blood leukocytes/ml were incubated in a 37 °C water-bath with gentle agitation. The cell stimulations were performed into 2 ml polypropylene tubes (Progene, CA). Total incubation period of the cells was 30 min. Immediately prior to starting the incubation period, 5  $\mu$ M dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF) (Invitrogen, CA) and 100  $\mu$ M sodium azide

(Sigma–Aldrich, CA) were added in all the groups. The cells were incubated with  $10^{-6}$  M DEX for 5 (DEX5), 10 (DEX10) or 15 (DEX15) min then, 5 ng/ml phorbol myristate acetate (PMA) (Sigma–Aldrich, CA) was added to the tubes for the last 15 min of incubation. One of the DEX15 group was incubated simultaneously with  $10^{-5}$  M RU486. Aliquots of 200  $\mu$ l of cell suspensions were placed on ice to stop the reaction and analyzed as soon as possible by flow-cytometry (within 30 min of acquisition). For each test, aliquots of 200  $\mu$ l were retrieved prior to the addition of PMA, in order to determine the auto-fluorescence of the cells (negative control). Cells incubated with the DCF and PMA without DEX were used as a positive control.

Flow-cytometry analysis was performed using a FACS Vantage SE (Becton Dickinson) interfaced with a Macintosh computer. Data were collected from 10,000 events gated on granulocytes and analyzed using the Cell Quest Pro software. Discrete cell populations were recognized on the basis of Forward scatter (FSC)/Side scatter (SSC) properties and were electronically sorted to allow light microscopic evaluation of the cells.

Actinomycin D (AMD) (Invitrogen, CA), an inhibitor of the genomic transcription, was co-incubated at the concentration of 10  $\mu$ M (Wang et al., 2007) with DEX15 in two horses.

### 2.5. Statistical analysis

Data were statistically analyzed using a repeated measure linear model to test for the effect of treatments between the different groups. Differences between groups were considered significant when *p* values were equal or less than 0.05.

## 3. Results

### 3.1. Experiment 1

The purity and viability of the neutrophils isolated from blood were >96% and >98%, respectively. LPS significantly stimulated TNF- $\alpha$ , IL-8 and TLR-4 mRNA expression by peripheral blood neutrophils (Fig. 1). This expression was significantly down-regulated when  $10^{-6}$  M DEX was added to the culture medium and then reversed by the GR inhibitor RU486.

### 3.2. Experiment 2

Cell viability was >94% prior to incubation of the cells with PMA and DEX. Different populations of cells were electronically sorted on the FSC/SSC cytograms. Two discrete cell populations were recognized. Light microscopic evaluation of the electronically sorted cells gated on granulocytes demonstrated >98% neutrophils.

DEX  $10^{-6}$  M inhibited the PMA-induced respiratory burst of equine peripheral blood neutrophils (Fig. 2). The inhibition was time-dependant starting at 10 min of incubation with DEX. This effect was prevented by RU486, but not by actinomycin D (Fig. 3), indicating that the process was mediated through the classic GR, but did not involve the repression of gene transcription.

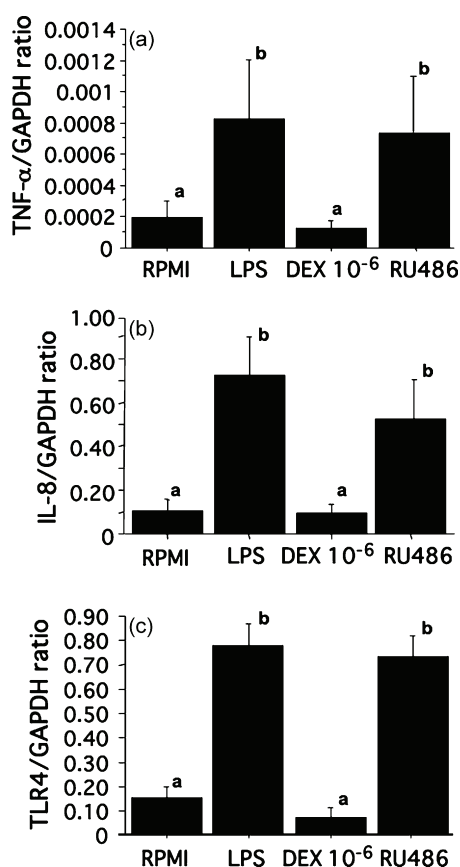


Fig. 1. (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-8 and (C) TLR-4 mRNA expression in peripheral blood neutrophils of healthy horses ( $n=6$ ) stimulated with LPS and treated with DEX  $10^{-6}$  M and an inhibitor of the GR, RU486. The expression of mRNA was quantified following reverse transcription into cDNA and real-time PCR. Gene expression was corrected using the house-keeping gene GAPDH. Bars represent the mean  $\pm$  S.E.M. Different letters indicate statistically significant difference between groups ( $p < 0.05$ ).

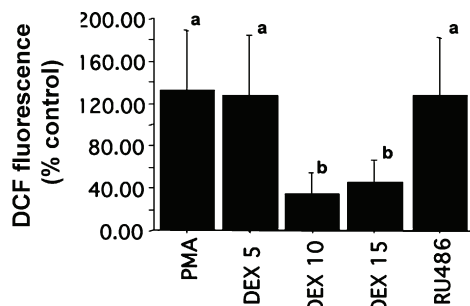


Fig. 2. Fluorescence intensity of neutrophils of healthy horses ( $n = 6$ ) stimulated with PMA and co-incubated during 5, 10 and 15 min with DEX or 15 min with DEX and RU486. Cells were pre-incubated with DCF (dichlorofluorescein). Bars represent the mean  $\pm$  S.E.M. Letters differing between groups indicate a statistically significant difference ( $p \leq 0.05$ ). When one letter is common between two groups, the difference is not statistically significant.

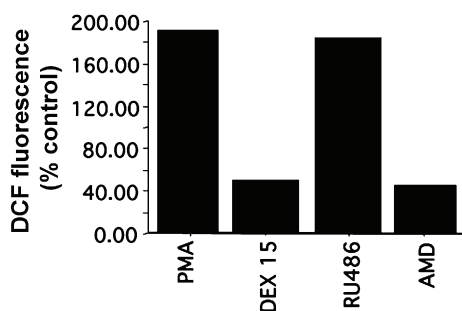


Fig. 3. Fluorescence of neutrophils of healthy horses ( $n = 2$ ) stimulated with PMA and co-incubated 15 minutes with DEX alone, DEX and RU486 or DEX and AMD. Cells were pre-incubated with DCF (dichlorofluorescein).

#### 4. Discussion

Neutrophils play a key role in host defense against invading organisms. They are the predominant cell types involved in the cellular phase of acute inflammation (Cassatella, 1999). Neutrophils were first believed to be terminally differentiated cells. Since then, they were shown to have the capacity to synthesize a large number of pro- and anti-inflammatory cytokines, chemokines and growth factors, in response to a great variety of stimuli (Sibille and Marchandise, 1993; Sibille and Reynolds, 1990). They are also pivotal cells for development and maintenance of chronic inflammatory responses. When activated, neutrophils release proteases, superoxide and other reactive oxygen species, along with the various cytokines they produce. This, in turn, leads to massive damages to the surrounding tissues. GC are powerful drugs in the treatment of chronic inflammatory diseases. Although widely used, their anti-inflammatory and immunosuppressive mode of action, especially on neutrophils, remains poorly understood (Goulding et al., 1998). In the present study, we demonstrated that DEX is a fast and potent inhibitor of activated equine peripheral blood neutrophils. These effects are mediated through both genomic and non-genomic pathways and appear to be mediated through the classic GR.

It is generally accepted that genomic effects of GC require binding to a specific receptor in the cytosol, the GR, that allows the translocation of the GC-GR complex to the nucleus (Beato and Klug, 2000). Once in the nucleus, the complex interacts with specific DNA sequences on target genes, either directly or via alteration of the transcription machinery (Bamberger et al., 1996). This process is long, hours to days, because it requires mRNA and protein synthesis. It is sensitive to inhibitors of transcription and translation such as actinomycin D or cycloheximide (Losel et al., 2003) or by molecules such as mifepristone (RU486) that prevent the translocation of the GC-GR complex to the nucleus (Honer et al., 2003; Mahajan and London, 1997).

It was previously believed that equine neutrophils may be less sensitive to GC than other cell types (Guelfi and Kraouchi, 1989). Recent studies have demonstrated that GC could exert powerful inhibitory effects on neutrophil functions, both in vitro and in vivo (Takahira et al., 2001) in other species. They were shown to down-regulate the production of several cytokines and adhesion molecules in rats (al-Mokdad et al., 1998), humans and cattle (Chang et al., 2004; Weber et al., 2004), but very little information is available on their actions on equine neutrophils. We demonstrated here that DEX down-regulated production of mRNA in equine peripheral blood neutrophils. Our findings are in agreement and extend the previous finding that DEX inhibits IL-8 production in human peripheral blood neutrophils (Wertheim et al., 1993). Down-regulation of IL-8, TNF- $\alpha$  and TLR-4 mRNA was obliterated by RU486, suggesting that the GC acted through a classic genomic effect.

More recently, another mechanism of action of GC has been studied, the non-genomic pathway. Compare to the genomic pathway, it is a faster process requiring only a few seconds to a few minutes to take place and does not require gene expression.

There are controversies in the signaling pathways involved in these responses and whether they require the activation of the classic GR or not. Evidence exists that the non-genomic pathway could act either through classic genomic GR or through ill defined "non-classic" specific receptors. It has been suggested that these receptors may be bound to the cytoplasmic membrane, activate different intra-cellular pathways than those of the genomic pathway (for the classic GR) or use totally different signaling pathways. Alternatively, GC may also interact directly with cellular membranes at high concentrations without activation of a specific receptor (Cato et al., 2002; Chen and Qiu, 1999; Losel et al., 2003; Wang et al., 2007).

To evaluate the possible contribution of a non-genomic inhibition of neutrophil activation by GC, we studied the oxidative burst of neutrophils using PMA, as reported by Roldal et al. (1998). Flow-cytometry allows rapid evaluation of a large number of cells on a cell-by-cell basis as well as identification of cell subpopulation without prior cell separation, which is well suited for the study of the non-genomic pathways (Fearon and Collins, 1983; Roldal et al., 1998). The oxidative burst response of equine peripheral blood neutrophils was strongly inhibited by DEX after 10 and 15 min of incubation. We concluded that this inhibition was independent of gene regulation as it was



not blocked by actinomycin D, a potent inhibitor of gene transcription (Koukouritaki et al., 1996; Wang et al., 2007). To further characterize the pathway involved in the non-genomic inhibition of the respiratory burst by DEX, neutrophils were co-incubated with RU486. This resulted in inhibition of the effects of DEX on equine neutrophils, showing that they were mediated through the classic GR and that a functional GR was necessary for the inhibition of the respiratory burst of equine peripheral blood neutrophils. Several studies corroborate our findings and have involved activation of different signaling cascades by the GR in a non-genomic manner (Losel and Wehling, 2003; Wang et al., 2007).

Heaves is a common respiratory condition of older horses in the northern hemisphere (Robinson, 2001). DEX is one of the most frequently used drugs to treat those patients. We demonstrated here that DEX is a powerful inhibitor of IL-8, TNF- $\alpha$  and TLR-4, which have been shown to be upregulated in heaves (Berndt et al., 2007; Franchini et al., 1998; Giguere et al., 2002). In agreement with our previous results (Joubert et al., 2001), we showed that neutrophils from healthy horses are able to express *de novo* mRNA for IL-8 and TNF- $\alpha$ . We now also showed that LPS promotes the expression of mRNA of its own receptor, TLR-4. Systemic administration and inhalation of GC drugs are associated with adverse effects such as adrenocortical suppression, muscle waisting, hyperglycemia, polyuria, immunosuppression and laminitis (Cohen and Carter, 1992; Eustace and Redden, 1990; Rush et al., 1998c). Side effects of GC are thought to be related to gene expression mediated by the glucocorticoids (Clark, 2007). Non-genomic action of glucocorticoids, if it can be uncoupled, could be a way to bypass those side effects (Catley, 2007).

### Conflict of interest

None.

### Acknowledgments

This work was financially supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and by the Fonds du Centenaire.

The authors gratefully acknowledge the help of Guy Beauchamp for the statistical analysis as well as Hong Huang and Emma Hamilton for their technical assistance.

### References

- al-Mokdad, M., Shibata, F., Takano, K., Nakagawa, H., 1998. Differential production of chemokines by phagocytosing rat neutrophils and macrophages. *Inflammation* 22, 145–159.
- Bamberger, C.M., Schulte, H.M., Chrousos, G.P., 1996. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr. Rev.* 17, 245–261.
- Beato, M., Klug, J., 2000. Steroid hormone receptors: an update. *Hum. Reprod. Update* 6, 225–236.
- Berndt, A., Derksen, F.J., Venta, P.J., Ewart, S., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Robinson, N.E., 2007. Elevated amount of Toll-like receptor 4 mRNA in bronchial epithelial cells is associated with airway inflammation in horses with recurrent airway obstruction. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 292, L936–943.
- Cassatella, M.A., 1999. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv. Immunol.* 73, 369–509.
- Catley, M., 2007. Dissociated steroids. *Sci. World J.* 7, 421–430.
- Cato, A.C., Nestl, A., Mink, S., 2002. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci. STKE* 2002, RE9.
- Chang, L.C., Madsen, S.A., Toelboell, T., Weber, P.S., Burton, J.L., 2004. Effects of glucocorticoids on Fas gene expression in bovine blood neutrophils. *J. Endocrinol.* 183, 569–583.
- Chen, Y.Z., Qiu, J., 1999. Pleiotropic signaling pathways in rapid, non-genomic action of glucocorticoid. *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* 2, 145–149.
- Clark, A.R., 2007. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 275, 79–97.
- Cohen, N.D., Carter, G.K., 1992. Steroid hepatopathy in a horse with glucocorticoid-induced hyperadrenocorticism. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 200, 1682–1684.
- Cornelisse, C.J., Robinson, N.E., Berney, C.E., Kobe, C.A., Boruta, D.T., Derksen, F.J., 2004. Efficacy of oral and intravenous dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction. *Equine Vet. J.* 36, 426–430.
- Cox, G., 1995. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J. Immunol.* 154, 4719–4725.
- Cox, G., Austin, R.C., 1997. Dexamethasone-induced suppression of apoptosis in human neutrophils requires continuous stimulation of new protein synthesis. *J. Leukoc. Biol.* 61, 224–230.
- Eustace, R.A., Redden, R.R., 1990. Iatrogenic laminitis. *Vet. Rec.* 126, 586.
- Fearon, D.T., Collins, L.A., 1983. Increased expression of C3b receptors on polymorphonuclear leukocytes induced by chemotactic factors and by purification procedures. *J. Immunol.* 130, 370–375.
- Franchini, M., Gilli, U., Akens, M.K., Fellenberg, R.V., Bracher, V., 1998. The role of neutrophil chemotactic cytokines in the pathogenesis of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66, 53–65.
- Garcia, C., de Oliveira, M.C., Verlengia, R., Curi, R., Pithon-Curi, T.C., 2003. Effect of dexamethasone on neutrophil metabolism. *Cell Biochem. Funct.* 21, 105–111.
- Giguere, S., Viel, L., Lee, E., MacKay, R.J., Hernandez, J., Franchini, M., 2002. Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 85, 147–158.
- Goulding, N.J., Euzger, H.S., Butt, S.K., Perretti, M., 1998. Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation. *Inflamm. Res.* 47 (Suppl. 3), S158–165.
- Guelfi, J.F., Kraouchi, D.E., 1989. The effect of a single dose of dexamethasone on the production of superoxide anion and on the chemotaxis of blood polynuclear neutrophils in the horse. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 12, 105–113.
- Honer, C., Nam, K., Fink, C., Marshall, P., Ksander, G., Chatelain, R.E., Cornell, W., Steele, R., Schweitzer, R., Schumacher, C., 2003. Glucocorticoid receptor antagonism by cyproterone acetate and RU486. *Mol. Pharmacol.* 63, 1012–1020.
- Joubert, P., Silversides, D.W., Lavoie, J.P., 2001. 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.* 33, 730–733.
- Koukouritaki, S.B., Theodoropoulos, P.A., Margioris, A.N., Gravanis, A., Stournaras, C., 1996. Dexamethasone alters rapidly actin polymerization dynamics in human endometrial cells: evidence for nongenomic actions involving cAMP turnover. *J. Cell. Biochem.* 62, 251–261.
- Lavoie, J.P., Leguillette, R., Pasloske, K., Charette, L., Sawyer, N., Guay, D., Murphy, T., Hickey, G.J., 2002. 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.* 63, 579–585.
- Losel, R., Wehling, M., 2003. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4, 46–56.
- Losel, R.M., Falkenstein, E., Feuring, M., Schultz, A., Tillmann, H.C., Rossol-Haseroth, K., Wehling, M., 2003. Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol. Rev.* 83, 965–1016.
- Mahajan, D.K., London, S.N., 1997. Mifepristone (RU486): a review. *Fertil. Steril.* 68, 967–976.
- Picandet, V., Leguillette, R., Lavoie, J.P., 2003. Comparison of efficacy and tolerability of isoflupredone and dexamethasone in the treatment of horses affected with recurrent airway obstruction ('heaves'). *Equine Vet. J.* 35, 419–424.
- Raidal, S.L., Bailey, G.D., Love, D.N., 1998. Flow cytometric determination of oxidative burst activity of equine peripheral blood and bronchoalveolar lavage-derived leucocytes. *Vet. J.* 156, 117–126.
- Robinson, N.E., 2001. International workshop on equine chronic airway disease. Michigan State University 16–18 June 2000. *Equine Vet. J.* 33, 5–19.

- Robinson, N.E., Jackson, C., Jefcoat, A., Berney, C., Peroni, D., Derksen, F.J., 2002. Efficacy of three corticosteroids for the treatment of heaves. *Equine Vet. J.* 34, 17–22.
- Rush, B.R., Flaminio, M.J., Matson, C.J., Hakala, J.E., Shuman, W., 1998a. 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.* 59, 1033–1038.
- Rush, B.R., Raub, E.S., Rhoads, W.S., Flaminio, M.J., Matson, C.J., Hakala, J.E., Gillespie, J.R., 1998b. Pulmonary function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *Am. J. Vet. Res.* 59, 1039–1043.
- Rush, B.R., Worster, A.A., Flaminio, M.J., Matson, C.J., Hakala, J.E., 1998c. Alteration in adrenocortical function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *Am. J. Vet. Res.* 59, 1044–1047.
- Schleimer, R.P., 2004. Glucocorticoids suppress inflammation but spare innate immune responses in airway epithelium. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1, 222–230.
- Sibille, Y., Marchandise, F.X., 1993. Pulmonary immune cells in health and disease: polymorphonuclear neutrophils. *Eur. Respir. J.* 6, 1529–1543.
- Sibille, Y., Reynolds, H.Y., 1990. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141, 471–501.
- Stellato, C., 2004. Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1, 255–263.
- Takahira, R., Yonemura, K., Fujise, Y., Hishida, A., 2001. Dexamethasone attenuates neutrophil infiltration in the rat kidney in ischemia/reperfusion injury: the possible role of nitroxyl. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 809–815.
- Vuorte, J., Jansson, S.E., Repo, H., 2001. Evaluation of red blood cell lysing solutions in the study of neutrophil oxidative burst by the DCFH assay. *Cytometry* 43, 290–296.
- Wang, D., Zhang, H., Lang, F., Yun, C.C., 2007. Acute activation of NHE3 by dexamethasone correlates with activation of SGK1 and requires a functional glucocorticoid receptor. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 292, C396–404.
- Weber, P.S., Toelboell, T., Chang, L.C., Tirrell, J.D., Saama, P.M., Smith, G.W., Burton, J.L., 2004. Mechanisms of glucocorticoid-induced down-regulation of neutrophil L-selectin in cattle: evidence for effects at the gene-expression level and primarily on blood neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 75, 815–827.
- Wertheim, W.A., Kunkel, S.L., Standiford, T.J., Burdick, M.D., Becker, F.S., Wilke, C.A., Gilbert, A.R., Strieter, R.M., 1993. Regulation of neutrophil-derived IL-8: the role of prostaglandin E2, dexamethasone, and IL-4. *J. Immunol.* 151, 2166–2175.

**Article #9**

***IL-4 stimulates the expression of CXCL-8, E-selectin, VEGF, and inducible nitric oxide synthase mRNA by equine pulmonary artery endothelial cells***

Huang H, Lavoie-Lamoureux A, Moran K, et Lavoie JP

**Contributions originales**

*J'ai participé à cet article à titre de mentor au laboratoire et dans l'analyse des résultats.*

*J'ai aussi participé à la rédaction de l'article*

Publié dans *l'Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L1147-1154.



# IL-4 stimulates the expression of CXCL-8, E-selectin, VEGF, and inducible nitric oxide synthase mRNA by equine pulmonary artery endothelial cells

Hong Huang, Anouk Lavoie-Lamoureux, Kantuta Moran and Jean-Pierre Lavoie  
*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:1147-1154, 2007. doi:10.1152/ajplung.00294.2006

**You might find this additional information useful...**

---

This article cites 64 articles, 24 of which you can access free at:

<http://ajplung.physiology.org/cgi/content/full/292/5/L1147#BIBL>

Medline items on this article's topics can be found at <http://highwire.stanford.edu/lists/artbytopic.dtl> on the following topics:

- Biochemistry .. Selectins
- Physiology .. Neutrophils
- Developmental Biology .. Vascular Endothelial Growth Factor
- Oncology .. CD62E
- Oncology .. Dexamethasone
- Physiology .. Horses

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://ajplung.physiology.org/cgi/content/full/292/5/L1147>

Additional material and information about *AJP - Lung Cellular and Molecular Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajplung>

---

This information is current as of May 16, 2007 .

## IL-4 stimulates the expression of CXCL-8, E-selectin, VEGF, and inducible nitric oxide synthase mRNA by equine pulmonary artery endothelial cells

Hong Huang, Anouk Lavoie-Lamoureux, Kantuta Moran, and Jean-Pierre Lavoie

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

Submitted 4 August 2006; accepted in final form 26 January 2007

**Huang H, Lavoie-Lamoureux A, Moran K, Lavoie J-P.** IL-4 stimulates the expression of CXCL-8, E-selectin, VEGF, and inducible nitric oxide synthase mRNA by equine pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L1147–L1154, 2007; doi:10.1152/ajplung.00294.2006.—Little is known concerning the possible contribution of T helper 2 (Th2)-type cytokines to the recruitment of neutrophils into the lung tissue. In the present study, endothelial cells from equine pulmonary arteries were cultured in the presence of recombinant equine (re) IL-4 and reIL-5, and the cytokine mRNA expression of molecules implicated in the chemotaxis and migration of neutrophils was studied using real-time RT-PCR. The functional response of reIL-4-induced endothelial cell stimulation on neutrophil migration was also studied using a chemotaxis chamber. ReIL-4 either increased the expression of CXCL-8, E-selectin, vascular endothelial growth factor (VEGF), and inducible nitric oxide synthase (iNOS), or potentiated the effects of lipopolysaccharide (LPS) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) on CXCL-8. Supernatants collected from cultured endothelial cells stimulated with reIL-4 significantly promoted neutrophil migration in a dose-dependent manner. Dexamethasone (DXM) decreased the expression of CXCL-8, VEGF, and iNOS induced by reIL-4, while 1400W dihydrochloride (1400W), a selective inhibitor of iNOS, decreased the expression of E-selectin, VEGF, and iNOS. DXM and 1400W attenuated the mRNA expression of E-selectin and iNOS induced by the costimulation of reIL-4, reTNF- $\alpha$ , and LPS. Neither equine nor human recombinant IL-5 influenced the mRNA expression of CXCL-8, E-selectin, or VEGF. These findings suggest that Th2-type cytokines may contribute to pulmonary neutrophilia during allergic inflammation by the increased expression of neutrophil chemokines and adhesion molecules by endothelial cells. DXM and the iNOS inhibitors may decrease pulmonary neutrophilia due, in part, to a direct inhibition of some of these factors.

interleukin-4; neutrophil chemokines

MIGRATION OF NEUTROPHILS FROM the vascular compartment to inflamed tissue is a multistep process involving cytokines and chemokines released from numerous cells, including activated leukocytes and endothelial cells. The arrest of circulating neutrophils at a site of inflammation is a prerequisite early event for the cell migration. It requires the sequential exposure to different adhesion molecules, such as E-selectin, and the expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, which are involved in the rolling and firm adhesion of neutrophils to the endothelium. Neutrophils then migrate into the inflammatory sites through transendothelial diapedesis and chemotaxis. CXCL-8, a member of the C-X-C family of chemokines, is the most potent neutrophil chemotactic cytokine known to date.

CXCL-8 not only upregulates the expression of  $\beta_2$ -integrins, it induces degranulation and promotes the attachment and trans-endothelial migration of neutrophils (27) and is also angiogenic (33). The expression of CXCL-8 may be upregulated by nitric oxide (NO), a volatile free radical, through a cGMP-independent pathway (13). VEGF, a multifunctional angiogenic regulator that has the ability to generate tissue edema through increased vascular permeability (12, 55), also stimulates endothelial synthesis of CXCL-8 in humans and induces a transient upregulation of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) expression of ICAM-1 and VCAM-1 (38, 66) and, therefore, could contribute to endothelial cell promotion of tissue neutrophilia.

Allergen exposure induces trafficking of newly produced neutrophils into the airways in both experimental and natural allergic lung diseases. Furthermore, neutrophils may facilitate the migration of eosinophils into the airways, possibly aggravating the asthmatic response (1). However, the mechanisms responsible for the chemotaxis and activation of neutrophils in these processes remain poorly defined; a number of pathways have been shown to possibly contribute to neutrophilia in allergic inflammation (15, 54, 59). There is also evidence that T helper 2 (Th2)-type cytokines, which are considered central to allergic inflammation, may contribute to neutrophil activation and recruitment to lung tissue. IL-4 in humans and IL-5 in Brown Norway rats cause a neutrophilia and accelerate the maturation of myelocytes to become neutrophils (5, 49). IL-4 also stimulates neutrophil phagocytic response (5), enhances neutrophil-mediated bactericidal activity, induces lysozyme release, and enhances the respiratory burst (7). Conversely, IL-4 has been shown to have anti-inflammatory effects on neutrophils by the inhibition of proinflammatory cytokines, including CXCL-8 (64) and IL-1 $\beta$  (43), and by increasing IL-1 $\alpha$  production (44). T lymphocytes may also indirectly contribute to the chemotaxis of neutrophils into lung tissue by the release of IL-17 (17, 48), a cytokine that selectively activates and recruits neutrophils through the release of inflammatory mediators, including CXCL-8 and MIP-2 (26).

Whereas the endothelium presents a critical barrier between blood and surrounding tissues and regulates leukocyte trafficking, there is limited and conflicting information on the role of Th2-type cytokines on the release of neutrophil chemotactic factors by vascular endothelial cells. IL-4 has been reported to either suppress the expression of E-selectin and CXCL-8 by endothelial cells (11, 57) or to increase CXCL-8 production after LPS activation (16). Little is known on the effects of IL-5 on neutrophil recruitment. However, the finding that it induces

For correspondence: J.-P. Lavoie, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec J2S 7C6, Canada

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

the expression of P-selectin by endothelial cells in nasal polyps (40) suggests that IL-5 may also contribute to neutrophilic inflammation.

Endothelial cells exhibit highly specialized functions in different vascular sites. Most of the above studies have used immortalized HUVECs, for which phenotypes and physiological responses may differ from those of mature individuals. Thus it may be necessary to use primary endothelial cells derived from the lung of adult subjects to investigate the role of the endothelial cell adhesion molecule in the pathogenesis of inflammatory conditions within this organ. To evaluate the possible contribution of Th2-type cytokines to the lung neutrophilia, we stimulated pulmonary artery endothelial cells harvested from healthy adult equine subjects. This species was chosen because horses have a pulmonary anatomy and blood vascularization that closely resemble that of humans (47, 56) and they are affected with a condition of the lungs that shows many similarities with chronic asthma (18, 36). We studied the expression of selected chemokines and adhesion molecules after stimulation with IL-4 and IL-5 alone, and with LPS and TNF- $\alpha$ , to determine synergistic or inhibitory effects. We also examined the reversibility of this response by glucocorticoids or through the inhibition of inducible NO synthase (iNOS) production.

## MATERIALS AND METHODS

### Endothelial Cell Culture

Equine artery endothelial cells were isolated and cultured as described by MacEachern et al. (42). Briefly, pulmonary arteries were removed from adult horses at a slaughterhouse. Each end of the vessel was occluded with bowel clamps, and 75% ethanol was applied to the external wall of the artery. A sterile catheter (Angiocath; Becton Dickinson Infusion Therapy Systems Sandy, UT) inserted through the wall of the artery was used to wash the lumen of the artery three times with sterile phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 solution, supplemented with penicillin/streptomycin (GIBCO), 200 U/ml and 200  $\mu$ g/ml, respectively. Twenty milliliters of sterile 0.1% type II collagenase (Invitrogen, CA) was then infused into the vessel, incubated for 30 min at room temperature, and flushed with 20 ml of sterile PBS. The cell suspension was centrifuged at 390 g for 10 min, and endothelial cells were resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) containing 10% fetal calf serum and penicillin/streptomycin (200 U/ml and 200  $\mu$ g/ml, respectively). The cells were cultured in sterile T-75 culture flasks placed in a humidified incubator (37°C in 95% air, 5% CO<sub>2</sub>) and allowed to adhere overnight. The medium was replaced every 48 h thereafter until confluence was attained. Endothelial cells were then removed using trypsin-EDTA (Invitrogen), washed once with PBS, transferred to sterile six-well plates, and allowed to form a confluent monolayer. In all experiments, cells were used at passages 3–5.

### Factor VIII Immunofluorescence Staining

The endothelial cells were grown on 22-mm<sup>2</sup> glass coverslips in sterile six-well plates. The coverslips were rinsed with PBS three times and then fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature. Approximately 200  $\mu$ l of a solution containing the primary antibody (rabbit anti-human von Willebrand factor, Sigma) diluted in PBS (1:200) or PBS alone (control) was placed on each coverslip and incubated for ~24 h at 4°C. The coverslips were rinsed with PBS three times, the secondary antibody was added (FITC-conjugated goat anti-rabbit Ig, Sigma) at a 1:100 dilution on both coverslips, and they were incubated for 24 h at 4°C. The coverslips were then rinsed with PBS and allowed to dry. Two drops of mounting

agent were placed on the slides. The cells were viewed and photographed with a Nikon Eclipse E800 ultraviolet microscope.

### Groups and Cytokine Induction

Added directly to the medium were the following: 1, 10, and 100 ng/ml recombinant equine (re) IL-4 (R&D Systems); 10 ng/ml reIL-4 plus 10<sup>-5</sup> M dexamethasone (DXM; Vetoquinol, CA); 10 ng/ml reIL-4 plus 10  $\mu$ g/ml 1400W dihydrochloride (1400W; Sigma, Germany); 1, 10, and 100 lab units of reIL-5 (kindly provided by Dr. Falko Steinbach, Institute for Zoo and Wildlife Research, Berlin, Germany); 10 and 100 ng/ml recombinant human (rh) IL-5 (Becton Dickinson); 2 ng/ml reTNF- $\alpha$  (R&D Systems) plus 2 ng/ml LPS (Sigma, CA); 2 ng/ml reTNF- $\alpha$  plus 2 ng/ml LPS (TL) plus 10<sup>-5</sup> M DXM; 10  $\mu$ g/ml TL plus 1400W; 10 ng/ml TL plus reIL-4 (LPIL-4); 10<sup>-5</sup> M LPIL-4 plus DXM; 10  $\mu$ g/ml LPIL-4 plus 1400W; or PBS (negative control). Incubation time and concentration of drugs were chosen based on preliminary experiments to stimulate the mRNA expression of genes of interest without saturating the response or altering endothelial cell viability (data not shown).

### Real-Time RT-PCR

Endothelial cells were homogenized in TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies), and extraction of RNA was performed according to the instructions of the manufacturer. At the end of the procedure, the RNA pellet was briefly dried in air and dissolved in RNase-free water. The concentration and the purity of RNA were determined by spectrophotometry.

Five hundred nanograms of RNA was reverse-transcribed using oligo(dT) (Invitrogen) and reverse transcriptase (AMV, Roche) according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR reactions were performed in a 20- $\mu$ l mixture containing 1  $\mu$ l of the cDNA preparation, 10  $\mu$ l of SYBR Green (Qiagen), and 5  $\mu$ M each primer in a Rotor-Gene system (Corbett Research). The sequences of the primers used for the amplifications are shown in Table 1. All sets of primers span at least two intron-exon boundaries to allow for the discrimination of amplified genomic DNA. The absence of nonspecific products was confirmed by the analysis of the melting point curves and by electrophoresis in 1.5% agarose gels. Ubiquitin (UBQ), GAPDH, and  $\beta$ <sub>2</sub>-microglobulin ( $\beta$ <sub>2</sub>M) served as an internal standard of mRNA expression.

mRNA quantification was achieved by constructing standard curves using cDNA of known concentrations. The standard curves consisted of serial dilutions of the PCR amplicon corresponding to the gene of interest; the amplicons were previously gel-extracted

Table 1. Primers used for the amplification of CXCL-8, E-selectin, VEGF, iNOS, and UBQ genes from mRNA derived from equine pulmonary artery endothelial cells

Primer	Sequence	Size, bp	Tm
Equine CXCL-8	5'CTTTCTGCAGCTCTGTGTGAAG3' 3'GCAGACCTCAGCTCCGGTTGAC5'	189	63
Equine E-selectin	5'ATGTGATGCTGTCCCGTCA3' 3'CCACATGTGACAGCTGCA5'	300	55
Equine VEGF	5'TGCAACGACGAGGGCCATA3' 3'ACCGCCTCGGCTTGCA5'	299	60
Equine iNOS	5'TGGTGGATGGCCCTGCA3' 3'ATGTGGGGCTGTTGGTGA5'	246	60
Equine UBQ	5'TAGCAGTTTCTCTCGTCCCGT3' 3'TGTAATCGGAAAGATGCGG5'	190	63
Equine GAPDH	5'AAGTGGATATTGTCCGCATCATA3' 3'AACTTGCCATGGGTGGAATC5'	88	61
Equine $\beta$ <sub>2</sub> M	5'TCGGGCTACTCTCCCTGACTG3' 3'CGGCAACTATACTCATCCACACAA5'	293	55

iNOS, inducible nitric oxide synthase; UBQ, ubiquitin;  $\beta$ <sub>2</sub>M,  $\beta$ <sub>2</sub>-microglobulin; Tm, melting temperature.



(QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) and quantified using a spectrophotometer (expressed as ng/ $\mu$ l). Four standard samples were included in each run. All concentrations of target gene cDNA were calculated relatively to their respective standard curves.

#### Neutrophil Migration Assay

Supernatant (30.5  $\mu$ l) derived from endothelial cells stimulated with reIL-4 at 1, 10, and 100 ng/ml were added in triplicate to the lower wells of a 48-well chemotaxis chamber (Neuro Probe, CA). Similarly, wells containing PBS or  $10^{-7}$  M leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>; Cayman Chemical, CA) served as negative and positive controls, respectively. The wells were then overlaid with an 8- $\mu$ m pore size cellulose nitrate filter. Equine neutrophils (55  $\mu$ l,  $1.5 \times 10^5$  cells/ml), isolated from equine peripheral blood by density gradient centrifugation using lymphocyte poly (Cedarlane, CA) and suspended in RPMI 1640 (GIBCO), were placed in the upper wells. After 1 h of incubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), filters were removed, fixed with mercuric chloride, and stained with hematoxylin and chromotrope 2R. Chemotactic activity was determined by counting the number of cells at the lower side of the filter using a light microscope and an eyepiece graticule to facilitate the counting. Five distinct fields were counted at high magnification ( $\times 400$ ), and the mean values of the triplicate samples were reported.

#### Data Analysis

Data were expressed as means  $\pm$  SE. Data were statistically analyzed using nonparametric Friedman and Wilcoxon tests. Differences between groups were considered significant when *P* values were  $\leq 0.05$ .

## RESULTS

### Factor VIII Expression on Endothelial Cells

Von Willebrand factor (factor VIII) is a glycoprotein synthesized by endothelial cells, which is not found in cultured smooth muscle or fibroblasts and is therefore considered a marker of endothelial cells. Figure 1 shows that endothelial cells stained positive for von Willebrand factor. The cells had a cobblestone appearance, were homogeneous, closely packed, and polygonal in shape with green fluorescence staining in their cytoplasm. Only weak fluorescence was detectable in the control cells.

### Cytokine mRNA Expression

*Effects of reIL-4.* UBQ was found to be a suitable house-keeping gene when studying the reIL-4-, reIL-5-, and rhIL-5-induced gene expression by equine pulmonary artery endothe-

lial cells (Fig. 2, A–D). ReIL-4 increased in a dose-dependent manner the expression of CXCL-8 mRNA (Fig. 3A). Similarly, supernatants collected from cultured endothelial cells containing reIL-4 at 1, 10, and 100 ng/ml, respectively, significantly promoted neutrophil migration (Fig. 3B), whereas reIL-4 alone did not stimulate neutrophil chemotaxis (data not shown). ReIL-4 also enhanced the expression of E-selectin (Fig. 4B), VEGF (Fig. 4C), and iNOS (Fig. 4D), whereas CXCL-8, VEGF, and iNOS expression was significantly inhibited by DXM and almost reached significance for E-selectin (*P* = 0.07). The iNOS inhibitor 1400W significantly attenuated the mRNA expression of E-selectin, VEGF, and iNOS (Fig. 4, B–D).

*Effects of TNF- $\alpha$  and LPS costimulation.* TNF- $\alpha$  and LPS significantly influenced the expression of UBQ and  $\beta_2$ M (Fig. 5), and significance was almost reached for GADPH (*P* = 0.07). Thus values for the expression of genes of interest are expressed as concentration. TNF- $\alpha$  and LPS costimulation increased the expression of CXCL-8, E-selectin, and iNOS but did not influence VEGF; DXM inhibited the expression of CXCL-8 and iNOS induced by TNF- $\alpha$  and LPS stimulation, whereas 1400W inhibited only iNOS mRNA expression (Fig. 6).

*Effects of reIL-4, TNF- $\alpha$ , and LPS costimulation.* ReIL-4 enhanced further the TNF- $\alpha$  and LPS expression of CXCL-8, while it almost reached significance for E-selectin (*P* = 0.07) but not for iNOS. DXM and 1400W attenuated the expression of E-selectin and iNOS, while the CXCL-8 mRNA was inhibited by DXM only.

*Effects of reIL-5.* Neither reIL-5 nor rhIL-5 significantly increased the expression of cytokines nor growth factors by equine pulmonary endothelial cells (Fig. 7).

## DISCUSSION

Neutrophils are recruited in experimentally induced allergic lungs (34, 54) and in natural pulmonary conditions such as human asthma (41, 54) and equine heaves (20). We chose to study heaves as this condition of horses shares many similarities with human asthma, including airway smooth muscle remodeling (24), hyperresponsiveness, and reversible airway obstruction. Furthermore, the airway neutrophilic inflammation present in heaves is associated with a predominant Th2-type cytokine response (36). Currently, little is known concerning the pathways leading to airway neutrophilia following the inhalation of allergens by susceptible individuals. We report here on the possible contribution of the Th2-type cytokines,

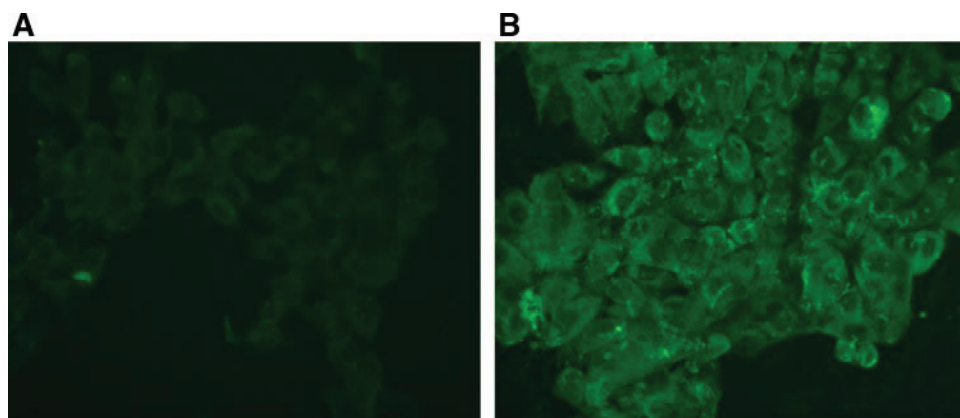
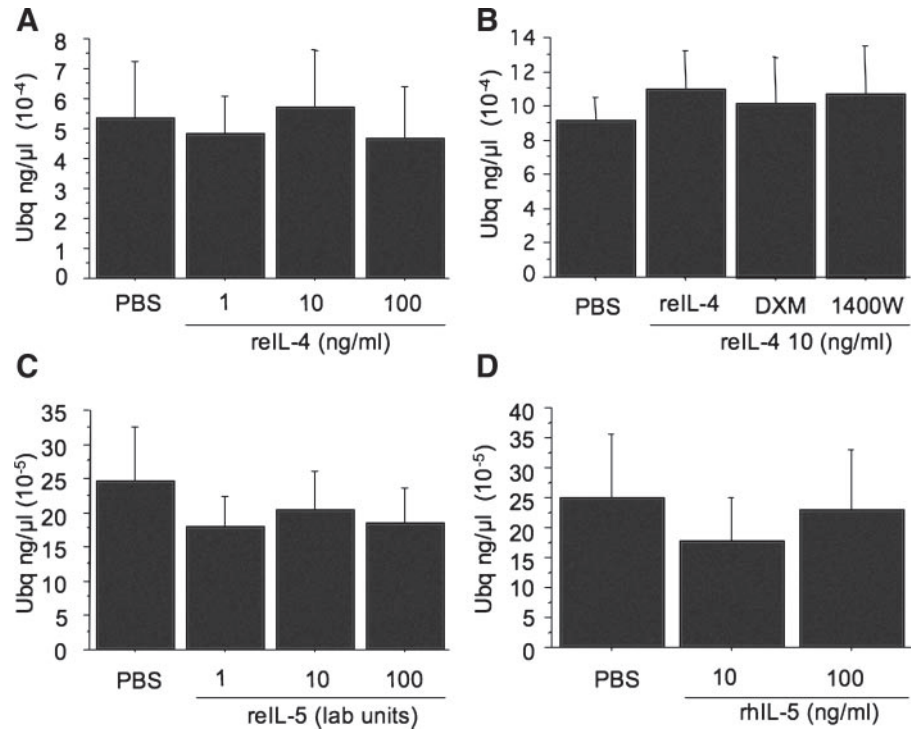


Fig. 1. Cultured equine pulmonary artery endothelial cells stained positive (B) for von Willebrand factor. Cells had a cobblestone appearance and were homogeneous, closely packed, and polygonal in shape with green fluorescence staining in their cytoplasm. Weak fluorescence was detectable in the control cells (A).

Fig. 2. A: expression of ubiquitin (UBQ) by endothelial cells (5 horses) stimulated with recombinant equine (re) IL-4 at different concentrations. B: expression of UBQ by endothelial cells (6 horses) stimulated with reIL-4 and in the presence of dexamethasone (DXM;  $10^{-5}$  M) and the inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitor 1400W dihydrochloride (1400W;  $10 \mu\text{g/ml}$ ). C: expression of UBQ by endothelial cells stimulated with reIL-5 (5 horses). D: expression of UBQ by endothelial cells stimulated with recombinant human (rh) IL-5 (5 horses).

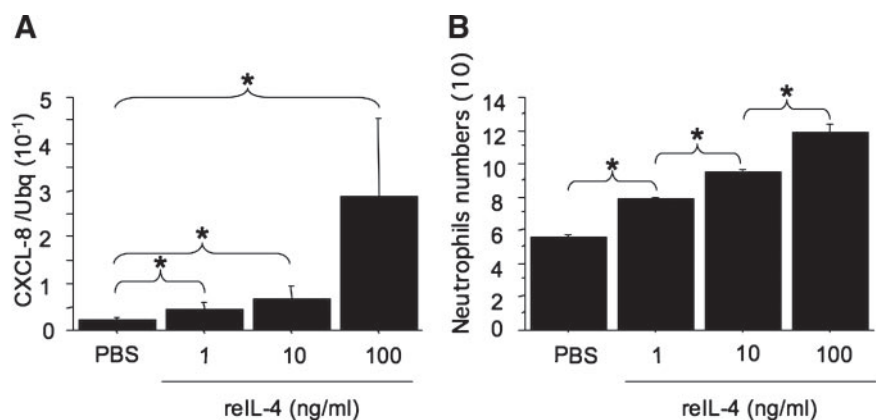


IL-4 and IL-5, to airway neutrophilia using primary pulmonary artery endothelial cell culture. In the present study, reIL-4, but not reIL-5 or rhIL-5, induced a selective increase in the mRNA expression of CXCL-8, E-selectin, and VEGF, key elements for the trafficking of neutrophils to the inflamed tissue. We were unable to confirm these results at the protein level due to the lack of specific antibodies against these targets, a common limitation when studying this equine model. Nevertheless, the mRNA signal for those genes usually leads to protein synthesis (9, 28, 31), and, using Boyden chambers, reIL-4 stimulation of endothelial cells was shown to induce the release of chemotactic factors for neutrophils. ReIL-4 also enhanced the CXCL-8 expression by endothelial cells costimulated with TNF- $\alpha$ , a proinflammatory cytokine present in the allergic lungs (62), and LPS, a bacterial wall component present in house dust. We also determined that DXM has selective inhibitory effects on the IL-4-, LPS-, and TNF- $\alpha$ -stimulated endothelial expression of chemokines and adhesions mole-

cules. Lastly, the upregulation of E-selectin and VEGF by endothelial cells was at least partially mediated by iNOS.

In the present report, IL-4 increased the CXCL-8 mRNA expression by equine pulmonary artery endothelial cells in a dose-dependent manner; moreover, the expression of CXCL-8 was further increased when IL-4 was coincubated with TNF- $\alpha$  and LPS, two proinflammatory mediators commonly present in the allergic lungs. These results are in contrast with some earlier reports indicating that IL-4 did not influence or even decrease the expression of CXCL-8 and E-selectin by HUVEC or human lung microvascular endothelial cells (3, 4, 11, 58). Interestingly, the response to LPS and TNF- $\alpha$  here was similar to those observed using HUVEC cells (14). The cell type studied may contribute to these differences, as we used primary cell cultures harvested from healthy adult animals, whereas previous studies have used primarily immortalized umbilical cells. The origin of the cells (lungs vs. umbilicus) and age (neonates vs. adults) of the cell donors may explain some of

Fig. 3. A: ratio of CXCL-8-to-UBQ mRNA expression by equine pulmonary artery endothelial cells (6 horses) stimulated with 1, 10, and 100 ng/ml of reIL-4. B: neutrophil migration in response to exposure to the supernatant of endothelial cells (5 horses) cultured in the presence of reIL-4. \* $P < 0.05$ . Five distinct fields were counted at high magnification ( $\times 400$ ), and the mean values ( $\times 10$ ) of the triplicate samples were reported.



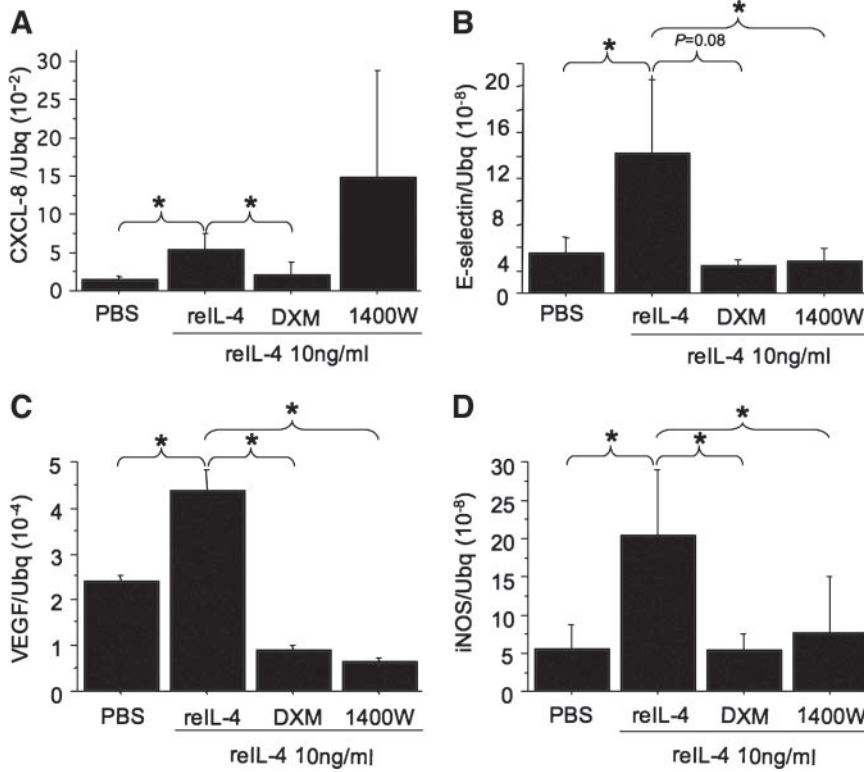


Fig. 4. Ratio of CXCL-8 (A; 5 horses), E-selectin (B; 5 horses), VEGF (C; 5 horses), and iNOS (D; 6 horses) to UBQ mRNA expression by endothelial cells stimulated with PBS alone or in the presence of reIL-4 (10 ng/ml), DXM, and 1400W. \**P* < 0.05.

these findings. Also, even within the pulmonary vasculature, endothelial cells from various tissues possessed significant morphological distinctions, both in circulation and culture (32, 50). Thus the response of pulmonary artery endothelial cells, such as in the present study, may differ from that of pulmonary

veins or capillary endothelial cells. However, this remains to be ascertained, as the overall gene expression pattern of lung macro- and microvascular endothelial cells after stimulation with IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-4 was reported not to be significantly different (52). Species differences may also contribute

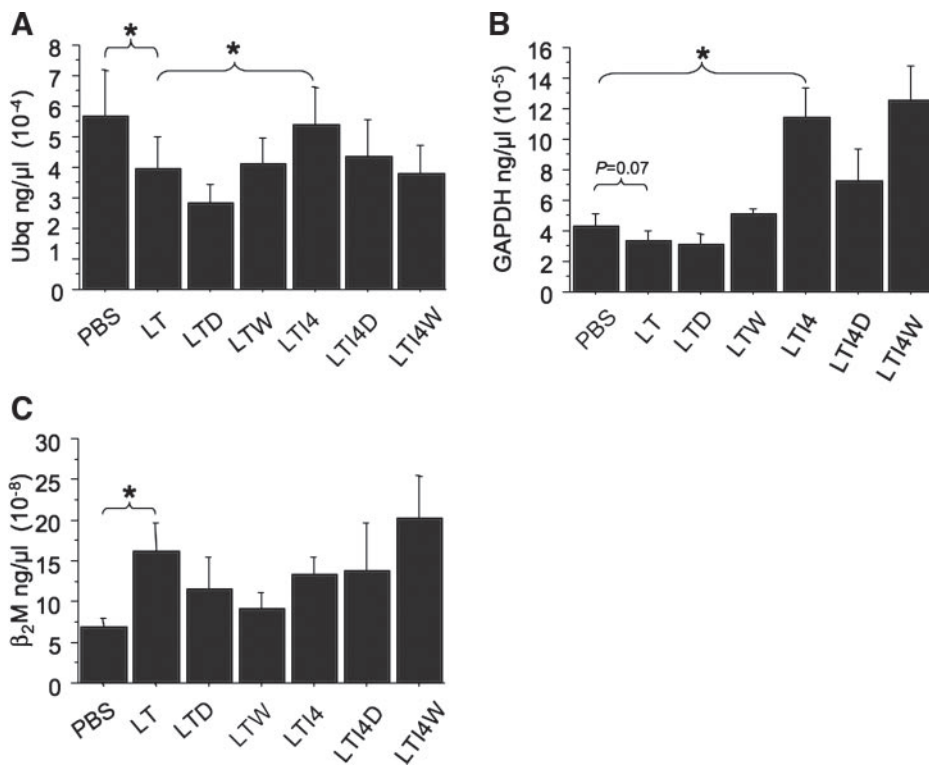
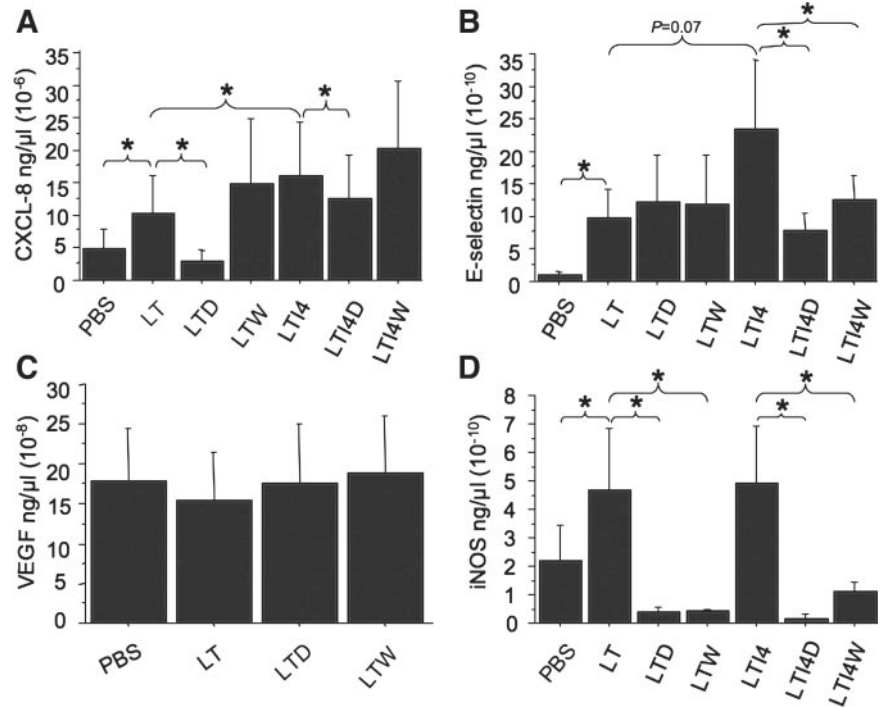


Fig. 5. Expression of UBQ (A), GAPDH (B), and  $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta_2$ M; C) mRNA expressed by endothelial cells from 6 horses when stimulated with PBS (negative control), LPS (L) and TNF- $\alpha$  (T) alone (LT), or combined with either DXM (D) (LTD), reIL-4 (I4; 10 ng/ml) (LTI4), or 1400W (W) (LTW). LTI4D is LPS, TNF- $\alpha$ , reIL-4, and DXM; LTI4W is LPS TNF- $\alpha$ , reIL-4, and 1400W. \**P* < 0.05.

Fig. 6. Expression of CXCL-8 (A), E-selectin (B), VEGF (C), and iNOS (D) by endothelial cells from 6 horses when stimulated with PBS (negative control), LPS (L) and TNF- $\alpha$  (T) alone, or combined with either DXM (D), reIL-4 (I4; 10 ng/ml), or 1400W (W). \* $P < 0.05$ .

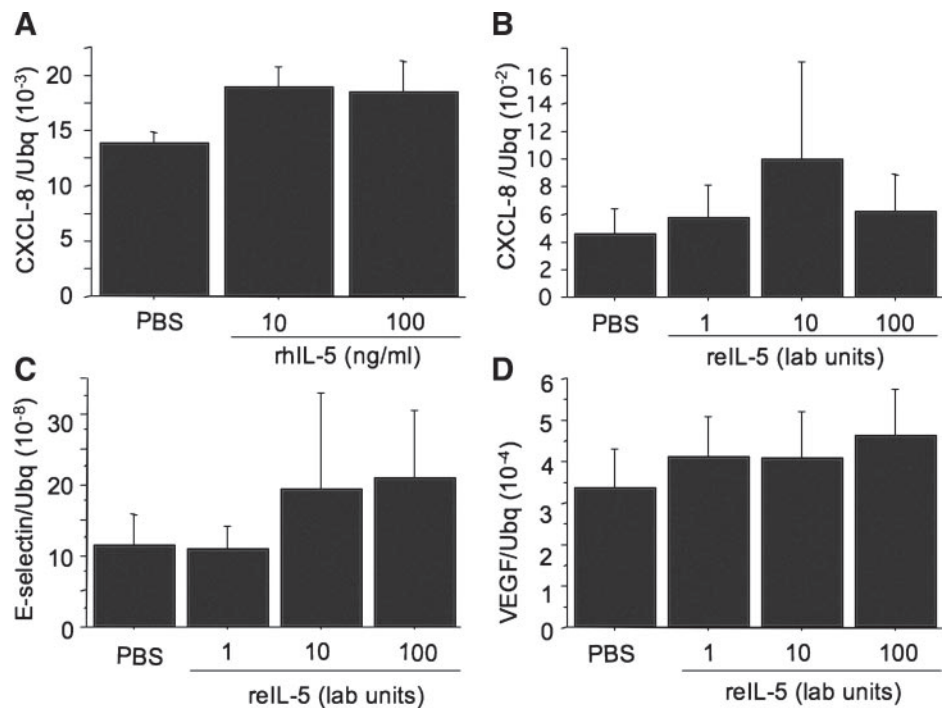


to these apparent discrepancies, considering that neutrophils predominate in the airways of horses following both experimental (8) and natural (20) allergen challenge. However, airway neutrophilia is also present in human asthma (23), especially in patient with severe asthma (51), nocturnal asthma (45), and steroid-dependent asthma (63). Conversely, neither reIL-5 nor rhIL-5 altered the mRNA expression of CXCL-8, E-selectin, and VEGF production by equine endothelial cells. These findings are in agreement and extend previous reports

suggesting that IL-5 may not contribute to the neutrophil recruitment and adhesion to pulmonary endothelium (60, 61).

The role of NO in leukocyte recruitment and migration remains controversial (2, 25). Inducible NOS has long been considered responsible for the excessive levels of NO found in chronic pathogenic inflammatory lesions. For these reasons, we postulated that selective blockade of the iNOS pathway, without impinging on endothelial NOS- or neuronal NOS-dependent events, would provide an ideal strategy to disrupt only the

Fig. 7. Ratio of CXCL-8-to-UBQ mRNA expression by endothelial cells from 5 horses stimulated with rhIL-5 (A) or reIL-5 (B). Ratio of E-selectin (C) and VEGF (D) to UBQ mRNA expression by endothelial cells stimulated by reIL-5.





presumptive harmful NO being produced in the vessels. We believed that the iNOS inhibitor 1400W would be a more effective anti-inflammatory agent than  $N^G$ -monomethyl-L-arginine (L-NMMA), which acts as a competitive inhibitor of both constitutive and inducible isoforms of NOS. In the present study, 1400W had no effect on the expression of CXCL-8 by endothelial cells stimulated with IL-4 alone or in combination with TNF- $\alpha$  and LPS. These results suggest that the IL-4-induced CXCL-8 expression by endothelial cells does not depend on an iNOS-dependent pathway. Interestingly, and in agreement with a previous report (21), we also found that 1400W decreased the E-selectin mRNA expression by endothelial cells stimulated with IL-4, indicating that NOS may nevertheless contribute to neutrophil migration.

VEGF plays a role in vascular growth and remodeling (39, 46). VEGF has also been shown to be capable of promoting airway neutrophilia by stimulating endothelial synthesis of CXCL-8, upregulating endothelial expression of cell-adhesion molecules, and increasing the adhesion and transendothelial migration of neutrophil (38). VEGF modulated the airway hyperresponsiveness (37) and extracellular matrix (10) and thus may contribute to the airway remodeling. Our results show that IL-4, but not IL-5, could promote neutrophil migration and airway remodeling indirectly through the modulation of the secretion of CXCL-8, E-selectin, and VEGF by endothelial cells. Conversely, neither TNF- $\alpha$  nor LPS influenced the expression of VEGF. These results contrast with those originating from other cell populations. For instance, VEGF gene expression was shown to be regulated by LPS in macrophages (19), and TNF- $\alpha$  is a potent activator of VEGF synthesis and secretion by neutrophils (22, 53). However, the different VEGF isoforms have distinctive biological effects and pattern of expression in specific cell population (29, 30). Therefore, the lack of a regulation of the equine VEGF<sub>164</sub> in the present study does not totally rule out an effect of LPS and TNF- $\alpha$  on VEGF in equine endothelial cells.

Glucocorticoids are the drugs most commonly used for the treatment of asthma. DXM, a potent glucocorticoid, had been shown to inhibit the CXCL-8 production in response to TNF- $\alpha$  by human coronary artery endothelial cells, human pulmonary artery cells, and HUVEC (35). Furthermore, DXM inhibited the upregulation of E-selectin expression in cultured human nasal microvascular endothelial cells stimulated by IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  (65). Our findings, that DXM inhibited the effects of IL-4, LPS, and TNF- $\alpha$  on CXCL-8 and also E-selectin, suggest that glucocorticoids may decrease pulmonary neutrophilia by a direct effect on the pulmonary endothelium.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge Isabelle Daneau from the Centre de recherche en reproduction animale, Université de Montréal, for skillful assistance.

#### GRANTS

This study was supported financially by the National Research Council Canada.

#### REFERENCES

- Atkinson JJ, Shapiro SD. Neutrophil-mediated eosinophil transmigration: parting the red sea or leaving bread crumbs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 645–646, 2006.
- Benjamin CF, Silva JS, Fortes ZB, Oliveira MA, Ferreira SH, Cunha FQ. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to

- reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect Immun* 70: 3602–3610, 2002.
- Bennett BL, Cruz R, Lacson RG, Manning AM. Interleukin-4 suppression of tumor necrosis factor alpha-stimulated E-selectin gene transcription is mediated by STAT6 antagonism of NF-kappaB. *J Biol Chem* 272: 10212–10219, 1997.
- Blease K, Seybold J, Adcock IM, Hellewell PG, Burke-Gaffney A. Interleukin-4 and lipopolysaccharide synergize to induce vascular cell adhesion molecule-1 expression in human lung microvascular endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 620–630, 1998.
- Bober LA, Waters TA, Pugliese-Sivo CC, Sullivan LM, Narula SK, Grace MJ. IL-4 induces neutrophilic maturation of HL-60 cells and activation of human peripheral blood neutrophils. *Clin Exp Immunol* 99: 129–136, 1995.
- Boey H, Rosenbaum R, Castracane J, Borish L. Interleukin-4 is a neutrophil activator. *J Allergy Clin Immunol* 83: 978–984, 1989.
- Bowles KS, Beadle RE, Mouch S, Pourciau SS, Littlefield-Chabaud MA, Le Blanc C, Mistic L, Fermaglich D, Horohov DW. A novel model for equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol* 87: 385–389, 2002.
- Braun F, Hosseini M, Wieland E, Sattler B, Laabs S, Lorf T, Muller AR, Fandrich F, Kremer B, Ringe B. Expression of E-selectin and its transcripts during intestinal ischemia-reperfusion injury in pigs. *Transplant Proc* 36: 265–266, 2004.
- Burgess JK, Ge Q, Poniris MH, Boustany S, Twigg SM, Black JL, Johnson PR. Connective tissue growth factor and vascular endothelial growth factor from airway smooth muscle interact with the extracellular matrix. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L153–L161, 2006.
- Chen CC, Manning AM. TGF-beta 1, IL-10 and IL-4 differentially modulate the cytokine-induced expression of IL-6 and IL-8 in human endothelial cells. *Cytokine* 8: 58–65, 1996.
- Clauss M. Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost* 26: 561–569, 2000.
- Corriveau CC, Madara PJ, Van Dervort AL, Tropea MM, Wesley RA, Danner RL. Effects of nitric oxide on chemotaxis and endotoxin-induced interleukin-8 production in human neutrophils. *J Infect Dis* 177: 116–126, 1998.
- Cuschleri J, Gourlay D, Garcia I, Jelacic S, Maier RV. Endotoxin-induced endothelial cell proinflammatory phenotypic differentiation requires stress fiber polymerization. *Shock* 19: 433–439, 2003.
- Dale DC, Liles WC, Llewellyn C, Price TH. Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on neutrophil kinetics and function in normal human volunteers. *Am J Hematol* 57: 7–15, 1998.
- De Beaux AC, Maingay JP, Ross JA, Fearon KC, Carter DC. Interleukin-4 and interleukin-10 increase endotoxin-stimulated human umbilical vein endothelial cell interleukin-8 release. *J Interferon Cytokine Res* 15: 441–445, 1995.
- Debrue M, Hamilton E, Joubert P, Lajoie-Kadoch S, Lavoie JP. Exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol* 105: 25–31, 2005.
- Derksen FJ. Chronic obstructive pulmonary disease (heaves) as an inflammatory condition. *Equine Vet J* 25: 257–258, 1993.
- Du M, Roy KM, Zhong L, Shen Z, Meyers HE, Nichols RC. VEGF gene expression is regulated post-transcriptionally in macrophages. *FEBS J* 273: 732–745, 2006.
- Fairbairn SM, Page CP, Lees P, Cunningham FM. Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure. *Clin Exp Allergy* 23: 821–828, 1993.
- Franco-Penteado CF, DeSouza I, Teixeira SA, Ribeiro-DaSilva G, De Nucci G, Antunes E. Involvement of nitric oxide on the peritoneal neutrophil influx induced by staphylococcal enterotoxin B in mouse. *Toxicol* 39: 1383–1386, 2001.
- Gaudry M, Bregerie O, Andrieu V, El Benna J, Pocard MA, Hakim J. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood* 90: 4153–4161, 1997.
- Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma: evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* 119: 1329–1336, 2001.
- Herszberg B, Ramos-Barbon D, Tamaoka M, Martin JG, Lavoie JP. Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 118: 382–388, 2006.
- Hierholzer C, Kalff JC, Billiar TR, Bauer AJ, Twardy DJ, Harbrecht BG. Induced nitric oxide promotes intestinal inflammation following



- hemorrhagic shock. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: G225–G233, 2004.
26. **Hoshino H, Lotvall J, Skoogh BE, Linden A.** Neutrophil recruitment by interleukin-17 into rat airways in vivo. Role of tachykinins. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1423–1428, 1999.
  27. **Huber AR, Kunkel SL, Todd RF 3rd, Weiss SJ.** Regulation of trans-endothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254: 99–102, 1991.
  28. **Inoue K, Slaton JW, Kim SJ, Perrotte P, Eve BY, Bar-Eli M, Radinsky R, Dinney CP.** Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastasis in human bladder cancer. *Cancer Res* 60: 2290–2299, 2000.
  29. **Ito Y, Betsuyaku T, Nagai K, Nasuhara Y, Nishimura M.** Expression of pulmonary VEGF family declines with age and is further down-regulated in lipopolysaccharide (LPS)-induced lung injury. *Exp Gerontol* 40: 315–323, 2005.
  30. **Jacobsen J, Grankvist K, Rasmuson T, Ljungberg B.** Different isoform patterns for vascular endothelial growth factor between clear cell and papillary renal cell carcinoma. *BJU Int* 97: 1102–1108, 2006.
  31. **Kassim SK, El-Salahy EM, Fayed ST, Helal SA, Helal T, Azzam Eel D, Khalifa A.** Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 are associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Clin Biochem* 37: 363–369, 2004.
  32. **King J, Hamil T, Creighton J, Wu S, Bhat P, McDonald F, Stevens T.** Structural and functional characteristics of lung macro- and microvascular endothelial cell phenotypes. *Microvasc Res* 67: 139–151, 2004.
  33. **Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elnor VM, Elnor SG, Strieter RM.** Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258: 1798–1801, 1992.
  34. **Koh YY, Dupuis R, Pollice M, Albertine KH, Fish JE, Peters SP.** Neutrophils recruited to the lungs of humans by segmental antigen challenge display a reduced chemotactic response to leukotriene B<sub>4</sub>. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8: 493–499, 1993.
  35. **Krishnaswamy G, Smith JK, Mukkamala R, Hall K, Joyner W, Yerra L, Chi DS.** Multifunctional cytokine expression by human coronary endothelium and regulation by monokines and glucocorticoids. *Microvasc Res* 55: 189–200, 1998.
  36. **Lavoie JP, Maghni K, Desnoyers M, Taha R, Martin JG, Hamid QA.** Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1410–1413, 2001.
  37. **Lee CG, Link H, Baluk P, Homer RJ, Chapoval S, Bhandari V, Kang MJ, Cohn L, Kim YK, McDonald DM, Elias JA.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat Med* 10: 1095–1103, 2004.
  38. **Lee TH, Avraham H, Lee SH, Avraham S.** Vascular endothelial growth factor modulates neutrophil transendothelial migration via up-regulation of interleukin-8 in human brain microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 277: 10445–10451, 2002.
  39. **Lee YC, Kwak YG, Song CH.** Contribution of vascular endothelial growth factor to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *J Immunol* 168: 3595–3600, 2002.
  40. **Li H, Xu G, Li Y, Xie M, Xu R.** [Expression of P-selectin in nasal polyps and its mechanisms]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 37: 356–359, 2002.
  41. **Louis R, Lau LC, Bron AO, Roldaan AC, Radermecker M, Djukanovic R.** The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 9–16, 2000.
  42. **MacEachern KE, Smith GL, Nolan AM.** Methods for the isolation, culture and characterisation of equine pulmonary artery endothelial cells. *Res Vet Sci* 62: 147–152, 1997.
  43. **Malyak M, Smith MF Jr, Abel AA, Arend WP.** Peripheral blood neutrophil production of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta. *J Clin Immunol* 14: 20–30, 1994.
  44. **Marie C, Pitton C, Fitting C, Cavillon JM.** IL-10 and IL-4 synergize with TNF-alpha to induce IL-1ra production by human neutrophils. *Cytokine* 8: 147–151, 1996.
  45. **Martin RJ, Cicutto LC, Smith HR, Ballard RD, Szefer SJ.** Airways inflammation in nocturnal asthma. *Am Rev Respir Dis* 143: 351–357, 1991.
  46. **McDonald DM.** Angiogenesis and remodeling of airway vasculature in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 164: S39–S45, 2001.
  47. **McLaughlin RF Jr.** Bronchial artery distribution in various mammals and in humans. *Am Rev Respir Dis* 128: S57–S58, 1983.
  48. **Molet S, Chakir J, Laviolette M, Zhu Z, Elias J, Hamid Q.** Response of remodeling-associated cytokines to steroids in bronchial biopsies of asthmatic patients. In: *2000 Inter Conf of the American Thoracic Society*. Toronto, ON, Canada: 2000, p. A686.
  49. **Nag SS, Xu LJ, Hamid Q, Renzi PM.** The effects of IL-5 on airway physiology and inflammation in rats. *J Allergy Clin Immunol* 111: 558–566, 2003.
  50. **Nilius B, Droogmans G.** Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev* 81: 1415–1459, 2001.
  51. **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* 161: 1185–1190, 2000.
  52. **Sana TR, Janatpour MJ, Sathe M, McEvoy LM, McClanahan TK.** Microarray analysis of primary endothelial cells challenged with different inflammatory and immune cytokines. *Cytokine* 29: 256–269, 2005.
  53. **Scapini P, Calzetti F, Cassatella MA.** On the detection of neutrophil-derived vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Immunol Methods* 232: 121–129, 1999.
  54. **Schneider T, van Velzen D, Moqbel R, Issekutz AC.** Kinetics and quantitation of eosinophil and neutrophil recruitment to allergic lung inflammation in a Brown Norway rat model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 702–712, 1997.
  55. **Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF.** Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 12: 303–324, 1993.
  56. **Staub NC.** Some aspects of airways structure and function. *Postgrad Med J* 51: 21–35, 1975.
  57. **Thornhill MH, Haskard DO.** IL-4 regulates endothelial cell activation by IL-1, tumor necrosis factor, or IFN-gamma. *J Immunol* 145: 865–872, 1990.
  58. **Van Der Meeren A, Squiban C, Gourmelon P, Lafont H, Gaugler MH.** Differential regulation by IL-4 and IL-10 of radiation-induced IL-6 and IL-8 production and ICAM-1 expression by human endothelial cells. *Cytokine* 11: 831–838, 1999.
  59. **Von Essen SG, Robbins RA, Thompson AB, Ertl RF, Linder J, Rennard S.** Mechanisms of neutrophil recruitment to the lung by grain dust exposure. *Am Rev Respir Dis* 138: 921–927, 1988.
  60. **Wang JM, Rambaldi A, Biondi A, Chen ZG, Sanderson CJ, Mantovani A.** Recombinant human interleukin 5 is a selective eosinophil chemoattractant. *Eur J Immunol* 19: 701–705, 1989.
  61. **Wardlaw AJ.** Eosinophil trafficking in asthma. *Clin Med* 1: 214–218, 2001.
  62. **Waserman S, Dolovich J, Conway M, Marshall JS.** TNF-alpha dysregulation in asthma: relationship to ongoing corticosteroid therapy. *Can Respir J* 7: 229–237, 2000.
  63. **Wenzel SE, Szefer SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ.** Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 737–743, 1997.
  64. **Wertheim WA, Kunkel SL, Standiford TJ, Burdick MD, Becker FS, Wilke CA, Gilbert AR, Strieter RM.** Regulation of neutrophil-derived IL-8: the role of prostaglandin E<sub>2</sub>, dexamethasone, and IL-4. *J Immunol* 151: 2166–2175, 1993.
  65. **Yamamoto Y, Ikeda K, Watanabe M, Shimomura A, Suzuki H, Oshima T, Imamura Y, Ohuchi K, Takasaka T.** Expression of adhesion molecules in cultured human nasal mucosal microvascular endothelial cells activated by interleukin-1 beta or tumor necrosis factor-alpha: effects of dexamethasone. *Int Arch Allergy Immunol* 117: 68–77, 1998.
  66. **Zhang H, Issekutz AC.** Growth factor regulation of neutrophil-endothelial cell interactions. *J Leukoc Biol* 70: 225–232, 2001.

## *Curriculum vitae*

### *Cursus scolaire :*

- **UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL**  
PhD en Sciences Vétérinaires, option Sc. Cliniques 2005-
- **UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL**  
MSc en Sciences Vétérinaires, option Sc. Cliniques  
Passage direct au PhD, grade conféré (AVRIL 2008) 2004-2005
- **UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL**  
Baccalauréat en Sciences biomédicales 2001-2004
- **COLLÈGE ÉDOUARD-MONTPETIT**  
Diplôme d'études collégiales en Sciences Pures 1999-2001
- **COLLÈGE NOTRE-DAMES-DE-LOURDES**  
Diplôme d'études secondaires 1994-1999

### Stage:

- **UNIVERSITÉ RENÉ-DESCARTES (PARIS V)** Été 2003  
Stage de fin d'études  
Laboratoire de biologie moléculaire - Développement musculaire  
Paris, France

### BOURSES ET MENTION ACCORDÉES

- **BOURSE DE FIN D'ÉTUDES DOCTORALES** Juin 2009  
Faculté des Études Supérieures, UdeM
- **BOURSE DE RÉDACTION** Mars 2009  
Faculté de médecine vétérinaire, UdeM
- **BOURSE DE FORMATION (Travel award)**

- Allergen NCE Inc.  
2008  
Mai
- **BOURSE DE FORMATION AU DOCTORAT**  
IRSC, Bourse d'études supérieures du Canada F. Banting et C. Best  
Mai 2008
- **BOURSE DE FORMATION AU DOCTORAT**  
FRSQ, Concours 2008-2009, Refusée  
Mai 2008
- **BOURSE D'EXCELLENCE AU PhD**  
Faculté de médecine vétérinaire, UdeM  
Déc. 2006
- **PRIX VÉTOQUINOL ET PLAQUE HONORIFIQUE**  
Vétoquinol  
Intérêt pour la gériatrie  
Janvier 2006
- **BOURSE DE PASSAGE DIRECT DE LA MAÎTRISE**  
AU PhD  
Faculté des Études Supérieures, UdeM  
Mai 2005
- **BOURSE D'EXCELLENCE À LA MAÎTRISE**  
Faculté de médecine vétérinaire, UdeM  
Admission  
Janvier 2005
- **BOURSE D'ÉTUDES À L'ÉTRANGER**  
Direction des relations internationales (UdeM)  
Stage d'été 2003 à Paris (3 mois)  
Avril 2003
- **MENTION**  
Mérite d'excellence pour moyenne soutenue supérieure à 90%  
Collège-Notre-Dame-de-Lourdes (secondaire V)  
Juin 1999

**Contributions scientifiques**Articles (ordre chronologique)

1. Huang H, **Lavoie-Lamoureux A**, Moran K, et al. IL-4 stimulates the expression of CXCL-8, E-selectin, VEGF, and inducible nitric oxide synthase mRNA by equine pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L1147-1154.
2. Huang H, **Lavoie-Lamoureux A**, Lavoie JP. Cholinergic stimulation attenuates the IL-4 induced expression of E-selectin and vascular endothelial growth factor by equine pulmonary artery endothelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2009;132:116-121.
3. Lecoq L, Vincent P, **Lavoie-Lamoureux A**, et al. Genomic and non-genomic effects of dexamethasone on equine peripheral blood neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol* 2009;128:126-131.
4. **Lavoie-Lamoureux A**, Maghni K, Lavoie JP. Optimization of a procedure to accurately detect equine TNFalpha in serum samples. *Vet Immunol Immunopathol* 2010;138:118-123.
5. **Lavoie-Lamoureux A**, Moran K, Beauchamp G, et al. IL-4 activates equine neutrophils and induces a mixed inflammatory cytokine expression profile with enhanced neutrophil chemotactic mediator release ex vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;299:L472-482.
6. Leclere M, **Lavoie-Lamoureux A**, Gelinas-Lymburner E, et al. Effect of Antigen Exposure on Airway Smooth Muscle Remodeling in an Equine Model of Chronic Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011. **45**(1): p. 181-7.
7. Dauvillier J, Felipe MJ, Lunn DP, **Lavoie-Lamoureux A**. et al. Effect of Long-Term Fluticasone Treatment on Immune Function in Horses with Heaves. *J Vet Intern Med* 2011.
8. Lavoie JP, Cesarini C, **Lavoie-Lamoureux A**, et al. Bronchoalveolar lavage fluid cytology and cytokine messenger ribonucleic Acid expression of racehorses with exercise intolerance and lower airway inflammation. *J Vet Intern Med* 2011;25:322-329.
9. Lavoie J-P, Lefebvre-Lavoie J, Leclère M, **Lavoie-Lamoureux A**. et al. Profiling of differentially expressed genes using subtractive suppression hybridization in an equine model of chronic asthma *soumis pour publication dans PlosOne*.
10. Leclere, M., A. Lavoie-Lamoureux, and J.P. Lavoie, *Heaves, an asthma-like disease of horses*. *Respirology*, 2011. **16**(7): p. 1027-46.

Communications orales:

1. Vanderstock J, Lecours M, **Lavoie-Lamoureux A**, et al. Circulating Neutrophil Phagocytosis and Killing of Streptococcus Equi Spp. Equi and Zooepidemicus in Heaves-Affected and Control Horses. ACVIM 2011.
2. M Leclère **Lavoie-Lamoureux A**, J G Martin, JP Lavoie. Inhaled Corticosteroids Accelerate the Reversal of Airway Smooth Muscle Remodeling in an Equine Model of Chronic Asthma. *2010 ATS International Conference*. New Orleans, 2010.
3. **Lavoie-Lamoureux A.**, JP Lavoie. Caractérisation de l'expression des isoformes de l'arginase dans un modèle équin de maladie respiratoire allergique Congrès annuel de l'APPQ ed. Montreal, 2009.
4. **Lavoie-Lamoureux A.**, J Martin, J.-P. Lavoie. Characterization of Arginase Expression by Neutrophils in an Equine Model of Asthma. San Diego: 2009 ATS International Conference, 2009.
5. **Lavoie-Lamoureux A.**, Beauchamp G, Quessy S, Martin JG, Lavoie J-P. Altered inflammatory response to microbial stimuli by peripheral blood leukocytes in an equine model of chronic asthma (heaves). Toronto: American Thoracic Society 2008 International Conference, 2008.
6. **Lavoie-Lamoureux A**, Martin JG, Lavoie J-P. Increased pro- and anti-inflammatory gene expression by leucocytes, in a large animal model of chronic asthma. . 18th MUHC Institute Research Axis, Respiratory Research Day 2007.
7. **Lavoie-Lamoureux A**, Martin JG, Lavoie J-P. The quest for the characterization of arginase expression by equine neutrophils. . 19th MUHC Institute Research Axis, Respiratory Research Day 2008.
8. **Lavoie-Lamoureux A**, Césarini C, Beauchamp G, et al. Study of the contribution of Th2-type cytokines and bacterial antigens to neutrophilic airway inflammation in heaves. Veterinary Comparative Respiratory Symposium, Purdue University, 2007.
9. Moran K. **Lavoie-Lamoureux A.** , Lavoie J.P. JNK inhibitor decreases neutrophil chemotactic activity induced by bronchoalveolar lavage fluid of horses with heaves. King City, (Ont): First AllerGen Trainee Symposium, 2006.
10. Lecoq L, **Lavoie-Lamoureux A**, Beauchamp G., Jean D., Lavoie J.P. . Genomic and non-genomic effects of dexamethasone on equine peripheral blood neutrophils. Louisville, KY: 24th Annual American College of Veterinary Medicine Forum, 2006.
11. **Lavoie-Lamoureux A.** CC, Beauchamps G., Martin J.G., Lavoie J.P. Activation des neutrophiles par L'IL-4, chez les chevaux asthmatiques (souffle). Québec: APPQ, 2006.
12. **Lavoie-Lamoureux A.**, Cesarini C, Beauchamps G., Lavoie J.P. Activation of peripheral blood neutrophils by Interleukin(IL)-4, in heaves. San Diego (CA): American Thoracic Society (ATS), 2006.
13. Huang H. **Lavoie-Lamoureux A**, Lavoie J.P. Recombinant equine IL-4 upregulates the expression of IL-8 and E-selectin mRNA by equine pulmonary artery endothelial cells. San Diego (CA): American Thoracic Society (ATS), 2006.
14. **Lavoie-Lamoureux A.**, J Martin, J.-P. Lavoie. Peripheral blood leucocytes from asthmatic horses (heaves) present an aberrant response to bacterial extracts. Montreal (QC): CSACI and AllerGen 2006.
15. **Lavoie-Lamoureux A.** DellaGaspara B. Étude de la régulation traductionnelle de XMRF4 lors de la myogénèse primaire chez *Xenopus Leavis*. Montreal (QC): Université de Montréal, 2003.