

Université de Montréal

LES NEUTROPHILES NE SONT PAS RÉSISTANTS AUX GLUCOCORTICOÏDES

par

GAËLLE HIRSCH

Département des sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences vétérinaires

option sciences cliniques

Juillet 2012

© Gaëlle Hirsch, 2012

Résumé

Les neutrophiles sont généralement considérés résistants aux glucocorticoïdes. Cependant, peu d'études comparant l'effet de ces drogues sur les neutrophiles et les autres leucocytes sanguins (monocytes, lymphocytes et éosinophiles) ont été rapportées. Dans notre étude, nous avons évalué la réponse aux glucocorticoïdes de ces deux populations cellulaires chez le cheval et l'homme. Les cellules, préalablement isolées du sang de 6 chevaux et 4 sujets humains sains, ont été incubées pendant 5 h en présence de lipopolysaccharide (LPS; 100 ng/mL) seul ou combiné avec de l'hydrocortisone, de la prednisolone ou de la dexaméthasone (10^{-8} M et 10^{-6} M). L'expression d'ARNm pour l'IL-1 β , le TNF- α , l'IL-8, la glutamine synthétase et le récepteur α des glucocorticoïdes (GR- α) a été quantifiée par qPCR. Les neutrophiles équins ont également été incubés pendant 20 h en présence de ces 3 glucocorticoïdes et la survie cellulaire a été évaluée par cytométrie de flux et microscopie optique.

Nous avons démontré que les glucocorticoïdes inhibaient l'expression des gènes pro-inflammatoires induite par le LPS pour les deux populations cellulaires chez les deux espèces étudiées. L'expression de la glutamine synthétase était également significativement augmentée par les glucocorticoïdes chez les neutrophiles et les autres leucocytes sanguins équins. De manière générale, l'intensité de la réponse aux glucocorticoïdes s'est avérée similaire dans les 2 populations leucocytaires et chez les deux espèces. Les glucocorticoïdes augmentaient également la survie des neutrophiles équins, phénomène également rapporté dans d'autres espèces.

Ainsi, les glucocorticoïdes exercent des effets d'intensité comparable sur les neutrophiles et les autres leucocytes sanguins. Nous spéculons que la faible réponse à la corticothérapie observée lors de maladies inflammatoires chroniques neutrophiliques comme l'asthme sévère ou la Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique (MPOC) ne s'explique pas par une corticorésistance intrinsèque des neutrophiles.

Mots-clés: neutrophiles, cheval, homme, réponse aux glucocorticoïdes, effets géniques, survie, cytokines pro-inflammatoires, récepteur α des glucocorticoïdes, glutamine synthétase

Abstract

Neutrophils are generally considered resistant to glucocorticoids compared to other inflammatory cells. However, there are few studies comparing the effects of glucocorticoids in neutrophils and those of other blood leukocytes (monocytes, lymphocytes and eosinophils). In our study, we assessed glucocorticoid-responsiveness in equine and human peripheral blood neutrophils and in neutrophil-depleted leukocytes. Cells were isolated from 6 healthy horses and 4 human healthy subjects. They were incubated for 5 h with or without lipopolysaccharide (LPS; 100 ng/mL) alone or combined with hydrocortisone, prednisolone or dexamethasone (10^{-8} M and 10^{-6} M). IL-1 β , TNF- α , IL-8, glutamine synthetase and Glucocorticoid Receptor α (GR- α) mRNA expression was quantified by qPCR. Equine neutrophils were also incubated for 20 h with or without the three glucocorticoids and cell survival was assessed by flow cytometry and light microscopy.

We found that glucocorticoids down-regulated LPS-induced pro-inflammatory mRNA expression in both cell populations and species. These drugs also significantly increased glutamine synthetase gene expression in both equine cell populations. The magnitude of glucocorticoid response was generally similar in both cell populations and species. As reported in other species, glucocorticoids significantly increase the survival in equine neutrophils.

Based on these results, it appears that glucocorticoids exert effects of similar magnitude on neutrophils and on other blood leukocytes. We speculate that the poor response to glucocorticoids observed in some chronic neutrophilic human diseases such as severe asthma or Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is not explained by an inherent attenuated response of neutrophils to these drugs.

Keywords: neutrophils, horse, human, glucocorticoids responsiveness, genomic effects, survival, pro-inflammatory cytokines, Glucocorticoid Receptor, glutamine synthetase

Table des matières

Résumé	ii
Abstract	iv
Liste des tableaux	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations	x
Remerciements	xiv
Introduction	1
Recension des écrits	3
I. Les neutrophiles	3
A. Le système immunitaire	3
B. Biologie du neutrophile	4
1. Du myéloblaste au neutrophile segmenté.....	4
2. Migration tissulaire: activation, diapédèse, chimiotactisme	5
3. Destinée et apoptose.....	5
C. Fonction du neutrophile.....	8
1. La phagocytose.....	8
a. Stress oxydatif	9
b. Relâche de substances antimicrobiennes.....	10
2. Synthèse protéique : synthèse <i>de novo</i>	11
a. Cytokines produites chez l'homme et chez le cheval.....	11
b. Rôle des cytokines étudiées.....	13
D. Neutrophiles et corticorésistance.....	14
II. Les glucocorticoïdes	16
A. Biosynthèse et régulation par l'axe hypothalamo-hypophysaire.....	16
1. Biosynthèse	16
2. Régulation par l'axe hypothalamo-hypophysaire.....	17
B. Effets biologiques	18
C. Mécanisme d'action moléculaire.....	20
1. Gène du GR et caractéristiques du GR.....	20

2.	Voie génique.....	22
a.	Liaison au GR et translocation nucléaire.....	22
b.	Activation de la transcription génique.....	23
c.	Inhibition de la transcription génique.....	23
d.	Interaction protéine-protéine	23
e.	Rôle des HAT et HDAC2.....	23
3.	Voie non génique.....	24
a.	Action non génique n'impliquant pas de récepteurs (non spécifique)	25
b.	Action non génique via le récepteur intracellulaire classique	25
c.	Action non génique via des récepteurs non classiques.....	25
4.	Interaction voie génique et non génique.....	26
5.	Effets post-transcriptionnels.....	26
6.	Effets secondaires des glucocorticoïdes chez le cheval	27
D.	La résistance aux glucocorticoïdes	28
1.	Résistance aux glucocorticoïdes exemple de l'asthme sévère: définition.....	28
2.	Mécanismes moléculaires.....	28
a.	Liaison au GR et translocation nucléaire déficiente.....	29
b.	Expression de l'isoforme GR- β augmentée.....	29
c.	Activation de facteurs transcriptionnels	30
d.	Acétylation anormale des histones et HDAC2.....	30
e.	Autres.....	31
E.	Résistance aux glucocorticoïdes chez le cheval.....	31
III.	Effet des glucocorticoïdes sur les neutrophiles	33
A.	Effets anti-inflammatoires des glucocorticoïdes sur les neutrophiles	33
B.	Effet des glucocorticoïdes sur la survie des neutrophiles	34
1.	Augmentation de la survie des neutrophiles par retard dans l'apoptose .	34
2.	Mécanismes moléculaires.....	34
C.	Les neutrophiles sont-ils résistants aux glucocorticoïdes?	35
	Manuscrit de l'article soumis au journal PLoS ONE	37
	Discussion	69

<i>Les glucocorticoïdes exercent des effets géniques sur les deux populations cellulaires et dans les 2 espèces étudiées</i>	70
<i>Étude des effets non géniques des glucocorticoïdes sur les neutrophiles et les autres leucocytes sanguins chez le cheval</i>	71
<i>L'efficacité des glucocorticoïdes étudiés sur les leucocytes équins est cortico-dépendante</i>	72
<i>Les glucocorticoïdes exercent des effets concentration-dépendants sur les neutrophiles équins</i>	74
<i>La réponse au LPS est spécifique d'espèce et influencée par le type de cellulaire étudié</i>	74
<i>La pureté en neutrophiles et les techniques d'isolation cellulaire peuvent-elles influencer les résultats obtenus?</i>	75
<i>Une diminution de l'expression du GR-α induite par les agonistes étudiés pourrait mener à une corticorésistance</i>	76
<i>Les glucocorticoïdes augmentent la survie des neutrophiles mais n'entraînent pas d'activation cellulaire prolongée</i>	77
Conclusion et perspectives	78
Sources documentaires	80
Annexe 1: Isolation des granulocytes humains au FICOLL-PREMIUM 1.084	I
Annexe 2: Isolation des neutrophiles humains par immunosélection magnétique (MACS).....	IV

Liste des tableaux

Tableau I. Cytokines produites par les neutrophiles humains et équins.....13

Tableau II. Effets biologiques des glucocorticoïdes.....18

Tableau de l'article soumis au journal PLoS ONE

Table S1. Sequences of primer pairs used for qPCR analysis.....68

Liste des figures

Figure 1. Mécanismes moléculaires de l'apoptose.....	7
Figure 2. Cytopréparation et coloration par protocole Hema 3 (Fisher Scientific) des neutrophiles équins viables et apoptotiques après 20h de culture.....	8
Figure 3. Stress oxydatif des neutrophiles.....	10
Figure 4. Mécanismes de régulation de la sécrétion de cortisol par l'axe hypothalamo-hypophysaire.....	17
Figure 5. Schématisation du gène et de l'ARNm du GR humain.....	21
Figure 6. Effets géniques des glucocorticoïdes.....	22
Figure 7. Suppression de l'activité des gènes pro-inflammatoires.....	24
Figure 8. Effets non géniques des glucocorticoïdes.....	26
Figure 9. Mécanismes de résistance aux glucocorticoïdes.....	31
Figure 10. Modèle schématique de l'augmentation de la survie des neutrophiles causée par les glucocorticoïdes.....	35

Figures de l'article soumis au journal PLoS ONE

Figure 1. Concentration-dependent effects of glucocorticoids on gene expression in equine peripheral blood neutrophils.....	64
Figure 2. Glucocorticoid effects on gene expression in equine peripheral blood neutrophils and neutrophil-depleted leukocytes.....	65
Figure 3. Glucocorticoid effects on pro-inflammatory cytokines gene expression in human peripheral blood neutrophils and neutrophil-depleted leukocytes.....	66
Figure 4. Comparison of glucocorticoid inhibitory effects between equine cell populations.....	67
Figure 5. Comparison of dexamethasone inhibitory effect in equine and human neutrophils.....	67
Figure 6. Glucocorticoids increase survival in equine peripheral blood neutrophils..	68

Liste des abréviations

ACTH	Adrenocorticotrop hormone; adrénocorticotrophine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALI	Acute lung injury
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	Activator protein-1; protéine activatrice-1
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
Bcl-2	B-cell lymphoma-2; lymphome à cellules B-2
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease; MPOC en français
CREB	cAMP response element-binding
CRF	Corticotropin-releasing hormone; corticolibérine
DCF	Fluorescent 2', 7' - dichlorofluorescein
ERK	Extracellular-signal-regulated kinase
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
fMLP	N-formyl-méthionine-leucine-phénylalanine
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor; facteur stimulant les granulocytes
GC	Glucocorticoïde
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor; facteur stimulant les granulocytes et les macrophages
GR	Glucocorticoid receptor; récepteur des glucocorticoïdes
GRE	Glucocorticoid responsive element
HAT	Histone acétyl transférase
HDAC2	Histone déacetylase 2
I κ B	Inhibitor of κ B; inhibiteur du κ B
IAP	Inhibitor of apoptosis protein; protéine inhibitrice de l'apoptose
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1; molécule d'adhésion intercellulaire-1
IKK	I κ B kinase

IL	Interleukine
IL-1Ra	IL-1 Receptor antagonist; récepteur antagoniste de l'IL-1
INF	Interféron
IV	Intraveineux
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Leucotriène
MACS	Magnetic antibody cell selection; immunosélection magnétique
MKP-1	Map kinase phosphatase-1
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor; facteur stimulant les macrophages
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mcl-1	Myeloid cell leukemia-1
MIF	Migration Inhibitory Factor; facteur inhibiteur de migration
MIP-2	Macrophage inflammatory protein-2; protéine inflammatoire des macrophages-2
MPOC	Maladie pulmonaire obstructive chronique
NAPDH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF- κ B	Nuclear factor- κ B; facteur nucléaire- κ B
NOS	Nitric oxid synthase; synthase d'oxyde nitrique
NOX	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase
NR3C1	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1; sous-famille des récepteurs nucléaires 3, groupe C, membre 1
PAF	Platelet activating factor; facteur activant les plaquettes
PCR	Polymerase chain reaction; réaction en chaîne par polymérase
PI3Ks	Phosphoinositide 3-kinases
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acétate
PO	<i>Per os</i>
ROS	Reactive oxygen species; dérivé réactif de l'oxygène
TGF	Transforming Growth Factor; facteur de croissance de transformation

TLR	Toll like receptor
TNF	Tumor necrosis factor; facteur de nécrose tumorale

A tous ceux que j'aime

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier du fond du cœur le Dr Jean-Pierre Lavoie de m'avoir donné la chance incroyable de travailler à ses côtés et de m'avoir supervisé pendant ces deux années. Je vous suis extrêmement reconnaissante des opportunités que vous m'avez offertes, des précieux conseils que vous m'avez prodigués, essentiels à la réussite de mon projet mais aussi de mon avenir professionnel. Même si vous étiez en Italie durant ma première année de maîtrise, vous étiez toujours à l'écoute et d'une grande disponibilité. Votre rigueur scientifique, votre ambition, votre créativité mais aussi vos qualités humaines exceptionnelles nous donnent à tous la motivation et l'envie de se surpasser. Vous êtes une source d'inspiration et un modèle à suivre. J'ai beaucoup appris à vos côtés et j'espère que nos chemins se croiseront à nouveau à l'avenir.

Mes remerciements très sincères aux Drs Mariela A. Segura et Christian Bédard pour avoir participé à la révision de ce mémoire ainsi que pour votre aide et votre disponibilité pendant ma maîtrise. Merci également aux Drs Mariela A. Segura et Daniel Jean d'avoir accepté d'être membres de mon comité-conseil et de m'avoir éclairé de vos lumières quand j'en avais besoin.

J'ai bénéficié de financement provenant des organismes CRNSG et de la Faculté de médecine vétérinaire depuis le début de ma maîtrise. Je tiens donc à les remercier pour m'avoir donné l'opportunité de mener à bien mon projet et de voyager à travers le Canada et les États-Unis afin d'assister et de participer à des conférences formatrices qui ont facilité les échanges et les rencontres humaines et scientifiques. Ce fût une expérience très enrichissante.

Un grand merci au personnel administratif de m'avoir aiguillé dans le labyrinthe des démarches et protocoles de la faculté! J'aimerais mentionner Geneviève Michon, Annie Lavertu, David Champigny, Micheline Saint-Germain, Christine Blondin et Huguette Mallet.

J'aimerais maintenant remercier tout particulièrement mes collègues présents et passés: Anouk Lavoie-Lamoureux, "la crème de la crème", je te suis éternellement reconnaissante pour ton aide précieuse, ta rigueur, ton dévouement, ta patience, ta

gentillesse et ta douceur qui m'ont permis de progresser et de mener à bien mon projet. Tu es mon initiatrice neutrophilique et j'espère conserver des liens solides avec toi dans les années à venir! Un grand merci également à Josiane Lefebvre-Lavoie pour sa rigueur, son sens de l'organisation, sa disponibilité, sa générosité et son sens du rythme! Sans oublier: Aude Peltier, Michele Bullone, Mathilde Leclère, Roxane Boivin, Mylène Chevigny, Émilie Gélinas, Karine GM, Natalia Rodrigues, Julia Dubuc, Amandine Vargasse, Mireille Godbout, Maud Delagarde, Johanne Vanderstock, Paul-André Risse, Alexandra Walling, Véronique Duval, Véronique Desjardins pour m'avoir aidé ou supporté et avoir rendu ces deux années de travail des plus agréables. Merci également aux animaliers de la Ferme Frontenac, Roger F., Robert C. et Normand L. pour leur soutien, leur humour et leur bonne humeur matinale.

Une mention spéciale à mes amis du Québec et d'Outre-Atlantique, Roxane, Maxime, les deux Camilles, les deux Aurélie, Pierrick, Thiébaud, Marianne, Maïa, Pablo, les deux Edouard, Fanny, Eduardo, Marie-Soleil, Caro, Perrine, Johanne, Nicolas, Christian et Raphaël, pour votre support inconditionnel, votre fidélité, vos encouragements, votre sens de l'humour et vos personnalités exceptionnelles. Malgré les kilomètres qui nous séparent ou qui vont nous séparer, vous aurez toujours une place dans mon cœur. Vous me manquez déjà.

Enfin, merci à mes parents Gilles et Sylvia pour leur amour et leur soutien depuis le tout début de mon marathon étudiant. C'est grâce à vous que je suis arrivée jusqu'ici. Je vous dois tant et je vous aime. Merci à Olivier, mon frère, pour ton support et surtout merci d'être ma source de distraction quotidienne! Un énorme merci à tous les membres de ma famille et en particulier mes grands-parents pour votre amour et vos encouragements.

Gaëlle

Introduction

Les neutrophiles infiltrent les voies respiratoires des patients atteints d'asthme sévère et de MPOC, deux maladies peu sensibles à la corticothérapie. On explique généralement la faible réponse de ces patients par une corticorésistance inhérente des neutrophiles. Le "souffle" est une maladie équine utilisée comme modèle de recherche pour l'asthme humain. Typiquement, cette maladie affecte les petites voies respiratoires des chevaux. Une caractéristique particulière de cette condition est la présence d'une neutrophilie pulmonaire importante chez les individus atteints. L'administration de glucocorticoïdes entraîne une amélioration significative de la fonction pulmonaire malgré une infiltration neutrophilique persistante dans les voies respiratoires.

Ce phénomène pourrait être expliqué par une augmentation de la demi-vie, due à un retard dans l'apoptose de ces cellules causée par les glucocorticoïdes. Un manque d'effet inhibiteur de ces derniers sur la relâche des métabolites de l'acide arachidonique, la dégranulation et le chimiotactisme des neutrophiles a également été rapporté. L'activation prolongée de cette population leucocytaire pourrait contribuer à la fois au maintien de la réponse inflammatoire et au dommage tissulaire par la relâche d'oxydants et de protéases dans le milieu. Les glucocorticoïdes ont des effets anti-inflammatoires puissants et sont couramment utilisés en médecine vétérinaire et humaine. Ainsi, une corticorésistance inhérente des neutrophiles à cette classe médicamenteuse proscrirait leur utilisation dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques neutrophiliques.

Cependant, plusieurs études ont démontré que les glucocorticoïdes inhibent la production de médiateurs pro-inflammatoires par les neutrophiles chez plusieurs espèces, dont l'homme et le cheval. Ceci questionne donc une corticorésistance intrinsèque réelle chez cette population cellulaire. Considérant que peu d'études comparant les effets des glucocorticoïdes sur les neutrophiles et les autres leucocytes sanguins sont rapportées dans la littérature, une corticorésistance relative des neutrophiles ne peut être exclue.

L'hypothèse de notre recherche est que les glucocorticoïdes exercent des effets d'intensité similaire sur ces deux populations cellulaires. Nous spéculons qu'une corticorésistance inhérente aux neutrophiles n'est pas responsable de la faible réponse à la corticothérapie observée lors de maladies inflammatoires chroniques neutrophiliques comme l'asthme sévère ou la MPOC. L'objectif principal est de comparer les effets de 3 glucocorticoïdes sur les neutrophiles et sur les autres leucocytes sanguins équins. Afin de déterminer si cette réponse est spécifique d'espèce, les leucocytes humains seront également étudiés.

Recension des écrits

I. Les neutrophiles

Afin de faciliter la compréhension du lecteur, le modèle utilisé dans cette première partie sera celui d'une invasion bactérienne.

A. Le système immunitaire

Par définition, le système immunitaire est le système de défense dirigé contre les maladies induites par des antigènes externes, particulièrement l'invasion de microorganismes infectieux (Tizard, 2009). Cette dernière génère une réponse immunitaire innée (non spécifique et quasi-immédiate) et acquise (spécifique) destinée à détruire l'agent pathogène. La majorité de ces microorganismes sont phagocytés puis tués par les cellules immunitaires. Ces cellules présentes dans la circulation sanguine sont appelées leucocytes. Elles dérivent de cellules souches produites dans la moelle osseuse et sont issues de deux lignées: la lignée lymphoïde et la lignée myéloïde. La première donne naissance aux lymphocytes, essentiels à l'immunité acquise, alors que la seconde est responsable de la production de cellules phagocytaires comme les macrophages ou les neutrophiles, éléments pivots de la réponse immunitaire innée. Bien que leurs rôles soient intimement liés dans l'orchestration de la réponse immunitaire, chaque population cellulaire possède des caractéristiques et des mécanismes d'action qui lui sont propres.

L'examen d'un frottis sanguin permet de différencier les types de leucocytes présents. Les granulocytes possèdent un cytoplasme granulaire, ainsi qu'un noyau lobulé et irrégulier et sont aussi nommés "polynucléaires" pour cette raison. Ils sont divisés en 3 catégories: éosinophiles, basophiles et neutrophiles. Les autres leucocytes possèdent un noyau rond et régulier et sont appelés "mononucléaires": ce sont les monocytes (précurseurs des macrophages tissulaires) et les lymphocytes.

Parmi les cellules phagocytaires, les neutrophiles migrent au site de l'inflammation dans sa phase aigüe et constituent la première ligne de défense de l'hôte contre l'invasion de microorganismes (Cassatella, 1995, 1999; Gabrilovich, 1999).

B. Biologie du neutrophile

Les neutrophiles constituent la plus grande population de leucocytes dans le sang dont 50% des leucocytes sanguins chez le cheval (Smith, 2009; Tizard, 2009).

1. Du myéloblaste au neutrophile segmenté

Les neutrophiles sont produits par la moelle osseuse à partir des myéloblastes sous l'influence de cytokines comme le GM-CSF, de facteurs exogènes comme le LPS dérivé de bactéries à GRAM -, et des autres populations leucocytaires (Smith, 2009; Tizard, 2009). La maturation du myéloblaste en neutrophile segmenté se fait entre 4 et 9 jours en fonction des espèces (Smith, 2009; Tizard, 2009). Une fois en circulation, ils sont incapables de se diviser. Dans le compartiment vasculaire, les neutrophiles sont divisés en deux groupes: les neutrophiles circulants et les neutrophiles marginalisés. Ces derniers sont capables d'adhérer à l'endothélium des capillaires au niveau de la moelle osseuse et des poumons principalement (Witko-Sarsat, Rieu, Descamps-Latscha, Lesavre, & Halbwachs-Mecarelli, 2000) et sont alors très rapidement mobilisables lors d'un phénomène inflammatoire. Chez les chevaux, la proportion de neutrophiles marginalisés est égale à la proportion de neutrophiles en circulation (Smith, 2009).

La durée de demi-vie des neutrophiles sanguins est d'environ 6 à 14h en fonction des espèces animales (Smith, 2009). Cependant, une étude a récemment démontré par marquage radioactif *in vivo* que la durée de vie totale des neutrophiles humains était de 5,4 jours soit 10 fois plus longue qu'estimée auparavant (Pillay et al., 2010). Les résultats obtenus demandent toutefois confirmation, la technique, le modèle mathématique ainsi que l'isotope (deutérium) utilisés dans l'estimation de la durée de vie des neutrophiles soulevant quelques questions (Li, Turner, Emson, Hellerstein, & Dale, 2011; Simon & Kim, 2010; Tofts, Chevassut, Cutajar, Dowell, & Peters, 2011). Il faut entre 48 et 60 h pour remplacer le pool total sanguin de neutrophiles.

Les neutrophiles migrent dans les tissus par diapédèse à travers l'endothélium vasculaire et ne retournent pas en circulation. Lors d'inflammation, d'infection ou de plaie, la migration tissulaire au site d'intérêt peut se faire en 2 h. En

l'absence de tels phénomènes, les neutrophiles sont détruits par les macrophages de la moelle osseuse, du foie et de la rate ou encore sont "perdus" dans les sécrétions corporelles et excréments dans les 4 jours suivants leur entrée dans la circulation sanguine (Smith, 2009).

2. Migration tissulaire: activation, diapédèse, chimiotactisme

Pour être fonctionnels les neutrophiles doivent être activés. La relâche de médiateurs inflammatoires par les tissus endommagés (alarmines), mais aussi par les microorganismes (LPS) présents au site de l'inflammation, active les cellules endothéliales. Ces dernières vont alors sécréter à leur surface des substances capables d'interagir avec le pool de neutrophiles marginalisés (PAF, LTB₄, IL-8, P et E-sélectines), les activer (augmentation de l'expression de L sélectines) et permettre l'adhésion des neutrophiles à la paroi vasculaire (interaction entre intégrine β 2 et ICAM-1). Les neutrophiles vont alors quitter la circulation sanguine et migrer entre les cellules endothéliales afin d'atteindre les tissus, c'est la diapédèse. La relâche de médiateurs inflammatoires par les tissus endommagés et les cellules comme les défensines, l'activation du complément, le LTB₄, les chimiokines (IL-8, MIP-2) ou encore la présence d'endotoxines (LPS) au site de l'inflammation vont entraîner la migration par chimiotactisme des neutrophiles (Pirie, Dixon, Collie, & McGorum, 2001; Smith, 2009; Tizard, 2009; Witko-Sarsat, et al., 2000).

3. Destinée et apoptose

Les neutrophiles ont une réserve d'énergie limitée qui ne peut être renouvelée. Ils sont immédiatement actifs après leur entrée en circulation mais ne peuvent effectuer qu'un nombre restreint de phagocytoses une fois dans les tissus contrairement aux macrophages. La neutralisation de l'agent pathogène qui en résulte mène à la résolution de l'inflammation. S'en suit l'apoptose des neutrophiles, une mort cellulaire programmée, (Filep & El Kebir, 2009). Des changements dans le profil lipidique (exposition des phosphatidylsérines) ou la glycosylation de la membrane cellulaire, ainsi que l'altération de l'expression des récepteurs de surfaces des cellules apoptotiques apparaissent et rendent ces dernières rapidement identifiables et phagocytées par les macrophages (Gabrilovich, 1999). Ce

phénomène prévient la relâche du contenu cytotoxique des neutrophiles (radicaux libres, enzymes des granules) et limite les dommages causés aux tissus environnants. De plus l'élimination des neutrophiles par les macrophages est associée à la relâche de molécules anti-inflammatoires par ceux-ci comme le TGF- β (Fadok et al., 1998). Les neutrophiles apoptotiques et nécrotiques sont également capables de libérer des substances anti-microbiennes et anti-inflammatoires, les α -défensines (Miles et al., 2009). L'apoptose joue donc un rôle essentiel dans la régulation du système immunitaire et la résolution de l'inflammation. Deux voies d'activation sont impliquées dans le mécanisme d'apoptose (Saffar, Ashdown, & Gounni, 2011) et sont illustrées sur la **Figure 1**:

- la voie extrinsèque, à laquelle prennent part les récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF, comme Fas,
- la voie intrinsèque mettant en jeu la mitochondrie (libération du cytochrome c) et gouvernée par des protéines appartenant à la superfamille Bcl-2.

Ces deux voies conduisent à l'activation de protéases à cystéine appelées caspases, responsables des phénomènes morphologiques et biochimiques observés: exposition des phosphatidylsérines à la surface de la membrane cellulaire, fragmentation du noyau et du cytosquelette et condensation de la chromatine (**Figure 2**). L'intégrité des membranes est conservée au cours du processus apoptotique.

L'apoptose des neutrophiles est donc régulée par de multiples protéines. Les plus importantes étant les caspases, les protéines de la famille Bcl-2 incluant Mcl-1, IAPs, PI3Ks et p38-MAPK. Toute molécule capable d'influencer l'activité de ces protéines peut exercer un effet sur l'apoptose de neutrophiles.

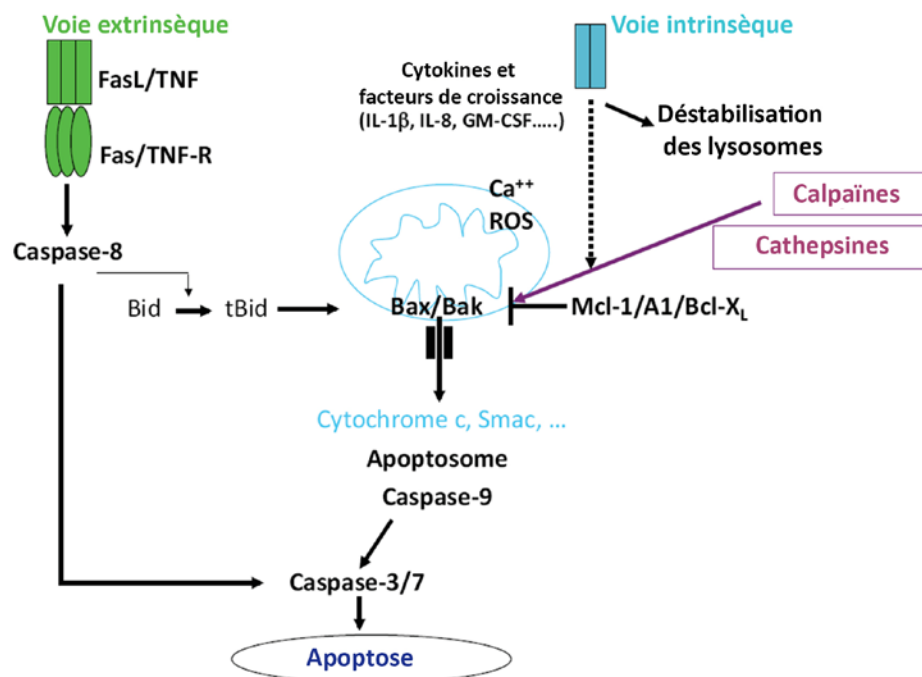


Figure 1. Mécanismes moléculaires de l'apoptose. Adaptée de "Neutrophil apoptosis during viral infections," par Elbim, C., Katsikis, P. D., & Estaquier, J. (2009). *Open Virol J*, 3, p. 53. © Elbim *et al.*; sous licence Creative Commons.

Bcl-X_L: B-cell lymphoma 2 XL; Bax/Bak ; Bcl-2-associated X protein/Bcl-2 homologous antagonist/killer; Bid: BH3 interacting-domain death agonist ; tBid: truncated active form of BID; Fas : apoptosis stimulating fragment; FasL: Fas Ligand ; GM-CSF: Granulocyte macrophage-colony stimulating factor; Mcl-1: Myeloid cell leukemia-1; ROS: reactive oxygen species; Smac: Second mitochondria-derived activator of caspases; TNF: Tumor Necrosis Factor; TNF-R: Tumor Necrosis Factor Receptor

Le mécanisme d'apoptose implique l'activation des cystéines protéases ou capsases, responsable de la dégradation des protéines contribuant au phénotype apoptotique. Deux voies majeures sont impliquées dans l'apoptose. La voie extrinsèque dépend de récepteurs comme Fas et TNF-R qui peuvent activer directement la cascade des caspases. La protéine pro-apoptotique Bid est clivée, activée et transloquée dans la mitochondrie où elle va induire la relâche du cytochrome c et d'autres facteurs pro-apoptotiques. La voie intrinsèque met en jeu la mitochondrie et gouvernée par des protéines appartenant à la superfamille Bcl-2. Les neutrophiles expriment les protéines anti-apoptotiques comme Mcl-1, A1 et Bcl-X, dont le niveau d'expression diminue avant le début de l'apoptose. Les calpaïnes est une famille de cystéine protéases non caspases. Lors de l'apoptose, l'activation des calpaïnes permet le clivage de Bax en un fragment actif. La sérine protéase cathepsine D présente dans les granules azurophiles des neutrophiles, pourrait également intervenir dans l'activation des caspases.

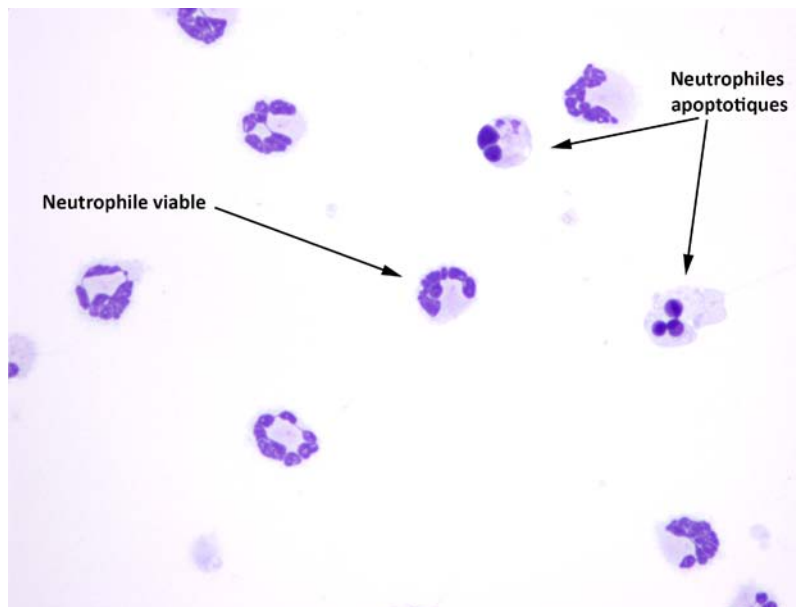


Figure 2. Cytopréparation et coloration par protocole Hema 3 (Fisher Scientific) des neutrophiles équin viables et apoptotiques après 20h de culture. Image obtenue par microscopie optique (magnification x500).

Les neutrophiles apoptotiques présentent une condensation de la chromatine ainsi que de la karyorrhexie. Les neutrophiles viables possèdent encore une lobulation normale du noyau et une granularité fine de la chromatine.

C. Fonction du neutrophile

On a longtemps pensé que le rôle du neutrophile dans le processus inflammatoire était limité à la phagocytose et à la relâche d'agents cytotoxiques. Cependant il a été également démontré que cette population cellulaire avait la capacité de synthétiser un grand nombre de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance, en réponse à une large variété de stimuli (Cassatella, 1995, 1999). Le neutrophile a donc une double fonction à savoir un rôle de surveillance immunitaire et d'élimination de microorganismes ou de débris cellulaires au site de l'inflammation.

1. La phagocytose

L'efficacité de la phagocytose est remarquablement augmentée par la présence d'opsonines (complément, lectine liant le mannose ou immunoglobulines) capables de recouvrir l'agent pathogène et de faciliter alors sa reconnaissance par les neutrophiles (Tizard, 2009). Une fois piégée par les lamellipodes des neutrophiles, la

bactérie est endocytée et séquestrée dans un phagosome, où elle va être détruite selon 2 mécanismes distincts (Gabrilovich, 1999; Tizard, 2009):

- par formation de radicaux libres et autres agents oxydants puissants, c'est qu'on appelle le stress ou métabolisme oxydatif,
- par relâche de médiateurs toxiques, d'enzymes lytiques et de peptides antimicrobiens par les granules intracellulaires ou les lysosomes.

Lorsque les neutrophiles sont incapables de phagocyter un agent pathogène, ils relâchent le contenu de leurs granules et des lysosomes dans le milieu pouvant alors créer des dommages tissulaires importants.

a. Stress oxydatif

Dans les secondes suivant la phagocytose d'un microorganisme, les neutrophiles augmentent leur consommation d'oxygène d'environ 100 fois (Tizard, 2009). Cette augmentation est le résultat de l'activation de la NADPH oxidase (NOX), un complexe enzymatique présent à la surface membranaire du phagosome. Les composants du complexe NOX sont séparés dans les cellules inactivées. Le processus d'activation est déclenché par des cytokines, comme le TNF- α , ou la liaison des récepteurs phagocytaires à une bactérie opsonisée. Il en résulte l'assemblage du NOX au niveau de la membrane du phagosome. Ce complexe catalyse ainsi la formation de produits bactéricides comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou les ions hypochlorides (OCl^-) via la superoxide dismutase et la myéloperoxydase diffusant dans le phagosome (**Figure 3**).

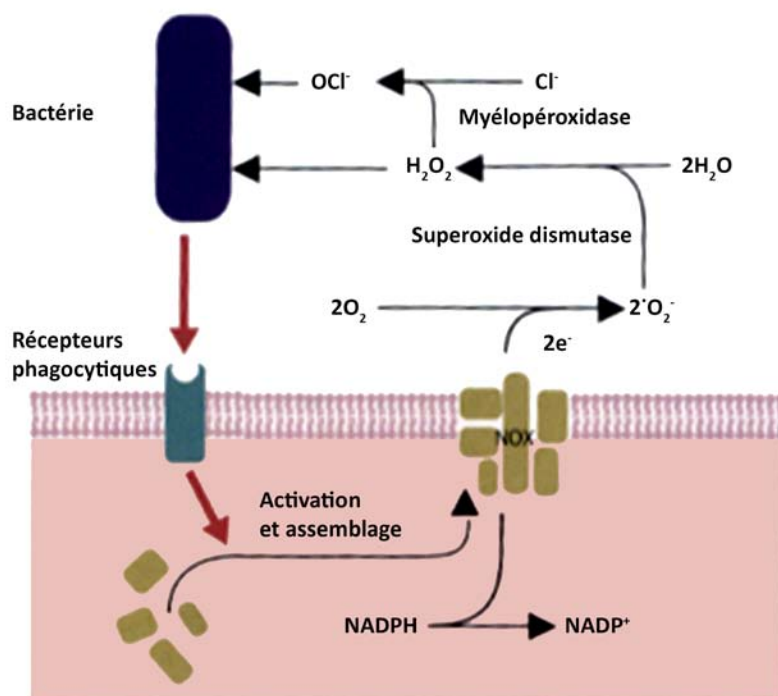


Figure 3. Stress oxydatif des neutrophiles. Adaptée de "Veterinary immunology : an introduction (8th ed.)" par Tizard, I. R. (2009). p. 35. © 2009 Tizard I. R. Reproduit avec permission.

b. Relâche de substances antimicrobiennes et cytotoxiques

Les neutrophiles sont également capables de relâcher dans le phagosome ou l'environnement toute une panoplie de substances antimicrobiennes et cytotoxiques (Gabrilovich, 1999; Tizard, 2009):

- **Enzymes lytiques:** au cours du temps, le phagosome acidifie progressivement son contenu, rendant alors son pH optimal pour l'activité enzymatique des protéases contenues dans les lysosomes qui fusionnent alors pour former le phagolysosome.
- **Peptides antimicrobiens:** Ils interagissent avec la membrane plasmique des bactéries, la déstabilisent, entraînent sa rupture et induisent la mort de ces dernières (on retrouve entre autres, la famille des défensines et cathélicidines).
Lysozyme: cette enzyme détruit le lien entre l'acide N-acétyl- muramique et N-acétyl-glucosamine et donc les peptidoglycanes des bactéries GRAM-positives. Le lysozyme est également une opsonine.

- **Lectines:** ce sont des opsonines capables de se lier aux carbohydrates, composants essentiels de la paroi bactérienne. Citons en exemple la lectine liant le mannose, la protéine D du surfactant ou encore la protéine C réactive.
- **Protéines se liant au fer:** certains pathogènes ont besoin de grandes quantités de fer pour leur croissance (agent catalyseur de nombreuses enzymes). L'organisme-hôte a également besoin de fer pour sa survie. Une des stratégies efficaces de défense de l'organisme est donc de lier le fer à des protéines, le rendant alors inutilisable par les bactéries. C'est le cas de la lactoferrine présente dans les granules des neutrophiles et relâchée dans le milieu environnant en réponse à une invasion bactérienne.

Ces substances anti-microbiennes et cytotoxiques sont principalement contenues dans les granules des neutrophiles.

Les granules apparaissent au cours du processus de différenciation du neutrophile. 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 (Faurischou & Borregaard, 2003). Les granules formées ultérieurement sont peroxydase-négatives et subdivisées en granules secondaires (ou « spécifiques ») et tertiaires (ou « gélatinase »). Les granules spécifiques possèdent une haute teneur en lactoferrine. Les granules tertiaires sont caractérisées par leur contenu élevé en gélatinase et contiennent principalement des enzymes permettant la dégradation de la matrice extracellulaire. Les granules secondaires, participent d'avantage à l'activité antimicrobienne.

2. Synthèse protéique : synthèse *de novo*

a. Cytokines produites chez l'homme et chez le cheval

Traditionnellement, il était admis que la maturation des neutrophiles en cellules différenciées aboutissait à l'incapacité de synthétiser des protéines. Cependant, les études réalisées dans les quinze dernières années ont démontré que les neutrophiles peuvent continuer à synthétiser des protéines et notamment des cytokines (Cassatella, 1995). Bien qu'un neutrophile élabore 10 à 300 fois moins de

cytokines qu'un monocyte, les polynucléaires étant dominants en nombre dans la plupart des phénomènes inflammatoires, il est aisément compréhensible que la somme des cytokines qu'ils produisent est non négligeable (Cassatella, 1999). Sous l'influence des produits bactériens comme le LPS, de cytokines comme le TNF- α , ou de facteurs de croissance comme le GM-CSF, les neutrophiles peuvent sécréter un grand nombre de cytokines. On en compte plus de 30 chez l'homme. Chez le cheval, la production de cytokines par les neutrophiles n'a pas encore été complètement explorée. Le **Tableau I** résume les principales cytokines dont la synthèse constitutive ou induite par les neutrophiles a été démontrée dans les 2 espèces.

Tableau I. Cytokines produites par les neutrophiles humains et équins, d'après Cassatella (1999); Driscoll (1994); Joubert, Silversides, & Lavoie (2001); Nerren, Payne, Halbert, Martens, & Cohen (2009).

Cytokines pro-inflammatoires	Chimiokines
-TNF- α	- IL-8
-IL-1 β	- MIP-2
-IL-6	
-IL-12	

b. Rôle des cytokines étudiées

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à 3 cytokines: IL-1 β , TNF- α et IL-8. L'IL-1 β et le TNF- α jouent un rôle important dans l'inflammation aigüe (Cassatella, 1999). Elles sont toutes les deux responsables de l'activation des neutrophiles, augmentent leur survie *in vitro* et stimulent *in vivo* la relâche systémique de glucocorticoïdes par leur action sur l'hypothalamus. Elles sont également des pyrogènes endogènes majeurs (Dinarello, 2004). La production de TNF- α par le neutrophile atteint son maximum après 5-10 h de stimulation avec du LPS et sa détection diminue par la suite jusqu'à 24 h. La production de TNF- α dans le neutrophile est agoniste-dépendante (Cassatella, 1999).

Au moins 4-5h sont requises avant de pouvoir détecter l'IL-1 β dans le surnageant de culture. Il est également à noter que les neutrophiles sécrètent constitutivement l'IL-1RA, une anticytokine agissant comme antagoniste compétitif des récepteurs à l'IL-1 β (Cassatella, 1999; Roberge et al., 1994). Cela représente donc un mécanisme d'autorégulation négative de la réponse inflammatoire par le neutrophile. L'expression de l'IL-1 β et de l'IL-1RA est différenciellement régulée en présence de certains agonistes, comme le TNF- α par exemple (Roberge et al., 1994). Ainsi, certaines conditions inflammatoires peuvent favoriser la relâche de l'un au détriment de l'autre, modulant ainsi la réponse inflammatoire (Cassatella, 1999).

L'IL-8 (CXCL8) est une chimiokine de la famille C-X-C qui a pour principale caractéristique d'exercer un effet chimiotactique sur les neutrophiles. Elle est produite par un grand nombre de types cellulaires (monocytes, cellules épithéliales etc.). C'est la cytokine la plus abondamment produite par les neutrophiles. Il a été démontré que ces derniers, fraîchement isolés, l'expriment l'ARNm de l'IL-8 de façon constitutive (Cassatella et al., 1992). Cette présence d'ARNm pourrait s'expliquer par un stress et une activation des neutrophiles lors du processus d'isolation ou par la présence d'un pool d'ARNm permettant la relâche rapide de la protéine après activation cellulaire. Nombreux sont les agonistes pouvant induire la production d'IL-8 par le neutrophile humain comme le LPS, lactoferrine, les ionophores, la substance P (Cassatella, 1999).

Le fait que ces cytokines soient responsables du chimiotactisme, de l'activation des neutrophiles et soient également sécrétées par ces derniers suggère l'existence d'un mécanisme d'auto-activation par un effet autocrine.

D. Neutrophiles et corticorésistance

Les glucocorticoïdes sont fréquemment utilisés dans le traitement des conditions immunes et inflammatoires chroniques pour leur effet anti-inflammatoire puissant. Cependant, les neutrophiles sont généralement considérés résistants à cette classe médicamenteuse en comparaison aux autres leucocytes sanguins (Schleimer, 1990, 2004). Ceci s'explique par le faible effet d'inhibition des glucocorticoïdes sur la dégranulation, le chimiotactisme ou sur la relâche des métabolites de l'acide arachidonique par les neutrophiles (Schleimer, Freeland, Peters, Brown, & Derse, 1989). De plus, les glucocorticoïdes prolongent la survie des neutrophiles par retard de la phase d'apoptose (Cox, 1995; Meagher, Cousin, Seckl, & Haslett, 1996). Certaines conditions inflammatoires chroniques associées à une inflammation neutrophilique, comme l'asthme sévère ou la MPOC, tendent à être résistantes à la corticothérapie (Barnes & Adcock, 2009; Ordonez, Shaughnessy, Matthay, & Fahy, 2000; Wenzel et al., 1999; Wenzel et al., 1997; Yang, Fong, Sim, Black, & Lasserson, 2007). Chez les chevaux atteints du souffle, la neutrophilie pulmonaire persiste après administration de glucocorticoïdes, malgré une amélioration

significative des signes cliniques (Lavoie et al., 2002; Lavoie et al., 2006; Leclere, Lavoie-Lamoureux, & Lavoie, 2011).

L'activation prolongée des neutrophiles contribue à la fois au maintien de la réponse inflammatoire et au dommage tissulaire par la relâche d'oxydants et de protéases dans le milieu. Ainsi, une corticorésistance inhérente des neutrophiles proscrireait leur utilisation dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques neutrophiliques.

II. Les glucocorticoïdes

A. Biosynthèse et régulation par l'axe hypothalamo-hypophysaire

1. Biosynthèse

Les glucocorticoïdes sont synthétisés par la *zona fasciculata* et *zona reticularis* du cortex des glandes surrénales (Hall & Guyton, 2011). Leur nom découle d'une de leur propriété qui est d'augmenter la glycémie. Le cortex des glandes surrénales synthétise les glucocorticoïdes à partir du cholestérol et les relâche dans la circulation sous l'influence de l'ACTH. Le glucocorticoïde majoritairement produit chez l'homme et le cheval est le cortisol (ou hydrocortisone). Environ 90 à 95% du cortisol sanguin se lie aux protéines plasmatiques, en particulier à une globuline appelée aussi transcortine et dans une moindre mesure, à l'albumine. Ce fort pourcentage de liaison diminue l'élimination du cortisol, ainsi ce dernier possède une demi-vie assez longue 60 à 90 minutes (Hall and Guyton 2011). La partie libre du cortisol après réduction et conjugaison par le foie est principalement excrétée dans l'urine.

Dans des conditions basales, les glandes surrénales produisent environ 15 à 20 mg/jour de cortisol chez l'homme (Hall & Guyton, 2011). Néanmoins, la concentration sanguine et le taux de sécrétion du cortisol fluctuent au cours de la journée, élevés tôt le matin et diminuant au cours de la journée . Cette production est contrôlée par l'axe hypothalamo-hypophysaire.

2. Régulation par l'axe hypothalamo-hypophysaire

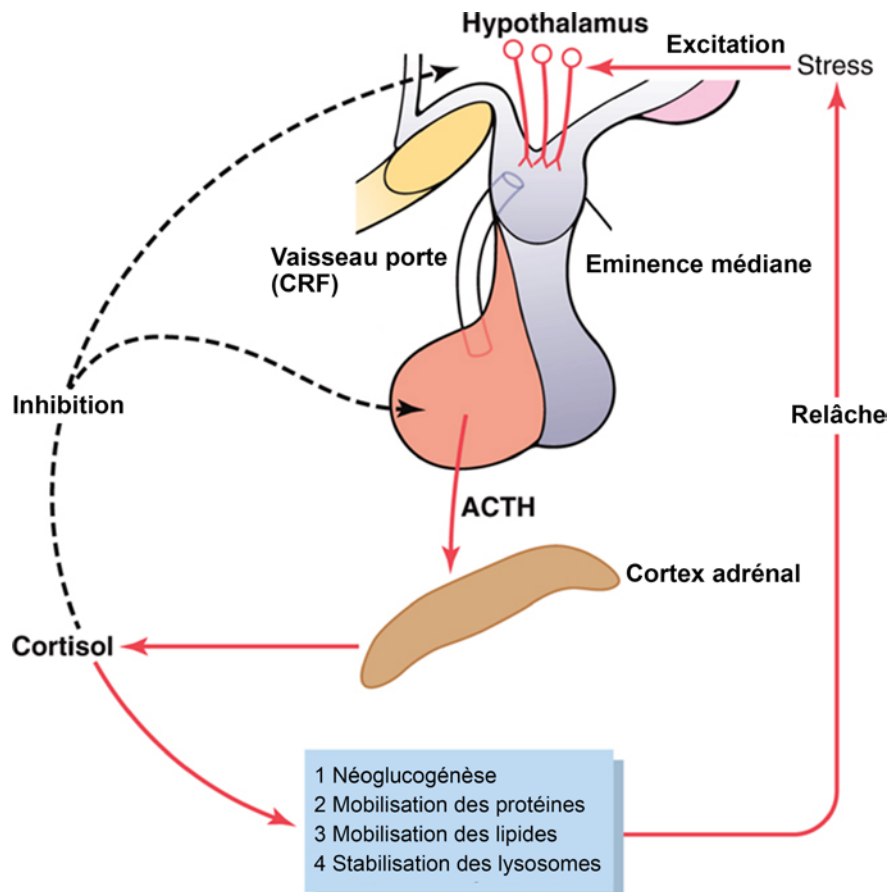


Figure 4. Mécanismes de régulation de la sécrétion de cortisol par l'axe hypothalamo-hypophysaire. Adaptée de "Guyton and Hall *Textbook of Medical Physiology* (12th ed.)" par Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2011). p. 932. © 2011 Saunders Elsevier. Reproduit avec permission.

Un stimulus de stress (douleur, infection, inflammation ou stress neurogénique) va entraîner la relâche de CRF par l'éminence médiane de l'hypothalamus via le système porte hypothalamo-hypophysaire. La glande pituitaire antérieure va alors augmenter sa relâche d'ACTH. Ce mécanisme entraîne la sécrétion rapide de cortisol dans la circulation sanguine et provoque une série d'effets métaboliques dirigés en réponse à l'état de stress. Il existe également un rétrocontrôle négatif direct du cortisol sur l'hypothalamus et la glande pituitaire antérieure (**Figure 4**).

B. Effets biologiques

Outre leurs effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs que nous allons aborder plus bas, les glucocorticoïdes possèdent de nombreux effets biologiques résumés dans le **Tableau II** ci-joint.

Tableau II. Effets biologiques des glucocorticoïdes, d'après Riviere & Papich (2009).

Métabolisme énergétique glucidique	<ul style="list-style-type: none"> - Stimulation de la néoglucogenèse. - Diminution de l'utilisation du glucose par les cellules. - Augmentation de la glycémie.
Métabolisme énergétique protéique	<ul style="list-style-type: none"> - Réduction du taux de protéines intracellulaires (augmentation du catabolisme et diminution de la synthèse protéique). - Augmentation de la synthèse des protéines plasmatiques par le foie. - Mobilisation des acides aminés dans la circulation sanguine. - Augmentation de l'urée dans la circulation sanguine.
Métabolisme énergétique lipidique	Mobilisation des acides gras libres dans la circulation sanguine (lipolyse).
Inhibition de la formation osseuse (ostéoporose induite par les glucocorticoïdes)	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition de la prolifération des ostéoblastes. - Stimulation de l'activité des ostéoclastes.
Effet minéralocorticoïde (liaison au récepteur des minéralocorticoïdes) : mime l'effet de l'aldostérone	<ul style="list-style-type: none"> - Polyurie et polydypsie. - Hypertension et hypokaliémie.
Effet cardio-respiratoire	<ul style="list-style-type: none"> - Effets chronotrope et inotrope positifs. - Potentialisation des effets des agonistes β-adrénergiques sur les muscles lisses bronchiques.

L'administration de glucocorticoïdes entraîne des effets anti-inflammatoires qui sont les suivants:

- **Stabilisation des membranes lysosomales.** La relâche des enzymes protéolytiques contenues dans les lysosomes et responsables des dommages tissulaires causant l'inflammation serait donc nettement diminuée par les glucocorticoïdes (Heiman & Lee, 1981; Hinz & Hirschelmann, 2000). Cet effet serait également bénéfique dans la diminution de la perméabilité des capillaires observées lors d'inflammation. Cependant, cette observation a été rapportée de manière expérimentale uniquement et à des concentrations supra-physiologiques (Schleimer, 1990).
- **Diminution de la migration des leucocytes** au site de l'inflammation et **de la phagocytose** des cellules lésées par la réduction de la formation de prostaglandines et de leukotriènes (Hall & Guyton, 2011).

Les glucocorticoïdes provoquent des changements dans la concentration, distribution et la fonction des leucocytes. Ils diminuent la production de cytokines pro-inflammatoires et chimiokines ce qui peut atténuer la fièvre (Barnes, 2006). Il a également été démontré que la corticostérone pouvait inhiber de façon non génique la phagocytose et la synthèse de radicaux libres *in vitro* chez les macrophages péritonéaux murins (Long et al., 2005). Cependant, bien que la corticostérone soit le glucocorticoïde circulant endogène prédominant chez les rongeurs, les oiseaux ou les reptiles, son rôle anti-inflammatoire et régulateur de l'axe hypothalamo-hypophysaire chez l'homme reste incertain (Raubenheimer, Young, Andrew, & Seckl, 2006) du fait de sa faible affinité pour le GR (Berger, Parandoosh, Perry, & Stein, 1992) et des faibles concentrations sériques observées dans cette espèce en comparaison au cortisol (Nishida, Matsumura, Horino, Oyama, & Tenku, 1977; Underwood & Williams, 1972). La corticostérone reste donc pour l'instant considérée comme un intermédiaire dans la formation de l'aldostérone. De manière plus générale, il a été démontré que les glucocorticoïdes comme la dexaméthasone ou l'hydrocortisone diminuent le métabolisme oxydatif induit par l'inflammation chez les cellules mononucléaires (lymphocytes et monocytes; Dandona, Mohanty, et al., 1999; Dandona, Thusu, Hafeez, Abdel-Rahman, & Chaudhuri, 1998). Enfin ils conduisent à

la démarginalisation des neutrophiles notamment par l'induction d'annexin-1 provoquant une leucocytose neutrophilique (Parente & Solito, 2004).

Les glucocorticoïdes exercent finalement un effet immunosuppresseur se traduisant par les changements suivants:

- **Une lymphopénie** causée par une diminution de la prolifération lymphocytaire, en particulier des lymphocytes T. Ceci entraîne une diminution de la quantité de cellules T mais aussi d'anticorps au site de l'inflammation, limitant ainsi la réaction immunitaire.
- **Une éosinopénie** est généralement constatée (Hall & Guyton, 2011).

C. Mécanisme d'action moléculaire

Les glucocorticoïdes et les autres stéroïdes exercent leur action sur les cellules entre autres par une altération de la voie génique, qui implique la liaison de l'hormone à son récepteur spécifique classique cytosolique, le GR. Ceci entraîne après translocation nucléaire et liaison à la molécule d'ADN, la modulation de l'expression génique et donc de la synthèse protéique (Barnes, 2006). Les glucocorticoïdes exercent également leurs effets à travers la voie non génique dont les mécanismes sont moins bien connus (Losel et al., 2003).

1. Gène du GR et caractéristiques du GR

Le GR, également appelé NR3C1, est le récepteur auquel se lie le cortisol et les autres glucocorticoïdes. Il appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires régulés par leurs ligands tout comme les récepteurs aux minéralocorticoïdes, aux hormones thyroïdiennes et sexuelles, à la vitamine D et enfin à l'acide rétinoïque (Pujols, Mullol, & Picado, 2007).

Le gène GR humain est situé sur le chromosome 5, chez le cheval sur le chromosome 14, et est composé de 9 exons. Le premier et le dernier exon du gène humain sont sujets à l'épissage alternatif. L'épissage alternatif au niveau de l'exon 9 donne naissance à l'isoforme α active du GR, ou à l'isoforme β , inactive du GR (**Figure 5**). D'autres variants, comme le GR- δ et le GR- γ ont également été décrits et pourraient jouer un rôle dans le développement de la résistance aux glucocorticoïdes dans certains cancers (Ito, Chung, & Adcock, 2006). Plusieurs isoformes du GR- α ont

été découvertes (A,-B, -C1, -C2, -C3, -D1, -D2 et -D3) et sont toutes fonctionnelles. Par contre, leur activité transcriptionnelle ainsi que leur distribution dans les différents tissus sont variables, ce qui pourrait expliquer la spécificité de réponse des tissus aux glucocorticoïdes (Lu & Cidlowski, 2006). Les isoformes issues de l'exon 1 ne seraient pas traduites sous forme de protéine.

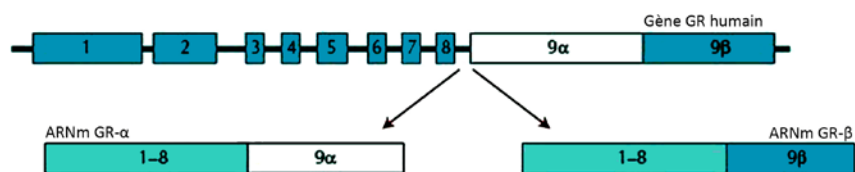


Figure 5. Schématisation du gène et de l'ARNm du GR humain.

L'épissage alternatif de l'exon 9 génère l'ARNm des isoformes α et β . Adaptée de "Alpha and beta glucocorticoid receptors: relevance in airway diseases" par Pujols, L., Mullol, J., & Picado, C. (2007). *Curr Allergy Asthma Rep*, 7(2), p. 94. © 2007 Current Medicine Group LLC. Reproduit avec permission.

Chez le cheval, la séquence complète de l'isoforme α a été décrite, mais aucune information concernant la séquence du GR- β n'a été rapportée pour le moment. Les glucocorticoïdes de synthèse, endogènes ou encore l'antagoniste de synthèse, la mifépristone, se lient spécifiquement au GR avec des affinités variables. Il a été démontré que la dexaméthasone se liait et saturait le GR de mastocytes de rats de manière spécifique entre 10^{-6} M et 10^{-8} M (Walajtys-Rode, Dabrowski, Grubek-Jaworska, Machnicka, & Droszcz, 1988). Cet intervalle de concentration est en général celui obtenu lors d'administration IV ou PO de glucocorticoïdes aux doses thérapeutiques. Par exemple:

- pour la dexaméthasone à 0,05mg/kg IV ou PO chez le cheval (Grady, Davis, Kukanich, & Sherck, 2010),
- pour la prednisolone jusqu'à 1 mg/kg IV chez l'homme (Xu, Winkler, & Derendorf, 2007).

2. Voie génique

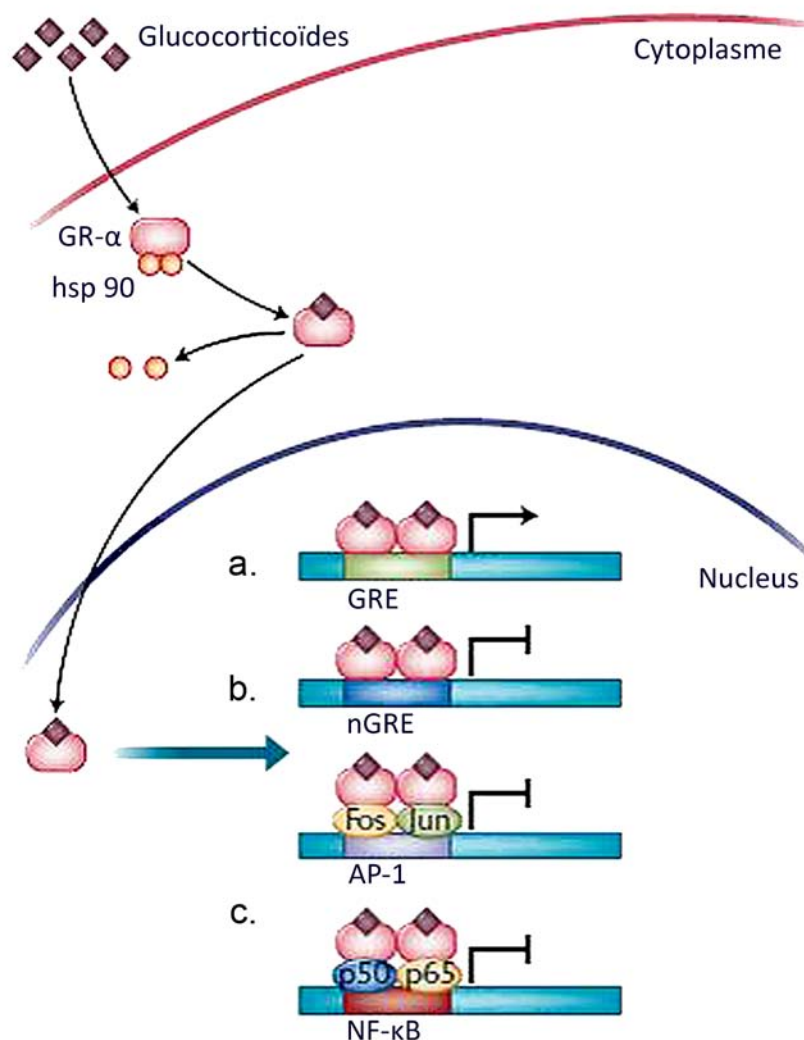


Figure 6. Effets géniques des glucocorticoïdes. a. Activation de la transcription génique; b. Inhibition de la transcription génique; c. Interaction protéine-protéine. Adaptée de "Alpha and beta glucocorticoid receptors: relevance in airway diseases" par Pujols, L., Mullol, J., & Picado, C. (2007). *Curr Allergy Asthma Rep*, 7(2), p. 95. © 2007 Current Medicine Group LLC. Reproduit avec permission.

a. Liaison au GR et translocation nucléaire

Après avoir diffusé à travers la membrane cellulaire de manière passive, les glucocorticoïdes se lient à l'isoforme active GR- α , qui est associée aux protéines chaperonnes (hsp90). S'en suit la dissociation de ces dernières et la translocation nucléaire du GR et de son ligand (Barnes, 2006; Pujols, et al., 2007). Le GR- α , sous forme d'homodimère va alors interagir avec l'ADN de 3 façons possibles (**Figure 6**).

b. Activation de la transcription génique

Le dimère peut se lier à des GRE dans la région promotrice des gènes ciblés et active ainsi la transcription génique comme par-exemple: l'induction de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, de l'annexin-1, du MKP1 (inhibiteur du p38 MAPK, stabilisateur des protéines inflammatoires), de l' $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$ (inhibiteur du NF- κB) (Barnes, 2006), mais également de la glutamine synthétase (Chandrasekhar, Souba, & Abcouwer, 1999; Esbaugh & Walsh, 2009).

c. Inhibition de la transcription génique

Le principe est le même que pour l'activation génique sauf qu'il implique les nGRE. S'en suit alors une inhibition de la transcription génique. Citons par exemple, l'ostéocalcine et la pro-opiomélanocortine (Barnes, 2006). Ce mécanisme n'est pas le plus souvent rencontré.

d. Interaction protéine-protéine

Ce mécanisme est majeur et le plus souvent décrit. Le GR une fois dans le noyau, interagit avec des molécules co-activatrices, comme la CREB-binding protéine (CBP) activée habituellement par des facteurs transcriptionnels comme le NF- κB . Cette interaction avec le GR inhibe l'expression des gènes activés par ces facteurs transcriptionnels (Barnes, 2006). De nombreuses études ont démontré que les glucocorticoïdes une fois lié au GR inhibaient les effets des facteurs post-transcriptionnels pro-inflammatoires comme AP-1 et NF- κB (Pujols, et al., 2007), régulant ainsi l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, TNF- α , IL-1 β ou des molécules d'adhésion comme les ICAM-1 (Barnes, 2006).

e. Rôle des HAT et HDAC2

L'acétylation et la désacétylation des histones régulent l'expression génique en permettant la décondensation ou la condensation de la chromatine respectivement. L'expression des gènes inflammatoires est déclenchée par différents stimuli inflammatoires comme l'IL-1 β ou le TNF- α , résultant en l'activation du NF- κB . Ce dernier interagit avec l'ADN du gène ciblé mais également avec des co-activateurs comme le CBP ou le p300/CBP-activating factor (pCAF), possédant une activité

histone acétyltransferase intrinsèque. Ceci provoque l'acétylation des histones, et donc l'activation de l'expression de nombreux gènes inflammatoires. Le GR formant un complexe avec son ligand est capable de se lier également au CBP, d'inhiber son activité HAT et de recruter des histones déacétylase-2 (HDAC2), menant ainsi à la suppression de l'expression des gènes pro-inflammatoires (Barnes, 2006) (**Figure 7**).

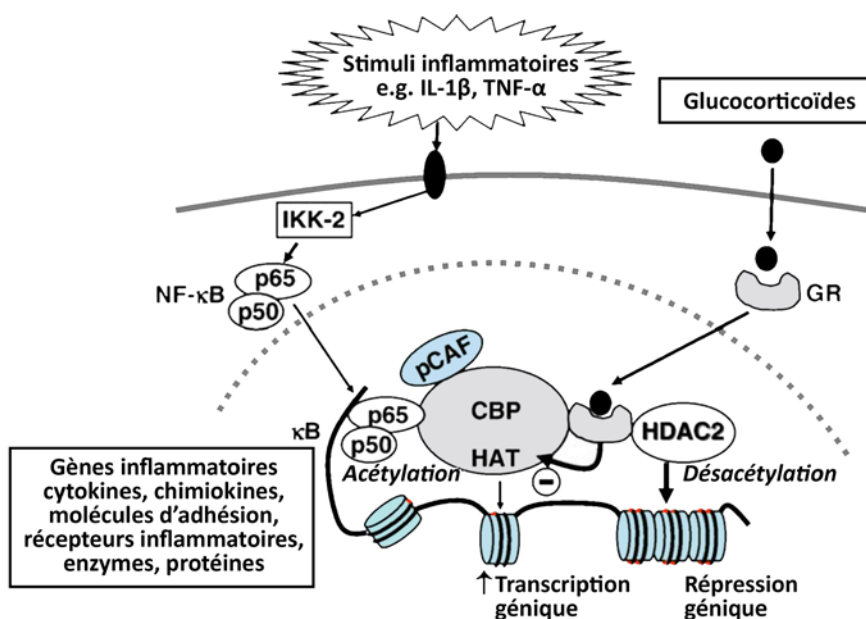


Figure 7. Suppression de l'activité des gènes pro-inflammatoires. Adaptée de "Corticosteroids: the drugs to beat" par Barnes, P. J. (2006). *Eur J Pharmacol*, 533(1-3), p. 10. © 2005 Elsevier B.V. Reproduit avec permission.

Les effets géniques des glucocorticoïdes, puisqu'ils nécessitent la synthèse protéique, ne sont visibles qu'à partir d'un certain délai, de l'ordre de quelques heures.

3. Voie non génique

La voie non génique d'action des glucocorticoïdes peut se définir ainsi (Losel, et al., 2003):

- les effets sont observés dans un délai de temps très court de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes,
- le profil pharmacologique est différent de la voie génique car les effets observés sont insensibles aux inhibiteurs transcriptionnels ou de synthèse protéique comme la cycloheximidine ou l'actinomycine D,

- les effets peuvent être observés sur des cellules anucléées comme les érythrocytes, les plaquettes ou encore les spermatozoïdes.

Trois principaux mécanismes ont été décrits concernant l'action non génique des glucocorticoïdes (**Figure 8**).

a. Action non génique n'impliquant pas de récepteurs (non spécifique)

Ces effets peuvent être médiés par une altération des propriétés physicochimiques de la membrane cellulaire et sans implication du GR (Stellato, 2004). Les glucocorticoïdes sont des molécules lipophiles qui diffusent très bien à travers les membranes cellulaires. Ils peuvent alors interagir, avec les composants de ces dernières comme les canaux ioniques ou leurs récepteurs. Ainsi, la dexaméthasone peut induire une diminution de la concentration en calcium intracellulaire (Losel, et al., 2003) ou encore stabiliser les membranes lysosomales (Hinz & Hirschelmann, 2000) indépendamment de sa liaison au GR. Puisque la majorité des effets n'impliquant pas de récepteurs spécifiques ont été décrits *in vitro* et à des concentrations en glucocorticoïdes dépassant le seuil physiologique ($>10^{-5}$ M), leur existence *in vivo* reste controversée.

b. Action non génique via le récepteur intracellulaire classique

Certains effets des glucocorticoïdes sont caractérisés par une insensibilité aux inhibiteurs transcriptionnels ou de synthèse protéique mais peuvent être renversés par l'antagoniste des glucocorticoïdes, la mifépristone (ou RU486). Ainsi ces effets sont donc médiés par le GR classique. Citons comme exemple l'activation de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) possédant un effet cardiovasculaire protecteur (Stellato, 2004) ou encore l'inhibition de la synthèse de radicaux libres par les neutrophiles équins (Lecoq, Vincent, Lavoie-Lamoureux, & Lavoie, 2009).

c. Action non génique via des récepteurs non classiques

Des études ont suggéré l'existence des récepteurs membranaires, différents du GR classique (Losel, et al., 2003; Stellato, 2004). Ce mécanisme impliquerait la présence d'un messager secondaire comme des protéines kinases ou l'AMPC.

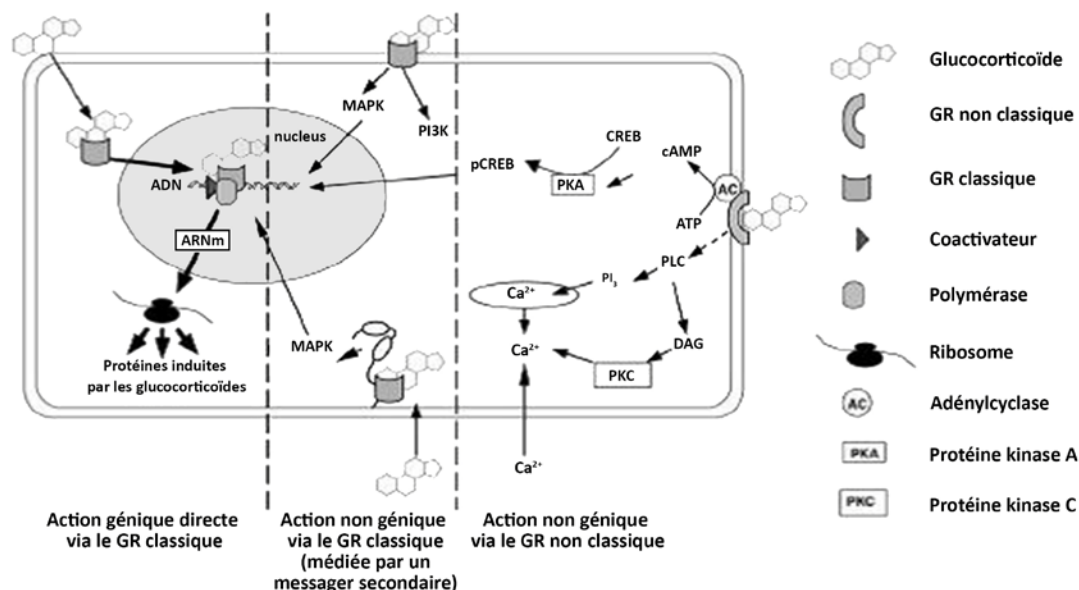


Figure 8. Effets non géniques des glucocorticoïdes. Adaptée de "Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers" par Losel, R. M., Falkenstein, E., Feuring, M., Schultz, A., Tillmann, H. C., Rossol-Haseroth, K., et al. (2003). *Physiol Rev*, 83(3), p. 1001. © 2003 The American Physiological Society. Absence de permission requise pour la reproduction.

4. Interaction voie génique et non génique

Malgré les différences existant entre voie génique et voie non génique, celles-ci peuvent interagir sur certains aspects. En effet, il a été démontré que les stéroïdes pouvaient augmenter rapidement la concentration cellulaire en AMPc et que la transcription génique induite par les stéroïdes pouvait être influencée par la concentration cellulaire en AMPc via les protéines et MAP kinases (Losel, et al., 2003).

5. Effets post-transcriptionnels

Des effets post-transcriptionnels ont également été rapportés mais ne seront pas l'objet de notre étude. Les glucocorticoïdes inhibent l'action des protéines kinases comme p38 MAPK, JNK, ERK, ce qui entraîne une instabilité de l'ARNm ou une diminution de la traduction des gènes inflammatoires (Stellato, 2004).

6. Effets secondaires des glucocorticoïdes chez le cheval

De nombreux effets secondaires ont été associés à l'utilisation des glucocorticoïdes chez les chevaux, incluant la fourbure (Johnson, Slight, Ganjam, & Kreeger, 2002), des infections secondaires liées à la suppression de la fonction immunitaire (Mair, 1996) ainsi que des déséquilibres électrolytiques dus à leur effet minéralocorticoïde (Picandet, Leguillette, & Lavoie, 2003). Dans la plupart des études, l'administration de glucocorticoïdes résultait en une diminution de la production de cortisol basal ainsi qu'à une formule de stress visible à l'hématologie, réversible et sans apparition d'un dysfonctionnement adrénocortical (Courouce-Malblanc, Fortier, Pronost, Siliart, & Brachet, 2008; Leclere, Lefebvre-Lavoie, Beauchamp, & Lavoie, 2010; Picandet, et al., 2003). Il est également important de constater que ces effets varient en fonction des tissus impliqués ce qui peut s'expliquer en partie par une expression variable des différentes isoformes du GR dans les différents tissus (Korn et al., 1998; Lu & Cidlowski, 2006).

A ce jour, il n'existe pas de glucocorticoïdes ayant des effets anti-inflammatoires et privés de tous les effets précédemment cités. La balance entre effet désiré (anti-inflammatoire et/ou immunosuppresseur) et effet secondaire est un défi constant lorsqu'une corticothérapie est envisagée.

D. La résistance aux glucocorticoïdes

Bien que les glucocorticoïdes soient très efficaces dans le traitement de la plupart des maladies inflammatoires et à médiation immunes chez l'Homme, un pourcentage non négligeable de patients est peu sensible à la corticothérapie même à doses élevées. C'est le cas, par exemple, lors d'asthme sévère ou de MPOC. L'une des caractéristiques principales de ces maladies résistantes aux glucocorticoïdes est une infiltration neutrophilique marquée (Barnes, 2004, 2005; Barnes & Adcock, 2009; Belvisi, 2004; Ordonez, et al., 2000; Wenzel, et al., 1999; Wenzel, et al., 1997; Yang, et al., 2007).

1. Résistance aux glucocorticoïdes exemple de l'asthme sévère: définition

Asthme sévère et asthme résistant aux glucocorticoïdes ne sont pas des termes interchangeables. En effet, bien que la résistance aux glucocorticoïdes se rencontre dans un certain pourcentage de patients asthmatiques sévères, tous les patients cortico-résistants ne sont pas nécessairement asthmatiques sévères (Pavord, 2007).

L'asthme est considéré comme une condition chronique inflammatoire hétérogène des voies respiratoires. L'asthme dit éosinophilique est caractérisé par une infiltration éosinophilique des voies respiratoires par opposition à l'asthme dit non-éosinophilique (neutrophilique et pauci-granulocytaire). L'asthme éosinophilique concerne 51% des patients contre 49% pour l'asthme non-éosinophilique (Douwes, Gibson, Pekkanen, & Pearce, 2002). Il a été démontré que l'infiltration neutrophilique était une des caractéristiques de l'asthme sévère (Pavord, 2007; Wenzel, et al., 1999). Le fait que les patients atteints d'asthme sévère requièrent souvent une corticothérapie à haute dose a fait naître l'association entre asthme sévère neutrophilique et corticorésistance.

2. Mécanismes moléculaires

A l'exception de l'autorégulation de l'expression des isoformes du GR dans certains tissus après stimulation par les glucocorticoïdes (Korn, et al., 1998), de nombreux mécanismes moléculaires contribuant à diminuer les effets anti-

inflammatoires des glucocorticoïdes ont été identifiés à ce jour, une prédisposition génétique possible chez l'Homme aurait même été rapportée (Barnes & Adcock, 2009). Ces mécanismes (**Figure 9**) ont été décrits dans diverses pathologies résistantes à la corticothérapie, ce qui suggère qu'une approche thérapeutique commune pourrait être développée à l'avenir.

a. Liaison au GR et translocation nucléaire déficiente

L'affinité des glucocorticoïdes pour leur récepteur, la stabilité et la translocation nucléaire de ce dernier ainsi que sa liaison à l'ADN peuvent être affectées par de nombreux facteurs. Par exemple, l'augmentation d'IL-2 ou d'IL-4 observée chez les patients asthmatiques corticorésistants peut diminuer la translocation nucléaire et l'affinité du GR dans le nucleus par phosphorylation d'un de ses résidus sérine par la p38 MAP kinase (Barnes & Adcock, 2009; Irusen et al., 2002; Miller et al., 2005). D'autres kinases comme la JNK ou encore une nitrosylation du GR peuvent aussi contribuer à altérer l'interaction de ce dernier avec son agoniste.

b. Expression de l'isoforme GR- β augmentée

Des études ont montré une augmentation de l'expression de l'isoforme β du GR chez des patients résistants à la corticothérapie dans des maladies comme l'asthme sévère (Hamid et al., 1999) ou encore la spondylarthrite ankylosante (Lee et al., 2005). Le GR- β agit comme inhibiteur dominant négatif, sous forme d'hétérodimère GR α /GR β , par compétition avec l'isoforme active α pour la liaison au GRE (Barnes & Adcock, 2009; Kino, Su, & Chrousos, 2009).

L'expression du GR- β s'est révélée augmentée de manière constitutive chez les neutrophiles humains par rapport à son isoforme active α étayant alors l'hypothèse d'une résistance intrinsèque de cette population cellulaire par rapport aux cellules mononucléaires (Strickland et al., 2001). Cependant l'implication de ce mécanisme dans l'asthme résistant aux glucocorticoïdes reste peu probable. En effet, le GR- β est exprimé dans de nombreux types cellulaires en très faible quantité (2800 fois moins d'ARNm GR- β que GR- α dans les cellules épithéliales humaines par exemple) par rapport à son isoforme active α (Pujols et al., 2001; Pujols, et al., 2007). De plus, il

n'y a pas d'augmentation de l'expression du GR- β chez les lymphocytes de patients asthmatiques sévères et corticorésistants après stimulation à la dexaméthasone (Jakiela, Bochenek, & Sanak, 2010). L'expression du GR- β chez les neutrophiles des patients atteints d'asthme sévère n'a pour l'instant pas été investiguée. Bien que le GR- β ne se lie pas aux glucocorticoïdes, cette isoforme s'avère transcriptionnellement active, possède une activité intrinsèque GR- α -indépendante, et enfin, peut se lier à la mifépristone (Kino et al., 2009). Cependant, l'existence de ligands endogènes n'est pas connue.

c. Activation de facteurs transcriptionnels

Il a été rapporté qu'une augmentation de l'activation du facteur AP-1 permettait de prévenir l'interaction du GR avec les GRE ou d'autres facteurs transcriptionnels via le JNK (Barnes & Adcock, 2009).

d. Acétylation anormale des histones et HDAC2

L'acétylation des résidus de lysine des histones permet la décondensation de la chromatine et la transactivation de gènes anti-inflammatoires comme le MKP1 par les glucocorticoïdes. Une acétylation anormale de ces résidus chez les patients asthmatiques corticorésistants est probable (Barnes & Adcock, 2009). D'autre part, le recrutement des HDAC2 aux sites des gènes pro-inflammatoires activés est un des mécanismes majeurs de répression génique par les glucocorticoïdes par condensation de la chromatine (Ito, Barnes, & Adcock, 2000). L'activité des HDAC2 serait réduite chez les patients corticorésistants (Barnes, Ito, & Adcock, 2004). De plus, une étude réalisée sur les cellules de LBA de patients asthmatiques corticorésistants a récemment montré la présence de GRE fonctionnels dans le promoteur du gène humain HDAC2 et a fourni l'évidence que le GR- β était capable d'inhiber l'activité du promoteur du gène HDAC2, contrôlant ainsi les niveaux cellulaires de l'enzyme (Li, Leung, Martin, & Goleva, 2010).

e. Autres

Une diminution de l'activité des cellules T régulatrices ou encore une augmentation de l'expression de la glycoprotéine P associée à la corticorésistance ont également été évoquées (Barnes & Adcock, 2009).

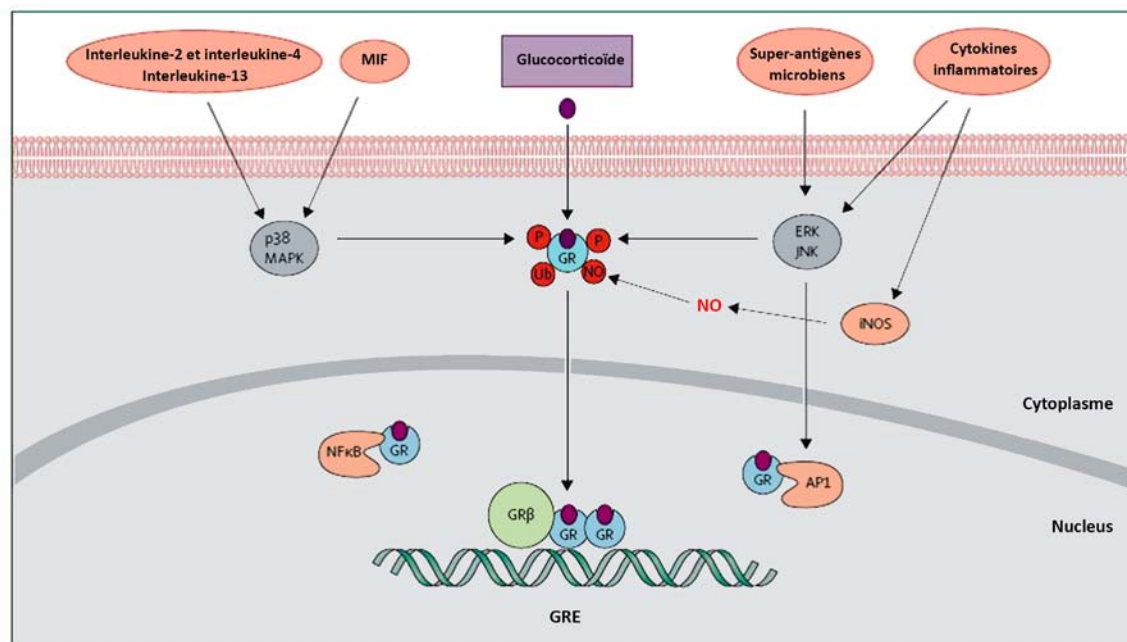


Figure 9. Mécanismes de résistance aux glucocorticoïdes. Adaptée de "Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases" par Barnes, P. J. & Adcock, I. M. (2009). *Lancet*, 373 (9678), p. 1910. © 2009 Elsevier. Reproduit avec permission.

E. Résistance aux glucocorticoïdes chez le cheval

A ce jour, aucun cas de corticorésistance dans l'espèce équine n'a été référencé. Cependant des données non publiées décrivent un cas de résistance acquise aux glucocorticoïdes chez un cheval atteint du souffle (Stamper, Rush, Wilkerson, Mitchell, & Shuman, 2002). L'administration de dexaméthasone a révélé une résistance clinique (non amélioration de la fonction pulmonaire) chez ce dernier par rapport à deux chevaux contrôles (sain et atteint du souffle mais sensible à la corticothérapie). L'expression basale du GR- α chez les lymphocytes sanguins était plus élevée chez les 2 chevaux atteints du souffle et une diminution de son expression induite par la dexaméthasone a également été observée chez ces animaux.

L'administration de dexaméthasone a entraîné une augmentation du nombre de GR chez les lymphocytes sanguins, plus marquée chez les chevaux atteints du souffle, ainsi qu'une diminution de son affinité pour les glucocorticoïdes chez tous les chevaux. Cependant aucun changement concernant l'expression du GR- β n'a été mis en évidence.

III. Effet des glucocorticoïdes sur les neutrophiles

A. Effets anti-inflammatoires des glucocorticoïdes sur les neutrophiles

Notre laboratoire a récemment démontré que la dexaméthasone exerçait des effets anti-inflammatoires sur les neutrophiles sanguins de chevaux sains à travers les voies géniques et non géniques (Lecoq, et al., 2009). La dexaméthasone réduisait de manière significative l'expression induite par le LPS de l'IL-8, du TNF- α et du TLR-4 mais diminuait également de façon marquée le métabolisme oxydatif des neutrophiles. Le GR est impliqué dans ces 2 mécanismes. Des études chez d'autres espèces animales abondent également dans ce sens. Il a été démontré que les glucocorticoïdes diminuent l'expression des cytokines pro-inflammatoires, des marqueurs d'activation, des chimiokines et des molécules d'adhésion des neutrophiles chez le rat (al-Mokdad, Shibata, Takano, & Nakagawa, 1998), l'homme (Nupponen, Repo, Kari, Pohjavuori, & Andersson, 2002; Wertheim et al., 1993) et la vache (Burton, Kehrli, Kapil, & Horst, 1995; Weber et al., 2004). La dexaméthasone diminuerait l'expression interféron γ -induite (IFN γ) du récepteur γ I du fragment cristallisable (Fc γ RI) ainsi que la phagocytose par les neutrophiles, effet d'ailleurs inverse de ce qu'on observe chez les cellules mononucléaires phagocytaires chez l'homme (Petroni, Shen, & Guyre, 1988).

Mise à part l'étude menée par notre laboratoire, les effets non géniques des glucocorticoïdes sur les neutrophiles ont été démontrés à des concentrations supra-physiologiques. La méthylprednisolone aurait un effet significatif sur la dégranulation des neutrophiles humains à très haute dose (10^{-4} M) après 5 minutes de stimulation au fMLP ou au PMA, cet effet n'impliquant pas le GR (Liu et al., 2005). Cependant, la pertinence de l'utilisation de doses aussi élevées reste controversée. L'étude de Schleimer montre une absence d'inhibition de la dégranulation des neutrophiles humains par la dexaméthasone à la dose de 10^{-6} M (Schleimer, et al., 1989).

B. Effet des glucocorticoïdes sur la survie des neutrophiles

1. Augmentation de la survie des neutrophiles par retard dans l'apoptose

Plusieurs études ont rapporté une prolongation de la survie des neutrophiles humains par retard de l'apoptose par les glucocorticoïdes. Cox (1995) a démontré un effet dose-dépendant de la dexaméthasone sur l'inhibition de l'apoptose, maximal à 10^{-6} M. Parmi les glucocorticoïdes testés, le budésonide possédait un effet comparable à celui de la dexaméthasone. Dans une autre étude, les mêmes observations concernant la dexaméthasone, la 6α -méthylprednisolone et l'hydrocortisone ont également été décrites (Liles, Dale, & Klebanoff, 1995). Enfin, une comparaison avec les éosinophiles a été réalisée dans l'étude de Meagher et al. (1996) et a montré un effet opposé des glucocorticoïdes sur ces deux populations cellulaires.

Une prolongation de la survie des neutrophiles peut entraîner une activation prolongée, également rencontrée lors de stimulation au LPS ou à IL-1 β (Colotta, Re, Polentarutti, Sozzani, & Mantovani, 1992) et générer un maintien de l'inflammation ainsi que des dommages tissulaires importants. Bien que les glucocorticoïdes prolongent la survie des neutrophiles, ceci n'est pas associé à une activation cellulaire (Cox, 1995) mesurée par la relâche d'IL-8 dans le surnageant et la production de radicaux libres après 24h de culture.

2. Mécanismes moléculaires

De nombreux mécanismes ont été proposés afin de décrire le phénomène de prolongation de la survie causé par les glucocorticoïdes qui est spécifique aux neutrophiles (**Figure 10**). L'isoforme dominante négative GR- β pourrait interférer avec l'expression des gènes pro-apoptotiques médiée par le GR- α . De plus, il est désormais accepté que la dexaméthasone augmente l'expression de facteurs anti-apoptotiques tels que Mcl-1 et IAP par transactivation (Saffar, et al., 2011). Il a également été confirmé l'augmentation de l'expression de Mcl-1 chez les neutrophiles en réponse à la dexaméthasone via PI3K et p38-MAPK (Saffar, Dragon, Ezzati, Shan, & Gounni, 2008).

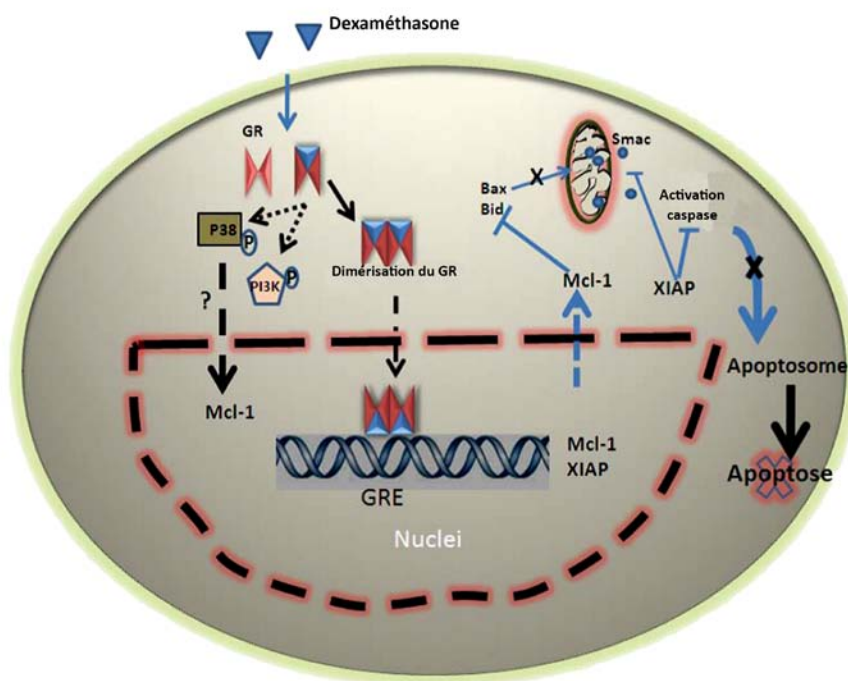


Figure 10. Modèle schématique de l'augmentation de la survie des neutrophiles causée par les glucocorticoïdes. Adaptée de "The molecular mechanisms of glucocorticoids-mediated neutrophil survival" par Saffar, A. S., Ashdown, H. & Gounni, A. S. (2011). *Curr Drug Targets*, 12(4), p. 559. © 2011 Bentham Science Publishers Ltd. Reproduit avec permission.

C. Les neutrophiles sont-ils résistants aux glucocorticoïdes?

Les différentes sections abordées précédemment remettent en cause une corticorésistance intrinsèque des neutrophiles. Cependant, même si les neutrophiles répondent aux glucocorticoïdes, une réponse atténuée par rapport aux autres leucocytes sanguins ne peut être exclue. Il y a peu d'études comparant l'effet des glucocorticoïdes sur les neutrophiles et les autres leucocytes sanguins.

Une étude *in vivo* a démontré qu'une administration IV de dexaméthasone à 0,04 mg/kg à des vaches Holstein induisait une augmentation significative d'IL-1RII chez les neutrophiles et les cellules mononucléaires à 24h avec un retour aux valeurs basales à 72h (Yu et al., 1997). L'augmentation d'IL-1RI n'avait lieu dans les 2 populations cellulaires qu'à partir de 72h. L'augmentation séquentielle de l'expression génique d'IL-1RII puis IL-1RI dans les deux populations cellulaires témoignait donc de l'effet anti-inflammatoire de la dexaméthasone sur les neutrophiles et les cellules mononucléaires. Cependant, l'étude de l'expression

génique ayant été réalisée par PCR standard et Northern Blot, une comparaison quantitative entre les deux populations cellulaires n'a pas pu être effectuée.

Il a aussi été démontré dans une étude *in vivo* que les glucocorticoïdes induisaient une diminution marquée du métabolisme oxydatif dans les deux populations cellulaires, toutefois plus importante pour les cellules mononucléaires avec la dexaméthasone (Dandona, Mohanty, et al., 1999; Dandona, Suri, et al., 1999; Dandona, et al., 1998).

Enfin, il a été démontré que l'administration IV de dexaméthasone à haute dose (1mg/kg) diminuait de 50% l'expression des L-sélectines chez les neutrophiles et de 26% chez les lymphocytes humains. Cet effet n'était que transitoire à plus faible dose (0,04 mg/kg) chez les lymphocytes et moins prononcé chez les neutrophiles (Jilma et al., 1997).

L'hypothèse de notre étude est que les glucocorticoïdes exercent des effets d'intensité comparable sur les neutrophiles et les autres leucocytes sanguins. Nous spéculons qu'une corticorésistance inhérente aux neutrophiles n'est pas responsable de la faible réponse à la corticothérapie observée lors de maladies inflammatoires chroniques neutrophiliques. Notre objectif principal est de comparer les effets de 3 glucocorticoïdes sur ces deux populations cellulaires chez le cheval. Afin de déterminer si cette réponse est spécifique d'espèce, les leucocytes humains seront également étudiés.

Manuscrit de l'article soumis au journal PLoS ONE

**Neutrophils Are Not Less Sensitive Than
Other Blood Leukocytes To The Genomic
Effects of Glucocorticoids**

**Gaëlle Hirsch, Anouk Lavoie-Lamoureux, Guy Beauchamp,
Jean-Pierre Lavoie**

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

Corresponding author: Jean-Pierre Lavoie
Department of Clinical Sciences
Faculty of Veterinary Medicine,
Université de Montréal,
CP 5000 Saint-Hyacinthe,
Quebec, Canada, J2S 7C6

Short title: Neutrophil responsiveness to glucocorticoids

Keywords : neutrophils, neutrophil-depleted leukocytes, horses, humans, glucocorticoids, responsiveness, genomic effects, apoptosis, survival, pro-inflammatory cytokines, Glucocorticoid Receptor, glutamine synthetase

Abstract

Background: Neutrophils are generally considered less responsive to glucocorticoids compared to other inflammatory cells. The reported increase in human neutrophil survival mediated by these drugs partly supports this assertion. However, it was recently shown that dexamethasone exerts potent anti-inflammatory effects in equine peripheral blood neutrophils. Few comparative studies of glucocorticoid effects in neutrophils and other leukocytes have been reported and a relative insensitivity of neutrophils to these drugs could not be ruled out.

Objective: We assessed glucocorticoid-responsiveness in equine and human peripheral blood neutrophils and neutrophil-depleted leukocytes.

Methods: Blood neutrophils and neutrophil-depleted leukocytes were isolated from 6 healthy horses and 4 human healthy subjects. Cells were incubated for 5h with or without LPS (100ng/mL) alone or combined with hydrocortisone, prednisolone or dexamethasone (10^{-8} M and 10^{-6} M). IL-1 β , TNF- α , IL-8, glutamine synthetase and GR- α mRNA expression was quantified by qPCR. Equine neutrophils were also incubated for 20h with or without the three glucocorticoids and cell survival was assessed by flow cytometry and light microscopy on cytospin preparations.

Results: We found that glucocorticoids down-regulated LPS-induced pro-inflammatory mRNA expression in both cell populations and species. These drugs also significantly increased glutamine synthetase gene expression in both equine cell populations. The magnitude of glucocorticoid response between cell populations was generally similar in both species. We also showed that dexamethasone had a comparable inhibitory effect on pro-inflammatory gene expression in both human and equine neutrophils. As reported in other species, glucocorticoids significantly increase the survival in equine neutrophils.

Conclusions: Glucocorticoids exert genomic effects of similar magnitude on neutrophils and on other blood leukocytes. We speculate that the poor response to glucocorticoids observed in some chronic neutrophilic diseases such as severe asthma or Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is not explained by a relative lack of inhibition of these drugs on pro-inflammatory cytokines expression in neutrophils.

Introduction

Neutrophils play a central role in innate immunity, acting as the first line of host defense against invading organisms. They are the predominant cell type involved in the cellular phase of acute inflammation. Their role in the inflammatory process was once thought to be restricted to phagocytosis and the release of cytotoxic agents, such as superoxide and other reactive oxygen species [1]. It is now known that these cells have also the capacity to synthesize a large number of pro-inflammatory cytokines, chemokines and growth factors, in response to a variety of stimuli [1]. Neutrophil activation leads to the development and maintenance of inflammatory response, but also to the resolution of inflammation by neutralization of the offending insult. These cells are removed from tissues by programmed cell death and phagocytosis, avoiding the release of harmful substances and promoting a return to homeostasis. Thus, a prolonged activation of neutrophils or delayed apoptosis contributes to maintaining chronic inflammation and leads, in turn, to damage to surrounding tissues.

Glucocorticoids (GCs) are potent anti-inflammatory drugs used for the treatment of chronic inflammatory and immune conditions. Neutrophils are, however, generally considered less responsive to GCs compared to other inflammatory cells [3, 4]. This is due to the lack of inhibitory effects of these drugs on neutrophils' degranulation, chemotaxis or release of arachidonic acid metabolites [5]. Furthermore, GCs increase human neutrophil survival [6, 7]. Chronic conditions associated with neutrophilic inflammation, such as severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), also tend to be clinically resistant to corticotherapy [8-13]. Conversely, these drugs have also been shown to down-regulate the production of several cytokines and adhesion molecules in rat [14], human [15-17], bovine [18, 19] and equine [20] neutrophils. These studies question the proposed inherent corticoreistance of neutrophils. Comparative potencies of GCs on neutrophils and other leukocytes have not been thoroughly studied and would be an alternative way to measure sensitivity of neutrophils to these drugs.

Based on these findings, we compared the effects of three different glucocorticoids through gene expression and cell survival assays in equine peripheral blood neutrophils and neutrophil-depleted leukocytes. To determine if the response is species specific, we also studied human leukocytes. We hypothesized that GCs exert effects of similar magnitude on neutrophils and neutrophil-depleted leukocytes in both species.

Materials and Methods

Ethics statement

Six healthy adult mixed-breed mares (weighing 450-500 kg; mean \pm SD, 11 \pm 2.7 years of age) and 4 healthy non-smoker adult female volunteers (mean \pm SD, 28 \pm 1.6 years of age) were studied. Mares were part of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal research herd. All animal experimental procedures were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal (10-Rech-1514). This study was also approved by the Ethic Research Committee of the Faculty of Medicine of the Université de Montréal (Protocol 11-029-CERFM-D) and an informed, written consent was obtained from the healthy human volunteers.

Neutrophil and neutrophil-depleted leukocyte isolation

Equine and human blood was drawn into heparinized sterile tubes (Groupe Tyco Medical, Pointe-Claire, QC, CA).

Equine neutrophil isolation

Neutrophils were isolated from the blood using density gradient and immunomagnetic selection to achieve high cell purity. Briefly, 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 Cell Separation Media, Cedarlane Laboratories, Burlington, ON, CA) according to the manufacturer's instructions. The remaining red blood cells (RBCs) were lysed by hypotonic treatment. Cells were then resuspended in degassed PBS-buffer (w/o Ca^{2+} / Mg^{2+} , pH 7.2; 0.5% BSA, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; 2mM EDTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Positive immunomagnetic selection (MACS® Cell Separation, Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, GER) was then performed as described previously with minor modifications [21]. Briefly, the polymorphonuclear-rich cell suspension obtained as

described above was incubated with a primary monoclonal antibody directed against equine neutrophils (Anti-Thy1, VMRD, Pullman, WA, USA) and a secondary rat anti-mouse IgM antibody conjugated to paramagnetic microbeads (MACS® Cell Separation). The cells were then loaded on a ferromagnetic LS separation column (MACS® Cell Separation) and neutrophils eluted in the positive cell fraction were pelleted and resuspended in degassed-PBS buffer.

Equine neutrophil-depleted leukocyte isolation

Neutrophil-depleted leukocyte isolation was performed using negative immunomagnetic selection (MACS® Cell Separation) as described earlier [22]. Briefly, neutrophils were isolated using positive immunomagnetic selection (MACS® Cell Separation) as described above, neutrophil-depleted leukocytes eluted in the negative cell fraction were pelleted and the RBCs were removed with isotonic NH₄Cl solution (155mM NH₄Cl, 10mM KHC₃, 0.1mM EDTA, pH 7.4, all products from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells were washed twice in degassed-PBS buffer using low speed centrifugation (1000rpm, 10min, GS-6R Centrifuge, Beckman, Brea, CA, USA) to remove platelets.

Cytospin slides were prepared (Shandon Cytospin 2, Thermo Scientific now part of Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) and stained with Protocol Hema 3 (Fisher Scientific, now part of Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) for differential counting of ≥ 400 cells to assess purity. Viability was determined by ADAM automatic Cell Counter (Montreal-Biotech Inc., Montréal, QC, CA). The purity and viability of equine neutrophils were $\geq 99.5\%$ and $\geq 95.0\%$ respectively. The purity and viability of neutrophil-depleted leukocytes were $\geq 91.5\%$ and $\geq 96.5\%$ respectively.

Human neutrophil and neutrophil-depleted leukocyte isolation

Human granulocytes were isolated from whole blood using dextran sedimentation and Ficoll-Paque™ gradient (Ficoll-Paque™ Premium 1.084, GE Healthcare Biosciences, Uppsala, SE) as described previously [23] with minor modifications.

Neutrophil-depleted leukocyte layer was harvested following whole blood centrifugation on Ficoll-Paque™ gradient, resuspended in degassed-PBS buffer and kept on ice for 1h until further use. Granulocyte pellet was resuspended in degassed-PBS buffer after RBCs were removed with isotonic NH₄Cl solution.

Neutrophil positive immunomagnetic selection by MACS® was then performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, neutrophils were obtained from the granulocyte suspension by incubation with a monoclonal mouse anti-human CD16 antibody conjugated to paramagnetic microbeads (MACS® Cell Separation) before being loaded on a ferromagnetic LS separation column (MACS® Cell Separation). Neutrophils eluted in the positive cell fraction were pelleted and resuspended in degassed-PBS buffer. The purity and viability of human neutrophils were ≥99.7% and ≥91.5% respectively. The purity and viability of human mononuclear cells were ≥93.5% and ≥97.5% respectively. Similar methods as per equine leukocytes were used to assess those parameters.

Cell culture

After isolation, cells were washed twice and resuspended in complete culture medium at 5×10^6 cells/mL for neutrophils and between 2 to 5×10^6 cells/mL for neutrophil-depleted leukocytes. Components of medium were RPMI 1640 supplemented with 10% heat inactivated low-endotoxin FBS, 2mM L-glutamine, 100U/mL penicillin and 100µg/mL streptomycin (all products from GIBCO®, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cells were cultured in 6- or 12-well plates (non-treated plastic, UtiDent Scientific, St. Laurent, QC, CA) in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* 0:111B4 (100ng/mL in Dulbecco's PBS) alone or combined with hydrocortisone, prednisolone or dexamethasone (10^{-8} M and 10^{-6} M in ethanol) (all products from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 5h. Cell viability was assessed before homogenization in TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

RNA extraction and Reverse Transcription

Total cellular RNA extraction was performed according to the manufacturer's instructions using a three-step nucleic acid precipitation with 0.2 volume of chloroform, 1 volume of isopropanol and 75% ethanol (TRIzol® reagent; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA pellets were air-dried, and total RNA concentration and purity were evaluated by spectrophotometry (NanoDrop 2000, Thermo Scientific®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Five hundred nanograms of total RNA were retro-transcribed into cDNA as described elsewhere (24).

Quantitative PCR

Quantitative PCR (qPCR) reactions were performed with the Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Sydney, AS) as previously described with minor modifications (24). One microliter of cDNA template was added to the QuantiTect® SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen, Toronto, ON, CA) in a 20- μ L final PCR volume containing 0.5 μ M each sense and antisense primers and MgCl₂. Equine and human specific primers (Table S1) were designed to span exon-intron boundaries to prevent amplification of genomic DNA. qPCR conditions were optimized for all primer sets. Amplification conditions included a denaturation step of 10min at 95°C followed by a maximum of 40 cycles of denaturation, annealing and elongation steps. Each reaction was run in duplicate with an appropriate negative control. All concentrations of target gene cDNA were calculated relatively to their respective standard curves. Absolute values were corrected using glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a reference gene. Gene expression was reported as the relative variation (fold increase) to unstimulated cell mRNA levels (arbitrary value of 1).

Flow cytometry

Equine neutrophil isolation and culture

Equine neutrophils were isolated from whole blood using a density gradient centrifugation technique (Lympholyte®-poly Cell Separation Media) according to the manufacturer's instructions. The remaining RBCs were lysed by short treatment of the pellet fraction with isotonic NH₄Cl solution. As a subsequent neutrophil positive

immunomagnetic selection by MACS affected viability after 20 h of culture, this step was not performed. Neutrophils purity and viability were $\geq 93.5\%$ and $\geq 98.5\%$ respectively. After isolation, equine neutrophils were washed twice and resuspended at 1×10^6 cells/mL in complete culture medium. Cells were then incubated at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere for 20h in the presence of hydrocortisone, prednisolone or dexamethasone (10^{-8}M and 10^{-6}M) or their vehicle (ethanol) as a negative control.

Quantification of neutrophil survival

After 20h of culture, neutrophil count was determined by ADAM automatic Cell Counter (Montreal-Biotech Inc., Montréal, QC, CA). As cell loss appeared more marked in unstimulated cells compared to GC-treated neutrophils, this factor was taken into account when calculating the percentages of viable and apoptotic neutrophils. Neutrophil survival was assessed by flow cytometry. Cells were washed twice with cold Dulbecco's PBS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and resuspended in binding buffer at a concentration of 10^7 cells/mL. One hundred microliters of the cell suspension was incubated with $5\mu\text{L}$ of APC Annexin V, an apoptosis cell marker and $5\mu\text{L}$ of 7-Aminoactinomycin D (7-AAD), a necrosis cell marker (BD Pharmingen™, San Diego, CA, USA) for 15 min at room temperature in the dark. Finally, $400\mu\text{L}$ of binding buffer was added to each tube. Cells were placed on ice and analyzed within 1h by flow cytometry. Data were collected from 10,000 events gated on granulocytes and analyzed using CellQuest Pro software on a FACScalibur instrument (BD Biosciences, Mississauga, ON, CA). Unstained cells as well as single marker-stained cells were used to set photomultipliers voltage and compensation parameters for fluorescence detection in FL-3 and FL-4 channels. APC Annexin V-negative and 7-AAD-negative cells were considered viable.

Neutrophil survival was also determined using light microscopy analysis. Briefly, after 20h of culture, neutrophils were sedimented by cytocentrifugation on a glass microscope slide and stained with Protocol Hema 3 method. One blinded investigator assessed the percentage of viable and apoptotic neutrophils on cytopsin preparations by analysis of 500 cells per slide. Identification of nuclear changes such as condensation of chromatin, simplification of nuclear structure and cytoplasmic

vacuolation were considered characteristic of apoptosis and allowed distinction between viable and apoptotic cells [25].

Statistical analysis

Data obtained from qPCR and flow cytometry survival experiments were analyzed using repeated-measures linear models. Treatment served as a within-subject factor for each equine cell population, which was analyzed separately. A priori contrasts were done between pairs of treatment means adjusting comparison-wise alpha levels using the sequential Bonferroni correction procedure to ensure that the family-wise error rate remained at the nominal level of 0.05. Gene expression between unstimulated cells and LPS-stimulated cells in equine and human cell populations was compared using a paired t-test. A paired t-test was also used to compare gene expression between treatments within neutrophils and neutrophil-depleted leukocytes in both species and between both doses of each GC within equine neutrophils. Dexamethasone percentage of inhibition of mRNA expression was compared between equine and human neutrophils using a two-sample t-test for unequal variances. Unilateral tests were used when testing predictions. Finally, neutrophil survival assessed by flow cytometry and light microscopy was compared using a mixed linear model with individual as a random factor. As variation between horses (1.8%) proved negligible, the random effect was ignored and a simple linear regression was performed.

Results

Glucocorticoids exert dose-dependent effects on gene expression in equine neutrophils

To assess whether GCs exert a dose-dependent effect on mRNA expression, equine neutrophils were incubated in the presence of LPS alone or combined with hydrocortisone, prednisolone or dexamethasone at 10^{-8} M and 10^{-6} M (n=3). The mRNA expression of genes that are either repressed (interleukin-1beta, IL-1 β ; tumor necrosis factor alpha, TNF- α ; interleukin-8, IL-8; and glucocorticoid receptor-alpha, GR- α) or induced (glutamine synthetase) by GCs were evaluated using qPCR (Figure 1).

Although there was a trend for a greater inhibitory effect of prednisolone and hydrocortisone on TNF- α mRNA expression at 10^{-6} M compared to 10^{-8} M, this difference was not significant (p= 0.069 and p= 0.052 respectively; Figure 1.B). All three GCs exerted a similar inhibitory effect at both concentrations on IL-1 β and IL-8 mRNA expression (Figure 1.A and 1.C). A significant dose- effect on glutamine synthetase mRNA expression was demonstrated for hydrocortisone (p= 0.020) and prednisolone (p=0.009; Figure 1.D). Unexpectedly, dexamethasone down-regulated GR- α mRNA expression in equine neutrophils, at 10^{-8} M only (p=0.003). There was also a trend for a greater inhibitory effect of prednisolone on GR- α mRNA expression at the lowest dose compared to 10^{-6} M (p=0.112; Figure 1.E).

Glucocorticoids exert effects on gene expression in neutrophils and neutrophil-depleted leukocytes in both species

We next compared the inhibitory effects of GCs on LPS-induced mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in equine neutrophils and neutrophil-depleted leukocytes using 10^{-6} M dose (Figure 2.A, 2.B and 2.C). We observed a significant LPS-induced increase in IL-1 β (10-fold increase, p \leq 0.045) and IL-8 (5-fold increase, p \leq 0.012) mRNA expression in both cell populations. LPS significantly stimulated TNF- α mRNA expression in equine neutrophils only (10-fold increase, p=0.033). All three GCs down-regulated the LPS-induced IL-1 β (p \leq 0.001), TNF- α (p \leq 0.004) and

IL-8 ($p \leq 0.010$) mRNA expression in equine neutrophils except for hydrocortisone, for which the effect on IL-8 expression did not reach significance after Bonferroni correction ($p = 0.050$). As for neutrophil-depleted leukocytes, prednisolone significantly down-regulated the LPS-induced IL-8 mRNA expression ($p = 0.006$). Hydrocortisone and dexamethasone also inhibited IL-8 mRNA expression, but to a lesser extent ($p = 0.036$ and $p = 0.014$ respectively, not statistically significant after Bonferroni correction).

We also assessed the transactivating effect of GCs on glutamine synthetase mRNA expression in equine neutrophils and neutrophil-depleted leukocytes (Figure 2.D). All three GCs significantly induced glutamine synthetase mRNA expression within both cell populations ($p \leq 0.014$). Hydrocortisone had a weaker effect on glutamine synthetase mRNA expression compared to dexamethasone in equine neutrophils ($p = 0.009$).

Finally, effect of GCs on their cytosolic receptor mRNA expression was studied. The reduced GR- α mRNA expression caused by dexamethasone in neutrophils was not significant ($p = 0.012$, not statistically significant after Bonferroni correction; Figure 2.E). LPS had no significant effect on glutamine synthetase and GR- α mRNA expression.

In order to evaluate a species-specific effect of GCs, human neutrophil and neutrophil-depleted leukocyte response to dexamethasone (10^{-6} M, $n = 4$) was similarly studied (Figure 3.A). LPS increased IL-8 ($p \leq 0.026$) and TNF- α mRNA expression ($p \leq 0.024$) in both cell populations, while IL-1 β mRNA expression was significantly increased in human neutrophil-depleted leukocytes only ($p = 0.036$). Dexamethasone down-regulated IL-8 ($p \leq 0.025$) and TNF- α ($p \leq 0.022$) mRNA expression within each cell population. However, despite a reduced IL-1 β mRNA expression caused by dexamethasone within neutrophils in all human volunteers, this effect was not statistically significant ($p = 0.086$).

These effects were shown to be similar between cell populations and between species. The inhibitory and transactivating effects of GCs on gene expression in neutrophils and neutrophil-depleted leukocytes of equine and human subjects were compared. IL-

1β ($p=0.046$; Figure 4A) and $\text{TNF-}\alpha$ ($p=0.048$; Figure 3.B) mRNA expression in equine and human neutrophils respectively, was more strongly inhibited by dexamethasone than in other blood leukocytes. Moreover, the three drugs had also a greater transactivating effect on glutamine synthetase mRNA expression in equine neutrophils compared to neutrophil-depleted leukocytes (from a 20- to 50-fold increase in neutrophils compared to a 2-fold increase in other leukocytes; $p\leq 0.007$; Figure 2.D). Equine $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{GR-}\alpha$ mRNA expression was not studied as there was neither effect of LPS nor effect of GCs on both cell populations. Except for genes mentioned above, GCs exerted effects of similar magnitude in both cell populations for both species.

To evaluate possible interspecies difference, we compared the effects of dexamethasone between human and equine neutrophils. Dexamethasone had a similar inhibitory effect in both human and equine neutrophils for $\text{IL-}1\beta$ and $\text{IL-}8$ (Figure 5.A and 5.C). However, a stronger transrepressing effect on $\text{TNF-}\alpha$ mRNA expression was observed in equine neutrophils when compared to human neutrophils ($p=0.013$; Figure 5B).

Finally, to ensure that GCs delayed equine neutrophil apoptosis as seen in humans [6, 7] neutrophil survival was assessed by flow cytometry and light microscopy. Indeed, hydrocortisone (10^{-6}M), prednisolone and dexamethasone (both at 10^{-6}M and 10^{-8}M) significantly increased the survival in equine neutrophils as assessed by flow cytometry ($p\leq 0.001$; Figure 6.A). A strong linear relationship was documented between values obtained by flow cytometry and by light microscopy (Figure 6.B; $r^2=0.67$, $p<0.0001$, $n=6$).

Discussion

In the present study, we investigated the believed relative GC-insensitivity of neutrophils by comparing the response of LPS-stimulated peripheral blood neutrophils and neutrophil-depleted leukocytes from healthy horses and human volunteers to 3 commonly prescribed drugs. We found that GCs exert gene-specific, cortico-specific and concentration-dependent genomic effects within each cell population. Also neutrophils were found to be at least as responsive as other blood leukocytes to GCs in both species. Taken together, these results challenge the concept that the poor response to corticotherapy observed in some chronic neutrophilic diseases is due to an inherent attenuated response of neutrophils to GCs.

The effects of GCs occur through binding and activation of the cytoplasmic GR- α isoform. After translocation to the nucleus, GC-GR- α complex interfere with pro- and anti-inflammatory genes via transcription factors such as NF- κ B [26-28]. GCs have also been shown to inhibit inflammation without requiring gene interaction, in a short-time, generally within minutes. These non-genomic effects of GCs on neutrophils were reported to be lesser than other inflammatory cells in an earlier study [5]. This led to the assertion that neutrophils are inherently less sensitive to GCs compared to other leukocytes. However, our group recently showed that dexamethasone potently reduced the oxidative respiratory burst in equine neutrophils at a physiologic dose as also used by Schleimer and colleagues when studying human neutrophils (*i.e.* 10^{-6} M) [5]. Furthermore, a marked reduction of reactive oxygen species generation was observed in both neutrophils and mononuclear cells following intravenous administration of dexamethasone in human healthy subjects [29]. Taken together, these findings question the hypothesis of an attenuated response to GCs through the non-genomic pathway in neutrophils.

We thus investigated herein the genomic effects of GCs in neutrophils and neutrophil-depleted leukocytes harvested from the same equine and human subjects. We observed a decreased expression of pro-inflammatory cytokines by GCs in neutrophils from both species. These findings are in agreement with, and extent the

previous findings that GCs inhibits pro-inflammatory gene expression in neutrophils in different species [14-20]. This effect was also observed in neutrophil-depleted leukocytes however to a lesser extent for some genes (IL-1 β and TNF- α). Moreover, dexamethasone down-regulated LPS-induced pro-inflammatory cytokines to their basal level of mRNA expression in human neutrophils while a residual effect of LPS still persisted in neutrophil-depleted leukocytes. These findings do not necessary imply stronger effects on neutrophils, as neutrophil-depleted leukocytes may have different kinetics for GC effects on pro-inflammatory gene expression. Nevertheless, the expression of glutamine synthetase, a glucocorticoid-inducible gene [30, 31], was increased by GCs to a greater extent in neutrophils compared to neutrophil-depleted leukocytes. In overall, GCs exerted effects of similar magnitude between cell populations in both human and equine subjects. We also found that equine and human neutrophils responded similarly to GCs. To our knowledge, this is the first report comparing the GC effects between equine and human neutrophils.

Dexamethasone is considered to be approximately 6-12 times and 25 times more potent than prednisolone and hydrocortisone, respectively. These conclusions are based on *in vivo* human and animal studies and *in vitro* experiments using a transactivation assay of cells transfected with human GR [32]. In the present study, we observed that dexamethasone was only twice as potent as hydrocortisone at inhibiting or transactivating mRNA expression. Dosages may have contributed to these apparent differences, as GC concentrations used to calculate GC potency in previous reports were far below those we studied. Also, the experimental settings we used differed from those of Grossmann and colleagues [32], possibly also contributing to these differences. Our group recently reported a significant improvement in pulmonary function mediated by prednisolone and dexamethasone in heaves-affected horses, a disease that share many features of human asthma [33]. To achieve equivalent potencies, doses for both drugs administrated were calculated based on their oral bioavaibility and reported ratios [32]. Yet, dexamethasone was found more effective than prednisolone in treatment of heaves-affected horses. Balance between genomic and non-genomic effects [34], influence of cell type,

various affinities for the GR [32] may also explain differences observed in reported relative potencies of GCs.

The concentrations studied here were chosen because they are reached systemically at dosage commonly prescribed for dexamethasone in horses [35] and other GCs in humans [36, 37]. In addition, GR saturation threshold ranges from 10^{-8} M to 10^{-6} M, as reported in a study performed on purified rat peritoneal mast cells [38]. A maximal effect was not reached for all genes at 10^{-8} M in the present study however. For instance, hydrocortisone and prednisolone had a lesser transactivating effect on glutamine synthetase mRNA expression at 10^{-8} M, whereas a maximal potency at inhibiting IL-1 β and IL-8 gene expression was already present at this concentration. This highlights the finely tuned regulation of the genomic pathway of GCs in neutrophils.

We chose LPS as the agonist to stimulate cells, as humans and horses are highly LPS-sensitive species [39-41]. Unexpectedly, the responsiveness to LPS we observed differed between cell populations of humans and horses. Equine neutrophils were shown to be more responsive to LPS than equine neutrophil-depleted leukocytes and, inversely for human cell populations. Human monocytes were shown to express LPS-signaling cell surface receptors Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 at higher levels than neutrophils [42]. In addition, human neutrophils were shown to express 10 to 20-fold less cytokines mRNA than monocytes [1]. In our study, the percentage of monocytes in horses and human volunteers were 15.0 ± 6.7 and 27.5 ± 8.7 (mean \pm SD) respectively. We hypothesized that variations in the percentage of monocytes within neutrophil-depleted leukocytes contributed to the different response patterns towards LPS in both species. LPS had no effect on GR- α mRNA expression in equine neutrophils and neutrophil-depleted leukocytes, while LPS combined with dexamethasone down-regulated GR- α mRNA expression. Nevertheless, LPS was reported to reduce GR mRNA expression in lung tissue in a rat model of acute lung injury model [43]. Thus, a decrease in GR expression in neutrophils in LPS associated diseases may lead to loss of GC efficacy and corticoreistance.

Human and equine neutrophils participate to the immunomodulation of acute phase inflammation by the release of potent pro-inflammatory cytokines and chemokines, such as IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 and macrophage inflammatory protein-2 [1, 21, 44]. A prolonged activation through a delayed apoptosis of neutrophils may contribute to sustained inflammation and result in massive damage in surrounding tissues. Several *in vitro* studies have shown that GCs increase human neutrophil survival by delaying apoptosis [6, 7]. Although molecular mechanisms implicated in these responses remain poorly understood, studies suggested that both genomic and non-genomic pathways may be involved. Various mechanisms for GC-mediated inhibition of apoptosis have been proposed including up-regulation of anti-apoptotic Bcl-2 and IAPs family members [45, 46]. For instance, it has been demonstrated that dexamethasone induces survival and enhances Mcl-1, an inhibitor of Bax, a pro-apoptotic Bcl-2 family member, via PI3K and p38 MAPK kinases in human neutrophils [45]. Results of our present study indicate that, as in human species, GCs also enhances equine neutrophil survival. In agreement with our observations, Cox and colleagues also reported that GC-induced survival was not associated with cell activation as assessed by IL-8 release in culture supernatant over 24h and superoxide production. These findings differ from data obtained using neutrophils stimulated with LPS, where decreased apoptosis was associated with sustained pro-inflammatory cytokine production [47]. Future studies assessing the genomic and non-genomic effects of a combination of both agonists on fresh and 24h-cultured neutrophils are of interest. Indeed, GCs are used therapeutically at times when stimuli such as LPS might also be present.

Results of our study do not support an attenuated response of neutrophils to GCs through the genomic pathway. Although GC effects on anti-inflammatory gene expression in immune cells were not assessed, this may warrant further investigation as a recent *in vitro* study reported that dexamethasone down-regulated sIL-1Ra more efficiently than IL- β in human TNF- α -stimulated neutrophils, inducing a pro-inflammatory shift in the cytokine balance [48]. This finding may contribute to GC-

resistance observed in severe asthma or COPD. However, there are some highly GC-responsive neutrophilic conditions. For instance, GCs are very efficient drugs in human Sweet's syndrome, an acute febrile dermatosis, characterized by a diffuse infiltration of mature neutrophils in the upper dermis [49]. In horses, GCs are commonly used for the treatment of heaves [50]. Despite a significant improvement in clinical signs, airway neutrophilia, a characteristic finding, persists after GC administration [50-52]. In light of our findings, an increase in neutrophil survival mediated by GCs is more likely contributing to persistence of these cells in tissues than an attenuated response of neutrophils to these drugs.

In conclusion, results from our study indicate that glucocorticoids exert genomic effects of similar magnitude in neutrophils and other blood leukocytes in both horses and humans. We therefore speculate that the poor response to corticotherapy observed in patients with severe asthma or COPD cannot be explained by a relative lack of inhibition of these drugs on pro-inflammatory cytokines expression in neutrophils. GC-resistant inflammatory diseases have been extensively studied during the last decade and several distinct molecular mechanisms contributing to decrease anti-inflammatory effects of GCs have now been identified. Among these mechanisms, an increase in the inactive isoform β expression of GR (GR- β) in GC-resistant inflammatory diseases has been proposed [8, 53]. Neutrophils highly express GR- β compared to other cell types [54]. Moreover, Hamid and colleagues recently suggested that an environment in which there is an increased level of interleukin-17 (IL-17) may influence GR- β signaling and steroid-responsiveness in asthmatic patients [55]. Future studies addressing potential direct or indirect effects of IL-17 on neutrophil GC-sensitivity would be of interest.

Acknowledgments

We thank Dr Gregory P Downey for his help with experiments involving human neutrophil survival and Josiane Lefebvre-Lavoie for her support with qPCR assays.

References

1. Cassatella MA (1999) Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol* 73: 369-509.
2. Filep JG, El Kebir D (2009) Neutrophil apoptosis: a target for enhancing the resolution of inflammation. *J Cell Biochem* 108: 1039-1046.
3. Schleimer RP (1990) Effects of glucocorticosteroids on inflammatory cells relevant to their therapeutic applications in asthma. *Am Rev Respir Dis* 141: S59-69.
4. Schleimer RP (2004) Glucocorticoids suppress inflammation but spare innate immune responses in airway epithelium. *Proc Am Thorac Soc* 1: 222-230.
5. Schleimer RP, Freeland HS, Peters SP, Brown KE, Derse CP (1989) An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotriene B4 by purified human neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther* 250: 598-605.
6. Cox G (1995) Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol* 154: 4719-4725.
7. Meagher LC, Cousin JM, Seckl JR, Haslett C (1996) Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *J Immunol* 156: 4422-4428.
8. Barnes PJ, Adcock IM (2009) Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet* 373: 1905-1917.
9. Ordonez CL, Shaughnessy TE, Matthay MA, Fahy JV (2000) 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.
10. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, et al. (1999) Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1001-1008.
11. Wenzel SE, Szeffler SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, et al. (1997) Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation

- associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 737-743.
12. Yang IA, Fong KM, Sim EH, Black PN, Lasserson TJ (2007) Inhaled corticosteroids for stable chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev*: CD002991.
 13. Barnes PJ (2007) New molecular targets for the treatment of neutrophilic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 119: 1055-1062; quiz 1063-1054.
 14. al-Mokdad M, Shibata F, Takano K, Nakagawa H (1998) Differential production of chemokines by phagocytosing rat neutrophils and macrophages. *Inflammation* 22: 145-159.
 15. Strandberg K, Blidberg K, Sahlander K, Palmberg L, Larsson K (2010) Effect of formoterol and budesonide on chemokine release, chemokine receptor expression and chemotaxis in human neutrophils. *Pulm Pharmacol Ther* 23: 316-323.
 16. Nupponen I, Repo H, Kari A, Pohjavuori M, Andersson S (2002) Early dexamethasone decreases expression of activation markers on neutrophils and monocytes in preterm infants. *Acta Paediatr* 91: 1200-1207.
 17. Wertheim WA, Kunkel SL, Standiford TJ, Burdick MD, Becker FS, et al. (1993) Regulation of neutrophil-derived IL-8: the role of prostaglandin E₂, dexamethasone, and IL-4. *J Immunol* 151: 2166-2175.
 18. Burton JL, Kehrli ME, Jr., Kapil S, Horst RL (1995) Regulation of L-selectin and CD18 on bovine neutrophils by glucocorticoids: effects of cortisol and dexamethasone. *J Leukoc Biol* 57: 317-325.
 19. Weber PS, Toelboell T, Chang LC, Tirrell JD, Saama PM, et al. (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.
 20. Lecoq L, Vincent P, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP (2009) Genomic and non-genomic effects of dexamethasone on equine peripheral blood neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol* 128: 126-131.

21. Joubert P, Silversides DW, Lavoie JP (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.
22. Lavoie-Lamoureux A, Beauchamp G, Quessy S, Martin JG, Lavoie JP (2012) Systemic inflammation and priming of peripheral blood leukocytes persist during clinical remission in horses with heaves. *Vet Immunol Immunopathol* 146: 35-45.
23. Haslett C, Guthrie LA, Kopaniak MM, Johnston RB, Jr., Henson PM (1985) Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol* 119: 101-110.
24. Lavoie-Lamoureux A, Moran K, Beauchamp G, Mauel S, Steinbach F, et al. (2010) 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* 299: L472-482.
25. Fialkow L, Fochesatto Filho L, Bozzetti MC, Milani AR, Rodrigues Filho EM, et al. (2006) Neutrophil apoptosis: a marker of disease severity in sepsis and sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *Crit Care* 10: R155.
26. Barnes PJ (2011) Glucocorticosteroids: current and future directions. *Br J Pharmacol* 163: 29-43.
27. Nicolaides NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E (2010) The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids* 75: 1-12.
28. Pujols L, Mullol J, Picado C (2007) Alpha and beta glucocorticoid receptors: relevance in airway diseases. *Curr Allergy Asthma Rep* 7: 93-99.
29. Dandona P, Mohanty P, Hamouda W, Aljada A, Kumbkarni Y, et al. (1999) Effect of dexamethasone on reactive oxygen species generation by leukocytes and plasma interleukin-10 concentrations: a pharmacodynamic study. *Clin Pharmacol Ther* 66: 58-65.

30. Chandrasekhar S, Souba WW, Abcouwer SF (1999) Identification of glucocorticoid-responsive elements that control transcription of rat glutamine synthetase. *Am J Physiol* 276: L319-331.
31. Gaunitz F, Heise K, Schumann R, Gebhardt R (2002) Glucocorticoid induced expression of glutamine synthetase in hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 1026-1032.
32. Grossmann C, Scholz T, Rochel M, Bumke-Vogt C, Oelkers W, et al. (2004) Transactivation via the human glucocorticoid and mineralocorticoid receptor by therapeutically used steroids in CV-1 cells: a comparison of their glucocorticoid and mineralocorticoid properties. *Eur J Endocrinol* 151: 397-406.
33. Leclere M, Lefebvre-Lavoie J, Beauchamp G, Lavoie JP (2010) Efficacy of oral prednisolone and dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction in the presence of continuous antigen exposure. *Equine Vet J* 42: 316-321.
34. Buttgereit F, Brand MD, Burmester GR (1999) Equivalent doses and relative drug potencies for non-genomic glucocorticoid effects: a novel glucocorticoid hierarchy. *Biochem Pharmacol* 58: 363-368.
35. Grady JA, Davis EG, Kukanich B, Sherck AB (2010) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dexamethasone after oral administration in apparently healthy horses. *Am J Vet Res* 71: 831-839.
36. Czock D, Keller F, Rasche FM, Haussler U (2005) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet* 44: 61-98.
37. Xu J, Winkler J, Derendorf H (2007) A pharmacokinetic/pharmacodynamic approach to predict total prednisolone concentrations in human plasma. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 34: 355-372.
38. Walajtys-Rode E, Dabrowski A, Grubek-Jaworska H, Machnicka B, Droszcz W (1988) Binding of dexamethasone and its effect on histamine release from rat mast cells. *Int J Immunopharmacol* 10: 925-930.
39. Burrows GE (1981) Dose-response of ponies to parenteral *Escherichia coli* endotoxin. *Can J Comp Med* 45: 207-210.

40. Berczi I, Bertok L, Bereznai T (1966) Comparative studies on the toxicity of *Escherichia coli* lipopolysaccharide endotoxin in various animal species. *Can J Microbiol* 12: 1070-1071.
41. Palsson-McDermott EM, O'Neill LA (2004) Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 113: 153-162.
42. Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MK, Dower SK (2002) Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol* 168: 4701-4710.
43. Wang XQ, Zhou X, Zhou Y, Rong L, Gao L, et al. (2008) Low-dose dexamethasone alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats and upregulates pulmonary glucocorticoid receptors. *Respirology* 13: 772-780.
44. Cassatella MA (1995) The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 16: 21-26.
45. Saffar AS, Dragon S, Ezzati P, Shan L, Gounni AS (2008) Phosphatidylinositol 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase regulate induction of Mcl-1 and survival in glucocorticoid-treated human neutrophils. *J Allergy Clin Immunol* 121: 492-498 e410.
46. Saffar AS, Ashdown H, Gounni AS (2011) The molecular mechanisms of glucocorticoids-mediated neutrophil survival. *Curr Drug Targets* 12: 556-562.
47. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A (1992) Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80: 2012-2020.
48. Langereis JD, Oudijk EJ, Schweizer RC, Lammers JW, Koenderman L, et al. (2011) Steroids induce a disequilibrium of secreted interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1beta synthesis by human neutrophils. *Eur Respir J* 37: 406-415.
49. Cohen (2007) Sweet's syndrome – a comprehensive review of an acute febrile neutrophilic dermatosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 34.

50. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP (2011) Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology* 16: 1027-1046.
51. Lavoie JP, Pasloske K, Joubert P, Cordeau ME, Mancini J, et al. (2006) Lack of clinical efficacy of a phosphodiesterase-4 inhibitor for treatment of heaves in horses. *J Vet Intern Med* 20: 175-181.
52. Lavoie JP, Leguillette R, Pasloske K, Charette L, Sawyer N, et al. (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.
53. Barnes PJ (2010) Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 120: 76-85.
54. Strickland I, Kisich K, Hauk PJ, Vottero A, Chrousos GP, et al. (2001) 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* 193: 585-593.
55. Vazquez-Tello A, Semlali A, Chakir J, Martin JG, Leung DY, et al. (2010) Induction of glucocorticoid receptor-beta expression in epithelial cells of asthmatic airways by T-helper type 17 cytokines. *Clin Exp Allergy* 40: 1312-1322.

Figure Legends

Figure 1. Concentration-dependent effects of glucocorticoids on gene expression in equine peripheral blood neutrophils.

Neutrophils were isolated from the blood of 3 healthy horses and were incubated for 5h with or without lipopolysaccharide (100ng/mL) combined with hydrocortisone (HC), prednisolone (PRED), dexamethasone (DEX) at 10^{-8} M and 10^{-6} M. Following culture, mRNA expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α and IL-8; A, B and C), glutamine synthetase (D) and GR- α (E) was quantified by qPCR. Absolute values were corrected using GAPDH as a reference gene. Gene expression was reported as the relative variation (fold increase) to unstimulated cell mRNA levels (arbitrary value of 1). Bars represent means. * Significant difference between treatments ($p \leq 0.020$).

Figure 2. Glucocorticoid effects on gene expression in equine peripheral blood neutrophils and neutrophil-depleted leukocytes.

Neutrophils and neutrophil-depleted leukocytes were isolated from the blood of 6 healthy horses and were incubated for 5h with or without lipopolysaccharide (LPS; 100ng/mL) alone or combined with hydrocortisone (HC), prednisolone (PRED), dexamethasone (DEX) at 10^{-6} M. Following culture, mRNA expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α and IL-8; A, B and C), glutamine synthetase (D) and GR- α (E) was quantified by qPCR. Absolute values were corrected using GAPDH as a reference gene. Gene expression was reported as the relative variation (fold increase) to unstimulated cell mRNA levels (arbitrary value of 1). Bars represent means + SEM. * Significant effect of treatment over LPS-stimulated cells ($p \leq 0.014$). † Significant difference between treatments ($p = 0.009$).

Figure 3. Glucocorticoid effects on pro-inflammatory cytokines gene expression in human peripheral blood neutrophils and neutrophil-depleted leukocytes.

Neutrophils and neutrophil depleted leukocytes were isolated from the blood of 4 healthy human volunteers and were incubated for 5h with or without

lipopolysaccharide (LPS; 100ng/mL) alone or combined with dexamethasone (DEX) at 10^{-6} M. Following culture, mRNA expression of proinflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α and IL-8) was quantified by qPCR. Absolute values were corrected using GAPDH as a reference gene.

A. Gene expression was reported as the relative variation (fold increase) to unstimulated cell mRNA levels (arbitrary value of 1). Bars represent means. *Significant effect of treatment over LPS-stimulated cells ($p \leq 0.050$).

B. Dexamethasone percentage of inhibition on LPS-induced mRNA expression was compared between cell populations. A 100% inhibition means that mRNA expression returned to unstimulated cell basal mRNA level. Bars represent means. † Significant effect of treatment between cell populations ($p = 0.048$).

Figure 4. Comparison of glucocorticoid inhibitory effects between equine cell populations.

Neutrophils and neutrophil depleted leukocytes were isolated from the blood of 6 healthy horses and were incubated for 5h with or without lipopolysaccharide (LPS; 100ng/mL) alone or combined with hydrocortisone (HC), prednisolone (PRED), dexamethasone (DEX) at 10^{-6} M. Following culture, mRNA expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and IL-8; A and B) was quantified by qPCR. Absolute values were corrected using GAPDH as a reference gene. GC percentage of inhibition on LPS-induced mRNA expression was compared between cell populations. A 100% inhibition means that mRNA expression returned to unstimulated cell basal mRNA level. Bars represent means + SEM. * Significant effect of treatment between cell populations ($p = 0.046$).

Figure 5. Comparison of dexamethasone inhibitory effect in equine and human neutrophils.

Neutrophils were isolated from the blood of 6 healthy horses and 4 healthy human volunteers and were incubated for 5h with or without lipopolysaccharide (LPS; 100ng/mL) alone or combined with dexamethasone (DEX) at 10^{-6} M. Following culture, mRNA expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α and IL-8;

A, B and C) was quantified by qPCR. Absolute values were corrected using GAPDH as a reference gene. Dexamethasone percentage of inhibition on LPS-induced mRNA expression was compared between both species. A 100% inhibition means that mRNA expression returned to unstimulated cell basal mRNA level. Bars represent means + SEM . * Significant effect of treatment between cell populations (p=0.013).

Figure 6. Glucocorticoids increase survival in equine peripheral blood neutrophils.

A. Freshly isolated equine neutrophils (n=6) were incubated for 20h in the absence or presence of hydrocortisone (HC), prednisolone (PRED), dexamethasone (DEX) at 10^{-6} M and 10^{-8} M. The number of viable cells was assessed by flow cytometry using APC Annexin V/7-AAD staining. APC Annexin V and 7-AAD negative cells were considered as viable cells. Bars represent means + SEM. *Significant effect of treatment over unstimulated cells (p \leq 0.001). B. The percentage of viable cells was assessed by flow cytometry using APC Annexin V/7-AAD staining (x axis) and by light microscopy (y axis) and analyzed using a simple linear regression (linear regression slope $R^2=0.67$, p<0.0001).

Tables

Table S1. Sequences of primer pairs used for qPCR analysis.

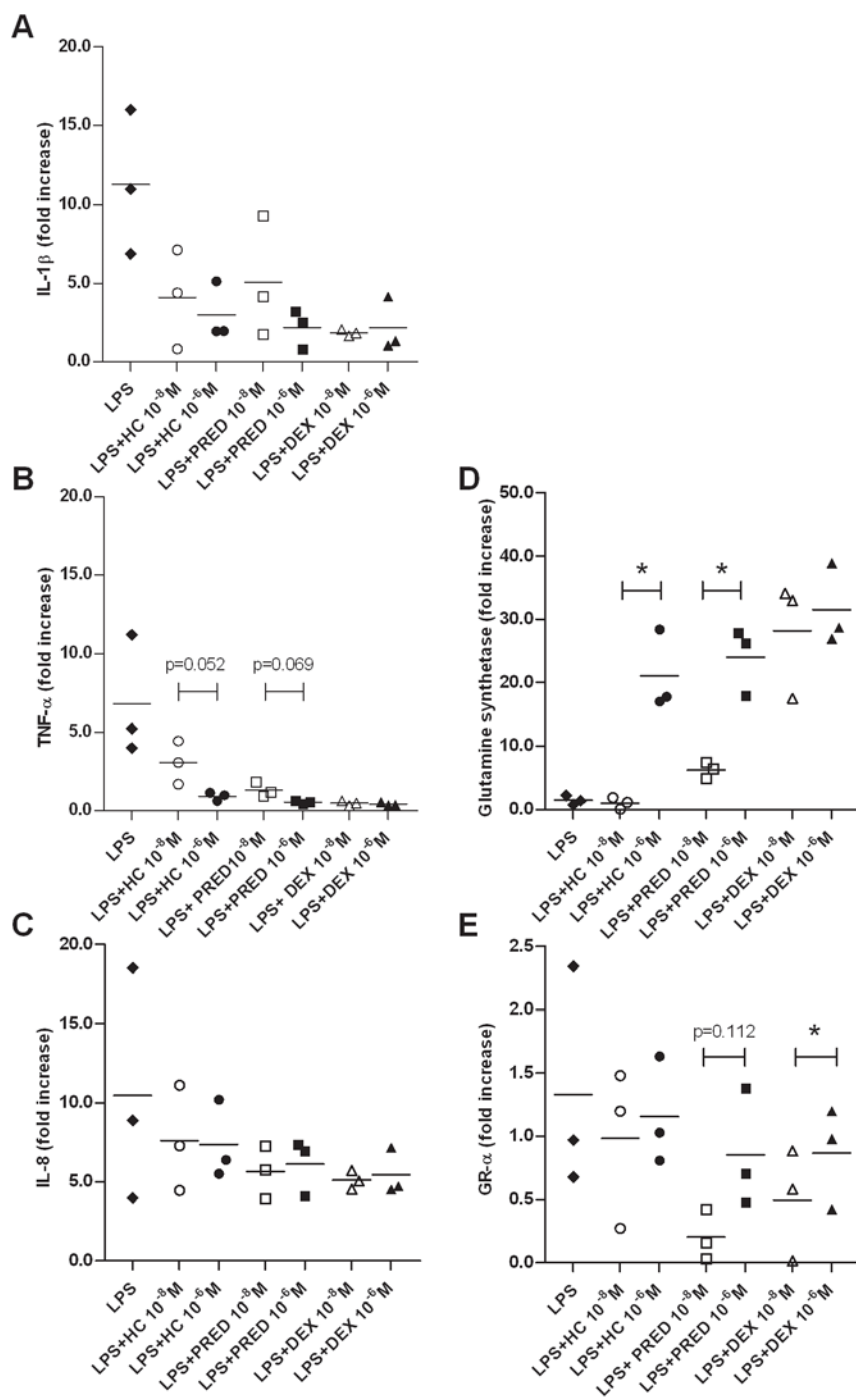


Figure 1. Concentration-dependent effects of glucocorticoids on gene expression in equine peripheral blood neutrophils.

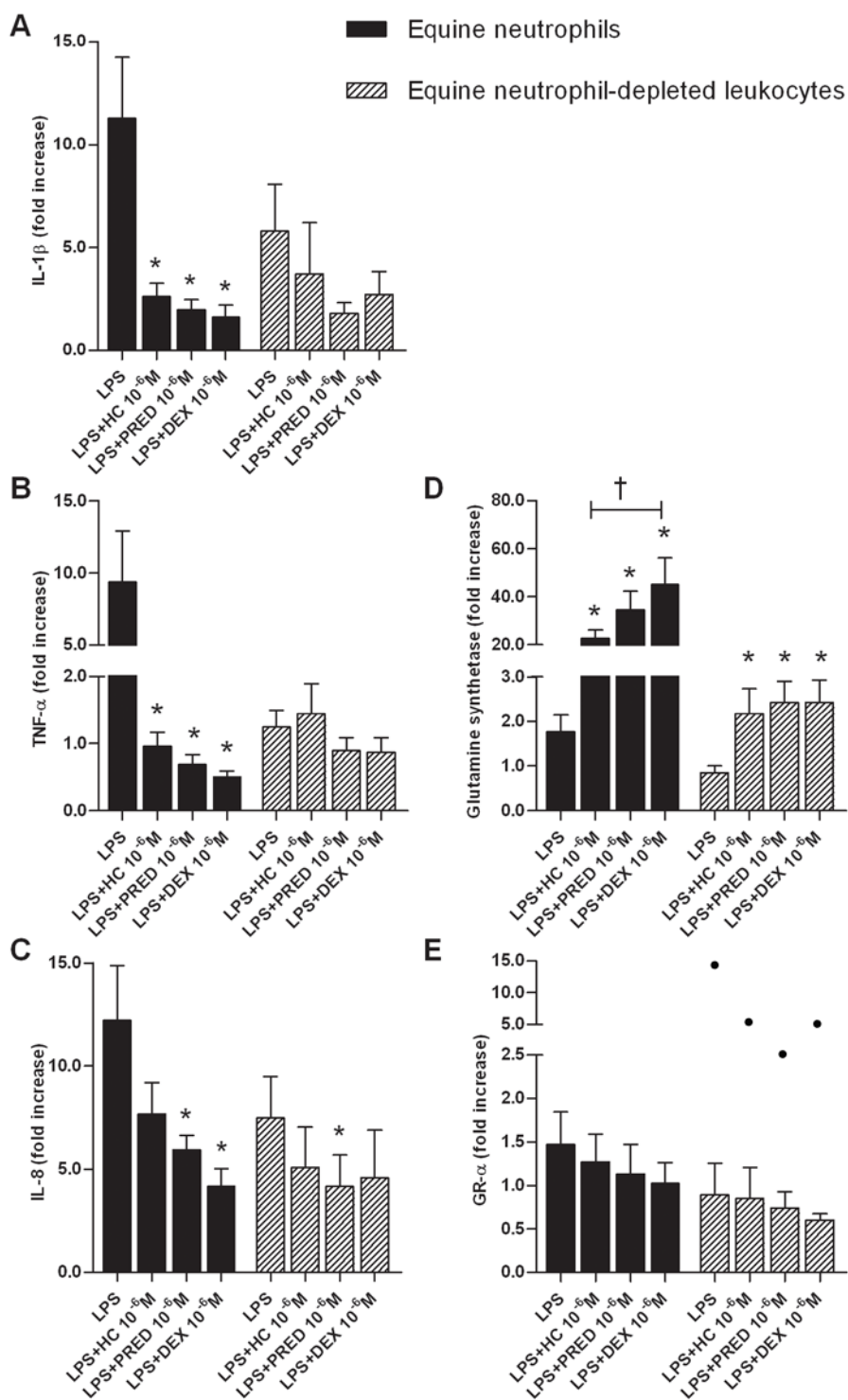


Figure 2. Glucocorticoid effects on gene expression in equine peripheral blood neutrophils and neutrophil-depleted leukocytes.

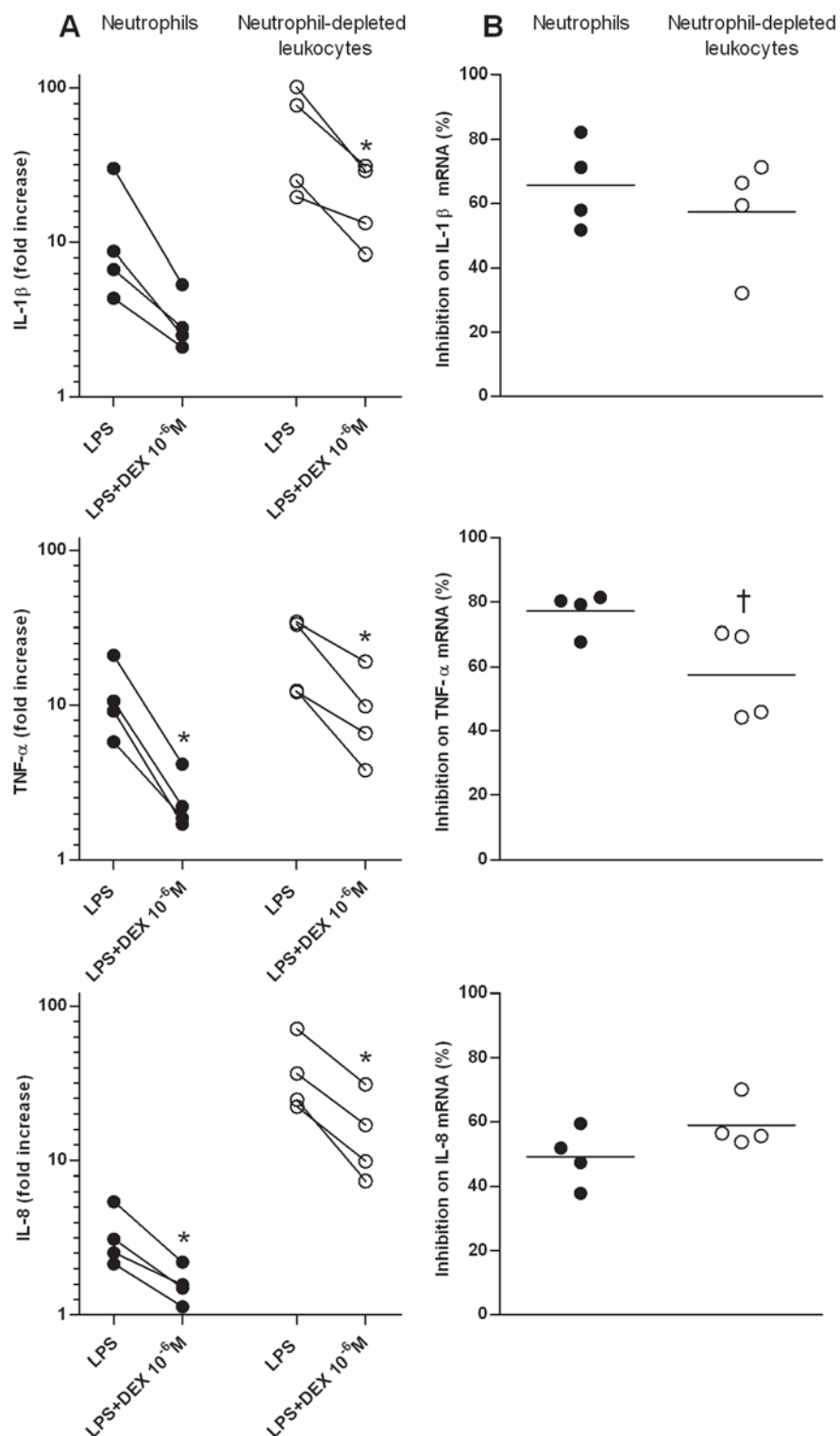


Figure 3. Glucocorticoid effects on pro-inflammatory cytokines gene expression in human peripheral blood neutrophils and neutrophil-depleted leukocytes.

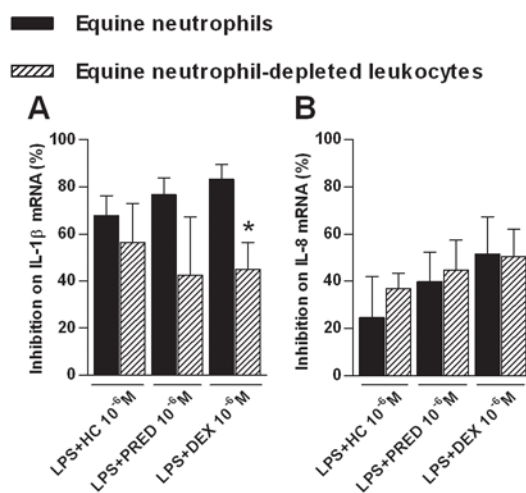


Figure 4. Comparison of glucocorticoid inhibitory effects between equine cell populations.

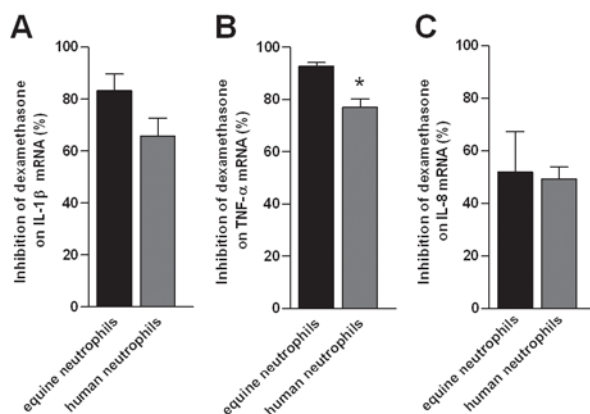


Figure 5. Comparison of dexamethasone inhibitory effect in equine and human neutrophils.

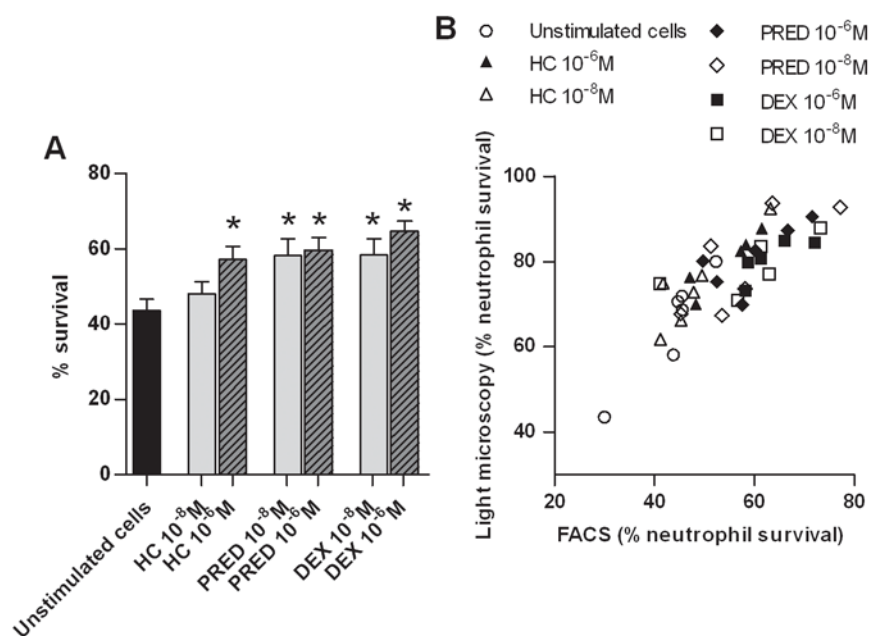


Figure 6. Glucocorticoids increase survival in equine peripheral blood neutrophils.

Table S1. Sequences of primer pairs used for qPCR analysis.

Species	Gene Id	Forward sequence (5'–3')	Reverse sequence (5'–3')
<i>Equus caballus</i>	<i>GAPDH</i>	AAGTGGATATTGTCGCCATCAAT	AACTTGCCATGGGTGGAATC
	<i>IL-1β</i>	GACTGACAAGATACCTGTGGCCT	AGACAACAGTGAAGTGCAGCCT
	<i>IL-8</i>	GCAGACCTCAGCTCCGTTGAC	CTTCTGCAGCTCTGTGTGAAG
	<i>TNF-α</i>	CTTGTGCCTCAGCCTTCTCCTTC	TGATGGCAGAGAGGAGGTTGA
	<i>GS</i>	ACTGGATTCCACGAAACCTCCAAC	GCTGCAAGTCTAGTCCGCTTAGTT
	<i>GR-α</i>	GAAGGAAACTCCAGCCAGAAC	CTGATTGGTGATGATTTCAGCTA
<i>Homo sapiens</i>	<i>GAPDH</i>	GTGAAGGTCGGAGTCAACGGATT	TTGACGGTGCCATGGAATTTGC
	<i>IL-1β</i>	ACCTGAGCTCGCCAGTAAAATGAT	TGGTCGGAGATTCGTAGCTGGAT
	<i>IL-8</i>	CCTTCTGATTTCTGCAGCTCTGT	TTGGGGTGGAAAAGGTTTGGAGT
	<i>TNF-α</i>	TGACAAGCCTGTAGCCCATGTT	GTTATCTCTCAGCTCCACGCCATT

GS: Glutamine synthetase

Discussion

Dans la présente étude, nous avons investigué l'existence d'une corticorésistance relative des neutrophiles en comparant leur réponse à celles des autres leucocytes sanguins chez les chevaux sains et chez l'homme. Trois glucocorticoïdes couramment prescrits ont été utilisés, soit l'hydrocortisone, la prednisolone et la dexaméthasone. Nous avons démontré que les glucocorticoïdes exerçaient des effets géniques gène-spécifiques, cortico-spécifiques et concentration-dépendants pour chacune des populations cellulaires étudiées. De plus, les neutrophiles apparaissaient au moins aussi sensibles que les autres leucocytes sanguins aux glucocorticoïdes dans les deux espèces. Nos résultats remettent donc en question la réponse atténuée des neutrophiles aux glucocorticoïdes comme cause de la faible réponse à la corticothérapie observée lors de maladies neutrophiliques chroniques.

Les effets des glucocorticoïdes sont provoqués par la liaison et l'activation de l'isoforme active GR- α . Après translocation nucléaire, le complexe GC-GR- α interfère avec les gènes ciblés (Nicolaidis, Galata, Kino, Chrousos, & Charmandari, 2010; Pujols, et al., 2007). Il a également été démontré que les glucocorticoïdes peuvent réduire l'inflammation sans interagir avec le génome, en un temps très court, généralement de quelques minutes. Dans une étude, ces effets, dits non géniques se sont avérés absents chez les neutrophiles humains, suggérant que cette population cellulaire était résistante aux glucocorticoïdes (Schleimer, et al., 1989). Cependant, notre groupe a récemment démontré que la dexaméthasone réduisait de façon marquée le métabolisme oxydatif des neutrophiles équins à la même concentration que celle utilisée par Schleimer *ie* 10^{-6} M (Lecoq, et al., 2009). De plus, une réduction importante de la production de radicaux libres a été observée chez les neutrophiles et les cellules mononucléaires suite à l'administration de dexaméthasone chez des sujets humains sains (Dandona, Mohanty, et al., 1999). Ainsi, ces données remettent en doute l'hypothèse d'une réponse non génique atténuée des neutrophiles aux glucocorticoïdes.

Les glucocorticoïdes exercent des effets géniques sur les deux populations cellulaires et dans les 2 espèces étudiées

Nous avons orienté notre projet vers la comparaison des effets géniques des glucocorticoïdes sur les neutrophiles et les autres leucocytes sanguins isolés à partir des mêmes sujets, dans 2 espèces différentes, l'homme et le cheval.

Nous avons observé une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires par les glucocorticoïdes chez les neutrophiles équins et humains. Nos résultats sont en accord avec ce qui a déjà été rapporté dans d'autres espèces où il a été démontré que les glucocorticoïdes diminuaient l'expression des cytokines pro-inflammatoires par les neutrophiles (al-Mokdad, et al., 1998; Burton, et al., 1995; Lecoq, et al., 2009; Nupponen, et al., 2002; Strandberg, Blidberg, Sahlander, Palmberg, & Larsson, 2010; Weber, et al., 2004; Wertheim, et al., 1993). Cet effet inhibiteur, bien que de moindre amplitude pour certains gènes comme l'IL-1 β chez le cheval et le TNF- α chez l'homme, a également été observé chez les cellules mononucléaires et les éosinophiles équins et humains. La dexaméthasone diminuait l'expression d'ARNm des cytokines pro-inflammatoires induites par le LPS jusqu'à leur niveau basal chez les neutrophiles humains, tandis qu'un effet résiduel du LPS semblait persister chez les autres leucocytes sanguins. Ces résultats n'impliquent pas nécessairement un effet plus marqué des glucocorticoïdes sur les neutrophiles. Les cellules mononucléaires et les éosinophiles pourraient avoir des cinétiques différentes concernant les effets des glucocorticoïdes sur l'expression des gènes pro-inflammatoires, ce que nous n'avons pas investigué.

L'effet transactivateur des glucocorticoïdes sur l'expression de la glutamine synthétase était également plus marqué chez les neutrophiles équins en comparaison aux autres leucocytes sanguins. Le gène responsable de l'expression de la glutamine synthétase est un des principaux gènes dont l'expression est induite par les glucocorticoïdes par transactivation, le complexe GC-GR- α se liant à l'ADN au niveau des GRE du gène cible (Chandrasekhar, et al., 1999; Gaunitz, Heise, Schumann, & Gebhardt, 2002). Son substrat, la glutamine possède des propriétés immuno-régulatrices et protectrices de la cellule. Elle est également nécessaire à

l'activation et à la prolifération des leucocytes (Roth, 2008). Enfin, elle aurait un rôle dans l'amélioration clinique et du taux de mortalité des patients admis en soins intensifs suite à une endotoxémie ou une infection sévère (Garrel et al., 2003; Preiser & Wernerman, 2003; Wischmeyer, 2007). Il a été démontré que la relâche de glutamine synthétase par le tissu pulmonaire augmentait en réponse à l'endotoxémie, et à l'administration de dexaméthasone chez le rat (Lukaszewicz, Abcouwer, Labow, & Souba, 1997). Dans notre étude, le LPS n'avait aucun effet sur l'induction de l'expression de la glutamine synthétase par les neutrophiles. Ces résultats sont en accord avec une étude antérieure où il a été démontré que l'endotoxémie induite par le LPS augmentait la relâche de glutamine synthétase par les poumons de rats indépendamment de leur infiltration neutrophilique (Lukaszewicz, et al., 1997). A notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir investiguer l'effet direct du LPS et des glucocorticoïdes sur l'expression de la glutamine synthétase par les leucocytes. La glutamine synthétase a été utilisée ici comme simple marqueur de la transactivation. Le rôle de son expression marquée par les neutrophiles en réponse aux glucocorticoïdes reste encore à investiguer.

Dans l'ensemble, nous avons pu démontrer que les glucocorticoïdes exerçaient des effets de magnitude similaire entre les populations cellulaires chez l'homme et le cheval. Nos résultats indiquent également que les neutrophiles équins et humains répondent aux glucocorticoïdes de façon comparable. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une telle comparaison est rapportée.

Étude des effets non géniques des glucocorticoïdes sur les neutrophiles et les autres leucocytes sanguins chez le cheval

L'un des objectifs initiaux de notre projet incluait l'étude comparative des effets non géniques des glucocorticoïdes sur les neutrophiles et les autres leucocytes sanguins chez le cheval. Le protocole précédemment optimisé dans notre laboratoire et permettant de mesurer le métabolisme oxydatif des neutrophiles équins par cytométrie de flux a été utilisé (Lecoq, et al., 2009). Brièvement, les leucocytes totaux ont été isolés du sang de chevaux sains, les cellules ont ensuite été incubées à $5 \cdot 10^6$ cellules/mL pendant un temps maximal de 30 minutes en présence de

dexaméthasone à 10^{-6} M (5 à 15 min) puis de PMA (5ng/mL, 15 min), un activateur reconnu du métabolisme oxydatif (Kobayashi, Tsunawaki, & Seguchi, 2001; Wolfson, McPhail, Nasrallah, & Snyderman, 1985). Les cellules incubées avec du PMA seul constituaient le groupe contrôle. L'oxydation du fluorochrome DCF par les cellules stimulées, ajouté dans le milieu (Jakubowski & Bartosz, 2000) a été mesuré par cytométrie de flux. Au moment de nos tests préliminaires, le technicien responsable du FACSVantage (BD Biosciences), appareil utilisé dans l'étude de Dre Lecoq, n'était plus disponible, d'où le choix d'un autre dispositif de type FACSCalibur (BD Biosciences), plus simple d'utilisation. Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure de reproduire les résultats obtenus par Dre Lecoq, c'est-à-dire, une inhibition par la dexaméthasone du métabolisme oxydatif induit par le PMA chez les neutrophiles équins. Quelques hypothèses afin d'expliquer nos résultats infructueux ont été émises. Le type de cytomètre de flux utilisé dans notre projet étant plus sensible que le FACSVantage, une quantité de fluorochrome trop élevée aurait pu masquer l'effet de la dexaméthasone. De plus, les niveaux de fluorescence obtenus avec le DCF seul étaient bien supérieurs à ceux obtenus par la Dre Lecoq. Des tests à des concentrations en fluorochrome plus faibles ont été réalisés, mais sans succès. Le protocole utilisé par Dre Lecoq avait été optimisé pour un cytomètre de flux fonctionnant différemment du FACSCalibur ce qui pourrait expliquer les différences observées. Finalement, la préparation d'un protocole spécifique au FACSCalibur est à envisager et indispensable à la poursuite de ces expériences.

L'efficacité des glucocorticoïdes étudiés sur les leucocytes équins est cortico-dépendante

La dexaméthasone est considérée comme étant 6 à 12 fois et 25 fois plus efficace que la prednisolone et l'hydrocortisone respectivement. Ces conclusions sont basées sur des études *in vivo* humaines et animales, se référant aux effets anti-inflammatoires (test de l'œdème auriculaire chez le rat ou test de vasoconstriction de McKenzie) ou métaboliques (évaluation de la production de glycogène hépatique) des glucocorticoïdes. Elles reposent également sur des expériences *in vitro*, utilisant, par exemple, un modèle de transactivation de cellules transfectées avec le GR humain

(Grossmann et al., 2004). Dans la présente étude, nous avons observé que la dexaméthasone était seulement 2 fois plus efficace que l'hydrocortisone tant dans son pouvoir inhibiteur que transactivateur de l'expression des gènes étudiés. Les concentrations que nous avons utilisées peuvent avoir contribué aux différences observées. En effet, celles décrites dans l'étude de Grossmann et al. (2004) étaient bien plus faibles que les nôtres. Des conditions expérimentales distinctes peuvent aussi expliquer les résultats obtenus. Grossman et al. (2004) mesuraient à l'aide d'un luminomètre l'activité de la luciférase dont l'expression par les cellules était induite par les glucocorticoïdes. Dans notre projet, l'intensité de la transactivation ou de la répression génique a été évaluée par qPCR.

Notre groupe a récemment rapporté une amélioration significative de la fonction pulmonaire suite à l'administration PO de prednisolone et de dexaméthasone chez les chevaux atteints du souffle (Leclere, et al., 2010). Afin d'obtenir des efficacités équivalentes, le calcul des doses administrées était basé sur la biodisponibilité orale de ces deux drogues mais également sur les ratios d'efficacité décrits dans la littérature. Pourtant, la dexaméthasone s'est avérée plus efficace que la prednisolone dans l'amélioration de la fonction pulmonaire des chevaux atteints du souffle. L'équilibre entre les effets géniques et non géniques des glucocorticoïdes (Buttgereit, Brand, & Burmester, 1999), l'influence du type cellulaire (Lim-Tio, Keightley, & Fuller, 1997), une affinité variable pour le GR peuvent enfin contribuer aux différences observées dans les ratios d'efficacité. Buttgereit et al. (1999) se sont concentrés sur les effets non géniques des glucocorticoïdes à des doses élevées (1 à 5 10^{-3} M). L'effet immédiat des glucocorticoïdes a été évalué sur la respiration et sur les flux de calcium et de sodium (via les pompes $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase et Ca^{2+} -ATPase) à travers la membrane plasmique chez les thymocytes de rats stimulés avec la concanavalin A. Ils ont démontré que la dexaméthasone était 3 fois plus efficace que la prednisolone et 6 fois plus efficace que la bétaméthasone ce qui diffère des ratios généralement obtenus par les études s'intéressant aux effets géniques des glucocorticoïdes.

Les glucocorticoïdes exercent des effets concentration-dépendants sur les neutrophiles équins

Les concentrations étudiées dans notre projet ont été choisies car il est possible de les atteindre de manière systémique aux doses habituellement prescrites chez le cheval pour la dexaméthasone (Grady, et al., 2010) mais aussi chez l'homme pour les autres glucocorticoïdes (Czock, Keller, Rasche, & Haussler, 2005; Xu, et al., 2007). D'après une étude effectuée sur des mastocytes de rats (Walajtys-Rode, et al., 1988) le seuil de saturation du GR se situe entre 10^{-8} et 10^{-6} M. Cependant, un effet maximal n'a pas été atteint pour tous les gènes à 10^{-8} M dans notre étude. L'hydrocortisone et la prednisolone avaient un effet transactivateur moindre sur l'expression de l'ARNm de la glutamine synthétase à 10^{-8} M alors qu'une inhibition maximale de l'expression des gènes IL-1 β et IL-8 était déjà présente à cette concentration. Ces résultats mettent en évidence la régulation fine de la voie génique des glucocorticoïdes chez les neutrophiles.

La réponse au LPS est spécifique d'espèce et influencée par le type de cellulaire étudié

Nous avons choisi le LPS comme agoniste de stimulation des cellules car l'homme et le cheval y sont très sensibles (Berczi, Bertok, & Bereznai, 1966; Burrows, 1981; Palsson-McDermott & O'Neill, 2004). De manière surprenante, la réponse au LPS observée différait entre les populations cellulaires dans les deux espèces. Les neutrophiles équins étaient plus sensibles au LPS que les autres leucocytes et inversement chez l'homme. Il a été démontré que les monocytes humains expriment les récepteurs de surface TLR-2, TLR-4 et CD14 impliqués dans les voies de signalisation du LPS à un niveau plus élevé que les neutrophiles (Sabroe, Jones, Usher, Whyte, & Dower, 2002). De plus, les neutrophiles humains expriment 10 à 20 fois moins d'ARNm de cytokines que les monocytes (Cassatella, 1995). Sabroe et al. (2002) ont également démontré que les éosinophiles humains n'exprimaient pas les récepteurs impliqués dans la réponse au LPS et que ce dernier aurait un rôle peu important dans la régulation de la fonction des éosinophiles (Sabroe, et al., 2002). Dans notre étude, les pourcentages de monocytes chez les

chevaux et chez les volontaires sains étaient de 15.0 ± 6.7 et 27.5 ± 8.7 (moyenne \pm SD). Le pourcentage d'éosinophiles équins était de $5.7 \pm 2.6\%$ alors qu'il était proche de 0 chez l'homme. Il est question ici des populations leucocytaires isolées autres que les neutrophiles. La présence d'un type cellulaire peu sensible au LPS comme les éosinophiles ainsi que les variations observées dans le pourcentage de monocytes ont pu contribuer aux différences de réponse au LPS observées dans les 2 espèces.

La pureté en neutrophiles et les techniques d'isolation cellulaire peuvent-elles influencer les résultats obtenus?

La faible production cytokinique relative des neutrophiles soulève la nécessité de travailler avec des populations de neutrophiles hautement purifiées pour les études d'expression génique par qPCR (Pelletier et al., 2010). Une pureté de 99.5% en neutrophiles est le seuil requis afin d'éviter les faux-positifs associés à de la contamination par d'autres populations cellulaires (Cassatella, 1999). Dans l'étude de Pelletier, les neutrophiles humains étaient isolés par centrifugation sur gradient de densité puis par immunosélection magnétique négative à l'aide d'un kit Easy Sep (StemCell Technologies). La pureté cellulaire obtenue était supérieure à 99.7%.

Dans notre étude, nous avons également décidé de combiner les techniques de centrifugation sur gradient densité et immunosélection magnétique, positive dans notre cas, lors de l'isolation des neutrophiles équins et humains destinés aux analyses par qPCR. La pureté en neutrophiles obtenue a toujours été supérieure à 99.5%. Pour les tests de survie, il était initialement prévu d'isoler les neutrophiles à l'aide de la même technique. Cependant, après 20h de culture, très peu de cellules étaient encore viables. Lorsque les neutrophiles équins étaient isolés par simple centrifugation sur gradient de densité, la viabilité après 20h de culture était encore excellente ($\geq 98.5\%$). Il est donc probable que l'isolation par immunosélection magnétique diminue la viabilité des cellules après une longue période de mise en culture. Il a pourtant été démontré que l'isolation par immunosélection magnétique des neutrophiles humains n'altérerait pas leur degré d'activation, évalué par cytométrie de flux par la mesure de l'expression de l'intégrine CD11b, des changements morphologiques et du métabolisme oxydatif (Zahler et al., 1997). Cependant, l'anticorps primaire utilisé

dans cette étude était dirigé contre l'antigène de surface CD15 des neutrophiles humains et alors que l'anticorps utilisé dans le cadre de notre projet était dirigé contre un antigène de surface différent spécifique des neutrophiles équins. La nature de l'antigène ciblé lors d'immunosélection magnétique pourrait induire des changements fonctionnels chez les neutrophiles et diminuer leur viabilité après plusieurs heures de culture.

Il a donc été décidé d'utiliser une technique d'isolation par centrifugation sur gradient seule (lympholyte-poly®) pour les tests de survie des neutrophiles équins après 20h de culture. Malgré un taux de pureté en neutrophiles plus faible ($\geq 93.5\%$), la contamination par d'autres populations cellulaires est moins problématique en cytométrie de flux puisqu'il est très aisé de distinguer morphologiquement les granulocytes des cellules mononucléaires. Neutrophiles et éosinophiles sont cependant indifférenciables par cette technique. Il a été démontré que les glucocorticoïdes exerçaient des effets opposés sur la survie des neutrophiles et des éosinophiles (Meagher, et al., 1996). Une contamination éosinophilique importante aurait donc pu biaiser nos résultats. Cependant cette dernière était faible dans notre étude et il est peu probable qu'elle ait affecté nos résultats ($< 0.5\%$).

Il est toutefois possible de reconnaître éosinophiles et neutrophiles humains en marquant ces derniers à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'antigène de surface CD16 (Gopinath & Nutman, 1997). Cependant, l'expression du CD16 diminue considérablement chez les neutrophiles apoptotiques (Dransfield et al., 1994). Il a été également suggéré que cet antigène était impliqué dans l'activation du PI3K chez les cellules NK, kinase ayant aussi un rôle dans le mécanisme d'apoptose (Cerboni et al., 1998). L'utilisation de ce marqueur pour notre projet ne semblait donc pas appropriée.

Une diminution de l'expression du GR- α induite par les agonistes étudiés pourrait mener à une corticorésistance

Le LPS n'a pas eu d'effet sur l'expression de GR- α chez les neutrophiles équins et les autres leucocytes sanguins alors que le LPS combiné à la dexaméthasone diminuait l'expression du GR- α . Les glucocorticoïdes diminuent la transcription du

GR dans différents types cellulaires (Schaaf & Cidlowski, 2002). De plus, il a été rapporté que le LPS diminuait l'expression du GR dans les tissus pulmonaires dans un modèle d'ALI chez le rat. Cette inhibition était significativement réduite par l'administration de dexaméthasone conjointement au LPS (Wang et al., 2008). Nos résultats ne sont pas en accord avec cette étude. Les effets des glucocorticoïdes sur l'expression du GR par les neutrophiles ou encore les effets du LPS combiné aux glucocorticoïdes sur ces cellules restent très peu documentés et il nous est, pour l'instant difficile d'expliquer les différences obtenues entre notre étude et celle de Wang et al.

Les glucocorticoïdes augmentent la survie des neutrophiles mais n'entraînent pas d'activation cellulaire prolongée

Les neutrophiles humains et équins participent au phénomène d'immunomodulation de la phase aigüe de l'inflammation par la relâche de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires puissantes, comme IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-6 et MIP-2 (Cassatella, 1995, 1999; Joubert, et al., 2001). Une activation prolongée des neutrophiles, causée par une apoptose retardée, pourrait contribuer à l'inflammation soutenue et résulterait en des dommages massifs aux tissus environnants. Plusieurs études ont démontré que les glucocorticoïdes augmentent la survie des neutrophiles humains par retard dans l'apoptose (Cox, 1995; Meagher, et al., 1996) par divers mécanismes (Saffar, et al., 2011).

Les résultats de notre étude indiquent que, de façon similaire à l'homme, les glucocorticoïdes augmentent la survie des neutrophiles équins. En accord avec nos observations, Cox (1995) rapporté que la survie induite par les glucocorticoïdes n'était pas associée à une activation cellulaire à la différence de ce qui est obtenu après stimulation au LPS par exemple (Colotta, et al., 1992; Cox, 1995). Des études ultérieures évaluant les effets géniques et non géniques des glucocorticoïdes combinés au LPS sur des neutrophiles fraîchement isolés et après 20h de culture permettraient de confirmer nos résultats et représenteraient de manière plus appropriée, les stimuli présents au site de l'inflammation chez des patients sous corticothérapie.

Conclusion et perspectives

En conclusion, les résultats de notre étude indiquent que les glucocorticoïdes exercent des effets d'intensité similaire chez les neutrophiles et les autres leucocytes sanguins chez l'homme et chez le cheval. Nous spéculons donc que la faible réponse à la corticothérapie observée chez les patients atteints d'asthme sévère ou de MPOC n'est pas expliquée par une réponse atténuée inhérente des neutrophiles à ces drogues. D'ailleurs, certaines conditions neutrophiliques répondent très bien aux glucocorticoïdes comme le syndrome de Sweet, une dermatose neutrophilique caractérisée par une infiltration diffuse de neutrophiles matures dans les couches supérieures du derme (Cohen, 2007). Il n'est cependant pas exclu que les neutrophiles, ainsi que d'autres populations cellulaires, deviennent résistants aux glucocorticoïdes en présence de stimuli spécifiques à certaines conditions.

L'augmentation de la survie des neutrophiles causés par les glucocorticoïdes, observée dans notre étude, est probablement en cause dans la persistance de la neutrophilie pulmonaire chez les chevaux atteints du souffle sous corticothérapie. Selon les études *in vitro* rapportées ici, ces cellules bien que viables et fonctionnelles seraient inactivées. Ainsi, la persistance d'un pourcentage de neutrophiles élevé dans les LBA de chevaux atteints du souffle sous corticothérapie mais non exposés au foin, ne reflèterait pas de manière appropriée l'inflammation pulmonaire. Cependant, de futures études sont à entreprendre concernant la réponse des neutrophiles aux glucocorticoïdes chez les chevaux atteints du souffle. En effet, la réponse innée des leucocytes sanguins semble altérée chez ces animaux (Lavoie-Lamoureux, Beauchamp, Quessy, Martin, & Lavoie, 2012).

L'isoforme GR- β , très fortement exprimée chez les neutrophiles reste également une piste à investiguer (Strickland, et al., 2001). Des expériences préliminaires ont été réalisées dans le cadre de notre projet concernant l'étude de l'expression du GR- β par les neutrophiles équins et humains par qPCR, western blot et cytométrie de flux. Toutes nos tentatives se sont révélées infructueuses pour le moment. Il est possible qu'il n'existe pas d'isoforme β chez le cheval, que sa structure et sa fonction diffère de l'isoforme humaine ou encore que le site d'épissage

des isoformes α et β ne se situe pas au niveau de l'exon 9, comme rapporté chez la souris (Hinds et al., 2010). Cependant, un manque d'optimisation de nos techniques est également possible.

Une étude a récemment suggéré qu'un environnement dans lequel l'IL-17 était présente de manière augmentée pouvait influencer les voies de signalisation du GR- β et moduler la réponse aux glucocorticoïdes chez les patients asthmatiques (Vazquez-Tello et al., 2010). Il a été démontré que l'IL-17 était impliquée dans l'asthme non-éosinophilique et dans le recrutement des neutrophiles associé à cette maladie. L'expression d'IL-17 est augmentée dans les voies respiratoires des asthmatiques sévères.(Al-Ramli et al., 2009). Elle aurait également un rôle dans l'apparition de la résistance aux glucocorticoïdes (McKinley et al., 2008). Chez les chevaux atteints du souffle, une augmentation significative de l'expression d'IL-17 dans le LBA des chevaux en crise par rapport aux animaux contrôles a été mise en évidence (Debrue, Hamilton, Joubert, Lajoie-Kadoch, & Lavoie, 2005).

Les effets de l'IL-17 sur les neutrophiles sont encore loin d'être élucidés. Même si des effets indirects chimiotactiques via l'IL-8 (Kolls & Linden, 2004; Laan et al., 1999) et sur l'apoptose des neutrophiles via l'inhibition du GM-CSF ont été démontrés (Dragon, Saffar, Shan, & Gounni, 2008) chez l'homme, des effets directs n'ont jamais été rapportés, probablement dus à l'absence d'expression de la sous-unité RC par les neutrophiles humains (Pelletier, et al., 2010). Les informations concernant l'IL-17 dans l'espèce équine sont rares. Les études parues ne semblent pour l'instant pas indiquer un lien direct entre la neutrophilie pulmonaire et l'IL-17 chez les chevaux atteints de souffle et les mécanismes restent pour l'instant très mal compris (Ainsworth, Wagner, Erb, Young, & Retallick, 2007; Ainsworth et al., 2006). Les données préliminaires effectuées par notre groupe ont démontré l'expression constitutive des 2 sous-unités RA et RC du récepteur de l'IL-17 chez les neutrophiles sanguins équins par qPCR, ce qui pourrait suggérer, à la différence de ce qui est observé chez l'homme, un effet direct possible de l'IL-17 sur les neutrophiles chez le cheval.

Sources documentaires

- Ainsworth, D. M., Wagner, B., Erb, H. N., Young, J. C., & Retallick, D. E. (2007). 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*, 68(12), 1361-1369.
- Ainsworth, D. M., Wagner, B., Franchini, M., Grunig, G., Erb, H. N., & Tan, J. Y. (2006). Time-dependent alterations in gene expression of interleukin-8 in the bronchial epithelium of horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res*, 67(4), 669-677.
- al-Mokdad, M., Shibata, F., Takano, K., & Nakagawa, H. (1998). Differential production of chemokines by phagocytosing rat neutrophils and macrophages. *Inflammation*, 22(2), 145-159.
- Al-Ramli, W., Prefontaine, D., Chouiali, F., Martin, J. G., Olivenstein, R., Lemiere, C., et al. (2009). T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 123(5), 1185-1187.
- Barnes, P. J. (2004). Corticosteroid resistance in airway disease. *Proc Am Thorac Soc*, 1(3), 264-268.
- Barnes, P. J. (2005). Molecular mechanisms and cellular effects of glucocorticosteroids. *Immunol Allergy Clin North Am*, 25(3), 451-468.
- Barnes, P. J. (2006). Corticosteroids: the drugs to beat. *Eur J Pharmacol*, 533(1-3), 2-14.
- Barnes, P. J. (2007). New molecular targets for the treatment of neutrophilic diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 119(5), 1055-1062; quiz 1063-1054.
- Barnes, P. J. (2010). Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 120(2-3), 76-85.
- Barnes, P. J. (2011). Glucocorticosteroids: current and future directions. *Br J Pharmacol*, 163(1), 29-43.
- Barnes, P. J., & Adcock, I. M. (2009). Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet*, 373(9678), 1905-1917.
- Barnes, P. J., Ito, K., & Adcock, I. M. (2004). Corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease: inactivation of histone deacetylase. *Lancet*, 363(9410), 731-733.

- Belvisi, M. G. (2004). Regulation of inflammatory cell function by corticosteroids. *Proc Am Thorac Soc*, 1(3), 207-214.
- Berczi, I., Bertok, L., & Bereznai, T. (1966). Comparative studies on the toxicity of Escherichia coli lipopolysaccharide endotoxin in various animal species. *Can J Microbiol*, 12(5), 1070-1071.
- Berger, T. S., Parandoosh, Z., Perry, B. W., & Stein, R. B. (1992). Interaction of glucocorticoid analogues with the human glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 41(3-8), 733-738.
- Burrows, G. E. (1981). Dose-response of ponies to parenteral Escherichia coli endotoxin. *Can J Comp Med*, 45(2), 207-210.
- Burton, J. L., Kehrli, M. E., Jr., Kapil, S., & Horst, R. L. (1995). Regulation of L-selectin and CD18 on bovine neutrophils by glucocorticoids: effects of cortisol and dexamethasone. *J Leukoc Biol*, 57(2), 317-325.
- Buttgereit, F., Brand, M. D., & Burmester, G. R. (1999). Equivalent doses and relative drug potencies for non-genomic glucocorticoid effects: a novel glucocorticoid hierarchy. *Biochem Pharmacol*, 58(2), 363-368.
- Cassatella, M. A., Bazzoni, F., Ceska, M., Ferro, I., Baggiolini, M., & Berton, G. (1992). 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*, 148(10), 3216-3220.
- Cassatella, M. A. (1995). The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today*, 16(1), 21-26.
- Cassatella, M. A. (1999). Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol*, 73, 369-509.
- Cerboni, C., Gismondi, A., Palmieri, G., Piccoli, M., Frati, L., & Santoni, A. (1998). CD16-mediated activation of phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) in human NK cells involves tyrosine phosphorylation of Cbl and its association with Grb2, Shc, pp36 and p85 PI-3K subunit. *Eur J Immunol*, 28(3), 1005-1015.
- Chandrasekhar, S., Souba, W. W., & Abcouwer, S. F. (1999). Identification of glucocorticoid-responsive elements that control transcription of rat glutamine synthetase. *Am J Physiol*, 276(2 Pt 1), L319-331.
- Cohen. (2007). Sweet's syndrome – a comprehensive review of an acute febrileneutrophilic dermatosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 34(2).

- Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S., & Mantovani, A. (1992). Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*, *80*(8), 2012-2020.
- Courouce-Malblanc, A., Fortier, G., Pronost, S., Siliart, B., & Brachet, G. (2008). Comparison of prednisolone and dexamethasone effects in the presence of environmental control in heaves-affected horses. *Vet J*, *175*(2), 227-233.
- Cox, G. (1995). Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol*, *154*(9), 4719-4725.
- Czock, D., Keller, F., Rasche, F. M., & Haussler, U. (2005). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet*, *44*(1), 61-98.
- Dandona, P., Mohanty, P., Hamouda, W., Aljada, A., Kumbkarni, Y., & Garg, R. (1999). Effect of dexamethasone on reactive oxygen species generation by leukocytes and plasma interleukin-10 concentrations: a pharmacodynamic study. *Clin Pharmacol Ther*, *66*(1), 58-65.
- Dandona, P., Suri, M., Hamouda, W., Aljada, A., Kumbkarni, Y., & Thusu, K. (1999). Hydrocortisone-induced inhibition of reactive oxygen species by polymorphonuclear neutrophils. *Crit Care Med*, *27*(11), 2442-2444.
- Dandona, P., Thusu, K., Hafeez, R., Abdel-Rahman, E., & Chaudhuri, A. (1998). Effect of hydrocortisone on oxygen free radical generation by mononuclear cells. *Metabolism*, *47*(7), 788-791.
- Debrue, M., Hamilton, E., Joubert, P., Lajoie-Kadoch, S., & Lavoie, J. P. (2005). Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol*, *105*(1-2), 25-31.
- Dinarello, C. A. (2004). Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J Endotoxin Res*, *10*(4), 201-222.
- Douwes, J., Gibson, P., Pekkanen, J., & Pearce, N. (2002). Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax*, *57*(7), 643-648.
- Dragon, S., Saffar, A. S., Shan, L., & Gounni, A. S. (2008). IL-17 attenuates the anti-apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils. *Mol Immunol*, *45*(1), 160-168.
- Dransfield, I., Buckle, A. M., Savill, J. S., McDowall, A., Haslett, C., & Hogg, N. (1994). Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. *J Immunol*, *153*(3), 1254-1263.

- Driscoll, K. E. (1994). Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation. *Exp Lung Res*, 20(6), 473-490.
- Elbim, C., Katsikis, P. D., & Estaquier, J. (2009). Neutrophil apoptosis during viral infections. *Open Virol J*, 3, 52-59.
- Esbaugh, A. J., & Walsh, P. J. (2009). Identification of two glucocorticoid response elements in the promoter region of the ubiquitous isoform of glutamine synthetase in gulf toadfish, *Opsanus beta*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 297(4), R1075-1081.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., & Henson, P. M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*, 101(4), 890-898.
- Faurschou, M., & Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*, 5(14), 1317-1327.
- Fialkow, L., Fochesatto Filho, L., Bozzetti, M. C., Milani, A. R., Rodrigues Filho, E. M., Ladniuk, R. M., et al. (2006). Neutrophil apoptosis: a marker of disease severity in sepsis and sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *Crit Care*, 10(6), R155.
- Filep, J. G., & El Kebir, D. (2009). Neutrophil apoptosis: a target for enhancing the resolution of inflammation. *J Cell Biochem*, 108(5), 1039-1046.
- Gabrilovich, D. I. (1999). *The neutrophils : new outlook for old cells*. London: Imperial College Press, pp 362.
- Garrel, D., Patenaude, J., Nedelec, B., Samson, L., Dorais, J., Champoux, J., et al. (2003). Decreased mortality and infectious morbidity in adult burn patients given enteral glutamine supplements: a prospective, controlled, randomized clinical trial. *Crit Care Med*, 31(10), 2444-2449.
- Gaunitz, F., Heise, K., Schumann, R., & Gebhardt, R. (2002). Glucocorticoid induced expression of glutamine synthetase in hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 296(4), 1026-1032.
- Gopinath, R., & Nutman, T. B. (1997). Identification of eosinophils in lysed whole blood using side scatter and CD16 negativity. *Cytometry*, 30(6), 313-316.
- Grady, J. A., Davis, E. G., Kukanich, B., & Sherck, A. B. (2010). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dexamethasone after oral administration in apparently healthy horses. *Am J Vet Res*, 71(7), 831-839.

- Grossmann, C., Scholz, T., Rochel, M., Bumke-Vogt, C., Oelkers, W., Pfeiffer, A. F., et al. (2004). Transactivation via the human glucocorticoid and mineralocorticoid receptor by therapeutically used steroids in CV-1 cells: a comparison of their glucocorticoid and mineralocorticoid properties. *Eur J Endocrinol*, *151*(3), 397-406.
- Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2011). *Guyton and Hall textbook of medical physiology* (12th ed.). Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, pp 1091.
- Hamid, Q. A., Wenzel, S. E., Hauk, P. J., Tsicopoulos, A., Wallaert, B., Lafitte, J. J., et al. (1999). Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, *159*(5 Pt 1), 1600-1604.
- Haslett, C., Guthrie, L. A., Kopaniak, M. M., Johnston, R. B., Jr., & Henson, P. M. (1985). Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol*, *119*(1), 101-110.
- Heiman, A. S., & Lee, H. J. (1981). Stabilization of rat liver lysosomes by new anti-inflammatory steroids in vitro. *Steroids*, *38*(4), 365-373.
- Hinds, T. D., Jr., Ramakrishnan, S., Cash, H. A., Stechschulte, L. A., Heinrich, G., Najjar, S. M., et al. (2010). Discovery of glucocorticoid receptor-beta in mice with a role in metabolism. *Mol Endocrinol*, *24*(9), 1715-1727.
- Hinz, B., & Hirschelmann, R. (2000). Dexamethasone megadoses stabilize rat liver lysosomal membranes by non-genomic and genomic effects. *Pharm Res*, *17*(12), 1489-1493.
- Irusen, E., Matthews, J. G., Takahashi, A., Barnes, P. J., Chung, K. F., & Adcock, I. M. (2002). p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol*, *109*(4), 649-657.
- Ito, K., Barnes, P. J., & Adcock, I. M. (2000). Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol*, *20*(18), 6891-6903.
- Ito, K., Chung, K. F., & Adcock, I. M. (2006). Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol*, *117*(3), 522-543.
- Jakiela, B., Bochenek, G., & Sanak, M. (2010). Glucocorticoid receptor isoforms in steroid-dependent asthma. *Pol Arch Med Wewn*, *120*(6), 214-222.
- Jakubowski, W., & Bartosz, G. (2000). 2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? *Cell Biol Int*, *24*(10), 757-760.

- Jilma, B., Voltmann, J., Albinni, S., Stohlawetz, P., Schwarzinger, I., Gleiter, C. H., et al. (1997). Dexamethasone down-regulates the expression of L-selectin on the surface of neutrophils and lymphocytes in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 62(5), 562-568.
- Johnson, P. J., Slight, S. H., Ganjam, V. K., & Kreeger, J. M. (2002). Glucocorticoids and laminitis in the horse. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 18(2), 219-236.
- 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(7), 730-733.
- Kino, T., Manoli, I., Kelkar, S., Wang, Y., Su, Y. A., & Chrousos, G. P. (2009). Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GRalpha-independent transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 381(4), 671-675.
- Kino, T., Su, Y. A., & Chrousos, G. P. (2009). Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell Mol Life Sci*, 66(21), 3435-3448.
- Kobayashi, T., Tsunawaki, S., & Seguchi, H. (2001). Evaluation of the process for superoxide production by NADPH oxidase in human neutrophils: evidence for cytoplasmic origin of superoxide. *Redox Rep*, 6(1), 27-36.
- Kolls, J. K., & Linden, A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*, 21(4), 467-476.
- Korn, S. H., Koerts-de Lang, E., Engel, G. E., Arends, J. W., Wouters, E. F., & Thunnissen, F. B. (1998). Alpha and beta glucocorticoid receptor mRNA expression in skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 19(7), 757-765.
- Laan, M., Cui, Z. H., Hoshino, H., Lotvall, J., Sjostrand, M., Gruenert, D. C., et al. (1999). Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol*, 162(4), 2347-2352.
- Langereis, J. D., Oudijk, E. J., Schweizer, R. C., Lammers, J. W., Koenderman, L., & Ulfman, L. H. (2011). Steroids induce a disequilibrium of secreted interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1beta synthesis by human neutrophils. *Eur Respir J*, 37(2), 406-415.
- Lavoie-Lamoureux, A., Beauchamp, G., Quessy, S., Martin, J. G., & Lavoie, J. P. (2012). Systemic inflammation and priming of peripheral blood leukocytes persist during clinical remission in horses with heaves. *Vet Immunol Immunopathol*, 146(1), 35-45.

- Lavoie-Lamoureux, A., Moran, K., Beauchamp, G., Muel, S., Steinbach, F., Lefebvre-Lavoie, J., et al. (2010). 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*, 299(4), L472-482.
- Lavoie, J. P., Leguillette, R., Pasloske, K., Charette, L., Sawyer, N., Guay, D., et al. (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(4), 579-585.
- Lavoie, J. P., Pasloske, K., Joubert, P., Cordeau, M. E., Mancini, J., Girard, Y., et al. (2006). Lack of clinical efficacy of a phosphodiesterase-4 inhibitor for treatment of heaves in horses. *J Vet Intern Med*, 20(1), 175-181.
- Leclere, M., Lavoie-Lamoureux, A., & Lavoie, J. P. (2011). Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology*, 16(7), 1027-1046.
- Leclere, M., Lefebvre-Lavoie, J., Beauchamp, G., & Lavoie, J. P. (2010). Efficacy of oral prednisolone and dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction in the presence of continuous antigen exposure. *Equine Vet J*, 42(4), 316-321.
- Lecoq, L., Vincent, P., Lavoie-Lamoureux, A., & Lavoie, J. P. (2009). Genomic and non-genomic effects of dexamethasone on equine peripheral blood neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol*, 128(1-3), 126-131.
- Lee, C. K., Lee, E. Y., Cho, Y. S., Moon, K. A., Yoo, B., & Moon, H. B. (2005). Increased expression of glucocorticoid receptor beta messenger RNA in patients with ankylosing spondylitis. *Korean J Intern Med*, 20(2), 146-151.
- Li, K. W., Turner, S. M., Emson, C. L., Hellerstein, M. K., & Dale, D. C. (2011). Deuterium and neutrophil kinetics. *Blood*, 117(22), 6052-6053; author reply 6053-6054.
- Li, L. B., Leung, D. Y., Martin, R. J., & Goleva, E. (2010). Inhibition of histone deacetylase 2 expression by elevated glucocorticoid receptor beta in steroid-resistant asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 182(7), 877-883.
- Liles, W. C., Dale, D. C., & Klebanoff, S. J. (1995). Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. *Blood*, 86(8), 3181-3188.
- Lim-Tio, S. S., Keightley, M. C., & Fuller, P. J. (1997). Determinants of specificity of transactivation by the mineralocorticoid or glucocorticoid receptor. *Endocrinology*, 138(6), 2537-2543.

- Liu, L., Wang, Y. X., Zhou, J., Long, F., Sun, H. W., Liu, Y., et al. (2005). Rapid non-genomic inhibitory effects of glucocorticoids on human neutrophil degranulation. *Inflamm Res*, 54(1), 37-41.
- Long, F., Wang, Y. X., Liu, L., Zhou, J., Cui, R. Y., & Jiang, C. L. (2005). Rapid nongenomic inhibitory effects of glucocorticoids on phagocytosis and superoxide anion production by macrophages. *Steroids*, 70(1), 55-61.
- Losel, R. M., Falkenstein, E., Feuring, M., Schultz, A., Tillmann, H. C., Rossol-Haseroth, K., et al. (2003). Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev*, 83(3), 965-1016.
- Lu, N. Z., & Cidlowski, J. A. (2006). Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol*, 16(6), 301-307.
- Lukaszewicz, G., Abcouwer, S. F., Labow, B. I., & Souba, W. W. (1997). Glutamine synthetase gene expression in the lungs of endotoxin-treated and adrenalectomized rats. *Am J Physiol*, 273(6 Pt 1), L1182-1190.
- Mair, T. S. (1996). Bacterial pneumonia associated with corticosteroid therapy in three horses. *Vet Rec*, 138(9), 205-207.
- McKinley, L., Alcorn, J. F., Peterson, A., Dupont, R. B., Kapadia, S., Logar, A., et al. (2008). TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol*, 181(6), 4089-4097.
- Meagher, L. C., Cousin, J. M., Seckl, J. R., & Haslett, C. (1996). Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *J Immunol*, 156(11), 4422-4428.
- Miles, K., Clarke, D. J., Lu, W., Sibinska, Z., Beaumont, P. E., Davidson, D. J., et al. (2009). Dying and necrotic neutrophils are anti-inflammatory secondary to the release of alpha-defensins. *J Immunol*, 183(3), 2122-2132.
- Miller, A. L., Webb, M. S., Copik, A. J., Wang, Y., Johnson, B. H., Kumar, R., et al. (2005). p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells: correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human glucocorticoid receptor at serine 211. *Mol Endocrinol*, 19(6), 1569-1583.
- Nerren, J. R., Payne, S., Halbert, N. D., Martens, R. J., & Cohen, N. D. (2009). Cytokine expression by neutrophils of adult horses stimulated with virulent and avirulent *Rhodococcus equi* in vitro. *Vet Immunol Immunopathol*, 127(1-2), 135-143.

- Nicolaides, N. C., Galata, Z., Kino, T., Chrousos, G. P., & Charmandari, E. (2010). The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids*, *75*(1), 1-12.
- Nishida, S., Matsumura, S., Horino, M., Oyama, H., & Tenku, A. (1977). The variations of plasma corticosterone/cortisol ratios following ACTH stimulation or dexamethasone administration in normal men. *J Clin Endocrinol Metab*, *45*(3), 585-588.
- Nupponen, I., Repo, H., Kari, A., Pohjavuori, M., & Andersson, S. (2002). Early dexamethasone decreases expression of activation markers on neutrophils and monocytes in preterm infants. *Acta Paediatr*, *91*(11), 1200-1207.
- Ordonez, C. L., Shaughnessy, T. E., Matthay, M. A., & Fahy, J. V. (2000). 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*(4 Pt 1), 1185-1190.
- Palsson-McDermott, E. M., & O'Neill, L. A. (2004). Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, *113*(2), 153-162.
- Parente, L., & Solito, E. (2004). Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm Res*, *53*(4), 125-132.
- Pavord, I. D. (2007). Non-eosinophilic asthma and the innate immune response. *Thorax*, *62*(3), 193-194.
- Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., Costantini, C., et al. (2010). Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*, *115*(2), 335-343.
- Petroni, K. C., Shen, L., & Guyre, P. M. (1988). Modulation of human polymorphonuclear leukocyte IgG Fc receptors and Fc receptor-mediated functions by IFN-gamma and glucocorticoids. *J Immunol*, *140*(10), 3467-3472.
- 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*(4), 419-424.
- Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L. M., de Boer, R. J., Borghans, J. A., et al. (2010). In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, *116*(4), 625-627.

- Pirie, R. S., Dixon, P. M., Collie, D. D., & McGorum, B. C. (2001). Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses. *Equine Vet J*, 33(3), 311-318.
- Preiser, J. C., & Wernerman, J. (2003). Glutamine, a life-saving nutrient, but why? *Crit Care Med*, 31(10), 2555-2556.
- Pujols, L., Mullol, J., Perez, M., Roca-Ferrer, J., Juan, M., Xaubet, A., et al. (2001). Expression of the human glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms in human respiratory epithelial cells and their regulation by dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 24(1), 49-57.
- Pujols, L., Mullol, J., & Picado, C. (2007). Alpha and beta glucocorticoid receptors: relevance in airway diseases. *Curr Allergy Asthma Rep*, 7(2), 93-99.
- Raubenheimer, P. J., Young, E. A., Andrew, R., & Seckl, J. R. (2006). The role of corticosterone in human hypothalamic-pituitary-adrenal axis feedback. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 65(1), 22-26.
- Riviere, J. E., Papich, M. G.; consulting editor: Adams H. R. (2009). *Veterinary pharmacology and therapeutics* (9th ed.). Ames, Ia: Wiley-Blackwell, pp 1524.
- Roberge, C. J., de Medicis, R., Dayer, J. M., Rola-Pleszczynski, M., Naccache, P. H., & Poubelle, P. E. (1994). Crystal-induced neutrophil activation. V. Differential production of biologically active IL-1 and IL-1 receptor antagonist. *J Immunol*, 152(11), 5485-5494.
- Roth, E. (2008). Nonnutritive effects of glutamine. *J Nutr*, 138(10), 2025S-2031S.
- Sabroe, I., Jones, E. C., Usher, L. R., Whyte, M. K., & Dower, S. K. (2002). Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol*, 168(9), 4701-4710.
- Saffar, A. S., Ashdown, H., & Gounni, A. S. (2011). The molecular mechanisms of glucocorticoids-mediated neutrophil survival. *Curr Drug Targets*, 12(4), 556-562.
- Saffar, A. S., Dragon, S., Ezzati, P., Shan, L., & Gounni, A. S. (2008). Phosphatidylinositol 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase regulate induction of Mcl-1 and survival in glucocorticoid-treated human neutrophils. *J Allergy Clin Immunol*, 121(2), 492-498 e410.
- Schaaf, M. J., & Cidlowski, J. A. (2002). Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 83(1-5), 37-48.

- Schleimer, R. P. (1990). Effects of glucocorticosteroids on inflammatory cells relevant to their therapeutic applications in asthma. *Am Rev Respir Dis*, 141(2 Pt 2), S59-69.
- Schleimer, R. P. (2004). Glucocorticoids suppress inflammation but spare innate immune responses in airway epithelium. *Proc Am Thorac Soc*, 1(3), 222-230.
- Schleimer, R. P., Freeland, H. S., Peters, S. P., Brown, K. E., & Derse, C. P. (1989). An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotriene B4 by purified human neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther*, 250(2), 598-605.
- Simon, S. I., & Kim, M. H. (2010). A day (or 5) in a neutrophil's life. *Blood*, 116(4), 511-512.
- Smith, B. P. (2009). *Large animal internal medicine* (4th ed.). St. Louis, Mo.: Mosby Elsevier, pp 1821.
- Stamper, A. J., Rush, B. R., Wilkerson, M. J., Mitchell, K. E., & Shuman, W. (2002). *Glucocorticoid resistance in a horse with heaves*. Paper presented at the 20th Veterinary Comparative Respiratory Society Symposium, Boston, Massachusetts.
- Stellato, C. (2004). Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids. *Proc Am Thorac Soc*, 1(3), 255-263.
- Strandberg, K., Blidberg, K., Sahlander, K., Palmberg, L., & Larsson, K. (2010). Effect of formoterol and budesonide on chemokine release, chemokine receptor expression and chemotaxis in human neutrophils. *Pulm Pharmacol Ther*, 23(4), 316-323.
- Strickland, I., Kisich, K., Hauk, P. J., Vottero, A., Chrousos, G. P., Klemm, D. J., et al. (2001). 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*, 193(5), 585-593.
- Tizard, I. R. (2009). *Veterinary immunology : an introduction* (8th ed.). St-Louis, Mo: Saunders Elsevier, pp 574.
- Tofts, P. S., Chevassut, T., Cutajar, M., Dowell, N. G., & Peters, A. M. (2011). Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, 117(22), 6050-6052; author reply 6053-6054.
- Underwood, R. H., & Williams, G. H. (1972). The simultaneous measurement of aldosterone, cortisol, and corticosterone in human peripheral plasma by displacement analysis. *J Lab Clin Med*, 79(5), 848-862.

- Vazquez-Tello, A., Semlali, A., Chakir, J., Martin, J. G., Leung, D. Y., Eidelman, D. H., et al. (2010). Induction of glucocorticoid receptor-beta expression in epithelial cells of asthmatic airways by T-helper type 17 cytokines. *Clin Exp Allergy*, 40(9), 1312-1322.
- Walajtys-Rode, E., Dabrowski, A., Grubek-Jaworska, H., Machnicka, B., & Droszcz, W. (1988). Binding of dexamethasone and its effect on histamine release from rat mast cells. *Int J Immunopharmacol*, 10(8), 925-930.
- Wang, X. Q., Zhou, X., Zhou, Y., Rong, L., Gao, L., & Xu, W. (2008). Low-dose dexamethasone alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats and upregulates pulmonary glucocorticoid receptors. *Respirology*, 13(6), 772-780.
- Weber, P. S., Toelboell, T., Chang, L. C., Tirrell, J. D., Saama, P. M., Smith, G. W., et al. (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(5), 815-827.
- Wenzel, S. E., Schwartz, L. B., Langmack, E. L., Halliday, J. L., Trudeau, J. B., Gibbs, R. L., et al. (1999). Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med*, 160(3), 1001-1008.
- Wenzel, S. E., Szeffler, S. J., Leung, D. Y., Sloan, S. I., Rex, M. D., & Martin, R. J. (1997). Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med*, 156(3 Pt 1), 737-743.
- Wertheim, W. A., Kunkel, S. L., Standiford, T. J., Burdick, M. D., Becker, F. S., Wilke, C. A., et al. (1993). Regulation of neutrophil-derived IL-8: the role of prostaglandin E2, dexamethasone, and IL-4. *J Immunol*, 151(4), 2166-2175.
- Wischmeyer, P. E. (2007). Glutamine: mode of action in critical illness. *Crit Care Med*, 35(9 Suppl), S541-544.
- Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., & Halbwachs-Mecarelli, L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest*, 80(5), 617-653.
- Wolfson, M., McPhail, L. C., Nasrallah, V. N., & Snyderman, R. (1985). Phorbol myristate acetate mediates redistribution of protein kinase C in human neutrophils: potential role in the activation of the respiratory burst enzyme. *J Immunol*, 135(3), 2057-2062.

- Xu, J., Winkler, J., & Derendorf, H. (2007). A pharmacokinetic/pharmacodynamic approach to predict total prednisolone concentrations in human plasma. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*, 34(3), 355-372.
- Yang, I. A., Fong, K. M., Sim, E. H., Black, P. N., & Lasserson, T. J. (2007). Inhaled corticosteroids for stable chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev*(2), CD002991.
- Yu, P. W., Schuler, L. A., Kehrl, M., Mattocks, L., Nonnecke, B. J., & Czuprynski, C. J. (1997). Effects of dexamethasone treatment on IL-1 receptor mRNA levels in vivo. *J Leukoc Biol*, 62(3), 401-404.
- Zahler, S., Kowalski, C., Brosig, A., Kupatt, C., Becker, B. F., & Gerlach, E. (1997). The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J Immunol Methods*, 200(1-2), 173-179.

Annexe 1: Isolation des granulocytes humains au FICOLL-PREMIUM 1.084

Adapté de Haslett, C., Guthrie, L. A., Kopaniak, M. M., Johnston, R. B., Jr. & Henson, P. M. (1985). Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol*, 119(1), 101-110.

Matériel:

- Tubes de collection de sang (Vacutainer heparin CDMV #101248, EDTA #101213)
- Système d'aspiration
- Ficoll-Paque PREMIUM 1.084 (GE Healthcare # 17-5446-02) *Storage*: stable 3 ans entre +4°C et +30°C si non ouvert **ET à l'abri de la lumière**. Une fois ouvert, conserver entre +4°C et +8°C.
- Tubes coniques stériles 10 mL polypropylène
- Aiguilles et seringues stériles
- Solution de lyse des érythrocytes : Ammonium chloride (NH₄Cl) 0.83% in H₂O pH=7.4
- Centrifugeuse GH 3-7 Rotor
- DPBS GIBCO # 14190-144 Mg et Ca free
- PBS (0.5 % BSA, EDTA 2mM, pH 7.2) Calcium and Magnesium free DEGAZE au préalable!
- NaCl 0.9% sterile
- Dextran leuconostoc spp Sigma Aldrich # 31392 (Mr 500 000). Préparer une solution à 6% (3g de Dextran dilués dans 50mL de NaCl sterile à 0.9%)
- Cytopsin, supports et chambre-entonnoirs
- lames colorfrost (Ultident, # 170-8105-W)
- coloration DiffQuick (Protocol Hema 3; Fisher)
- Travailler en conditions aseptiques

Protocole

1. Utiliser des tubes de collection contenant un anticoagulant tel l'héparine ou l'EDTA pour recueillir le sang.
2. Centrifuger les tubes de sang pendant 20 min à 300g et température pièce.
3. Récupérer à l'aide d'une pipette le plasma riche en plaquettes (PRP), le placer dans un tube stérile conique de 10 mL et le centrifuger 15 min à 2500g.
4. A la fin de la centrifugation, récupérer le plasma pauvre en plaquettes (PPP), le diluer 1 :4 dans du DPBS et le conserver à +4°C.

5. La portion contenant les érythrocytes et les leucocytes toujours présente dans les tubes héparinés est collectée dans un tube conique stérile de 50mL et diluée avec du dextran 6% 1 :1.
 6. Mélanger par inversion 10 fois et laisser sédimenter 30 min à TP. Le dextran va faire sédimenter les érythrocytes tout en gardant les leucocytes en suspension.
 7. Aspirer la portion riche en leucocytes et pauvre en érythrocytes à l'aide d'une pipette et la centrifuger pendant 6 min à 275g.
 8. Aspirer le surnageant et resuspendre le culot de leucocytes dans 8 mL de la préparation PPP.
 9. Dans un tube conique stérile de 15mL en polypropylène, verser 3 mL de FICOLL (prélevés à l'aide d'une aiguille 18G et d'une seringue) et les recouvrir délicatement des 8 mL de suspension cellulaire.
 10. Centrifuger 25min à 750g et à TP.
 11. Resuspendre le culot obtenu (contient les granulocytes et les érythrocytes) dans la solution de lyse érythrocytaire pour un maximum de 5 minutes à TP en agitant doucement.
 12. Centrifuger 10 min à 1000 rpm à TP.
- Travailler sur glace à partir de l'étape 13.**
13. Resuspendre dans la solution de PBS (0.5 % BSA, EDTA 2mM, pH 7.2).
 14. Effectuer 2 lavages consécutifs au PBS (0.5 % BSA, EDTA 2mM, pH 7.2).
 15. Bien mélanger les cellules recueillies et prendre un aliquot pour le comptage/viabilité

Par exemple, prélever 20 µl de cellules diluées dans 60 µl de PBS + 20 µl de Trypan bleu (dilution 1 :5). Introduire env. 10 µl dans chacune des 2 chambres de l'hémacytomètre et compter au moins 100 cellules par chambre.

$$\text{_____} \div 2 \times 10\,000 \times 5 \times 3 \text{ ml} = \text{_____}$$

Nb cell. comptées ÷ nb chambres de 1mm³ X facteur conversion mm³ → ml X facteur de dilution X volume total = nb cell. Totales

On peut également effectuer un comptage cellulaire à l'aide du compteur ADAM-MC.

16. Différentiel cellulaire, par exemple, diluer 20 μL de suspension cellulaire dans 120 μL de PBS. Faire un cytopspin avec 70 μL de cette dilution (5min à 1000 rpm). Faire un différentiel sur 400 cellules.
17. Resuspendre les cellules dans le milieu choisi pour obtenir la concentration cellulaire désirée ou continuer avec le protocole MACS si une double isolation des neutrophiles est désirée.

Annexe 2: Isolation des neutrophiles humains par immunosélection magnétique (MACS)

Matériel

- Système d'aspiration
- PBS (0.5 % BSA, EDTA 2mM, pH 7.2) Calcium and Magnesium free DEGAZE au préalable!
- Glace
- CD16 Microbeads human. Microbeads conjuguées à anticorps murin monoclonal anti CD16 humain (Isotype: mouse IgM) (MACS, Myltenyi biotec; #130-045-701). Protéger de la lumière et conserver entre 4 et 8°C.
- Colonnes LS (MACS, Myltenyi biotec; #130-042-401 ou #130-041-306)
- Unité de séparation MidiMACS
- Cytopsin, supports et chambre-entonnoirs
- lames « colorfrost » (Ultident, #170-8105-W)
- coloration DiffQuick (Protocol Hema 3; Fisher)
- Tubes coniques de 15 mL et eppendorfs stériles
- Travailler en conditions aseptiques

Protocole

1. Effectuer un comptage/viabilité des neutrophiles en suspension dans du PBS.
2. Centrifuger à 4°C à 300g pour 10 min.
3. Aspirer le surnageant.
4. Resuspendre dans 100µL de PBS pour 50×10^6 cellules totales.
5. Ajouter 100µL de CD16 Microbeads pour 50×10^6 cellules totales.
6. Bien mélanger et incuber 30 min à 4°C.
7. Laver les cellules dans 1-2 mL de PBS pour 10×10^6 cellules totales et centrifuger à 300g pour 10 min à 4°C.
8. Aspirer le surnageant.
9. Resuspendre dans du PBS à la concentration maximale de 100×10^6 cellules pour 500µL de buffer.
10. Installer une colonne LS sur le support MidiMacs.
11. Hydrater la colonne avec 3 mL de PBS.
12. Faire passer la suspension cellulaire, 1 ml à la fois, dans la colonne en récoltant la fraction négative de l'isolation dans un tube conique de 15 ml.
13. Laver la colonne avec 3 mL de PBS, **3 fois**.

14. Retirer la colonne du support et l'installer sur un tube conique à l'écart du champ magnétique.
15. Ajouter 5 ml de PBS à la colonne et expulser les cellules marquées à l'aide du piston.
16. Bien mélanger les cellules recueillies et prendre un aliquot pour le comptage/viabilité.
17. Centrifuger les cellules à 2000 rpm 5 min et resuspendre dans le milieu de culture à la concentration désirée (ex. 5×10^6 cell/ml).