

Université de Montréal

Hétérogénéité des neutrophiles dans l'asthme équin

par

Nicolas HERTEMAN

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

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

Août 2016

© Nicolas HERTEMAN, 2016

Résumé

Les granulocytes de faible densité (LDGs) sont un sous-type de neutrophiles mis en évidence initialement dans le sang de patients atteints de différentes maladies telles que le lupus érythémateux systémique ou le psoriasis. Cependant, des études rapportent également leur présence chez des individus sains. On connaît mal à ce jour les caractéristiques des LDGs, notamment en ce qui a trait à leur profil inflammatoire. De plus, leur biogenèse demeure toujours mal connue.

Mes travaux de maîtrise visaient à comparer les propriétés des LDGs à celles des neutrophiles de densité normale (NDNs). Pour ce faire, 8 chevaux atteints d'asthme équin sévère et 11 chevaux sains bien caractérisés ont été sélectionnés pour l'étude et sur lesquels des isolations de NDNs ainsi que des LDGs ont été réalisées. La morphologie des neutrophiles a ensuite été évaluée par microscopie optique. Le contenu en myéloperoxidase, un composant des granules primaires azurophiles des neutrophiles, et la présence de récepteurs du N-formylméthionine-leucyl-phénylalanine (fMLP-R) ont été évalués par cytométrie de flux et immunofluorescence, respectivement. Enfin, la capacité fonctionnelle de ces cellules à produire spontanément des pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs) a été étudiée *in vitro* par microscopie confocale.

Les résultats démontrent que le nombre de LDGs est augmenté dans le sang des chevaux asthmatiques lors d'exacerbation de la maladie. De plus, ces cellules présentent une morphologie différente puisqu'elles sont de taille plus petite et contiennent plus de fMLP-R que les NDNs. Le contenu en myéloperoxidase est cependant similaire dans les deux populations de neutrophiles. Enfin, les LDGs produisent plus de NETs, et sont plus sensibles aux stimuli activateurs que les NDNs.

Ces caractéristiques sont similaires dans les 2 groupes de chevaux suggérant ainsi que ce sont des propriétés intrinsèques des LDGs et qu'ils représentent une population cellulaire préactivée et qui de plus, est majoritairement mature. Cette étude caractérise et compare pour la première fois les LDGs chez des animaux sains et ceux retrouvés chez des animaux atteints d'une maladie inflammatoire chronique.

Mots-clés : Neutrophiles, Granulocytes de faible densité (LDGs), Pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs), Asthme, Chevaux.

Abstract

Low-density granulocytes (LDGs) are a subset of neutrophils first described in the bloodstream upon pathological conditions. However, several studies also reported the presence of these cells in the blood of healthy patients. Whether LDGs characteristics, especially their enhanced pro-inflammatory profile, are specific to this subset of neutrophils and not related to disease states is unknown.

Thus, we sought to compare the properties of LDGs to those of autologous normal-density neutrophils (NDNs), in both health and disease. We studied 8 horses with severe equine asthma and 11 healthy animals. Neutrophil morphology was studied using optical microscopy, and content in myeloperoxidase and N-formylmethionine-leucyl-phenylalanine receptors (fMLP-R) evaluated using flow cytometry and immunofluorescence, respectively. Confocal microscopy was used to determine their functional capacity to spontaneously release neutrophil extracellular traps (NETs) stimulating with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA).

LDGs were smaller and contained more fMLP-R than NDNs, but myeloperoxidase content was similar in both populations of neutrophils. They also had an increased capacity to produce NETs, and were more sensitive to activation stimuli.

These characteristics were similar in both healthy and diseased horses, suggesting that these are intrinsic properties of LDGs. Furthermore, these results suggest that LDGs represent a population of primed and predominantly mature cells. Our study is the first to characterize LDGs in health, and to compare their characteristics with those of animals with a naturally occurring disease.

Keywords: Neutrophils, Low-density granulocytes (LDGs), Neutrophil extracellular traps (NETs), Asthma, Horses.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract	iii
Table des matières	iv
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations	x
Remerciements	xiii
Introduction – Avant-Propos	14
PARTIE A : REVUE DE LITTERATURE.....	16
Chapitre I - La Réponse Inflammatoire	16
1. Qu'est-ce que l'inflammation ?	16
2. L'inflammation : un processus séquentiel	16
2.1. Initiation de l'inflammation	17
2.2. Les médiateurs de l'inflammation	18
2.3. La phase vasculaire de l'inflammation.....	18
2.4. Amplification	19
2.5. Résolution.....	20
3. Réactions aiguë et chronique : des notions importantes.....	20
Chapitre II : Les Neutrophiles.....	21
1. Présentation des polymorphonucléaires.....	21
1.1. Les différents types de polymorphonucléaires.....	21
1.2. Les polymorphonucléaires neutrophiles.....	22
2. Cycle cellulaire des neutrophiles.....	23
2.1. Formation du neutrophile	23
2.2. Entrée et sortie de la moelle osseuse.....	24

2.3. Élimination des neutrophiles.....	25
2.4. Durée de vie d'un neutrophile : un concept qui change.....	26
3. Rôle des neutrophiles dans la réponse immunitaire innée	27
3.1. La phagocytose.....	27
3.2. Les granules des neutrophiles	27
3.3. L'explosion oxydative.....	29
3.4. La NETose.....	29
Chapitre III : Neutrophiles dans l'inflammation.....	31
1. Recensement des neutrophiles	31
1.1. Les étapes du recensement neutrophilique.....	31
1.2. Les obstacles des neutrophiles.....	34
2. Lien avec les pathologies inflammatoires pulmonaires	34
Chapitre IV : Hétérogénéité et Plasticité des Neutrophiles	36
1. Le neutrophile et son environnement.....	36
2. Les neutrophiles vieillissants	36
3. Les modifications des neutrophiles lors des passages endothéliaux.....	38
Chapitre V : Les Granulocytes de Faible Densité	39
1. Les LDGs dans le temps.....	39
2. Isolation et caractérisation des LDGs.....	40
2.1. Gradient de densité par Ficoll	40
2.2. Étude des LDGs après isolation.....	40
3. Des rôles qui diffèrent des neutrophiles « normaux »	41
3.1. Propriétés pro-inflammatoires	42
3.2. Propriétés immunosuppressives	43
4. Origine et stade de différenciation des LDGs.....	43
5. Les LDGs dans les pathologies.....	44
5.1. Les LDGs et le lupus	44
5.2. Les LDGs dans les autres pathologies.....	45
5.3. Les LDGs et l'asthme humain	45

Chapitre VI : Hypothèses et Objectifs.....	47
1. L’asthme équin sévère	47
2. Hypothèses et objectifs.....	47
PARTIE B : ARTICLE	48
CHARACTERIZATION OF CIRCULATING LOW-DENSITY NEUTROPHILS INTRINSIC PROPERTIES IN HEALTHY AND ASTHMATIC HORSES.	50
Nicolas Herteman, Amandine Vargas, Jean-Pierre Lavoie.....	50
Running head : Low-Density Neutrophils in health and disease.....	50
Abbreviations.....	50
Corresponding author	51
Introduction.....	53
Material and methods.....	55
Results	61
Discussion	63
<i>LDNs have intrinsic properties</i>	64
<i>LDNs are a mixed population of immature and mature cells</i>	65
<i>NET production</i>	66
<i>Horses and severe equine asthma as a model for LDN study</i>	67
Grants.....	70
Acknowledgements.....	70
PARTIE C : DISCUSSION GENERALE	83
1. Le défi de l’isolation LDGs dans le sang.....	85
1.1. Principe du tri cellulaire magnétique	85
1.2. Résultats du tri cellulaire magnétique	86

2. Défi de quantification des NETs	87
3. Durée de vie des LDGs.....	88
4. LDGs et neutrophilie pulmonaire	90
5. LDGs et neutrophilie sanguine	90
6. Comparaison comptage visuel et tri par cytométrie de flux	90
PARTIE D : CONCLUSION & PERSPECTIVES	92
BIBLIOGRAPHIE	95

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des granulocytes de faible densité (LDGs) dans différentes maladies.	44
Tableau 2 : Résultats des différentes tentatives d'isolation des LDGs par MACS.	86

Liste des figures

Figure 1 : Schéma bilan des principaux médiateurs inflammatoires et leurs rôles.....	18
Figure 2 : Diagramme de la maturation neutrophilique et liste des modifications morphologiques observées au cours de ce processus.....	24
Figure 3 : Composition des pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs).....	30
Figure 4 : Les étapes du recensement des neutrophiles au niveau des sites inflammatoires. .	32
Figure 5: Changements au sein du neutrophile au cours de son parcours.	37
Figure 6: Différents sous-types de neutrophiles après séparation par gradient de densité.	41
Figure 7 : Taux d'apoptose dans chaque couche de cellules.	89
Figure 8 : Corrélation entre les pourcentages de LDGs comptés à la cytométrie de flux et à la microscopie optique chez les chevaux contrôles (A) et asthmatiques (B).....	91

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BPI	<i>Bactericidal permability increasing protein</i>
CD	Cluster de différenciation
CLRs	<i>C-type lectin receptors</i>
CR	Récepteurs du complément
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
FcγR	Récepteurs du fragment constant des immunoglobulines de type IgG
fMLP	N-formylmethionine-leucyl-phenylalanine
FRO	Formes réactives de l'oxygène
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
G-MDSCs	<i>Granulocytic myeloid-derived suppressor cells</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte monocyte-colony stimulating factor</i>
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HOCl	Acide hypochloreux
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IOS	Oscillométrie d'impulsion
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LDGs	Granulocytes de faible densité (<i>low-density granulocytes</i>)
LDNs	Neutrophiles de faible densité (<i>low-density neutrophils</i>)
LES	Lupus érythémateux systémique
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LTB ₄	Leucotriène B ₄
M-CSF	<i>Monocyte-colony stimulating factor</i>
MMPs	Métalloprotéinases matricielles
MPO	Myéloperoxydase
MPOC	Maladie pulmonaire obstructive chronique

NDNs	Neutrophiles de densité normale (<i>normal-density neutrophils</i>)
NETs	Pièges extracellulaires des neutrophiles (<i>neutrophil extracellular traps</i>)
NLRs	<i>NOD-like receptors</i>
NSP4	<i>Neutrophil serin protease 4</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMCs	Cellules mononucléées du sang périphérique
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PMA	Phorbol myristate acétate
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
RLRs	<i>RIG-I-like receptors</i>
rTEM	<i>Reverse Transepithelial migration</i>
SDF-1	<i>Stromal derived factor 1</i>
SDRA	Syndrome de détresse respiratoire aigüe
TEM	<i>Transepithelial migration</i>
TLRs	<i>Toll like receptors</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
VEMS	Volume expiratoire maximal par seconde
VIH	Virus d'immunodéficience humaine (ou HIV en anglais)

*« Vis comme si tu devais mourir demain.
Apprends comme si tu devais vivre toujours. »*
Gandhi

Remerciements

En tout premier, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Jean-Pierre Lavoie, pour m'avoir encadré d'abord durant mon internat, puis lors de ma maîtrise au sein de son laboratoire. Merci pour cette incroyable opportunité qui m'a permis de participer à 2 congrès ACVIM. Mais merci surtout pour votre dévouement, votre gentillesse, vos conseils et votre patience (et il en a fallu surtout pour ma diction), je vous dois beaucoup. Ces deux années ont été riches en nouvelles expériences pour moi et se culminent par un rêve, intégrer un programme de résidence. Je vais tâcher d'utiliser au mieux ce que vous m'avez appris pour mener à bien ce nouveau chapitre de ma vie.

Un gargantuesque merci à mes collègues, mais aussi amis, du laboratoire. Amandine toi d'abord pour ta bonne humeur, ton dévouement aux autres personnes du laboratoire, pour nos repas sushis, pour ta patience quand j'oubliais des choses dans mes manipulations au laboratoire (et il y en a eu :p, mais comme dit Dr Lavoie, c'est comme cela que l'on apprend ^^). Enfin voilà, merci d'avoir été là, notamment au cours de cette dernière année, je te souhaite plein de bonnes choses pour tes projets futurs, mais aussi avec ta famille. Michela, merci pour ta disponibilité et ta patience également, même quand je te harcelais de questions sur Visiopharm ou autres. Merci également pour tes conseils et tes questions qui m'ont aidé à avancer. Mohamed, cher voisin de bureau, merci pour ton sourire, ta sympathie, ton écoute, tes conseils. Merci également à ta remplaçante (de bureau), Marine, cela aura été court, mais intense ces quelques mois à côté de toi (et les photos de tes chiens, et leurs poils ... :p). Merci également à Juan, Maria, Gabrielle, Roxane, Katherine et Yoana pour leur amitié, leur aide, leurs conseils. En résumé, un énorme merci du fond du cœur, vous allez tous me manquer.

Un merci tout spécial et chaleureux à mes parents (pour leur patience dans mon parcours universitaire qui s'éternise) et à mes amis : Marylène, Vanessa, Valentin, Xavier, Xytilis, Benjamin, Hortense, Julie, Élodie, Julia et j'en oublie très certainement qui m'auront soutenu dans mes projets.

Pour finir, j'aimerais remercier les Dre Segura et Dre Leclère d'avoir accepté d'être membres de mon jury de maîtrise. J'espère que la lecture de ce mémoire vous intéressera.

Merci encore énormément à toutes les personnes citées ci-dessus et à toutes celles que j'aurai pu oublier !!!!

Introduction – Avant-Propos

« Une guerre est juste quand elle est nécessaire » (1). L'inflammation, dans son image de « mal nécessaire », illustre bien ces propos tenus par Machiavel. Elle représente une contre-attaque de l'hôte envers l'agression d'un tissu, mais aussi la réparation de ce qui a été lésé dans le but d'assurer l'intégrité de l'organisme. Lorsqu'elle est adéquate, l'inflammation se déroule selon un plan préétabli d'étapes dont l'une des plus importantes est le recrutement de leucocytes sur le site de l'agression. La fonction de ces derniers sera d'éliminer et « préparer le terrain » pour la résolution de l'inflammation. Parmi eux, les neutrophiles polymorphonucléaires sont les premiers à infiltrer les tissus lésés et représentent une étape essentielle de l'arsenal de l'organisme. La réponse inflammatoire est en général bénéfique pour l'hôte, cependant, dans diverses situations, une persistance de l'activation immunitaire peut entraîner des dommages aux tissus.

L'asthme équin sévère est une maladie inflammatoire de nature neutrophilique et caractérisée par une obstruction réversible des voies respiratoires profondes du cheval adulte. Au niveau clinique, elle se définit par une détresse respiratoire au repos, comme dans l'asthme humain sévère. On lui prête une grande variété d'agents initiateurs, mais l'étiologie et la pathogénie de la maladie restent encore incomplètement élucidées. À ce jour, il a été démontré que c'est l'exposition à des antigènes (poussières, moisissures, ...) présents dans le foin et la paille (éléments constitutifs de l'environnement des chevaux) qui va induire une obstruction des voies respiratoires responsable des signes cliniques énoncés ci-dessus. Cette obstruction est due à un bronchospasme, mais également à un remodelage du tissu bronchique (fibrose péribronchiolaire, hyperplasie/hypertrophie de la couche de cellules musculaires lisses, pertes des structures ciliées au niveau de l'épithélium). Chez les humains atteints d'asthme sévère, on observe une persistance de l'activation immunitaire qui est représentée par une infiltration leucocytaire pulmonaire (souvent des éosinophiles, mais également des neutrophiles). L'asthme équin est une des rares conditions affectant les mammifères domestiques présentant des caractéristiques semblables à l'asthme humain, ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude de cette maladie.

Il est important de focaliser notre attention sur ces cellules clefs de la réponse inflammatoire que sont les neutrophiles, afin de pouvoir les caractériser de façon spécifique, définir leur rôle dans l'inflammation et les mécanismes qui vont réguler leur participation.

Les granulocytes de faible densité (ou *Low-Density Granulocytes*, LDGs) représentent un sous-type de neutrophiles récemment mis en évidence dans le sang de patients atteints de maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique où ils sont retrouvés en plus grande quantité par rapport à des patients sains. Bien que de nombreux points restent à élucider, il a été mis en évidence que ces cellules présentent un profil pro-inflammatoire plus important que les autres populations de neutrophiles et qu'il existe une corrélation entre le taux de LDGs circulants et la sévérité (et/ou l'activité) de la maladie.

Comme énoncé ci-dessus, l'inflammation doit idéalement se dérouler selon une séquence prédéterminée et dans un certain laps de temps pour être bénéfique. Les effets délétères apparaissent dès qu'il y a une réponse inadaptée du système immunitaire menant à une persistance de l'inflammation. À travers ce travail, les caractéristiques morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles des LDGs seront évaluées dans le sang de chevaux sains et asthmatiques afin d'investiguer leur possible implication dans la persistance inappropriée de l'inflammation pulmonaire.

PARTIE A : REVUE DE
LITTERATURE



Chapitre I - La Réponse Inflammatoire

C'est un médecin romain du nom de Celsus (2) (I^{er} siècle av. J.-C. - I^{er} siècle apr. J.-C.) qui caractérise pour la première fois le processus inflammatoire à travers la description des manifestations locales accompagnant l'infection d'une plaie : on parle de la « tétrade de Celse » à savoir *tumor* (œdème), *rubor* (rougeur), *calor* (chaleur) et *dolor* (douleur). C'est en 1858 que l'allemand Rudolf Virchow ajoute à cette définition initiale le terme de *functio laesa*, signifiant la perte de fonction du tissu touché.

1. Qu'est-ce que l'inflammation ?

L'inflammation est un processus réactif, une réponse physiologique d'un tissu vivant à une perturbation d'origine pathologique ou traumatique provenant du milieu extérieur ou intérieur. Il existe diverses causes d'inflammation à savoir les infections par des micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons), les réactions d'hypersensibilité (allergènes), une agression par des agents physiques (traumatismes, irradiation, chaleur, froid), ou à des produits chimiques toxiques ou corrosifs, et de la nécrose suite à de l'ischémie (infarctus). Son dessein est l'isolement du tissu agressé afin de limiter les dommages tissulaires et d'éliminer efficacement des agresseurs éventuels. La réponse inflammatoire représente donc un élément clef de l'immunité innée, mais également un facteur initiateur et régulateur de la réponse immunitaire adaptative. La réponse inflammatoire résulte normalement à un retour à l'homéostasie, mais lorsque l'inflammation est inappropriée, exagérée ou chronique, elle peut mener à la perte de fonction.

2. L'inflammation : un processus séquentiel

L'inflammation est un processus dynamique évoluant selon une séquence d'évènements complexes et intriqués :

- Une phase d'initiation, générée par un signal de danger d'origine exogène ou endogène et qui met en jeu des effecteurs primaires ;
- Une phase d'amplification avec la mobilisation et l'activation d'effecteurs secondaires ;
- Une phase de résolution et de réparation qui tend à restaurer l'intégrité du tissu agressé et à éliminer l'agent causal.

2.1. Initiation de l'inflammation

2.1.1. Les inducteurs inflammatoires

Les inducteurs exogènes de l'inflammation sont traditionnellement répartis en microbiens et non microbiens. Parmi les inducteurs non microbiens, on distingue notamment les allergènes et divers irritants. Les inducteurs microbiens sont quant à eux formés de deux classes : les *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, ou PAMPs [lipopolysaccharide ou LPS (3, 4), flagelline (3), acide lipotéichoïque, peptidoglycanes (4)] et les facteurs de virulence. Le terme « PAMPs » désigne un ensemble de motifs moléculaires très conservés chez les pathogènes (5, 6). Les *Toll-like Receptors* (TLRs) représentent la principale classe de récepteurs que l'organisme a développés afin de reconnaître et agir contre ces PAMPs.

Par opposition, il existe des inducteurs issus de l'organisme même, produits lorsqu'un tissu est lésé (trauma, infection). Selon le principe de compartimentalisation des tissus sains, ces inducteurs endogènes ne sont pas détectables en temps normal par le système immunitaire inné. Ces signaux sont aussi appelés « alarmines » ou *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs) (7). On distingue notamment l'ATP, les ions potassium K^+ , l'acide urique, les protéines de choc thermique (*Heat Shock Protein*) (8, 9), ou encore la protéine S100A9 (10).

2.1.2. Les senseurs de signaux dangers

Il existe des sentinelles, placées de façon permanente à des sites stratégiques du corps : on parle de cellules résidentes (les macrophages alvéolaires du poumon, les cellules de Langerhans au niveau de la peau). Ce sont les premières à réagir à la présence d'un agent agresseur via des DAMPs ou des PAMPs: on parle de « sensing ».

Les récepteurs de signaux dangers sont constitués des *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) regroupant les TLRs qui sont transmembranaires et endosomaux, les *RIG-I-Like Receptors* (RLRs) qui eux sont intracellulaires, les NOD-Like Receptors (NLRs) qui sont cytoplasmiques et les *C-type Lectin Receptors* (CLRs) qui sont transmembranaires (11).

Le but final de chacun de ces senseurs est de générer des médiateurs permettant l'arrivée des effecteurs de l'inflammation au sein du site lésé. Pour se faire, des mécanismes de signalisation complexes impliquant plusieurs protéines sont nécessaires.

2.2. Les médiateurs de l'inflammation

Ces médiateurs sont issus du plasma ou sécrétés par les cellules présentes sur le site inflammatoire. En se basant sur leurs propriétés biochimiques, 7 groupes distincts sont identifiables au cours du processus inflammatoire (12): les molécules vasoactives, les composants du complément, les kinines, les médiateurs lipidiques, les cytokines, les chimiokines et les enzymes protéolytiques (figure 1).

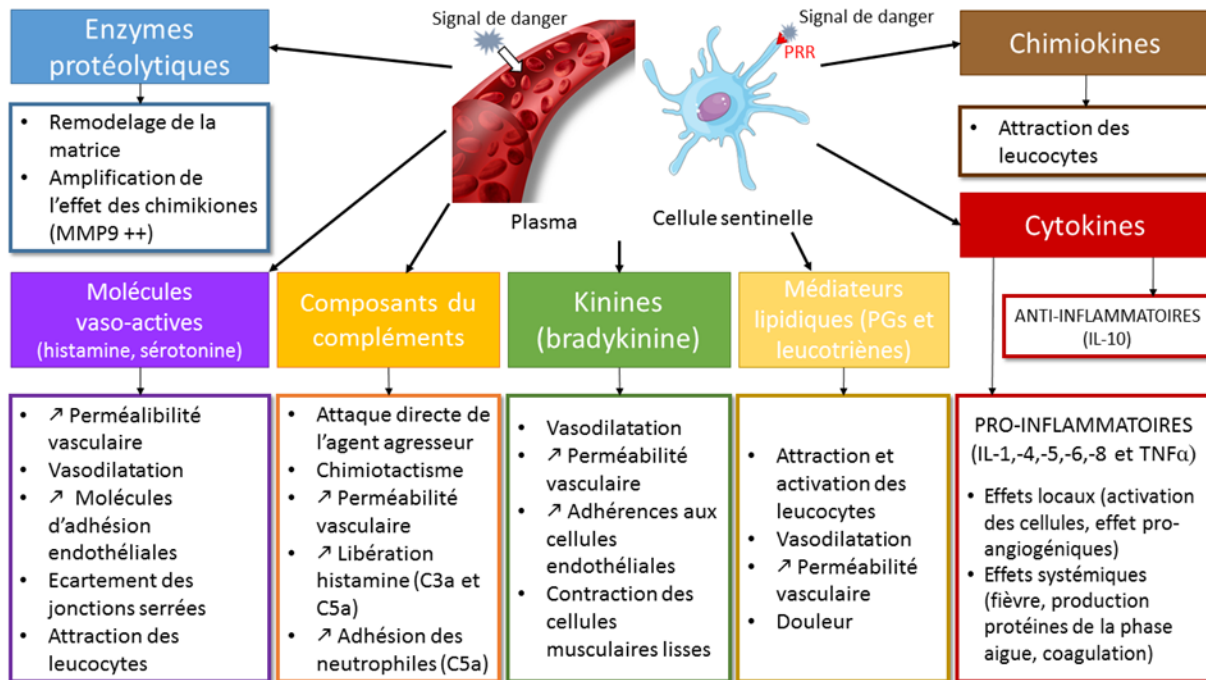


Figure 1 : Schéma bilan des principaux médiateurs inflammatoires et leurs rôles.

Les médiateurs contribuent donc tous à la dilatation des artérioles près de la lésion: c'est ce que l'on appelle la phase vasculaire de l'inflammation, étape cruciale favorisant l'arrivée des cellules effectrices au niveau du site inflammatoire.

2.3. La phase vasculaire de l'inflammation

La réponse vasculaire joue un rôle de jonction entre la reconnaissance d'un signal de danger ou la détection d'un pathogène, et la phase effectrice (phase cellulaire). On observe au niveau des tissus atteints d'importantes modifications microvasculaires et notamment une hausse importante de ces structures : on parle d'angiogenèse (2). Dans le but de monter une réponse efficace contre une agression, l'organisme recrute un nombre important d'agents réparateurs (cellulaires et moléculaires) qui devront être véhiculés efficacement (rapidité et en

quantité) au niveau de la lésion. Dans cette optique, une cascade programmée à l'avance va se mettre en place. Cette suite d'évènements va débuter par une vasoconstriction réflexe brève des artérioles, qui permet l'activation des plaquettes et donc la coagulation (2). En quelques secondes (13), une vasodilatation des capillaires sanguins s'en suit, puis une augmentation du débit sanguin. Tout cela va se traduire par l'apparition du *calor* et du *rubor*. Parallèlement, les vaisseaux sanguins sont plus perméables, permettant la fuite de plasma et de cellules dans le tissu (13), induisant l'œdème des tissus (le *tumor*). Associée à la libération de médiateurs chimiques, cette distension des tissus va comprimer les terminaisons nerveuses environnantes, responsables de la sensation douloureuse (le *dolor*).

L'augmentation de l'apport sanguin permet de drainer vers le site d'intérêt les leucocytes et des protéines sériques. L'œdème inflammatoire, corrélatif de l'exsudation, favorise l'apport local de médiateurs chimiques et de moyens de défense (immunoglobulines, facteurs de coagulation, éléments du complément). Les cellules déjà présentes ou infiltrées vont libérer des médiateurs chimiques qui vont entretenir et amplifier l'inflammation.

2.4. Amplification

Cette phase représente l'arrivée des patrouilles circulantes et l'activation des cellules au niveau du tissu lésé: c'est la phase cellulaire de l'inflammation. Dès leur arrivée sur le site lésé, les cellules du système inné sont activées soit par contact direct avec le pathogène, soit par la présence des médiateurs sécrétés par les cellules résidentes. Cela conduit à la phagocytose et à la destruction d'une partie des pathogènes (2). Les neutrophiles, après ingestion de l'agresseur, produisent et déversent des composés hautement réactifs contenus dans leurs granules : il s'agit de formes réactives de l'oxygène (FRO), de monoxyde d'azote, d'enzymes protéolytiques et de peptides antimicrobiens (2).

Parallèlement, des cellules dites « dendritiques » (famille très hétérogène de cellules) ont la fonction commune de reconnaître et dégrader les antigènes. Suite à leur migration vers les ganglions lymphatiques, ces cellules dendritiques vont présenter des fragments des agents infectieux impliqués aux lymphocytes T et initier une réponse plus ciblée (2). Cette réponse adaptative, qui s'installe en 2 à 5 jours, prend la suite de la réponse innée si nécessaire. Si ce n'est pas le cas, il y a alors réparation intégrale du tissu via l'expression de facteurs humoraux déclenchant la prolifération cellulaire, et la genèse d'un nouveau tissu fonctionnel. Cette dernière phase doit être complétée afin que la résolution de l'inflammation puisse avoir lieu.

2.5. Résolution

La réponse inflammatoire est basée sur la collaboration entre neutrophiles, monocytes inflammatoires et macrophages qui constituent le système myéloïde phagocytaire spécialisé dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires et extracellulaires (14). Lorsque la menace a été contrôlée, le processus inflammatoire doit cesser et une phase de réparation doit s'engager. Ce processus comporte un changement dans le profil lipidique local, la libération de molécules constituant des signaux prorésolutifs [comme l'Annexine A1 (15)], une inactivation des chimiokines. Les deux étapes clés de ce processus sont le contrôle de la survie du neutrophile et la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages (efferocytose).

3. Réactions aiguë et chronique : des notions importantes

Dans son but primaire, l'inflammation se veut bénéfique pour l'hôte, étant donné son rôle majeur dans la défense de l'organisme contre des agents agresseurs. Mais comme énoncé précédemment, la réponse inflammatoire peut se dérouler au détriment de l'organisme. À ce niveau, la différence entre inflammations aiguë et chronique est centrale, la première des deux étant celle ayant essentiellement un impact positif (excepté dans le cas du choc anaphylactique où le caractère aigu est délétère). Elle se met en place rapidement et son déroulement va s'étaler sur une courte période (quelques jours à quelques semaines) (2). On a alors une guérison que l'on peut qualifier de quasiment automatique. Malgré tout, il arrive que la réponse immunitaire persiste, pour conduire à ce que l'on qualifie d'inflammation chronique (évolution sur plusieurs mois, voire plusieurs années). La tendance n'est plus à la guérison spontanée et des conséquences pathologiques y sont souvent associées. L'inflammation chronique se résume donc en une réponse de durée prolongée au cours de laquelle des processus inflammatoires, des dommages tissulaires et des tentatives de réparation vont se dérouler simultanément.

L'inflammation représente le processus fonctionnel ayant le potentiel le plus néfaste pour l'organisme, notamment lors d'inflammation chronique. Parmi toutes les cellules y jouant un rôle, celui des neutrophiles est central.

Chapitre II : Les Neutrophiles

Les neutrophiles sont les leucocytes les plus abondants dans le sang (16), représentant 50 à 75% des leucocytes circulants. Chez le cheval, le nombre de leucocytes est évalué entre 5,4 à $14,3 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ de sang (17). En cas d'inflammation, ils sont les premiers leucocytes à se rendre sur place, et ce en nombre important.

1. Présentation des polymorphonucléaires

Les polymorphonucléaires sont produits dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes qui se transforment en progéniteurs myéloïdes. Ceux-ci se différencient en plusieurs types cellulaires sous l'influence de l'environnement stromal et de facteurs de croissance comme le GM-CSF (*Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor*). Une première étape correspond à un stade de progéniteur commun aux polymorphonucléaires et aux monocytes. Les polymorphonucléaires se différencient ensuite sous l'influence du G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*), et les phagocytes mononucléés sous l'influence du M-CSF (*Monocyte-Colony Stimulating Factor*).

Les polymorphonucléaires constituent une réserve rapidement mobilisable en cas d'infection. Au cours de cette maturation, les granulations définissent les différents types de polymorphonucléaires et jouent un rôle majeur dans leurs fonctions, apparaissant séquentiellement. Après leur maturation médullaire, les polymorphonucléaires quittent la moelle osseuse et passent dans la circulation sanguine.

1.1. Les différents types de polymorphonucléaires

Les polymorphonucléaires sont une famille de cellules comptant trois sous-types : les éosinophiles, les basophiles et les neutrophiles. Ces cellules partagent la caractéristique de posséder un noyau polylobé, d'où leur nom de « polymorphonucléaire » et des granules dans leur cytoplasme. Ces granules les rattachent à la famille des granulocytes. Ce sont des compartiments subcellulaires contenant l'ensemble de l'arsenal moléculaire qui va être utilisé pour la défense de l'hôte. Elles se distinguent par la capacité de ces granules à retenir des colorants neutres, basiques ou à base d'éosine.

Les neutrophiles polymorphonucléaires ont un noyau comportant 3 à 5 lobes et des granulations qui prennent les colorants acides et basiques pour aboutir à une teinte beige. Les polymorphonucléaires éosinophiles ont un noyau bilobé et des granulations prenant les colorants acides en particulier l'éosine de couleur orangée. Les polymorphonucléaires

basophiles ont des granulations prenant les colorants basiques et apparaissent violet foncé. Les neutrophiles sont des cellules phagocytaires, ce qui n'est pas le cas des éosinophiles ni des basophiles qui ont surtout une capacité d'exocytose, libérant à l'extérieur le contenu de leurs granulations.

1.2. Les polymorphonucléaires neutrophiles

C'est à Paul Ehrlich et son équipe que l'on doit la découverte des neutrophiles à la fin du XIXe siècle et le prix Nobel lui a été remis pour cette découverte. Leur appellation vient du fait que leur coloration est neutre lorsque l'on utilise un mélange de colorants acides et basiques (18). Les neutrophiles ont longtemps été décrits comme des cellules « kamikazes », situés en bas de la hiérarchie de l'immunité. Les recherches menées ces 20 dernières années ont fait évoluer ce dogme.

Il est estimé que la moelle osseuse d'un être humain adulte produit environ 10^{11} neutrophiles par jour. Cette population cellulaire conséquente est répartie en 3 catégories :

- Les neutrophiles circulants, libres dans la circulation dont le nombre varie selon l'espèce considérée. Dans l'espèce murine, ce « compartiment » de neutrophiles est estimé à 10-25%, tandis que chez l'homme, elle serait de 50-70% (19, 20) et 50% ou moins chez les animaux domestiques dont le cheval (21);
- Les neutrophiles matures sont situés dans la moelle osseuse et constituent une réserve. Ces derniers sont stockés afin d'être libérés en cas d'agression (infection bactérienne), pendant laquelle le nombre de neutrophiles circulants peut augmenter d'un facteur 10 (22).
- La dernière catégorie de neutrophiles que l'on retrouve dans l'organisme est décrite comme « marginalisée ». On désigne par ce terme les neutrophiles adhérents aux vaisseaux notamment dans la rate, le foie, les poumons et le rein. Ce secteur est de taille équivalente à celui des neutrophiles circulants. C'est en 1960 que le phénomène de « marginalisation » est proposé. Mauer et son équipe ont injecté des neutrophiles marqués dans la circulation sanguine et ont constaté qu'environ la moitié d'entre eux disparaissent très rapidement (23). Après l'administration d'adrénaline ou de glucocorticoïdes, il y a une mobilisation rapide de ces neutrophiles ce qui met en évidence l'existence d'un pool marginé dont la nature exacte est débattue. Une hypothèse émise est que les neutrophiles seraient piégés dans de très fins capillaires sanguins secondairement à des propriétés mécaniques contraignantes (24). Le foie, la rate, les poumons et la moelle osseuse sont des sites anatomiques où le temps de transit des neutrophiles est allongé contrairement à ce que l'on pourrait s'attendre dans le

cas d'un passage libre (25, 26). Un tissu sain ne renferme généralement pas de neutrophiles, mais les poumons semblent enrichis en neutrophiles polymorphonucléaires matures (25). Plusieurs études rapportent que les neutrophiles persistent plus longtemps au niveau pulmonaire par rapport aux autres sites de « margination » (foie, rate) ou encore par rapport à la moelle osseuse (27-29). L'hypothèse principale est qu'au niveau pulmonaire, on trouve un réseau capillaire plus fin générant une séquestration mécanique des neutrophiles (30). De nombreuses données suggèrent donc les poumons comme un site majeur de « stockage » des neutrophiles, mais des études scintigraphiques démontrent que le système pulmonaire n'est que modestement impliqué dans ce « pooling neutrophilique » (29). Cependant, il est suggéré que les poumons soient un site de rétention des neutrophiles activés (29) et où ils seraient « désactivés » (31, 32). Ainsi, la controverse d'un pool pulmonaire de neutrophiles marginalisés persiste.

2. Cycle cellulaire des neutrophiles

La quantité de neutrophiles en circulation reflète un équilibre entre la production et l'élimination des neutrophiles sanguins par le foie, la rate et la moelle osseuse elle-même, principalement par phagocytose (33).

2.1. Formation du neutrophile

Les neutrophiles sont formés au cours d'un processus connu sous le nom de « granulopoïèse », à partir d'une cellule souche hématopoïétique (34). Comme représenté dans la figure 2, ils vont « maturer » en myéloblastes, promyélocytes, myélocytes, métamyélocytes, neutrophiles non segmentés (dits « en bande ») et enfin en neutrophiles matures (35).

La formation du neutrophile comprend principalement le développement de la cellule, suivi par sa maturation. Chacune des 2 phases a une durée d'environ une semaine : une mitotique (dite de multiplication) et une non mitotique (dite de maturation). Dans un premier temps, la granulopoïèse se produit sous l'influence de GM-CSF et d'IL-3 avec le passage progressif des cellules souches en myéloblaste, puis promyélocytes. La phase non mitotique de la granulopoïèse débute lorsque le stade de myélocyte est atteint. Par la suite, les facteurs G-CSF et GM-CSF induisent la différenciation du stade myélocyte au stade de métamyélocyte. Cette dernière étape permet le passage d'un neutrophile « non segmenté » (ou encore « band cell ») au stade de cellule terminale avec un noyau polysegmenté (34).

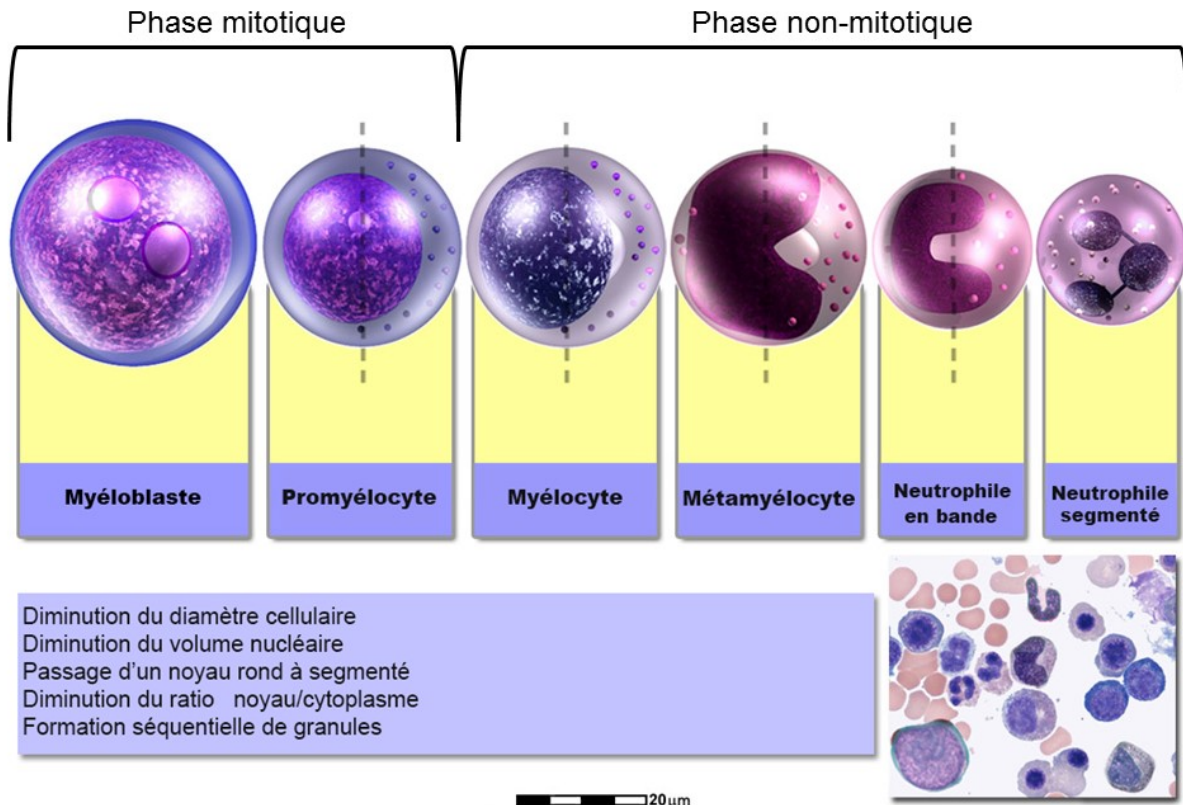


Figure 2 : Diagramme de la maturation neutrophilique et liste des modifications morphologiques observées au cours de ce processus.

Modifié avec permission de (36).

2.2. Entrée et sortie de la moelle osseuse

La libération des neutrophiles de la moelle osseuse est modulée par différents signaux chimiques (34), avec notamment l'intervention du couple de récepteurs CXCR4 et CXCR2 (37). La vitesse de libération dépend du stimulus: elle apparaît par exemple 6 h après un traitement par le G-CSF chez la souris, et après seulement quelques minutes dans le cas de l'IL-8 (38).

CXCR4 joue un rôle crucial dans le maintien des neutrophiles et l'élimination du pool circulant via le retour des neutrophiles « âgés » dans la moelle osseuse (39). Le taux de CXCR4 augmente chez les neutrophiles sénescents. Le récepteur est dès lors plus sensible envers son ligand SDF-1 (*Stromal Derived Factor 1*). Le gradient de SDF-1 attire les neutrophiles à la moelle, où ils sont éliminés par phagocytose (40).

CXCR2 est un autre récepteur exprimé à la surface des cellules myéloïdes et qui intervient dans la libération des neutrophiles par la moelle osseuse (37).

2.3. Élimination des neutrophiles

De toutes les cellules du système immunitaire, ce sont les granulocytes qui possèdent la durée de vie la plus courte. Ces courtes durées de vie s'expliquent par le fait que les granulocytes circulants rentrent dans le cycle de l'apoptose spontanément dès leur libération dans la circulation sanguine (ou même déjà avant) sans requérir de signal extérieur. Cette mort constitutive constitue la grande spécificité des granulocytes par rapport aux autres types cellulaires.

Le mécanisme de destruction des neutrophiles circulants n'est pas connu avec précision, mais des études de radio-marquages indiquent que les sites de fixation sont la moelle osseuse, le foie et la rate (41) ou ils sont éliminés par la phagocytose(42). Il est suggéré que les neutrophiles retournant à la moelle pourraient à nouveau être recrutés, mais cela resterait un phénomène marginal (43).

Comme toutes les cellules apoptotiques, les granulocytes exhibent les mêmes modifications de la surface cellulaire qui favorisent la reconnaissance par les cellules phagocytaires (44, 45). Ainsi, leur membrane plasmique perd l'asymétrie phospholipidique; la phosphatidylsérine, normalement présente sur le feuillet interne de la membrane, est externalisée et permet la reconnaissance de la cellule apoptotique par les macrophages (44). Ces changements maintiennent la membrane plasmique intègre qui continue, du moins durant les premières phases de l'apoptose, d'assurer sa fonction de barrière de façon à ce que les composants cellulaires, comme les protéases, soient retenus à l'intérieur des granulocytes apoptotiques. Si la cellule mourait par nécrose et que sa membrane plasmique se rompait, ces composants cytoplasmiques seraient alors relâchés dans l'espace tissulaire. Vu la concentration granulocytaire importante pouvant être mesurée lors d'une inflammation, le déversement des contenus cytoplasmiques submergerait les mécanismes locaux de protection contre les protéinases et les substances oxydantes extracellulaires, ce qui donnerait lieu à des dommages tissulaires incontrôlés. La phagocytose par les macrophages constitue donc un mécanisme d'élimination des granulocytes au site de l'inflammation qui n'induit pas de dommages aux tissus environnants (45). Ces mécanismes sont donc cruciaux pour la résolution de l'inflammation.

2.4. Durée de vie d'un neutrophile : un concept qui change

De nombreuses règles régissent le cycle de vie des neutrophiles. Ainsi le dogme veut qu'ils demeurent dans la moelle osseuse (compartiment de stockage médullaire), puis migrent dans la circulation sanguine (compartiment circulant). Mais une fois cette étape atteinte, le neutrophile ne prolifère plus, il a atteint un stade « terminal ». Tous ces dogmes font l'objet d'une intense controverse depuis quelques années. Un des débats principaux concerne la durée de vie de ces cellules. Les principales études sur lesquelles repose l'estimation de la demi-vie du neutrophile circulant utilisaient un marquage *ex vivo* des neutrophiles, puis une réinjection (46). Les temps trouvés variaient de 5 à 9 h (46) sauf pour le marquage au ^{51}Cr qui donnait une demi-vie de 17,5 h (47). En utilisant un marquage à l'eau lourde, la demi-vie des neutrophiles a été plutôt estimée à 90 h (48). Toutes ces valeurs doivent cependant être considérées avec prudence. Les manipulations impliquant l'isolation des neutrophiles entraînent l'activation de ces derniers et donc influencent l'estimation de leur demi-vie (49) et certains protocoles sont parfois remis en doute (50).

L'étude de la durée de vie des neutrophiles dans l'inflammation est soumise aux mêmes limites énoncées ci-dessus, surtout que les études ont majoritairement été réalisées *in vitro*. Malgré cela, plusieurs facteurs peuvent influencer la demi-vie des neutrophiles durant un processus inflammatoire. L'exposition aux glucocorticoïdes est un exemple d'allongement de la durée de vie des neutrophiles, via un retard de l'apoptose (51). Une étude récente de Marwick rapporte que les glucocorticoïdes perdent cet effet « pro-neutrophilique » lorsque la pathologie inflammatoire est associée à des conditions environnementales d'hypoxie (52). De plus, une étude menée sur le poisson-zèbre avec des neutrophiles marqués avec la GFP (*Green Fluorescent Protein*), suggère que lors de la résolution de l'inflammation, certains neutrophiles retourneraient dans la circulation (53). Les neutrophiles issus du site inflammatoire semblent également recirculer jusqu'aux ganglions lymphatiques, possiblement pour remplir le rôle de cellules présentatrices d'antigène (54). Ce retour dans le torrent circulatoire est qualifié de « reverse transendothelial migration ».

3. Rôle des neutrophiles dans la réponse immunitaire innée

Le rôle primaire du neutrophile est de défendre l'organisme contre des agents agresseurs. Différentes armes sont à sa disposition afin de mener à bien sa mission.

3.1. La phagocytose

La phagocytose est la capacité que possèdent certaines cellules à reconnaître les particules étrangères pour les ingérer, puis les digérer afin de limiter l'invasion du tissu sain (55, 56). Les phagocytes, dont font partie les neutrophiles, possèdent des récepteurs spécialisés dans la reconnaissance de leurs cibles. Classiquement, ce processus de défense nécessite l'intervention de récepteurs spécialisés dans la reconnaissance et « l'enrobage » des éléments à phagocyter. Parmi ceux-ci, on distingue notamment les récepteurs des fragments constants des immunoglobulines de type IgG (FcγR) et les récepteurs du complément (CR). L'opsonisation de la particule est une étape nécessaire afin que les récepteurs précédemment cités la reconnaissent comme leur cible. À la suite de cette reconnaissance, il y a internalisation de la particule dans une vacuole dérivée de la membrane, formant le phagosome.

En fonction du récepteur impliqué, il y a aura un impact sur le mode d'internalisation (57) mais également sur la dégradation (58-60).

3.2. Les granules des neutrophiles

Les neutrophiles possèdent entre 50 et 200 granules dans leur cytoplasme (61). Ces granules peuvent être classées en 4 familles sur base des conditions dans lesquelles ils peuvent être sécrétés (62, 63).

3.2.1. Les vésicules sécrétoires

Ce sont les premières à être mobilisées en réponse à des stimuli inflammatoires. Elles constituent des réservoirs facilement disponibles (18) de récepteurs membranaires requis dans les phases précoces d'activation du neutrophile et d'adhésion sur l'endothélium (récepteur du N-formylmethionine-leucyl-phenylalanine ou fMLP, récepteur du LPS, intégrines β2).

Ces granules contiennent également de l'azurocidine et la protéinase-3 (64) tout comme les trois autres familles de granules introduites ci-dessous. Ces protéines montrent une capacité à augmenter la perméabilité endothéliale et l'adhérence des monocytes sur les cellules endothéliales (65). De plus, le clivage de l'IL-8 par la protéinase 3 améliore sa capacité à induire

le chimiotactisme et permettre la libération de TNF- α et de l'IL-1 β . L'azurocidine est chimiotactique pour les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes T (66).

3.2.2. *Les granules primaires*

Ils sont également qualifiés d'azurophiles ou de peroxydase-positifs. En tant que vésicules intracytoplasmiques, ces granules ont 2 possibilités d'évolution : elles peuvent fusionner avec d'autres vésicules intracytoplasmiques ou sécréter leur contenu dans le milieu extérieur via un processus d'exocytose. Les granules primaires vont majoritairement se fusionner avec le phagosome afin de détruire la particule ingérée. Elles contiennent des molécules antimicrobiennes telles que des cathepsines, des défensines, des enzymes (élastase, protéinase 3) (67) ou de la NSP4 (*Neutrophil Serin Protease 4*) (68).

Constituant environ 50% des molécules contenues dans les granules primaires, les défensines jouent un rôle important dans la défense de l'organisme contre les pathogènes bactériens. Ces protéines présentent un large spectre antimicrobien et agissent au niveau de la perméabilité de la membrane des bactéries (61). Le BPI (*Bactericidal Permeability Increasing Protein*) agit de façon équivalente aux défensines comme l'indique son nom, mais son spectre d'action se concentre surtout sur les bactéries à Gram négatif. L'élastase et l'azurocidine sont des protéases bactéricides à large spectre qui détruisent également la membrane bactérienne (69). Un autre élément de l'arsenal contenu dans les granules primaires est la myéloperoxydase (MPO). Par interaction avec le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), cette enzyme catalyse la formation de produits toxiques tels que l'acide hypochloreux (HOCl).

3.2.3. *Les granules secondaires (ou spécifiques)*

Ces granules vont mobiliser leur contenu préférentiellement pour une exocytose dans le milieu extracellulaire, plutôt que pour une fusion avec un phagosome (18). Leur arsenal ne contient pas de MPO (d'où leur classification en tant que peroxydases-négatifs), mais comprend des molécules ayant des propriétés bactéricides telles que la lactoferrine (composé majoritaire), la lipocaline ou encore des pro-défensines.

L'action bactéricide de la lactoferrine se fait par liaison aux atomes de fer autour d'elle. En le piégeant, elle prive les bactéries du fer nécessaire à leur croissance. La lactoferrine a un effet différent de celui cité précédemment. Par liaison à des TLRs, elle va jouer le rôle d'alarmine (61). Les granules secondaires contribuent donc à la modulation de la migration et de l'adhésion des neutrophiles.

3.2.4. Les granules tertiaires

On les désigne également par le terme de granules à gélatinases. Ce sont des réservoirs d'enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire, mais également de récepteurs membranaires utiles pour la diapédèse du neutrophile. Ils sont donc importants pour une migration efficace au site inflammatoire. Tout comme les granules secondaires, ces granules n'expriment pas de MPO et sont donc peroxydases-négatifs.

Parmi les enzymes présentes dans ces granules, on distingue notamment, la gélatinase et des MMP telle que MMP-9 (ou gélatinase B), MMP-8 et MMP-25, participant à la migration en dégradant par exemple le collagène de type IV de la matrice extracellulaire. Ces granulations sont libérées plus difficilement que les vésicules sécrétoires [une stimulation par le N-formylméthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP) induit une libération de seulement 20% des granulations tertiaires], mais plus facilement que les granulations primaires et secondaires.

3.3. L'explosion oxydative

Afin de détruire le corps étranger présent à l'intérieur du phagosome, les neutrophiles ont recours à une voie dépendante de l'oxygène, l'explosion oxydative (ou « respiratory burst »). Elle est définie par la production importante d'espèces réactives de l'oxygène et leur libération. L'anion superoxyde O_2^- , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et l'acide hypochloreux HOCl sont les espèces majoritairement produites lors de l'explosion oxydative. Ces espèces oxygénées réactives vont être retrouvées en forte concentration dans le phagosome. Ces conditions environnementales sont toxiques et mènent à la destruction des micro-organismes. Si ces produits sont libérés de façon exagérée dans le milieu extracellulaire, ils peuvent engendrer des dommages tissulaires.

3.4. La NETose

Les pièges extracellulaires des neutrophiles (ou *Neutrophil Extracellular Traps*, NETs) désignent une toile tissée à partir d'ADN, d'histone et de composants des granules relargués par les neutrophiles (figure 3). Leur but est de piéger les agresseurs, notamment les bactéries, afin de faciliter leur élimination (70). La formation des NETs a été d'abord décrite comme une mort du neutrophile via un mécanisme dépendant d'une enzyme NADPH oxydase fonctionnelle (71), de la présence d'élastase et de MPO (72), ainsi que de la citrullination des histones (73). Cette dernière consiste en la transformation de l'acide aminé arginine en citrulline (hydrolyse du groupe NH_2 terminal chargé positivement en un groupe oxygène). Cependant, il semble que la NETose ne représente pas un programme de mort du neutrophile.

Une autre étude *in vitro* montre que tous les granulocytes peuvent relarguer de l'ADN mitochondrial sans que cela ne soit associé à leur mort (74). Une étude *in vivo* récente démontre que les neutrophiles restent présents et continuent d'avoir un effet antibactérien, et ce malgré qu'ils soient passés par un processus de NETose (75).

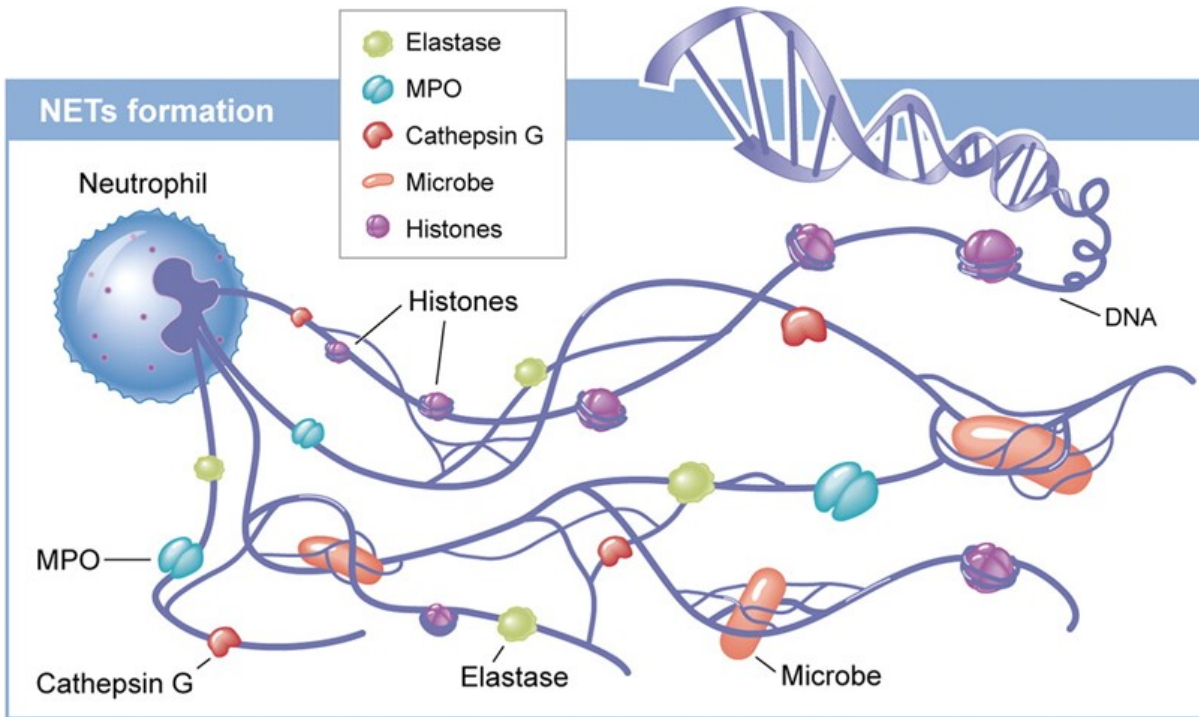


Figure 3 : Composition des pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs).

En attente de permission de (76).

Chapitre III : Neutrophiles dans l'inflammation

Lors d'une inflammation induite par une infection, un grand nombre d'acteurs cellulaires et humoraux de l'immunité interviennent afin de protéger l'hôte et de réparer les lésions provoquées par le pathogène. Parmi ces acteurs cellulaires, les neutrophiles ont pour rôle principal la destruction et l'élimination du pathogène. En cas d'inflammation, la production journalière de neutrophiles par la moelle osseuse peut être augmentée de 20 à 50 fois: cela représente une ligne de défense supplémentaire de l'organisme en fournissant plus de cellules effectrices agissant contre l'agresseur.

1. Recensement des neutrophiles

L'activation du neutrophile doit être vue comme un continuum, une suite d'événements, dont le but ultime est l'évolution d'un état « naïf » du neutrophile dans le torrent circulatoire vers un niveau supérieur dans les tissus lésés.

Dans notre cheminement dans le cycle de vie du neutrophile, nous en étions à sa localisation dans la circulation périphérique. La suite logique dans la migration consiste à quitter la circulation sanguine et traverser la paroi endothéliale. La microscopie intravitale a permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués (77). La migration transendothéliale dure environ 15 à 45 minutes (69) et s'organise en 3 étapes (figure 4) : une phase de roulement, d'adhésion ferme, puis de transmigration. Cette articulation d'étapes n'est pas immuable. Dans le tissu hépatique, la migration transendothéliale débute directement par une adhésion ferme (78).

1.1. Les étapes du recensement neutrophilique

1.1.1. *Le roulement*

À l'image du céphalopode décrit par Victor Hugo (79), les neutrophiles possèdent des tentacules (qualifiés de « pseudopodes ») et vont se servir d'un système de ventouses afin de migrer vers les tissus. Ils vont projeter loin devant eux un long et fin tentacule (80, 81). À sa surface, se trouvent des molécules d'adhésion de deux types : les LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen-1*) et les PSGL-1 (*P-Selectin Glycoprotein Ligand-1*), qui se lient respectivement aux sélectines ICAM-1 et aux P-sélectines (82), des molécules spécifiques situées à la surface des cellules endothéliales: c'est l'attachement initial (figure 4a).

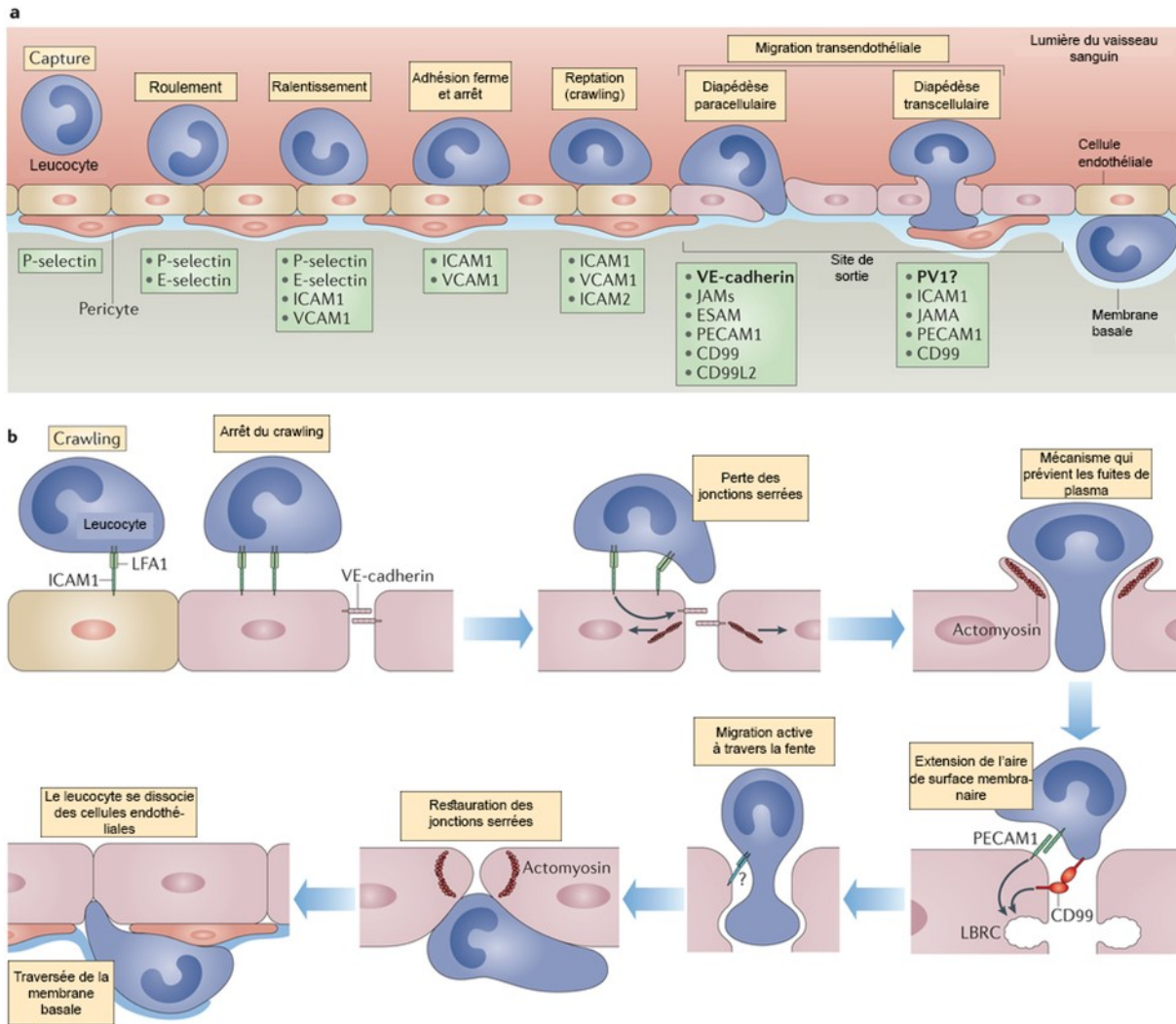


Figure 4: Les étapes du recensement des neutrophiles au niveau des sites inflammatoires.

a. La cascade de recrutement des neutrophiles au niveau d'un site inflammatoire commence par le roulement. C'est un processus dépendant des sélectines, tandis que l'adhésion, la reptation (ou « crawling ») et la transmigration dépendent des interactions avec les intégrines. Ce changement de molécules à la surface des neutrophiles est dû à l'impact des chimiokines situées sur la partie luminaire de l'endothélium. Les neutrophiles vont suivre le gradient de chimiokines vers les sites préférentiels de transmigration. Il existe 2 processus de transmigration (ou diapédèse) reconnus : paracellulaire (entre les cellules endothéliales) et transcellulaire (à travers les cellules endothéliales). **b.** Le processus de diapédèse paracellulaire est ici développé. *Modifié avec permission de (83).*

Ces liaisons sont qualifiées de « lâches » et vont permettre aux neutrophiles de s'arrimer à la paroi des vaisseaux, tout en poursuivant sa course. Ancrés en aval par l'extrémité de leur tentacule, ils s'enroulent autour de celui-ci en progressant le long de la paroi, puis continuent d'avancer en le déroulant de nouveau sur toute sa longueur (80, 81). Par la suite, ils projettent de nouveau leur long appendice, et le cycle recommence. Emportés par le flux sanguin, les neutrophiles «roulent» sur la paroi du vaisseau. Ce processus résulte en un ralentissement du neutrophile au niveau de l'endothélium. Une voie de signalisation via les récepteurs couplés aux protéines G va se mettre en place et aboutir en l'activation de kinases et la réorganisation du cytosquelette du neutrophile (84, 85). En même temps, le neutrophile libère les vésicules sécrétoires, ce qui le rend plus sensible à son environnement en augmentant la quantité de récepteurs, notamment des intégrines (35).

1.1.2. L'adhésion ferme

En réponse au contexte inflammatoire, les cellules endothéliales expriment des intégrines (comme ICAM-1 et VCAM-1) (figure 4a). Ces dernières vont se lier avec des intégrines-β2 (LFA-1 et Mac-1), exprimées par le neutrophile (86, 87) et qui sont libérées en réponse aux chimiokines comme l'IL-8 et certains médiateurs lipidiques comme le leucotriène B4 (LTB4). Cette nouvelle interaction sera plus forte que celle énoncée dans le paragraphe précédent et va provoquer un arrêt du roulement des neutrophiles.

1.1.3. La diapédèse

Ce terme décrit le processus par lequel un neutrophile traverse la paroi endothéliale au niveau du site où son roulement s'est arrêté (figure 4b). On distingue deux voies de passage : la première consiste à s'insinuer entre 2 cellules endothéliales et à se frayer un chemin vers le tissu. Cette voie est qualifiée de « paracellulaire » et prend environ 2 à 5 minutes (88). La deuxième option est la « voie transcellulaire » au cours de laquelle le neutrophile traverse la cellule endothéliale. Cette voie est cependant plus longue (20 à 30 minutes) (82). La balance entre ces deux voies est contrôlée par le binôme LFA-1/Mac-1 et leurs ligands ICAM-1/ICAM-2. C'est ainsi que le céphalopode cellulaire va se servir de ses pseudopodes pour choisir la « meilleure voie » (89).

Les vaisseaux sanguins constituent un réseau servant à véhiculer le sang dans l'organisme. Une de leur principale caractéristique est leur étanchéité (qui varie selon la localisation). Cette propriété est assurée par des jonctions serrées bloquant le passage de

fluides entre les cellules. Dans la voie paracellulaire, les neutrophiles passent donc au travers de ces jonctions. Des zones sont plus faciles à traverser que d'autres, notamment les intersections comprenant 3 cellules endothéliales où l'organisation des jonctions serrées est moins régulière (90). La voie transcellulaire est notamment observée au niveau des endothéliums micro-vasculaires comme ceux présents au niveau cérébral. Ce processus équivaut en la « transcytose » du neutrophile par la cellule endothéliale dans le sens qu'il va la traverser, en évitant le noyau. Pour se faire, l'hypothèse a été émise que le neutrophile utilise un système de « protrusions » qui vont palper la surface endothéliale à la recherche d'une zone de moindre résistance (91). Selon les tissus impliqués, cette voie de passage est empruntée par 5 à 30% des neutrophiles (92).

Par la suite, le neutrophile migre à travers la lame basale endothéliale en remodelant cette dernière grâce à la relâche d'enzymes énoncées précédemment et localisées dans ses granules (91).

1.2. Les obstacles des neutrophiles

Après leur odyssée sanguine, les neutrophiles atteignent directement le site inflammatoire, dans la majorité des situations. Il arrive qu'ils doivent traverser encore certains obstacles comme la barrière épithéliale au niveau de l'arbre bronchique ou au niveau intestinal. On parle alors de migration transépithéliale. Cette dernière utilise principalement la voie paracellulaire (85).

Une conséquence de la migration transépithéliale est le retard de la mort par apoptose des neutrophiles qui empruntent cette voie (93). Il semble que suite au passage de la barrière épithéliale bronchique, l'expression de FasL et de certaines caspases soit diminuée (94).

2. Lien avec les pathologies inflammatoires pulmonaires

L'absence ou la persistance du neutrophile a été décrite au cours du processus inflammatoire, soulignant le rôle clef que joue cette cellule dans l'inflammation (95). La phagocytose du neutrophile est essentielle à l'homéostasie tissulaire, mais aussi à la résolution de l'inflammation (95). Une augmentation de la survie des neutrophiles a été décrite dans de nombreuses pathologies inflammatoires, comme le sepsis, le SDRA (syndrome de détresse respiratoire aiguë) ou la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) (96). Ce défaut

d'apoptose est généralement associé à un mauvais pronostic dans ces pathologies (97). Dans le cas du SDRA, des forts taux de GM-CSF circulants seraient impliqués dans ce phénomène (97).

Au niveau de l'appareil respiratoire, il existe différentes causes pouvant résulter en une atteinte inflammatoire aiguë et donc en l'activation des processus non spécifiques de défense bronchique. On distingue notamment les infections (bactérienne, virale) ou encore l'inhalation massive de particules irritantes. Au niveau physiopathologique, cela se traduit par une hypersécrétion glandulaire, une vasodilatation des vaisseaux de la sous-muqueuse permettant l'afflux des neutrophiles dans la lumière (98). Les signes cliniques seront la toux traduisant la présence de mucus, la stimulation des fibres nerveuses, et l'expectoration ayant souvent un aspect purulent lié à l'afflux de neutrophiles (98).

Certaines maladies respiratoires sont caractérisées par l'inflammation chronique des voies aériennes, dont les plus fréquentes chez l'homme sont l'asthme et la MPOC. Elles sont associées à une inflammation bronchique spécifique (98).

L'infiltration de la paroi bronchique par des neutrophiles est une caractéristique de certains asthmes modérés à sévères (99, 100), d'asthme nocturne (101), ou encore dans le cas de patients ne répondant plus adéquatement aux corticostéroïdes (102). Une hausse des neutrophiles circulant est aussi observée, associée celle de TNF- α et d'IL-8 chez les asthmatiques sévères (103). Chez ces mêmes patients, le nombre de neutrophiles est plus important dans leurs expectorations (99, 104-107), leurs liquides de lavage broncho-alvéolaire (LBA) (102), ainsi que dans leurs biopsies bronchiques sous la membrane basale (108), au niveau de l'épithélium (109), et dans les glandes sous-muqueuses bronchiques (110).

Deux études ont aussi clairement mis en évidence une interaction des neutrophiles avec la couche de cellules musculaires lisses. La première a montré qu'il y avait une infiltration neutrophilique dans le muscle lisse bronchique des patients atteints de MPOC et que cette dernière est corrélée négativement avec le volume expiratoire maximal par seconde (VEMS) (111). La seconde montre par microscopie électronique des neutrophiles en contact avec les faisceaux de muscle dans un modèle de souris sensibilisée à l'ovalbumine (112).

Chapitre IV : Hétérogénéité et Plasticité des Neutrophiles

Les neutrophiles sont traditionnellement considérés comme des cellules terminalement différenciées, avec une courte durée de vie et qui ne recirculent plus après avoir migrés dans un tissu. Avec la remise en question de la durée de vie du neutrophile et l'émergence de la notion de « transmigration inverse », les notions d'hétérogénéité et plasticité des neutrophiles apparaissent de plus en plus, et ce aussi bien dans des conditions physiologiques que pathologiques.

1. Le neutrophile et son environnement

Le neutrophile répond à son environnement par l'expression de nombreux récepteurs membranaires acquis au cours de sa maturation cellulaire et au contact de signaux de danger. Cette plasticité du neutrophile nécessite un phénomène dit de « priming », que l'on peut traduire par amorçage ou pré-activation. Considérons par exemple le cas de l'IL-10. En temps normal, les neutrophiles circulants ne sont pas très sensibles à cette molécule. Son récepteur est constitué de 2 sous-unités et les neutrophiles n'expriment constitutivement qu'une seule d'entre-elles. Si les neutrophiles sont stimulés par un signal de danger, la deuxième sous-unité du récepteur à l'IL-10 sera synthétisée *de novo* (113).

2. Les neutrophiles vieillissants

Le neutrophile exprime de nombreux récepteurs de chimiokines et leur expression peut être modulée au cours de la vie du neutrophile. Les neutrophiles circulants dans le sang vont « vieillir » avec le temps, on parle d'un processus de sénescence. Via ce processus, ces neutrophiles « âgés » changent de phénotype ce qui a un impact sur leur rôle immunitaire (42). On observe alors une hausse de l'expression de CXCR4 (figure 5), ce qui augmente la sensibilité de ces neutrophiles à SDF-1. Parallèlement à cette hausse, l'expression de CXCR2 diminue ainsi que la migration vers les sites inflammatoires. De plus, les neutrophiles sénescents sont moins efficaces dans la destruction bactérienne (impact sur les granules, explosion oxydative diminuée) et leur membrane devient plus rigide.

Une autre étude réalisée sur un modèle murin s'est intéressée à l'impact de la maturité des neutrophiles sur leurs fonctions, mais également l'impact de leur état d'activation (114).

Des neutrophiles ont été prélevés à partir de la moelle osseuse (seuls les immatures ont été sélectionnés), du sang, et des tissus. Afin de suivre leur évolution dans le sang, ils ont été marqués et réinjectés dans le sang de souris. Les neutrophiles immatures sont retournés dans la moelle osseuse tandis que les neutrophiles matures activés se sont majoritairement dirigés vers le foie. Quant aux neutrophiles circulants, ayant un phénotype considéré comme intermédiaire entre les deux autres, ils ont suivi les 2 voies sans différence significative.

Ces deux études démontrent qu'un retour à la moelle osseuse des neutrophiles est possible, tout au moins chez la souris, mais également que la migration des neutrophiles va être influencée par leur "âge" et/ou par leur état d'activation.

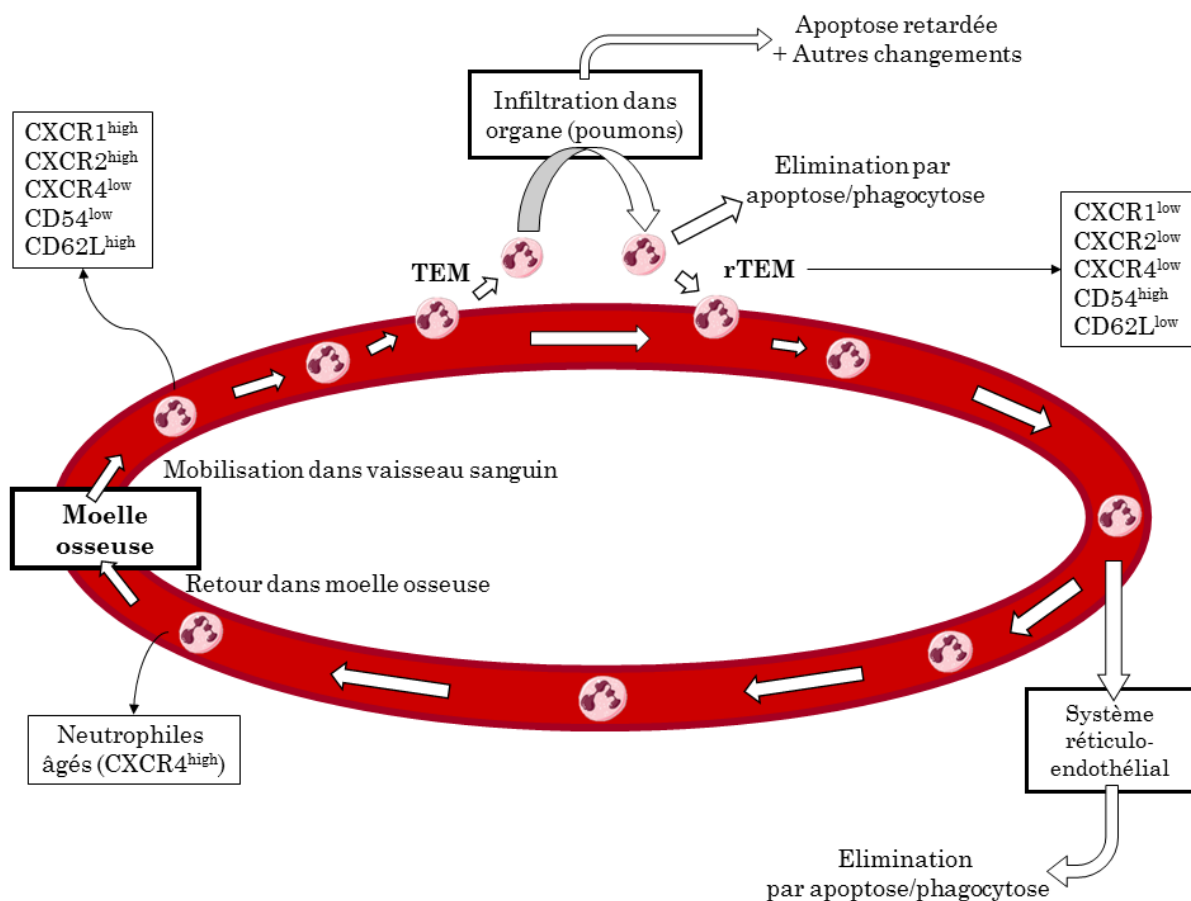


Figure 5: Changements au sein du neutrophile au cours de son parcours.

À la fin de leur processus de maturation dans la moelle osseuse, les neutrophiles matures sont mobilisés dans la circulation sanguine. La migration transendothéliale (TEM) est depuis longtemps considérée comme l'étape finale de la migration des neutrophiles vers le site inflammatoire. Des études récentes ont mis en évidence que les neutrophiles pouvaient retourner dans la circulation sanguine via un processus de migration transendothéliale inverse (rTEM). Cette dernière est associée à des modifications au niveau des marqueurs de surface des neutrophiles. *Modifié de (115).*

3. Les modifications des neutrophiles lors des passages endothéliaux

La transmigration neutrophilique consiste en la sortie des neutrophiles du torrent circulatoire. Au cours de ce passage, le neutrophile va entrer en contact avec différents composants (membrane cellulaire des cellules endothéliales, membrane basale, péricytes). Suite à ces contacts, différents changements vont se réaliser au niveau du neutrophile (figure 5) (116). On constate notamment une hausse de certaines intégrines, de molécules de reconnaissance (CXCR3, CXCR4) et de protéases comme l'élastase (116, 117). Le neutrophile va également présenter une demi-vie allongée (118, 119), ainsi qu'une libération accrue de protéases, une explosion oxydative et une formation de NETs également augmentée (117, 120).

Comme rapporté précédemment, il existe un processus de transmigration inverse. Dans cette situation encore, des modifications sont réalisées à la fois au niveau du phénotype des neutrophiles, mais également au niveau fonctionnel. La molécule d'adhésion ICAM-1 est exprimée en plus importante quantité, tandis que le récepteur CXCR1 l'est moins (121). Ce sous-type de neutrophiles présente également la particularité d'être plus rigide, produire plus de FRO et d'avoir une apoptose retardée (121).

À la lecture de ce chapitre, l'image d'une population neutrophilique homogène laisse place au fait que ces cellules présentent bel et bien un vaste degré d'hétérogénéité et de plasticité. Au-delà du phénotype des neutrophiles, les éléments mêmes qui définissent ce type de leucocytes changent : leur durée de vie peut différer, et les stimuli qu'ils ont rencontrés participent à la libération de certaines granulations et à l'acquisition de certains récepteurs.

L'hétérogénéité des neutrophiles permet aussi de comprendre les différences entre individus quant à leur capacité de défense contre les micro-organismes, car on distingue même des variations neutrophiliques selon les individus. Ces sous-populations expriment de manière variable des cytokines comme IL-2, des chimiokines ou encore des TLRs (122). Cette découverte s'est faite à partir de souris présentant soit une résistance, soit une sensibilité aux souches de *Staphylococcus aureus* à la méthicilline (123). La même hétérogénéité a été observée chez l'homme ayant été exposé ou non à des LPS (124, 125). Cela démontre que cette hétérogénéité des neutrophiles se retrouve aussi bien dans les conditions pathologiques que physiologiques.

Chapitre V : Les Granulocytes de Faible Densité

C'est en 1986 que le docteur Hacbarth et son équipe mettent en évidence la présence de « granulocytes avec une faible flottabilité » dans le sang de patients atteints de lupus, d'arthrite rhumatoïde ou encore de fièvre rhumatismale aiguë (126). Cet intérêt pour la répartition des cellules selon un gradient de densité dans le sang des patients atteints des pathologies énoncées ci-dessus vient d'observations préalables sur la variation du pourcentage de lymphocytes dans le sang de patients cancéreux. Plusieurs années plus tard, l'intérêt pour ces neutrophiles particuliers et leur implication dans différentes pathologies s'est accru.

1. Les LDGs dans le temps

Comme énoncé précédemment, la première mise en évidence des LDGs fut dans le sang de patients atteints de pathologies auto-immunitaires (126). Dans leurs résultats, ils mettent en exergues un lien entre la présence de ce sous-type de neutrophiles et l'activité de la maladie chez les patients atteints de fièvre rhumatismale aiguë (126). Leur hypothèse est que suite à la présence de facteurs humoraux dans le sang de ces patients, il y a activation des neutrophiles ce qui induit leur dégranulation et l'augmentation de leur volume cellulaire, expliquant ainsi la baisse de densité.

C'est par la suite en 2003 que Bennet et son équipe viennent compléter les connaissances sur ces neutrophiles à faible flottabilité (127). Suite à des expériences avec des puces à ADN sur les cellules mononuclées du sang périphérique de patients atteints de lupus (après isolation par gradient de densité), cette équipe démontre une haute expression de gènes liés à la granulopoïèse neutrophilique, notamment spécifiques des premiers stades de maturation (myéloblaste et promyélocytes). Ils émettent alors l'hypothèse d'un lien entre la présence de granulocytes immatures isolés de la couche de cellules mononuclées du sang périphérique et la pathogenèse du lupus (127). L'hypothèse d'un caractère immature des LDGs apparaît alors. Nakou et son équipe corroborent les premiers résultats de Bennet énoncés ci-dessus avec une augmentation de l'expression de gènes reliés aux premières étapes de la granulopoïèse, mais cette fois dans la moelle osseuse de patients atteints de lupus (128).

Le caractère immature des LDGs fait alors peu à peu son apparition dans la littérature scientifique. Le problème qui se pose désormais est la purification de ces neutrophiles afin de pousser plus loin l'investigation sur leurs caractéristiques. C'est en 2009 que Denny et son équipe mettent au point un protocole expérimental via une sélection négative permettant

d'avoir une haute pureté des LDGs (129). Leur première étape d'emploi de ce protocole confirme les résultats des expériences citées ci-dessus, avec notamment une hausse des LDGs dans le sang des patients atteints de lupus, notamment avec des lésions au niveau de la peau ou encore de vasculite. Ces études indiquent également que les LDGs représenteraient approximativement 50% de la population cellulaire dans la couche des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs).

2. Isolation et caractérisation des LDGs

2.1. Gradient de densité par Ficoll

Les PBMCs peuvent être isolées du sang de donneurs sains par une méthode ayant recours au *Ficoll-Hypaque*. C'est une solution de haute densité, mais de faible viscosité et de faible pression osmotique. Elle permet de séparer la fraction mononucléaire contenant les cellules souches, des globules rouges, des granulocytes, des plaquettes et des précurseurs immatures de la lignée myéloïde (130-132). Cette méthode s'exécute par centrifugation du sang sur un gradient de polysaccharides de différentes densités. Elle permet la formation d'une phase en forme d'anneau bien distincte, tout en laissant les érythrocytes et les granulocytes dans le culot.

2.2. Étude des LDGs après isolation

Au cours de la dernière décennie, des études portant sur l'inflammation systémique, les maladies auto-immunes ou encore sur le cancer, mettent en évidence l'existence d'une catégorie distincte de cellules circulantes et ayant une morphologie similaire aux neutrophiles. Ces cellules montrent soit des propriétés pro-inflammatoires (les LDGs) soit immunosuppressives appelées « *granulocytic myeloid-derived suppressor cells* » (G-MDSCs). Tandis que les LDGs n'ont été isolées que dans la fraction de cellules mononucléées du sang périphérique après réalisation d'un gradient de densité par centrifugation, les G-MDSCs sont retrouvées aussi bien dans cette même couche que dans celle où l'on retrouve les NDNs. En plus de leur morphologie, toutes ces populations neutrophiliques ont également en commun de présenter à leur surface CD66b, marqueur spécifique des neutrophiles et qui participe à leur adhésion à la fibronectine (133-136).

Le phénotype, l'état de maturité/activité et la fonction des LDGs, semblent varier en fonction de la pathologie impliquée. Les LDGs ont été non seulement détectés chez des patients atteints de pathologies auto-immunes (127, 129), de sepsis (137), du sida (138, 139), de cancer,

mais également dans le cas de réaction du greffon contre l'hôte (140), chez des femmes enceintes (141) ou encore dans le cas d'administration de G-CSF pour la récolte de cellules souches chez des patients sains (142). Pour illustrer cette variation entre les pathologies, on peut notamment souligner que les LDGs impliqués dans le sepsis semblent majoritairement immatures (137) tandis que dans le lupus, on observe une population mixte de cellules immatures et matures (129).

3. Des rôles qui diffèrent des neutrophiles « normaux »

Dans leur revue de littérature, Scapini et Cassatella regroupent les LDGs et les G-MDSCs (figure 6) sous l'appellation de neutrophiles de faible densité (*low-density neutrophils*, ou LDNs) (143). Ils distinguent 3 types de LDNs. La 3^e catégorie désignant des neutrophiles immatures uniquement retrouvés actuellement chez les patients en sepsis et dont la fonction est encore inconnue (137).

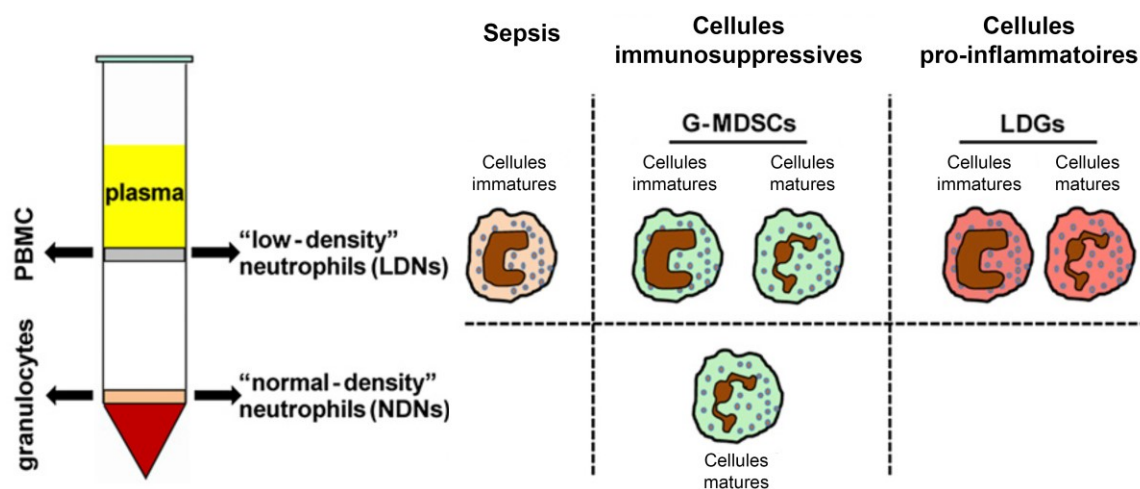


Figure 6: Différents sous-types de neutrophiles après séparation par gradient de densité.

Les granulocytes sédimentent typiquement au-dessus des globules rouges après séparation selon un gradient de densité. Des neutrophiles de faible densité (LDNs) contaminent la couche des cellules mononucléées (PBMCs) et selon la littérature, on distingue 3 types. Le premier est retrouvé dans le sang des patients en sepsis est constitué de cellules immatures dont la fonction est encore indéfinie. Le 2^e sous-type (G-MDSCs) est retrouvé principalement dans le cas de cancer et est constitué de cellules immunosuppressives matures et immatures. On en retrouve également dans la couche de densité normale. Le dernier sous-type (LDGs) a des propriétés pro-inflammatoires augmentées et est constitué de cellules matures et immatures. *Modifié de (143).*

3.1. Propriétés pro-inflammatoires

Denny et son équipe, grâce à leur protocole de haute purification des neutrophiles ont pu évaluer l'expression des molécules chez les LDGs et NDNs de patients atteints de lupus, ainsi que chez les NDNs de patients sains (129). Une expression plus importante de diverses cytokines pro-inflammatoires (IL-6/8, TNF- α et IFN- γ) par les LDGs a été ainsi mise en évidence et serait suffisante pour interférer avec la capacité des cellules endothéliales progénitrices de se différencier en cellules endothéliales matures (129). Ce mécanisme est impliqué dans les stades précoces d'athérosclérose et touche également les patients de lupus.

Il a été démontré que les LDGs favorisent un état inflammatoire via une capacité augmentée à générer des NETs, et ce suite à différents stimuli (IFN type I, complexes immunitaires) (144). Les NETs vont entre autres :

- Stimuler la machinerie inflammatoire impliquant l'inflammasome NLRP3. Une fois que ce dernier active son récepteur, une cascade de recrutement se met en place pour aboutir à la maturation de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 (145).
- Générer la formation d'anticorps contre le soi. En effet, ils exposeraient de fortes concentrations de matériel antigénique, comme l'ADN double brin et le peptide LL-37 (144). La NETose implique des modifications post-traductionnelles des histones (oxydation, méthylation, citrullination) qui seraient inductrices de la formation d'anticorps contre le soi chez les patients atteints de lupus (146, 147).

La capacité de dégradation des NETs est diminuée chez les patients atteints de lupus. Leur demi-vie peut être augmentée par divers facteurs : la protection de l'ADN contre l'action de nucléases par certaines protéines des NETs, l'inhibition directe de la DNase-1 circulante par le C1q déposé sur les NETs (148) et un déficit génétique en DNase (149). Récemment, dans une étude prospective, ce défaut dans la dégradation des NETs a été associé à certains paramètres cliniques des patients comme le développement d'une glomérulonéphrite ou la présence d'anticorps anti-ADN et anti-histones (150). L'amélioration des scores cliniques après traitement est associée à une meilleure capacité à dégrader les NETs. Cette capacité augmentée à former des NETs, associées à une incapacité à les dégrader peuvent résulter en la persistance non désirée de matériel antigénique ce qui va induire la formation de cytokines pro-inflammatoires et l'entrée dans un cercle vicieux. D'autres propriétés des LDGs ont été mises en évidence, notamment leur capacité phagocytaire diminuée (129) par rapport aux autres neutrophiles.

3.2. Propriétés immunosuppressives

Les G-MDSCs sont notamment retrouvés dans certains cancers, d'atteinte du sida ou encore chez les donneurs recevant du G-CSF. Les G-MDSCs sont constitués de cellules immatures et matures. Leur effet immunodépresseur se définit majoritairement par leur capacité à inhiber l'activation/prolifération des lymphocytes T. Le mécanisme impliqué est mal connu à ce jour, mais il semble que cela soit dû à une surproduction d'arginase 1 et/ou de FRO (133).

4. Origine et stade de différenciation des LDGs

Cette question est une des problématiques les plus brûlantes sur les LDGs. Cela s'explique notamment par les écarts obtenus entre les études sur la morphologie du noyau, l'expression génique et la caractérisation des molécules présentes à la surface de ces cellules. Comme on peut le voir dans le tableau 1, si parfois la morphologie du noyau et les gènes exprimés penchent plus pour un phénotype immature, l'analyse des marqueurs de surface favorise l'idée d'un granulocyte mature.

Le seul consensus actuel qui semble donc acceptable serait que les LDGs soient une population hétérogène de cellules matures et immatures. D'autres études portant sur le contenu protéique des différents granules des LDGs permettraient d'en savoir plus et de s'orienter vers une des hypothèses actuelles sur l'origine des LDGs. L'interrogation de savoir si les LDGs sont libérés de la moelle osseuse suite à un stimulus particulier (cytokines, complexes immuns, ...) ou si ce sont des NDNs dont les caractéristiques (expression génique, phénotype, ...) sont modifiées suite à un message chimique précis. Dans le cas de la première hypothèse, on peut également se demander si les LDGs sont des neutrophiles immatures dont la granulopoïèse a été arrêtée précocement par le stimulus incriminé ou s'ils sont directement ainsi formés à cause de la pathologie en cause. Une étude récente fournit une piste de réponse. Singh et son équipe se sont intéressés aux altérations génomiques rencontrées dans les LDGs des patients atteints de lupus (151). Ils ont relevé plusieurs indicateurs de mutations au niveau somatique qui sont compatibles avec des dommages génétiques ou de l'instabilité génomique (151). Cela suggère que les LDGs dérivent de cellules progénitrices différentes de celles des NDNs.

Pathologie	Marqueurs (CD)	MET	Giemsa	Observations
Lupus érythémateux systémique	10 ⁺ , 11c ^{lo} , 14 ^{lo} , 15 ^{hi} , 16 ^{hi} , 31 ⁺ , 114 ⁺ , 116 ⁻	Mature, moins segmentée	Hétérogène (myeloid-like, en bande)	<ul style="list-style-type: none"> • Phagocytose ↘ • Sécrétion cytokines ↗ • NETose ↗ • Lien avec lésions
Psoriasis	10 ⁺ , 14 ^{lo}	Non-évaluée	Non-évaluée	<ul style="list-style-type: none"> • NETose ↗ • Sécrétion IL-17
Sida (VIH)	11b ^{hi} , 15 ^{hi}	Mature, segmentée	Non-évaluée	<ul style="list-style-type: none"> • Activité arginase faible • Lien avec activité de la maladie
Cancer	11b ^{hi} , 13 ^{hi} , 15 ^{hi} , 16 ^{lo} , 24 ^{hi} , 33 ^{hi} , 62L ^{lo} , 66b ^{hi} , VEGFR1 ^{hi}	Non-évaluée	Population hétérogène	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibe prolifération lymphocytes T et la production d'IFNγ
Infection sévère (sepsis)	10 ⁻	Mature, dégranulée avec plusieurs vacuoles	Non-évaluée	<ul style="list-style-type: none"> • Chémotactisme ↘ • Activité β-glucuronidase minimale
Asthme	15 ^{hi} , 11b ^{hi} , 66b ^{hi}	Non-évaluée	Hétérogène	<ul style="list-style-type: none"> • Possible lien entre niveaux de LDGs et sévérité
Malaria	14 ^{lo} , 66b ^{hi} , 16 ^{hi} , CCR5 ^{high} , SSC ^{high}	Non-évaluée	Non-évaluée	/
Dermatomyosite	14 ^{lo} , 15 ^{hi}	Non-évaluée	Non-évaluée	<ul style="list-style-type: none"> • Lien entre niveaux de LDGs et sévérité
Tuberculose pulmonaire	14 ^{lo} , 15 ^{hi} , 33 ^{hi} , 62L ^{lo} , 66b ^{hi}	Non-évaluée	Non-évaluée	<ul style="list-style-type: none"> • ERO ↗ • <i>Mtb</i> induit production de LDGs à partir de NDNs

Tableau 1 : Caractéristiques des granulocytes de faible densité (LDGs) dans différentes maladies.

Tableau indiquant les marqueurs de surface dont l'expression variait chez les LDGs par rapport aux neutrophiles de densité normale (+ pour présence, - pour absence, hi pour supérieure, lo pour inférieure), l'aspect des populations selon 2 modalités de microscopie (microscopie optique après coloration au Giemsa et MET pour microscopie électronique à transmission) et les observations quant à leur fonction (*Mtb* = *Mycobacterium tuberculosis*). Modifié de (134) et complété avec (152-154).

5. Les LDGs dans les pathologies

5.1. Les LDGs et le lupus

Le lupus érythémateux systémique (LES) est une maladie caractérisée par la présence d'auto-anticorps principalement dirigés contre des antigènes nucléaires, en particulier l'ADN double brin et différentes protéines du noyau. Il va donc y avoir une attaque du tissu conjonctif contenu dans tout l'organisme : peau, yeux, tendons, muscles, organes, ...

Une association entre les LDGs et des dommages endothéliaux a déjà été mise en évidence dans le cadre du LES (129). À travers la NETose, il apparaît que les LDGs ont une capacité augmentée d'induire la mort cellulaire de cellules endothéliales. En présence d'une nucléase micrococcalle, les effets cytotoxiques des LDGs sont inhibés (144). Les patients atteints de LES sont plus sensibles au développement de complications cardiovasculaires. Cela est dû au développement accéléré de lésions d'athérosclérose. En condition d'homéostasie, il y a un équilibre entre dommages et réparations cellulaires. Dans le LES, cet équilibre est notamment rompu au niveau vasculaire avec une apoptose accélérée des cellules endothéliales et la formation de nouvelles cellules anormales phénotypiquement et fonctionnellement (155, 156). Une étude *in vitro* a mis en évidence que suite à la destruction des LDGs, les cellules endothéliales ont de nouveau une différenciation normale (129).

5.2. Les LDGs dans les autres pathologies

Les LDGs ont été rapportés dans des cas de sida (138, 139), le sepsis (137), le psoriasis (157), la malaria (152), la maladie granulomateuse chronique (158) et plus récemment dans la tuberculose pulmonaire (153) et la dermatomyosite (154). Des études sur des animaux chez qui la maladie a été induite ont également relevé une hausse du nombre de LDGs circulants comme par exemple dans l'arthrite induite par le pristane (huile) chez le rat (159) ou encore dans le cas d'infection avec le virus de la peste porcine (160). Dans ces pathologies, les LDGs n'ont pas été autant caractérisés que dans le cas du lupus et il est encore incertain à ce jour s'ils représentent bien un phénotype distinct de neutrophiles ou si ce sont simplement des neutrophiles ayant partiellement dégranulés d'où leur densité plus faible que les autres. On peut citer comme exemple les cellules ressemblant à des neutrophiles et qui ont été retrouvées dans la couche de PBMCs chez des patients en sepsis. Elles présentaient la singularité d'avoir une réponse chimiotactique et une activité enzymatique de la β -glucuronidase diminuées (161). Cependant, l'étude de leur morphologie et de leurs marqueurs de surface indiquent que ce sont des neutrophiles matures dégranulés avec un cytoplasme vacuolisé.

5.3. Les LDGs et l'asthme humain

Les neutrophiles sont de plus en plus impliqués dans la physiopathologie de l'asthme humain sévère (101, 104) ou encore corticorésistant (102). Il a été observé que le pourcentage de LDGs est plus important chez les patients asthmatiques (162). Les valeurs les plus élevées se retrouvent notamment dans les cas d'asthme modéré persistant à sévère (maximum atteint étant de 39% dans les cas d'asthme sévère). Précisons également que ces patients recevaient

des corticostéroïdes par inhalation, ce qui peut avoir un impact sur le nombre de LDGs circulants, mais l'effet de cette thérapie sur ce sous-type de neutrophiles est encore inconnu à ce jour. Il semble donc exister un lien entre le niveau de LDGs et la sévérité de l'asthme. On sait peu de choses par contre sur les LDGs et leur rôle dans cette condition.

Les LDGs présentent différences fonctionnelles et morphologiques par rapport aux neutrophiles normaux, mais il est encore impossible de savoir si la dégranulation explique également les différences fonctionnelles ou si ce sont des neutrophiles fondamentalement différents de ceux avec une densité normale. Une étude approfondie concernant la morphologie, le contenu granulaire et les caractéristiques fonctionnelles des LDGs est donc importante afin d'en savoir plus notamment sur leur origine, leurs caractéristiques et leur rôle qui semblent varier selon la pathologie.

Chapitre VI : Hypothèses et Objectifs

1. L'asthme équin sévère

Une pathologie du cheval, conséquence de la domestication de cet animal, partage plusieurs aspects de cette maladie humaine : l'asthme équin sévère (ou plus communément appelé souffle) (163). Cette dernière est donc proposée comme modèle animal pour l'étude de l'asthme, et ce à plusieurs égards (164, 165). Le souffle est une pathologie naturelle notamment caractérisée par une neutrophilie pulmonaire chez le cheval, permettant ainsi d'évaluer des changements structuraux complexes et leur évolution dans le temps. De plus, de par sa taille, le cheval présente un volume sanguin et pulmonaire importants, ce qui facilite l'étude de plusieurs paramètres simultanément. Un point non négligeable est le fait que l'on puisse induire un état de rémission chez le cheval ce qui n'est pas systématiquement possible avec d'autres modèles animaux. Cette caractéristique permet la réutilisation ultérieure des animaux (moins d'euthanasie).

Cette prédominance des neutrophiles dans les voies respiratoires des chevaux asthmatiques (et dans certains cas d'asthme humain) et son association à des lésions tissulaires soulève des questions quant aux paramètres et la cascade d'évènements responsables du recrutement des neutrophiles et de leur activation.

2. Hypothèses et objectifs

À la lumière de ces informations, nous avons entrepris d'étudier dans le cadre de ce mémoire un aspect de l'hétérogénéité des neutrophiles démontrée précédemment et notamment la caractérisation des LDGs dans l'inflammation asthmatique. Notre hypothèse générale est que les LDGs sont présents en plus grand nombre dans le sang périphérique des chevaux asthmatiques et qu'ils comportent des caractéristiques distinctes des neutrophiles de densité normale.

Nous avons pour objectifs de comparer le taux de ces LDGs dans le sang des chevaux asthmatiques par rapport aux chevaux sains et de les caractériser sur les plans morphologique, phénotypique et fonctionnel.

PARTIE B : ARTICLE



Mémoire de maîtrise présenté sous forme d'article,
en accord avec Dr J.P. Lavoie (directeur de recherche) et Dr J. Lussier (vice-doyen).

Article rédigé en vue d'être soumis au « Scientific Report »

Article en cours de préparation pour soumission.

Dans le cadre de ce projet de maîtrise, j'ai contribué à l'élaboration du protocole de recherche, à toutes les phases expérimentales, à l'analyse des résultats et des statistiques et à la rédaction de l'entièreté de l'article.

CHARACTERIZATION OF CIRCULATING LOW-DENSITY NEUTROPHILS INTRINSIC
PROPERTIES IN HEALTHY AND ASTHMATIC HORSES.

Nicolas Herteman, Amandine Vargas, Jean-Pierre Lavoie

Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal.

Running head : Low-Density Neutrophils in health and disease.

Abbreviations

BAL	Bronchoalveolar lavage
CD	Cluster of differentiation
fMLP	N-formylmethionine-leucyl-phenylalanine
fMLP-R	N-formylmethionine-leucyl-phenylalanine receptor
G-MDSCs	Granulocytic myeloid-derived suppressor cells
LDGs	Low-density granulocytes
LDNs	Low-density neutrophils
MPO	Myeloperoxidase
NDNs	Normal-density neutrophils
NETs	Neutrophil extracellular traps
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
ROI	Region of interest
SLE	Systemic lupus erythematosus

Corresponding author

Dr. Jean-Pierre Lavoie, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Clinical Sciences,
Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada J2S 2M2, email: jean-
pierre.lavoie@umontreal.ca

1. ABSTRACT

Low-density neutrophils (LDNs) are a subset of neutrophils first described in the bloodstream upon pathological conditions, and recently, in the blood of healthy humans. LDNs may have an enhanced pro-inflammatory (low-density granulocytes, LDGs) or an immunosuppressive (Granulocytic myeloid-derived suppressor cells, G-MDSCs) profile. Whether these characteristics are specific to LDNs or related to disease states is unknown. Thus, we sought to investigate the properties of LDNs in both health and disease states, and to compare them to those of autologous normal-density neutrophils (NDNs). We studied 8 horses with severe equine asthma and 11 healthy animals. Neutrophil morphology was evaluated using optical microscopy, and the content in myeloperoxidase and in N-formylmethionine-leucyl-phenylalanine receptors (fMLP-R) was assessed using flow cytometry and immunofluorescence, respectively. The functional capacity of LDNs to spontaneously release neutrophil extracellular traps (NETs) when stimulated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) was determined with confocal microscopy.

LDNs were smaller and contained more fMLP-R than NDNs, but the myeloperoxidase content was similar in both cell populations. They also had an increased capacity to produce NETs, and were more sensitive to activation by PMA. This profile is suggestive of LDGs. These characteristics were similar in both healthy and diseased animals, indicating that these are intrinsic properties of LDNs. Furthermore, these results suggest that LDNs represent a population of primed and predominantly mature cells. This study is the first to characterize LDNs in health, and to compare their properties with those of NDNs and of animals with a naturally occurring disease.

Introduction

Neutrophils are key players in the inflammatory response, and they are the first leukocytes to reach tissues to fight against infectious agents and various other aggressors (41). They were initially considered terminally differentiated cells (54), but it is now recognized that neutrophils are a heterogeneous cell population, composed of subsets displaying distinct properties (3, 47). Low-density neutrophils (LDNs) are neutrophils that co-segregate with blood mononuclear cells after density-gradient separation techniques. They have been reported to be present in the bloodstream of human patients suffering from autoimmune disorders (e.g. systemic lupus erythematosus or SLE) (2, 20, 26, 50, 56), systemic and local infection (12, 13, 19, 21, 35, 38) and dermatomyelosis (57). LDNs with still unknown functions have been also identified in patients with malaria (44) and asthma (22). LDNs have also been observed in the peripheral blood of pigs after experimental viral infection (42) and of rats with pristane-induced arthritis (28).

Several findings in humans suggested that LDNs can display an enhanced pro-inflammatory profile with an increased synthesis of cytokines (TNF- α , IL-6/-8, IFN type I) (20), capable of contributing to neutrophilic recruitment and persistence in chronic inflammatory conditions. They also have an increased proclivity to spontaneously produce neutrophil extracellular traps (NETs) (56), in a process known as NETosis (7), and circulating LDN levels are correlated with disease state and severity in humans (13, 22, 39). Because of these findings, LDNs were initially considered as an aberrant, pathological population of cells (20, 39), and the term "low density granulocytes" (LDGs) has been introduced to describe LDNs with pro-inflammatory properties. Since then, however, LDNs were reported to also be present in the bloodstream of healthy

human subjects (13, 22, 53) suggesting that similarly to NDNs, they are a normal cell population that may be increased in number under disease conditions.

Because of their expression of defensin (2) and their morphology (26), it has been postulated that LDNs are immature cells, progenitors of normal-density neutrophils (NDNs) that are prematurely released from the bone marrow secondary to an increased recruitment during inflammation (10). Conversely, it has been suggested that LDNs are mature NDNs activated following inflammatory signals (10) or that they derived from progenitor cells distinct from those leading to NDNs (50). However, it was also proposed that they were a mixed population (20) or even, mostly mature cells (19). Clearly, the presence of LDNs in the blood of healthy individuals, their maturation status, their origin, and their enhanced pro-inflammatory profile compared to NDNs, remain controversial. Therefore, the present study was performed to evaluate the properties of LDNs in health and during chronic asthmatic inflammation. We hypothesized that LDNs have several characteristics that may not be influenced by the health status of the subject. We first determined that LDNs were present in the blood of healthy horses and of animals affected with severe equine asthma (heaves), a neutrophilic inflammatory airway disease commonly affecting adult horses (34). We then characterized these cells (morphologically, phenotypically and functionally) both in healthy and diseased horses.

Material and methods

1. Experimental design

Study 1: 14 horses (6 healthy and 8 asthmatic) were stabled and fed hay for at least 30 days to cause exacerbation of asthma in susceptible animals. The amount of circulating LDNs, and the morphological (diameter and segmentation of nuclei) and phenotypical (flow cytometry and immunofluorescence) evaluations of neutrophils (LDNs and NDNs) were studied. The amount of circulating LDNs was also evaluated in 6 of these asthmatic horses while at pasture for 6 weeks to induce clinical remission of the disease.

Study 2: The production of NETs by LDNs and NDNs was assessed in 12 horses (6 healthy and 6 asthmatic) stabled and fed hay for at least 30 days.

2. Animals

Eight mixed-breed adult horses with severe asthma (means of 527.6 ± 16.3 kg and 15.1 ± 1.78 years of age, mean \pm SEM) and 11 age-matched healthy controls (means of 512.7 ± 7.41 kg and 12.4 ± 1.16 years of age) from the research herd of the Equine Asthma Research Laboratory at the Université de Montréal (including 16 mares and 3 geldings) were studied. The two groups of horses were housed together during the entire course of the study. Horses with severe equine asthma had a previous history of airway obstruction documented by lung function measurements and pulmonary neutrophilia in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) ($\geq 25\%$) upon stabling and hay feeding (15). Control horses had no history or clinical signs suggesting airway diseases. The degree of respiratory impairment in horses were assessed daily by clinical scoring (43, 45). A score from 0 to 4 is attributed to nasal flaring (0: no flaring; 4: severe, continuous flaring during each respiration) and abdominal movement (0: no abdominal effort; 4: severe, marked

abdominal movement). Both scores are added for a maximal score of 8. Scores ≥ 4 indicates respiratory dysfunction. Furthermore, at the beginning of the study and at the time of the sampling, respiratory mechanics were performed using an impulse oscillometry (IOS) device as described by Van Erck et al. (55) with the Equine MasterScreen IOS system (Jaeger, Würzburg, Germany). However, these data are not presented in this paper because part of another study conducted by Fillion-Bertrand et al. (paper in redaction) at the same time than our and including the same horses. All experimental procedures were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council for Animal Care and were approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal (Rech-1716).

3. Neutrophil Isolation

Blood was drawn by venipuncture in a jugular vein using sterile heparinized tubes (Tyco healthcare, Pointe-Claire, QC, Canada). NDNs and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated according to the manufacturer's instructions. Briefly, after 30 to 45 minutes of sedimentation, the plasma-rich layer was recovered and used in a density gradient centrifugation method with Ficoll-PaqueTM Premium 1084 (GE Healthcare Bio-sciences Corp, Mississauga Canada). Five ml of the PBMCs layer was harvested (Figure 1) and the NDNs layer was collected in the bottom of the tubes after erythrocyte lysis using a hypotonic treatment with distilled water (Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada). Cells were washed and suspended in a buffer solution containing PBS 1X, EDTA 0.5 mM (Thermo Fisher Scientific), and BSA 0.2% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Cell counting and viability were evaluated using ADAM automatic Cell Counter (Montreal-Biotech Inc., Montréal, QC, Canada). The viability of NDNs and PMBCs were $98.23 \pm 0.22\%$ (mean \pm SEM), and $98.63 \pm 0.33\%$, respectively.

Cytopreparations (Cytospin, Rottorfix Hettish) were stained with Protocol Hema 3 (Fisher Canada, Nepean, Canada) and a differential count performed on 400 cells, with the assessor blinded to sample origin. The purity of NDNs was $97.7\% \pm 0.37$. There were $5.77\% \pm 0.58$ LDGs in PMBCs layers for the control horses and $26.81\% \pm 4.19$ for the asthmatic horses. Cells were then fixed 20 minutes in paraformaldehyde 2%, washed three times in PBS 1X and stored in 500 μ L of PBS 1X at 4°C until analyses.

4. Flow cytometry

Intracellular MPO content was evaluated in each layer (NDNs and LDNs). Prior to staining, 10^6 cells were harvested and washed twice in PBS 1X. All antibody incubation steps were performed at room temperature.

Granulocytes and PMBCs/LDNs were resuspended in blocking buffer (PBS 1X containing 2% FBS) and incubated on ice for 20 minutes. The cells suspension was then permeabilized with 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for 5 min and incubated with anti-rabbit MPO (IgG, 16 mg/L, Dako, Denmark) and with a monoclonal canine DH24A antibody (18, 30, 32) (IgM, 15 μ g/mL, VMRD, Pullman WA, USA) for 45 minutes in order to select equine neutrophils. After three washes in washing buffer, cells were incubated in dark for 45 min with secondary goat Alexa488-coupled anti-rabbit IgG antibodies (1:500 in washing buffer, Thermo Fisher Scientific) and goat PE anti-mouse IgM antibody (1:1000 in washing buffer, Invitrogen). Cells were then washed twice in washing buffer (PBS 1X) and suspended in 500 μ L PBS before flow cytometry acquisition of 10 000 events and analysis using Cellquest Pro software on a FACScalibur instrument (BD Biosciences). Isotype-matched control antibodies (mouse IgM and rabbit IgG) were used to set photomultipliers (PTM) voltage and compensation parameters for fluorescence detection in FL-1 and FL-2 channels.

5. Immunofluorescence

N-formylmethionine-leucyl-phenylalanine receptor (fMLP-R) expression was evaluated in each layer (NDNs and LDNs). Prior to staining, 10^6 cells were harvested and washed twice in PBS 1X.

Granulocytes were resuspended in blocking buffer (PBS 1X containing 2% FBS) and incubated on ice for 20 min. The cell suspension was then permeabilized with 0.3% Triton X-100 and incubated with anti-FPRL1 antibody [GM1D6] (2 mg/mL; ab26316, Abcam, Germany) for 45 min. Cells were washed three times in washing buffer and incubated in dark for 45 min with secondary goat Alexa594-coupled anti-mouse IgG antibody (1:500 in washing buffer, Invitrogen) and 50 µg/ml of 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vector Laboratories). Cells were then washed twice in washing buffer and suspended in 500 µL PBS 1X, for finally being mounted in a drop of ProLong Antifade reagent (P36930; Invitrogen Canada).

Images were taken using an Axio Imager M.1 microscope (Zeiss) and analyzed using Zen software (Figure 6A). A library of images was randomly established in order to have at least 200 granulocytes for each slide. Cells were identified as neutrophils based on nuclear morphology (segmentation of the nucleus) and because of the paucity in eosinophils and basophils (data not shown) by an operator blinded to horses and to the layer.

6. Morphological evaluation

Granulocytes (NDNs and LDNs) were classified as immature or mature according to their nuclear segmentation. Nuclei displaying >2 nuclear lobes were considered as mature, those with ≤2 lobes were classified as immature granulocytes (Figure 3A). At least 400 granulocytes were evaluated by an assessor blinded to sample origin.

All slides were then digitized at 200× magnification with the NanoZoomer 2.0-HT system (Hamamatsu Photonics, SZK, Japan). The diameter of each type of granulocyte was measured using ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) with cells approximated as circles. The evaluator was blinded to slide identification and measurements were over 200 randomly selected granulocytes.

7. Induction of NET formation and DNA staining

Neutrophils were isolated as described above except that blood was drawn in sterile EDTA tubes, as heparin dismantles NETs (23). They were resuspended in complete RPMI and seeded (10^6) onto six-well plates containing 1.5 mm-thick poly-L-lysine-coated coverslips, stimulated for 3 h with 200 nM phorbol myristate acetate (PMA), and fixed for 20 min in cold methanol. After three washes in PBS 1X, a DNA-staining technique is performed by incubation of cells with propidium iodide (PI; 50 µg/ml) for 5 min at room temperature, and washed three times with PBS. The coverslips were then mounted in a drop of ProLong Antifade reagent (Thermo Fisher Scientific) and images were acquired with a MRC1024 confocal laser-scanning microscope at magnification x100 (BioRad, Hercules, CA) equipped with a Nikon Eclipse TE300 camera (Nikon, Tokyo, Japan) and a Perfect Focus System (Figure 8A).

8. NET quantification

NET production was blindly assessed with NewCast software version 4.5.1.324b (Visiopharm, Denmark). A region of interest (ROI) was defined, for each image in order to exclude the border of the slides (5 mm from the border of each side). The regions where the focus prevented a reliable assessment of the cells were excluded. The NET mean area per granulocyte was assessed on 25% of the ROI (randomly selected by the software). A point counting technique using grids with 900 crosses per screen was performed (this point density allowed to reliably evaluate the structures of interest). NET mean area per granulocyte was calculated for each horse

as follows: $A_{NETs} = (4 * A_{cross} * \Sigma P_{NETs}) / (\text{Estimated number of granulocytes})$, where A_{cross} indicates the area occupied per one cross (area of the ROI divided per 900) and ΣP_{NETs} the sum of the points falling onto a NETs. The differential count of granulocytes per layer allowed the correction of the calculated area by the number of studied cells in each image (differential * 1×10^6).

9. Statistical analysis

Analyses were carried out using Prism 6.05 (GraphPad Software Inc, CA, USA). For cells quantification, data were analyzed with unpaired t-tests with Welch's correction. For all other analysis, a two-way repeated measures ANOVA with a Sidak's multiple comparisons post-test. For NET quantification, differences between means were analyzed using t test or by a two-way repeated measures ANOVA with or without Sidak's multiple comparison post-tests, where a $p \leq 0.05$ was considered significant.

All the results are expressed regarding the following presentation: mean \pm SEM.

Results

1. Quantification of Low-Density Neutrophils in the PBMCs

LDNs were identified in the PBMC layer from both healthy and asthmatic horses, and levels were not affected by the age and the sex of the animals. Horses with severe asthma in exacerbation of the disease had a significantly greater percentage ($35.9\% \pm 7.13$) and absolute number ($1.05 \cdot 10^6 \pm 2.89 \cdot 10^5$ cells per ml) of LDNs in the PBMC layer compared with controls ($7.0\% \pm 0.62$, $p = 0.05$ and $2.48 \cdot 10^5 \pm 5.19 \cdot 10^4$ cells per ml, $p = 0.03$, respectively; Figure 2A-B). The percentages of LDNs decreased during disease remission in 5 of the 6 asthmatic horses when compared to disease exacerbation, but this difference was not statistically significant ($p = 0.11$, Figure 2C).

There was a significant increase of the NDN absolute number in severe equine asthma ($3.94 \cdot 10^6 \pm 5.91 \cdot 10^5$) when compared to controls ($2.63 \cdot 10^6 \pm 3.05 \cdot 10^5$, $p = 0.04$), but the values remained within the normal range for this species (51). There were no other significant differences in the numbers of cells isolated from each layer in all groups (data not shown). Eosinophils were only found in the normal density layer. The values remained within the normal range for horses (51) and no difference between control and asthmatic horses ($4.73 \cdot 10^5 \pm 1.13 \cdot 10^5$ and $5.34 \cdot 10^5 \pm 1.10 \cdot 10^5$, respectively; data not shown) were observed.

2. Morphological evaluation

Morphological evaluation was performed to assess the maturity of LDNs. Immature granulocytes were considered as having a hyposegmented nucleus with 2 lobes or less, but also a greater diameter (Figure 3A) (11, 36). In each group of horses, there was had significantly less LDNs with a normally segmented nucleus ($88.7\% \pm 2.93$ in control horses and $89.9\% \pm 2.53$ in

asthmatic horses) compared to NDNs ($98.0\% \pm 0.59$ in control horses, $p = 0.03$ and $96.5\% \pm 0.36$ in asthmatic horses, $p = 0.05$; Figure 3B).

In both control and asthmatic horses, LDNs were significantly smaller ($10.82 \mu\text{m} \pm 0.22$, and $10.98 \pm 0.16 \mu\text{m}$, respectively; Figure 4) than NDNs ($12.10 \mu\text{m} \pm 0.34$, $p = 0.006$ and $12.82 \pm 0.22 \mu\text{m}$, $p < 0.0001$, respectively). There was no significant effect of the condition on the segmentation of the nucleus, nor on the cell diameter in either type of granulocytes. However, there was a trend for NDNs from asthmatic horses to be bigger than those of controls ($p=0.08$).

3. Flow cytometry

The intracellular levels of MPO have been used to evaluate the maturity of neutrophils and to determine if the cells had degranulated (20). LDNs and NDNs displayed comparable levels of intracellular MPO expression (Figure 5) in the present study and it was not affected by the health status of the animals.

4. Immunofluorescence

The level of expression of the fMLP-R in the granules increases in mature neutrophils (2). Significantly more LDNs expressed the fMLP-R ($69.9\% \pm 4.22$) when compared to NDNs ($21.0\% \pm 6.79$, $p < 0.0001$; Figure 6B). While severe equine asthma had no impact on the expression of fMLP-R in LDNs, they were significantly increase in asthmatic NDNs compared to those from healthy horses ($31.6\% \pm 10.6$ and $6.83\% \pm 1.40$, respectively; $p = 0.05$; Figure 6B).

5. NET production

NETs on confocal microscopy appear as a thin white filament originating from a nucleus and orientating toward another one (Figure 7A). Spontaneous NET formation was enhanced in LDNs when compared to NDNs in both group of horses (Figure 7B). After logarithm transformation, the mean NET area per neutrophil in control horses for LDNs and NDNs was 4.50 ± 0.07 log of μm^2 / neutrophil and -5.14 ± 0.14 ($p = 0.03$), respectively. In asthmatic horses, the values for LDNs and NDNs were -4.88 ± 0.12 and -5.57 ± 0.19 , respectively ($p = 0.02$). Stimulation with PMA significantly increased the production of NETs in both groups of horses ($p = 0.0008$, Figure 8A).

Fold increases also indicated that LDNs produced significantly more NETs than NDNs (between 2.40 to 4.70 more, $p < 0.001$, Figure 8B). When expressed as LDN/NDN ratios, NET mean area per neutrophil was significantly increased only in LDNs of control horses, in absence of PMA stimulation (3.70-fold increase, $p = 0.03$), when compared to asthmatic horses. However, asthmatic LDNs produced significantly more NETs with and without PMA (4.70-fold increase and $p = 0.001$ for non-stimulated, against a 4.60-fold increase and $p=0.0020$ for stimulated LDNs).

Discussion

LDNs are now recognized as a subset of neutrophils that may be found in the blood of human patients in association with disease severity in various inflammatory conditions. Whether the low buoyancy of these cells results from degranulation of NDNs, or from a distinct properties or maturation process is unclear, as their contribution to disease processes. The present study

provides new insights into several aspects of LDNs during asthmatic inflammation, but also importantly, in health. LDNs were present in the bloodstream of healthy horses and their levels were increased in asthmatic animals, as observed in humans (22). The LDNs levels in the blood of asthmatic horses decreased during clinical remission of the disease, but remained above those of healthy controls. Moreover, compared to autologous NDNs, LDNs exhibited morphological, phenotypical and functional differences that were present in both healthy and asthmatic horses. These results suggest that LDNs have intrinsic properties that are neither influenced nor secondary to asthma, but that these cells increase in number and may be primed during inflammatory states.

LDNs have intrinsic properties

Several differences between LDNs and NDNs were observed in the present study. LDNs were smaller than NDNs, which might contribute to their low buoyancy. Phenotypically, LDNs also had a different granular content (more fMLP-R) compared to NDNs and they had an increased capacity to produce NETs. These differences were present in both healthy and asthmatic horses, suggesting that these properties may be intrinsic to LDNs. fMLP-R are chemoattractant receptors that belong to the G protein-coupled receptor family (49). When activated by N-formyl peptides such as fMLP, they contribute to the physiological defense against bacterial infection and cell disruption (24). This increased fMLP-R in LDNs suggest that these cells are more sensitive to activation stimuli and is in agreement with their enhanced pro-inflammatory profile (20) and anti-bacterial activities. Regarding the low expression in NDNs, Snyderman and his team already demonstrated that equine neutrophils contain less fMLP-R compared to human (6, 17, 52). Furthermore, in a study previously conducted by our team, it appears that stimulation of equine NDNs with LPS/fMLP did not induce the expression of arginase 1 mRNA (31). The

low levels of fMLP-R may explain these results and, associated with the absence of chemotactic response to N-formylated peptides (52), illustrate possible immunosuppressive properties of some NDNs (17, 48).

LDNs are present in the bloodstream of healthy horses but there was a mean 5-fold increase in numbers in the blood of asthmatic horses, as reported in human asthma (22). The percentages of LDNs decreased, although not significantly, during disease remission when compared to exacerbation in asthmatic horses, and remained above values of controls, indicating that levels of LDNs vary with the severity of the disease. This is in agreement with the association between LDNs and human asthma severity (22) and the possible role of the LDNs as a clinical biomarker. The lack of significant difference between these two disease states is likely explained by the low power of the study for this effect (it was estimated that 2 additional asthmatic horses would have been necessary in order to have 80% of chances to observe a significant difference). Also, a longer period of antigen avoidance (pasture for 6 weeks here) may have resulted in a significant decrease of the LDNs when compared to exacerbation state or even to a complete resolution of the asthmatic inflammation (LDN values similar to control horses). Indeed, in patients with pulmonary tuberculosis, LDN levels required 2 weeks of medical treatment to significantly decreased, and a 6-month period to be equal to those of healthy volunteers (19).

LDNs are a mixed population of immature and mature cells

LDNs were first considered as immature cells because of their low buoyancy (2, 21, 26), their elevated expression of CD33 (13), and their granulopoiesis signature (2). In the present study, the receptor for the chemoattractant fMLP was used to assess maturity as it is synthesized in the final stage of the maturation of the neutrophils (16). The increased expression of fMLP-R in LDNs we observed at the proteomic level is in agreement with the increased mRNA expression

found in LSE children (2). Associated with the decreased diameter and the segmentation of the nuclei (11), with the lack of difference of the MPO content we observed, these findings suggest that LDNs are mostly a mature population of neutrophils, unlike what was initially suggested (10, 57). In general, hyposegmented neutrophils are larger than segmented neutrophils, it may seem then surprising that the overall size of LDN is smaller despite a larger proportion of hyposegmented cells. Cells counting and measurements were not realized at the same time. The exactly same cells are not retrieved in each data. Furthermore, it has been shown in human medicine that neutrophils of patients with moderate to severe asthma have larger neutrophils compared to healthy patients (33). This increase was attributed to the activation of the neutrophils and the formation of a lamellipodium (33). Same observations have been realized in our laboratory (unpublished data). This tendency is visible in our data (Figure 4) and may have partially biased our observation. The same observation could be awaited in LDNs but as previously demonstrated, they seem to have a diminished chemotactism (21) and then would not develop a lamellipodium. LDNs were also reported as mature neutrophils based on the surface molecular expression (CD10, CD15, CD16, CD66b, CD11b), although some cells had hyposegmented nuclei (band cells, lobular nuclei) rather indicating immaturity (2, 20, 22, 42).

NET production

Their increased formation of NETs in the present study suggests that LDNs in equine asthma have pro-inflammatory properties and may then belong to the group of LDGs. Furthermore, it suggest that they are more sensitive to activation stimuli compared to NDNs. NETs are chromatin filaments released by neutrophils that are associated with nuclear, cytoplasmic and granular proteins (7). They have a function in host defense by protecting against pathogens and

may cause direct epithelial and endothelial cell damages, by releasing toxic proteins (such as MPO) (46) and by exposing autoantigens (37). Two studies in humans (25, 56) have also reported that unstimulated LDNs undergo significantly more NET formation compared to NDNs. In severe equine asthma, but not in healthy horses, unstimulated and stimulated LDNs produced almost the same amount of NETs and they were more sensitive to the stimulation compared to NDNs. This is in agreement with the results of Villanueva et al. (56) in SLE patients, and support the hypothesis that these cells are primed in the diseased subjects (39).

Several hypotheses regarding LDN origin have been suggested. An unidentified stimulus may alter the normal development of neutrophils in the bone marrow (e.g. early release, altered gene expression) (10, 28) or may act directly on mature circulating neutrophils resulting in their lower buoyancy (e.g. activation, degranulation) (10, 19). Another hypothesis proposes that LDNs and NDNs originate from different progenitor cells (50). The evaluation of their surface markers in SLE patients indicated that LDNs may display some characteristics of activated neutrophils. However, other indexes (L-selectin shedding, levels of MPO and of ROS, transmission electron microscopy) rather suggested that they are not an activated and degranulated subset of neutrophils (10, 20). Our results with MPO mean fluorescence intensity would be in agreement with this latter observation. However, the increased NETs formation and fMLP-R production suggest that LDGs may nevertheless be more easily activated than NDNs (11). It is also consistent with their enhanced pro-inflammatory profiles in asthma as formylated peptides are well-known pro-inflammatory molecules (1, 29).

Horses and severe equine asthma as a model for LDN study

Severe equine asthma is a spontaneously and commonly occurring disease of adult horses, associated with bronchospasm, mucus accumulation and remodeling of the airways leading to

periods of dyspnea (8). Airway neutrophilia is a characteristic finding of this condition, with these cells infiltrating the lungs of susceptible horses as early as 5–6 h after antigen exposure, and preceding the development of airway obstruction (4). The increased circulating LDNs we observed in asthmatic horses indicates that they possibly contribute to the disease expression, by enhanced NET production. The presence of NETs in the lungs of asthmatic horses but not in controls has been reported (14).

Equine asthma is not only a disease of veterinary importance, but it is also considered as a suitable model for human asthma (8, 34), because of the numerous similarities between the conditions. Furthermore, equine and human neutrophils have similar biology (5, 9, 11, 27, 40) and the remodeling of asthmatic airways affects the epithelium, extracellular matrix and smooth muscle layers in both species (8). Results of the current study also indicate that horses are an appropriate model to study unresolved issues regarding the origin or the pathophysiology of LDNs in health, and their contribution to neutrophilic asthma. The size of horses facilitates these studies, as it allows collecting non-invasively large amount of blood (and cells) without altering the animal immune response and measuring various physiological parameters (BALF, respiratory mechanics, and lungs biopsies), without anesthesia, or scarifying the animals, as in rodents.

In conclusion, results of the present study suggest that LDNs in equine asthma are a population of mostly mature and primed cells, having characteristics that are distinct from those of NDNs, in both health and disease. According to the criteria enounced by the Scapini et al.(47, 48), it appears that LDNs in asthma have pro-inflammatory properties and are then LDGs. Our study also highlights the possible contribution of LDNs to domestic animal diseases and the suitability

of horses as a model for the study of LDNs in human asthma. The presence of LDNs in healthy patients suggests that they could be a physiologic subset of neutrophils with a purpose in the homeostasis of the organism and that their increased expression in some disease cause a dysregulation contributing to the pathogenesis. However, more data are required before to assess this hypothesis.

Grants

This study was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada (#RGPIN-2014-06-198).

Acknowledgements

The authors thank Dr. Carolyn Grimes and Dr. Caroline Cluzel for their expert counsel in clinical pathology, Dr. Sophie Mainguy-Seers for the help in sampling and Denis Flipo (Department of Biological Sciences, UQÀM) for the help with the confocal microscopy.

Conflict of Interest

No conflicts of interest, financial or otherwise are declared by the author(s).

References

1. **Bender JG, McPhail LC, and Van Epps DE.** Exposure of human neutrophils to chemotactic factors potentiates activation of the respiratory burst enzyme. *J Immunol* 130: 2316-2323, 1983.
2. **Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, and Pascual V.** Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 197: 711-723, 2003.
3. **Beyrau M, Bodkin JV, and Nourshargh S.** Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. *Open Biol* 2: 120134, 2012.
4. **Brazil TJ, Dagleish MP, McGorum BC, Dixon PM, Haslett C, and Chilvers ER.** Kinetics of pulmonary neutrophil recruitment and clearance in a natural and spontaneously resolving model of airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 35: 854-865, 2005.
5. **Brazil TJ, Dixon PM, Haslett C, Murray J, and McGorum BC.** Constitutive apoptosis in equine peripheral blood neutrophils in vitro. *Vet J* 202: 536-542, 2014.
6. **Brazil TJ, Rossi AG, Haslett C, McGorum B, Dixon PM, and Chilvers ER.** Priming induces functional coupling of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine receptors in equine neutrophils. *J Leukoc Biol* 63: 380-388, 1998.
7. **Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, and Zychlinsky A.** Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-1535, 2004.
8. **Bullone M, and Lavoie JP.** Asthma "of horses and men"--how can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences? *Mol Immunol* 66: 97-105, 2015.
9. **Bullone M, Moran K, Lavoie-Lamoureux A, and Lavoie JP.** PI3K and MAPKs regulate neutrophil migration toward the airways in heaves. *J Vet Intern Med* 27: 164-170, 2013.
10. **Carmona-Rivera C, and Kaplan MJ.** Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin Immunopathol* 35: 455-463, 2013.
11. **Carvalho LO, Aquino EN, Neves AC, and Fontes W.** The Neutrophil Nucleus and Its Role in Neutrophilic Function. *J Cell Biochem* 116: 1831-1836, 2015.
12. **Cloke T, Munder M, Bergin P, Herath S, Modolell M, Taylor G, Muller I, and Kropf P.** Phenotypic alteration of neutrophils in the blood of HIV seropositive patients. *PLoS One* 8: e72034, 2013.
13. **Cloke T, Munder M, Taylor G, Muller I, and Kropf P.** Characterization of a novel population of low-density granulocytes associated with disease severity in HIV-1 infection. *PLoS One* 7: e48939, 2012.

14. **Cote O, Clark ME, Viel L, Labbe G, Seah SY, Khan MA, Douda DN, Palaniyar N, and Bienzle D.** Secretoglobin 1A1 and 1A1A differentially regulate neutrophil reactive oxygen species production, phagocytosis and extracellular trap formation. *PLoS One* 9: e96217, 2014.
15. **Couetil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Leguillette R, and Richard EA.** Inflammatory Airway Disease of Horses--Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med* 30: 503-515, 2016.
16. **Cowland JB, and Borregaard N.** The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. *J Leukoc Biol* 66: 989-995, 1999.
17. **Dahlgren C, Gabl M, Holdfeldt A, Winther M, and Forsman H.** Basic characteristics of the neutrophil receptors that recognize formylated peptides, a danger-associated molecular pattern generated by bacteria and mitochondria. *Biochem Pharmacol* 114: 22-39, 2016.
18. **Dauvillier J, Felipe MJ, Lunn DP, Lavoie-Lamoureux A, Leclere M, Beauchamp G, and Lavoie JP.** Effect of long-term fluticasone treatment on immune function in horses with heaves. *J Vet Intern Med* 25: 549-557, 2011.
19. **Deng Y, Ye J, Luo Q, Huang Z, Peng Y, Xiong G, Guo Y, Jiang H, and Li J.** Low-Density Granulocytes Are Elevated in Mycobacterial Infection and Associated with the Severity of Tuberculosis. *PLoS One* 11: e0153567, 2016.
20. **Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, Thacker SG, Anderson M, Sandy AR, McCune WJ, and Kaplan MJ.** A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J Immunol* 184: 3284-3297, 2010.
21. **Drifte G, Dunn-Siegrist I, Tissieres P, and Pugin J.** Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 41: 820-832, 2013.
22. **Fu J, Tobin MC, and Thomas LL.** Neutrophil-like low-density granulocytes are elevated in patients with moderate to severe persistent asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 113: 635-640 e632, 2014.
23. **Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Jr., Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, and Wagner DD.** Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 15880-15885, 2010.
24. **Gao JL, Lee EJ, and Murphy PM.** Impaired antibacterial host defense in mice lacking the N-formylpeptide receptor. *J Exp Med* 189: 657-662, 1999.
25. **Grayson PC, Carmona-Rivera C, Xu L, Lim N, Gao Z, Asare AL, Specks U, Stone JH, Seo P, Spiera RF, Langford CA, Hoffman GS, Kallenberg CG, St Clair EW, Tchao NK,**

Ytterberg SR, Phippard DJ, Merkel PA, Kaplan MJ, Monach PA, and Rituximab in A-AV-ITNRG. Neutrophil-Related Gene Expression and Low-Density Granulocytes Associated With Disease Activity and Response to Treatment in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. *Arthritis Rheumatol* 67: 1922-1932, 2015.

26. **Hacbarth E, and Kajdacsy-Balla A.** Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever. *Arthritis Rheum* 29: 1334-1342, 1986.

27. **Hirsch G, Lavoie-Lamoureux A, Beauchamp G, and Lavoie JP.** Neutrophils are not less sensitive than other blood leukocytes to the genomic effects of glucocorticoids. *PLoS One* 7: e44606, 2012.

28. **Hoffmann MH, Bruns H, Backdahl L, Neregard P, Niederreiter B, Herrmann M, Catrina AI, Agerberth B, and Holmdahl R.** The cathelicidins LL-37 and rCRAMP are associated with pathogenic events of arthritis in humans and rats. *Ann Rheum Dis* 72: 1239-1248, 2013.

29. **Issekutz AC, Lee KY, and Biggar WD.** Enhancement of human neutrophil bactericidal activity by chemotactic factors. *Infect Immun* 24: 295-301, 1979.

30. **Lavoie-Lamoureux A, Beauchamp G, Quessy S, Martin JG, and Lavoie JP.** Systemic inflammation and priming of peripheral blood leukocytes persist during clinical remission in horses with heaves. *Vet Immunol Immunopathol* 146: 35-45, 2012.

31. **Lavoie-Lamoureux A, Martin JG, and Lavoie JP.** Characterization of arginase expression by equine neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol* 157: 206-213, 2014.

32. **Lavoie-Lamoureux A, Moran K, Beauchamp G, Mauel S, Steinbach F, Lefebvre-Lavoie J, Martin JG, and Lavoie JP.** IL-4 activates equine neutrophils and induces a mixed inflammatory cytokine expression profile with enhanced neutrophil chemotactic mediator release ex vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299: L472-482, 2010.

33. **Leckie MJ, Bryan SA, Khan J, Dewar A, Aikman SL, McGrath J, Okrongly DA, Burman JF, Barnes PJ, and Hansel TT.** Automated quantitation of circulating neutrophil and eosinophil activation in asthmatic patients. *Thorax* 55: 471-477, 2000.

34. **Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, and Lavoie JP.** Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology* 16: 1027-1046, 2011.

35. **Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, Wang JY, Riblett M, Yalavarthi S, Villanueva EC, Shah P, Kaplan MJ, and Bruce AT.** Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol* 187: 490-500, 2011.

36. **Linderkamp O, Ruef P, Brenner B, Gulbins E, and Lang F.** Passive deformability of mature, immature, and active neutrophils in healthy and septicemic neonates. *Pediatr Res* 44: 946-950, 1998.

37. **Liu CL, Tangsombatvisit S, Rosenberg JM, Mandelbaum G, Gillespie EC, Gozani OP, Alizadeh AA, and Utz PJ.** Specific post-translational histone modifications of neutrophil extracellular traps as immunogens and potential targets of lupus autoantibodies. *Arthritis Res Ther* 14: R25, 2012.
38. **Lood C, Blanco LP, Purmalek MM, Carmona-Rivera C, De Ravin SS, Smith CK, Malech HL, Ledbetter JA, Elkon KB, and Kaplan MJ.** Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat Med* 22: 146-153, 2016.
39. **Midgley A, and Beresford MW.** Increased expression of low density granulocytes in juvenile-onset systemic lupus erythematosus patients correlates with disease activity. *Lupus* 25: 407-411, 2016.
40. **Murcia RY, Vargas A, and Lavoie JP.** The Interleukin-17 Induced Activation and Increased Survival of Equine Neutrophils Is Insensitive to Glucocorticoids. *PLoS One* 11: e0154755, 2016.
41. **Phillipson M, and Kubes P.** The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med* 17: 1381-1390, 2011.
42. **Porntrakulpipat S, Depner KR, and Moennig V.** Are low-density granulocytes the major target cells of classical swine fever virus in the peripheral blood? *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 48: 593-602, 2001.
43. **Robinson NE, Olszewski MA, Boehler D, Berney C, Hakala J, Matson C, and Derksen FJ.** Relationship between clinical signs and lung function in horses with recurrent airway obstruction (heaves) during a bronchodilator trial. *Equine Vet J* 32: 393-400, 2000.
44. **Rocha BC, Marques PE, Leoratti FM, Junqueira C, Pereira DB, Antonelli LR, Menezes GB, Golenbock DT, and Gazzinelli RT.** Type I Interferon Transcriptional Signature in Neutrophils and Low-Density Granulocytes Are Associated with Tissue Damage in Malaria. *Cell Rep* 13: 2829-2841, 2015.
45. **Rush BR, Raub ES, Rhoads WS, Flaminio MJ, Matson CJ, Hakala JE, and Gillespie JR.** Pulmonary function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *Am J Vet Res* 59: 1039-1043, 1998.
46. **Saffarzadeh M, and Preissner KT.** Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: manoeuvres for host protection. *Curr Opin Hematol* 20: 3-9, 2013.
47. **Scapini P, and Cassatella MA.** Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood* 124: 710-719, 2014.

48. **Scapini P, Marini O, Tecchio C, and Cassatella MA.** Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunol Rev* 273: 48-60, 2016.
49. **Selvatici R, Falzarano S, Mollica A, and Spisani S.** Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *Eur J Pharmacol* 534: 1-11, 2006.
50. **Singh N, Traisak P, Martin KA, Kaplan MJ, Cohen PL, and Denny MF.** Genomic alterations in abnormal neutrophils isolated from adult patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 16: R165, 2014.
51. **Smith BP.** *Large animal internal medicine.* St. Louis, Missouri: Elsevier Mosby, 2015, p. xliv, 1661 pages, 1614 pages de planches.
52. **Snyderman R, and Pike MC.** N-Formylmethionyl peptide receptors on equine leukocytes initiate secretion but not chemotaxis. *Science* 209: 493-495, 1980.
53. **Ssemaganda A, Kindinger L, Bergin P, Nielsen L, Mpendo J, Ssetaala A, Kiwanuka N, Munder M, Teoh TG, Kropf P, and Muller I.** Characterization of neutrophil subsets in healthy human pregnancies. *PLoS One* 9: e85696, 2014.
54. **Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, and Chilvers ER.** Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* 31: 318-324, 2010.
55. **van Erck E, Votion D, Art T, and Lekeux P.** Measurement of respiratory function by impulse oscillometry in horses. *Equine Vet J* 36: 21-28, 2004.
56. **Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgin JB, Khandpur R, Lin AM, Rubin CJ, Zhao W, Olsen SH, Klinker M, Shealy D, Denny MF, Plumas J, Chaperot L, Kretzler M, Bruce AT, and Kaplan MJ.** Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 187: 538-552, 2011.
57. **Zhang S, Shen H, Shu X, Peng Q, and Wang G.** Abnormally increased low-density granulocytes in peripheral blood mononuclear cells are associated with interstitial lung disease in dermatomyositis. *Mod Rheumatol* 1-8, 2016.

Figure Captions

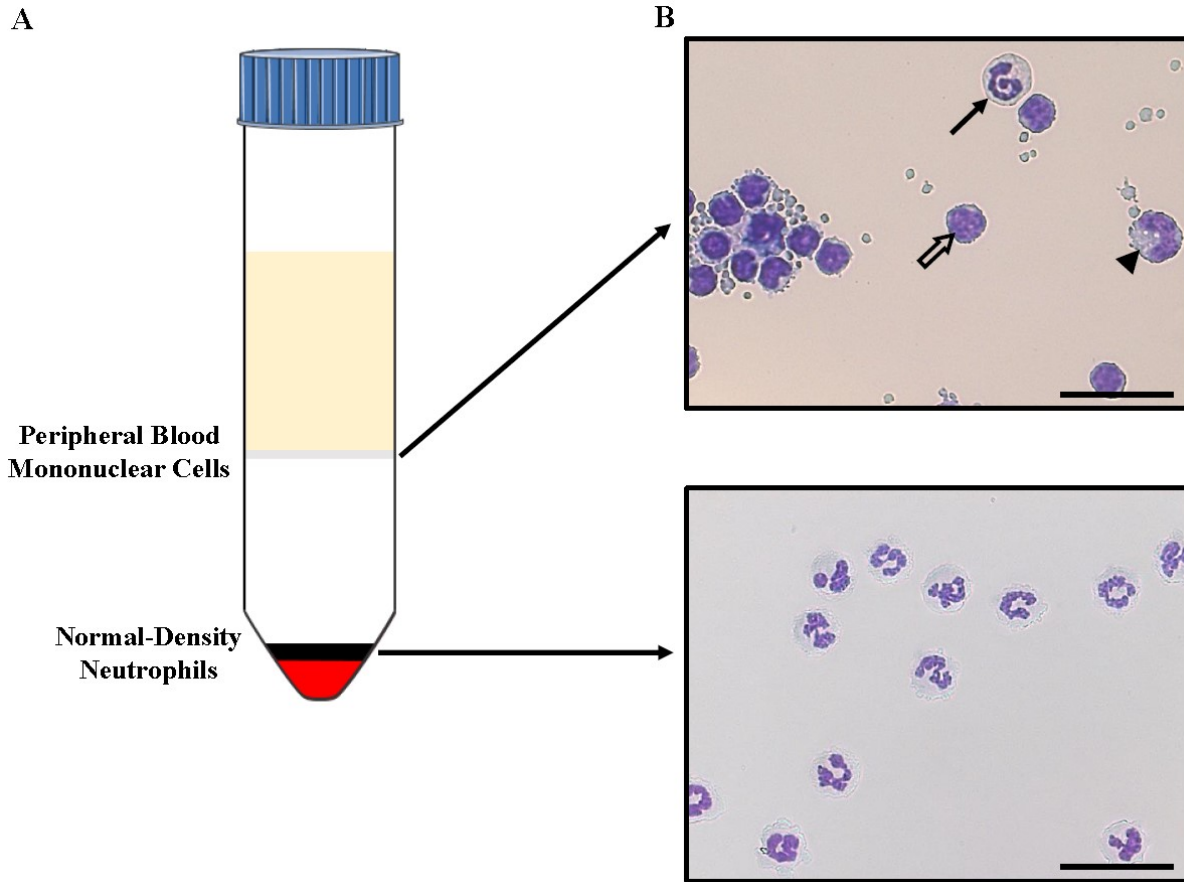


Figure 1: Isolation procedure for the neutrophil subsets from equine blood.

A. Ficoll density gradient separating Low-Density Neutrophils (migrating at the interface blood/gradient together with peripheral mononuclear cells) from Normal-Density Neutrophils migrating at the bottom of the gradient together with red blood cells.

B. Neutrophil subsets morphology evaluated by optical microscopy at 400 \times magnification (scale bar = 28 μm). Upper panel: LDNs (full arrow) with mononuclear cells (lymphocytes indicated by the empty arrow and monocytes indicated by the arrowhead). Lower panel: NDNs after erythrolysis by a hypotonic treatment. Neutrophil subsets were cytocentrifuged and stained with Protocol Hema 3 and imaged using the NanoZoomer 2.0-HT system.

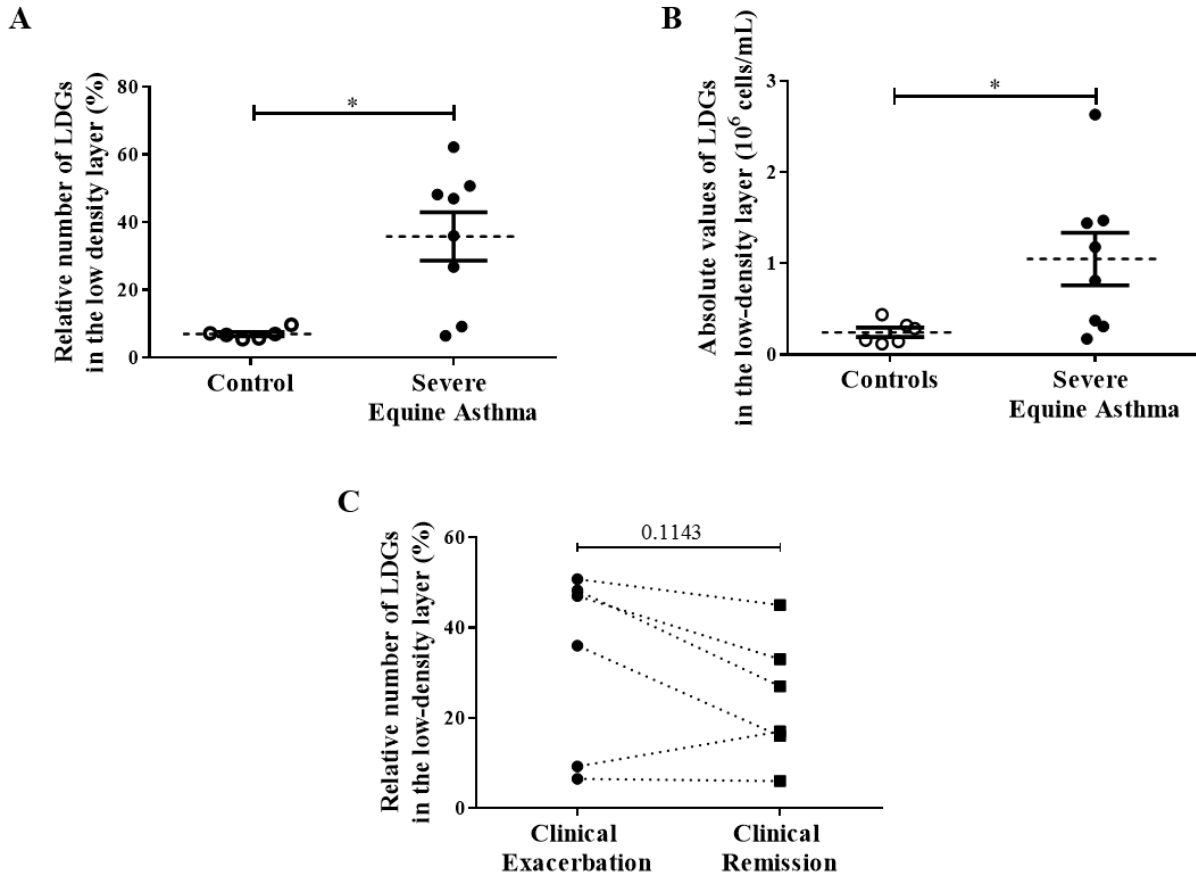


Figure 2: Levels of low-density neutrophils (LDNs).

A-B. Percentages and numbers of LDNs in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of controls and horses with severe equine asthma during disease exacerbation. Each symbol denotes a single animal, and the mean \pm SEM for each study population is shown. * $p < 0.05$ compared with control.

C. Percentages of LDNs in PBMCs of horses with severe equine asthma, comparing clinical exacerbation with clinical remission ($p = 0.1143$). Each symbol denotes a single animal.

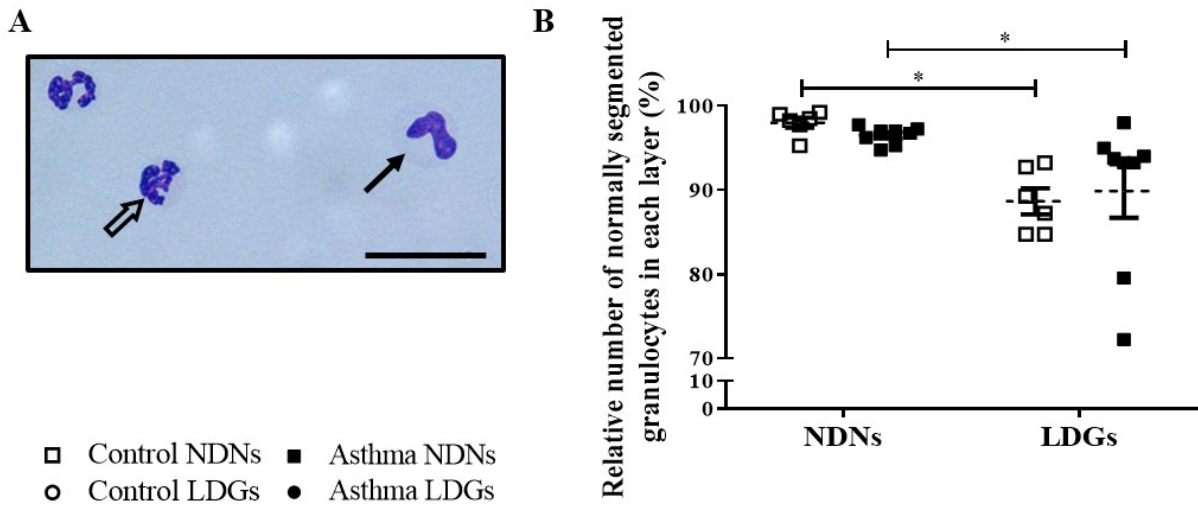


Figure 3: Levels of normally segmented granulocytes in each layer.

A. Representative photography of cytopspins (x400, stained Protocol Hema 3) of the peripheral blood mononuclear cell layers (scale bar = 28 μ m). Mature granulocytes (empty arrow) have more than 2 nuclear lobes (classically between 3 and 4) connected by filaments, whereas immature granulocytes (full arrow) have a curved nucleus with 2 or fewer nuclear lobes. LDNs were quantitated morphologically by light microscope.

B. Percentages of normally segmented LDNs in peripheral blood mononuclear cells of controls and horses with severe asthma. Each symbol denotes a single animal (mean \pm SEM). * $p < 0.05$ compared with control.

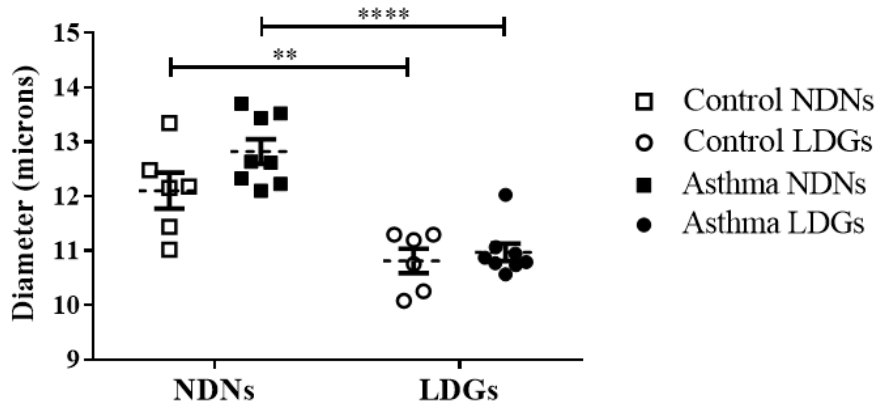


Figure 4: Size of Low-Density Neutrophils (LDNs) and Normal-Density Neutrophils (NDNs).

Each symbol denotes the size mean for a single horse, and the mean \pm SEM for each studied population is shown. ** $p \leq 0.01$ and **** $p \leq 0.0001$.

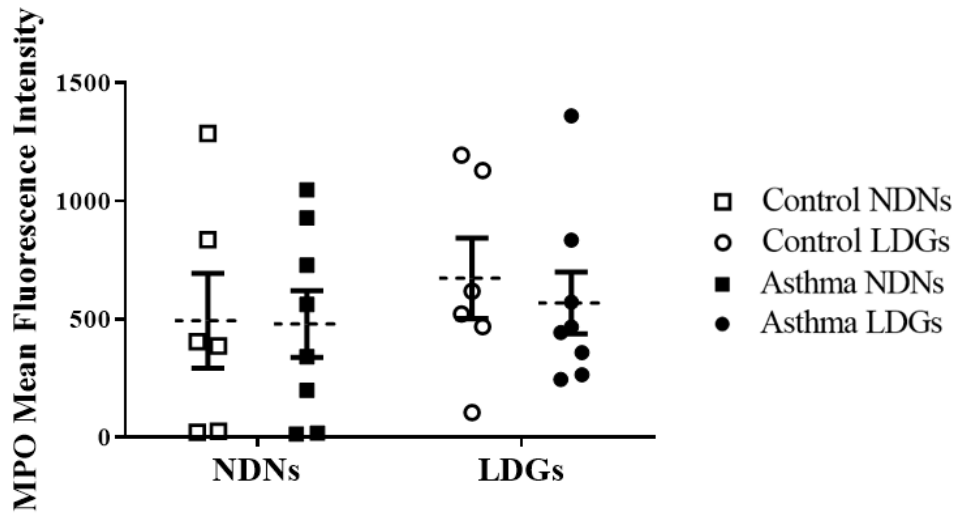


Figure 5: Mean Fluorescence Intensity of MPO in both layer of cells.

Each symbol denotes the size mean for a single animal. The mean \pm SEM for each studied population is shown.

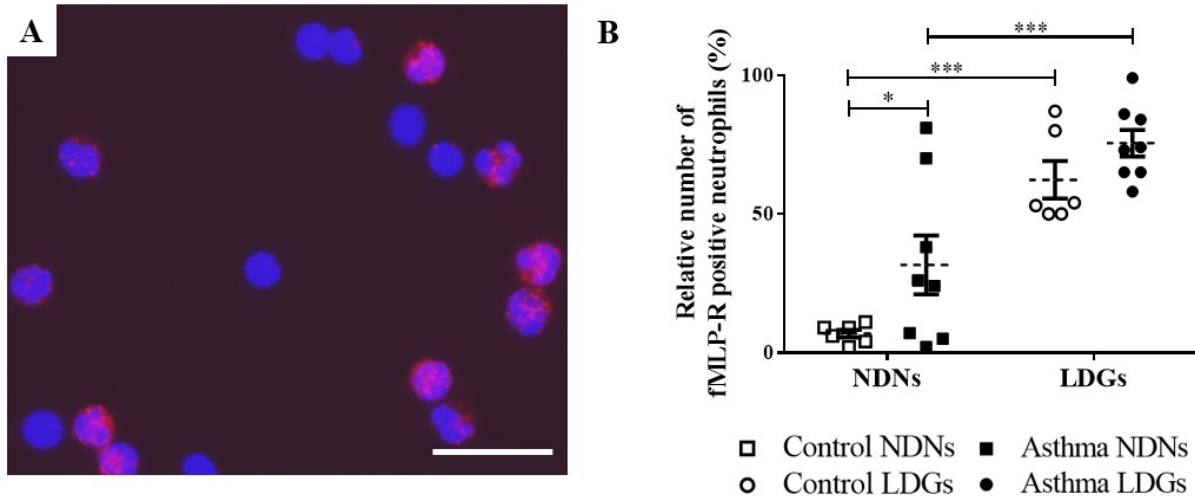


Figure 6: Immunofluorescence of fMLP-R in both layers of cells.

A. Representative photography at x400 magnification (scale bar = 28 μ m) of using an Axio Imager M.1 microscope (Zeiss) of the low-density layer. fMLP-R appeared as red points by immunofluorescence, giving the cells containing this receptor a piknotic aspect. The DNA appears in blue.

B. Percentages of low-density neutrophils and normal-density neutrophils positive for fMLP-R. Each symbol denotes a single animal. Mean \pm SEM for each study population is shown. * $p \leq 0.05$ and *** $p \leq 0.001$.

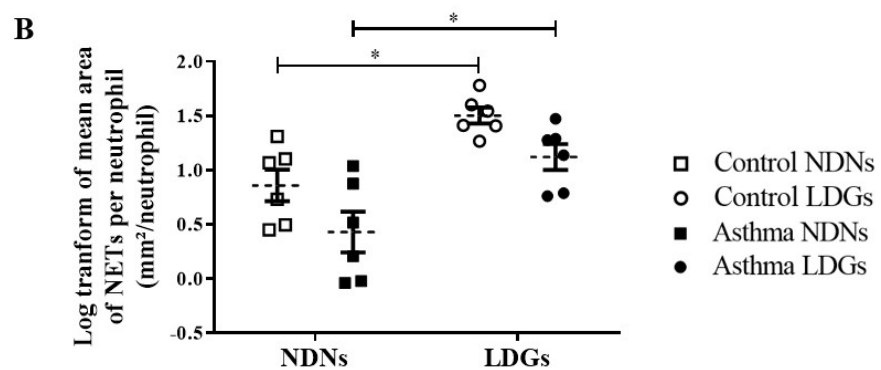
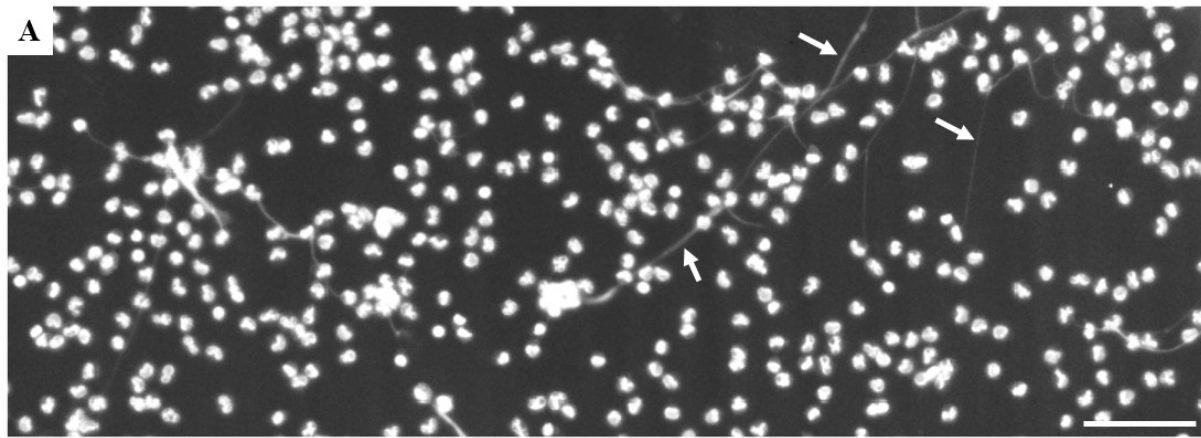


Figure 7: Neutrophil extracellular trap (NET) production in both layers of cells.

A. Representative photography of using a MRC1024 confocal laser-scanning microscope at x100 magnification (BioRad, Hercules, CA) equipped with a Nikon Eclipse TE300 camera (Nikon, Tokyo, Japan) of the low-density layer (scale bar = 100 μ m). White arrows indicate NETs' structures.

B. Log transform of the mean area of NETs per neutrophil in each layer (non-stimulated NS). Each symbol denotes a single animal. Mean \pm SEM for each study population is shown. * $p \leq 0.05$.

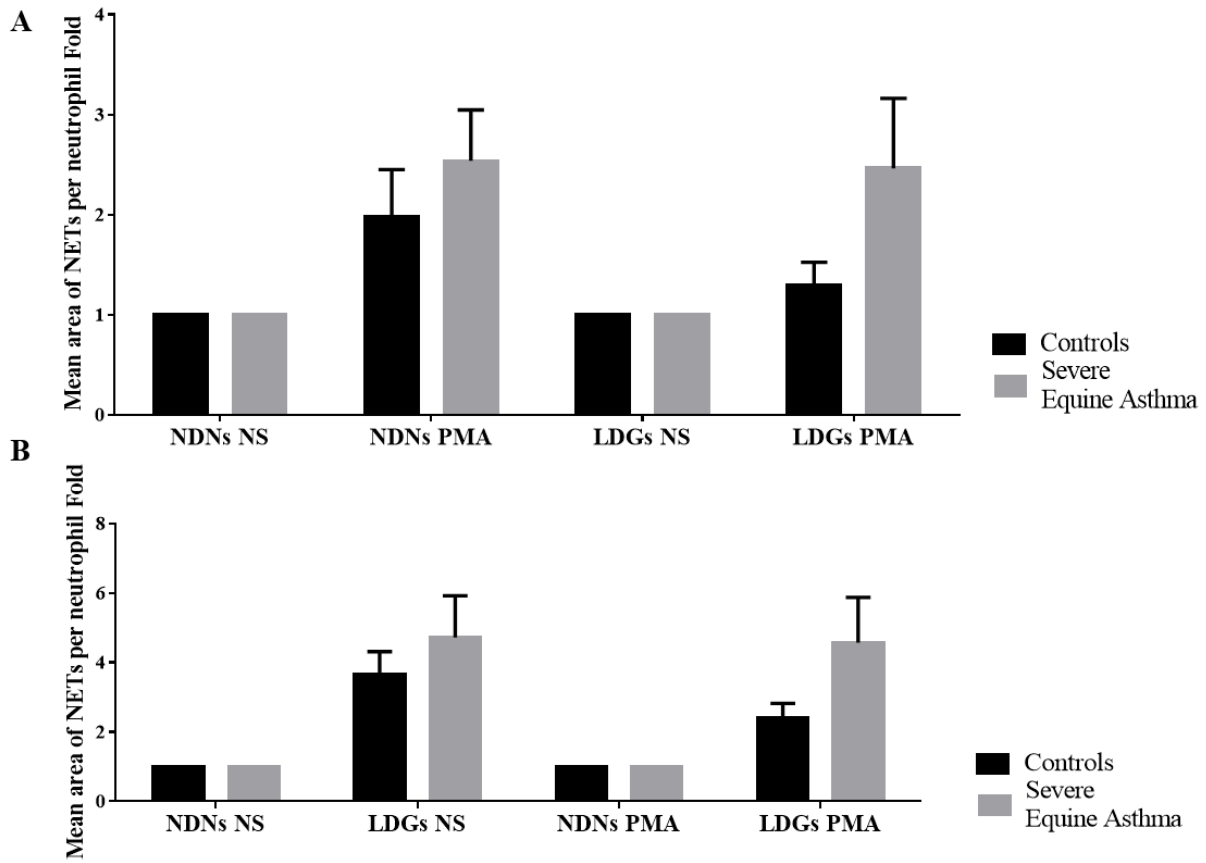


Figure 8: Fold changes of mean area of NETs per neutrophil in each layer of cells.

Results represent fold induction of the effects of PMA stimulation on the mean area of NETs per neutrophil on each layer of cells in each group of horses (A) and the mean area of NETs per neutrophil by LDNs compared to NDNs in each group of horses, before and after stimulation with PMA (B).

PARTIE C : DISCUSSION

GENERALE



Discussion générale

Longtemps considéré comme une simple cellule « kamikaze » à l'aspect original, le neutrophile est maintenant la cellule hématopoïétique suscitant le plus de débats. Sans en faire une liste exhaustive, les fonctions du neutrophile semblent plus complexes que la simple phagocytose d'agents agresseurs. Il apparaît comme un pont entre les réponses immunitaires innées et acquises par ses nombreuses interactions avec les cellules environnantes et interviendrait directement avec le système de défense acquis de l'organisme. En plus de cette facette multifonctionnelle, l'état inflammatoire va entraîner une persistance des neutrophiles dans le courant circulatoire en retardant leur apoptose. Enfin, la vision du neutrophile n'est plus celle d'une simple population cellulaire « uniforme », mais plutôt d'un ensemble de sous-types avec des fonctions distinctes et douées d'une plasticité permettant de répondre aux besoins locaux, qu'ils soient inflammatoires ou infectieux. Ce mémoire avait pour but de s'intéresser à un exemple de cette hétérogénéité des neutrophiles dans le contexte de l'asthme équin sévère.

Les granulocytes de faible densité (LDGs) sont un sous-type de neutrophiles aux propriétés pro-inflammatoires augmentées qui sont présents dans le sang de patients atteints de différentes pathologies, notamment auto-immunes. Nos résultats révèlent que ces cellules sont augmentées chez les chevaux asthmatiques par rapport aux chevaux sains. De plus, cette population cellulaire présente des caractéristiques intrinsèques qui lui sont propres, et qui ne sont pas influencées par la maladie. Les LDGs présentent notamment une taille inférieure à celle des NDNs, ainsi qu'un contenu granulaire plus riche en récepteurs du fMLP, une production augmentée de NETs, une sensibilité accrue aux stimuli inflammatoires et un profil préactivé suggéré.

Les NETs ont initialement été mis en évidence *in vitro*, puis *in vivo* lors d'appendicite chez l'homme (70). Par la suite, leur implication dans différentes pathologies auto-immunes (LES, arthrite rhumatoïde) a été soulevée (144, 166, 167). Au niveau pulmonaire, ils ont notamment été identifiés dans des maladies humaines (168, 169) et des infections expérimentales chez les animaux (168, 170, 171). Chez les chevaux asthmatiques, ils ont été mis en évidence dans les fluides de lavage broncho-alvéolaire (170). Comme énoncé précédemment, les NETs sont composés d'ADN à laquelle sont fixées des molécules toxiques qui sont capables de détruire les pathogènes, et d'induire des lésions tissulaires. Un rôle

éventuel des NETs dans la formation de lésions observées dans des pathologies pulmonaires est d'entraîner un recrutement neutrophilique important. Des études réalisées *in vitro* avec des NETs et des cellules pulmonaires proposent une action directe des NETs au niveau de la barrière alvéolo-capillaire (172). De façon intéressante, si une stratégie thérapeutique ciblant les NETs est mise en place, on observe une amélioration de la perméabilité pulmonaire, des échanges gazeux et même du taux de survie (173-175). Ces études suggèrent que les NETs sont capables d'induire des lésions des 2 côtés de l'interface alvéolo-capillaire. Dans les pathologies pulmonaires chroniques, la formation intra-luminale accrue de NETs semble également impliquée indirectement dans l'obstruction des voies respiratoires en favorisant la production surrégulée de mucus (176).

Notre étude fournit pour la première fois un lien entre les LDGs dans le cadre d'une inflammation asthmatique et la production de NETs. Cependant notre étude reste fondamentalement descriptive. Les liens de causalité entre les LDGs et les remodelages observés dans la maladie restent à faire. Malheureusement, il existe plusieurs obstacles à cette étude approfondie.

1. Le défi de l'isolation LDGs dans le sang

Les LDGs sont retrouvés dans la couche des cellules mononucléées du sang périphérique après une technique de séparation par gradient de densité. Chez l'homme, un mélange d'anticorps permet de séparer les LDGs de ces autres populations cellulaires (129). Malheureusement, cela n'est pas encore possible chez les chevaux étant donné le manque d'anticorps spécifiques. Une autre technique de sélection cellulaire (*cell sorting*) par cytométrie de flux a été envisagée, mais l'appareillage n'était pas disponible.

1.1. Principe du tri cellulaire magnétique

Le système MACS (*MAgnetic Cell Sorter*) consiste à marquer les cellules à isoler avec des microbilles paramagnétiques. Ces dernières seront retenues dans une colonne remplie de matériel ferreux via l'application d'un champ magnétique par un aimant. Les cellules non marquées ne sont pas retenues dans la colonne et sont récoltées dans une première fraction appelée fraction négative. La colonne est ensuite rincée, les cellules récoltées dans cette fraction (lavage) ne sont pas utilisées. Les cellules marquées (fraction positive) sont récupérées en retirant la colonne de l'aimant.

Il existe deux types de sélection par MACS : positive (cellules d'intérêt marquées par les billes et retrouvées dans la deuxième fraction) et négative (cellules d'intérêt non marquées et récupérées dans la première fraction).

1.2. Résultats du tri cellulaire magnétique

Une première tentative d'isolation des LDGs a été réalisée par sélection positive via l'anticorps DH24A (anticorps fréquemment employé dans notre laboratoire pour sélectionner les neutrophiles équins). La pureté a été améliorée de 45 à 60%. Malheureusement, ce taux de pureté était insuffisant et cette technique était accompagnée de la formation de NETs par les LDGs. Une deuxième tentative a été réalisée avec notamment le but d'éviter l'induction de la NETose. Un protocole impliquant une double sélection négative (pour ne pas activer les neutrophiles) a cette fois été mis en place en utilisant un anticorps ciblant CD4 pour isoler les lymphocytes, puis un anticorps ciblant la chaîne alpha CD163 pour isoler les monocytes. La technique de séparation par sélection positive a de nouveau été réalisée en parallèle pour comparer les 2 protocoles (tableau 2).

Comme on peut le constater, la pureté en LDGs a été améliorée pour la sélection positive, mais le nombre de cellules récupérées était très faible. En ce qui concerne le deuxième protocole par double sélection négative, on constate que le nombre de cellules récoltées était satisfaisant avec une diminution de plus d'un quart du pourcentage de lymphocytes trouvés initialement. Par contre, le pourcentage de monocytes restait quasiment similaire.

	SANS SÉPARATION	SÉPARATION PAR SÉLECTION +	SÉPARATION PAR SÉLECTION -
Nombre de cellules récupérées	44.1x10 ⁶	3.0x10 ⁵	18.45x10 ⁶
% LDGs	42.25	91.5	75.0
% lymphocytes	47.25	7.0	11.25
% monocytes	10.5	1.5	13.75

Tableau 2 : Résultats des différentes tentatives d'isolation des LDGs par MACS.

Il apparaît donc que la sélection des monocytes en ciblant la chaîne alpha CD163 n'est pas la bonne solution. Un autre anticorps développé par l'équipe du Dr Wagner et qui cible le CD14 (177) semble préférable pour marquer les monocytes équins (178), mais il n'a pas encore pu être testé dans notre laboratoire pour augmenter la pureté en LDGs. En ce qui concerne les lymphocytes, nous n'avons tout d'abord employé qu'un anticorps ciblant que le CD4 car il était déjà en notre possession et que nous voulions le tester. Dans le futur, nous envisageons de l'employer en combinaison avec un anticorps ciblant le CD8 (encore à déterminer) afin d'isoler un plus grand nombre de lymphocytes.

2. Défi de quantification des NETs

Le fait que l'on ne puisse adéquatement isoler les LDGs des PBMCs nous a empêché d'étudier leur capacité individuelle à produire des NETs. Les lymphocytes ne semblent pas former de pièges extracellulaires et l'impact suggéré du PMA sur ces cellules est un effet mitotique qui a été mis en évidence chez des humains, des primates et des bovins (179, 180), mais pas chez le cheval. On peut supposer que l'effet est le même chez cette espèce, ce qui laisse présumer qu'une contamination par les lymphocytes ne représente pas un problème.

En ce qui concerne les monocytes, les données sont assez floues. La littérature scientifique actuelle rapporte la capacité de la lignée de monocytes/macrophages à libérer également leur ADN dans le milieu extracellulaire sous la forme d'un réseau. Mais si l'on approfondit la question, les cellules ayant produit ces pièges sont des macrophages et non des monocytes (181). En ce qui concerne l'impact du PMA sur les monocytes, il apparaît qu'une stimulation de 20 h avec 200 nM entraîne la différenciation des monocytes en macrophages (182). Cette durée assez longue convenait pour notre étude où l'on stimulait les cellules pendant 2-3 h, mais pour d'autres manipulations comme la co-culture avec des cellules musculaires lisses, l'information serait faussée. Ces résultats soulignent encore une fois l'importance de la mise au point d'un protocole d'isolation des LDGs.

Un autre problème rencontré dans notre étude fut lors de la quantification des NETs. Il était initialement prévu de compter séparément le nombre de neutrophiles formant un NETs. Malheureusement, la densité cellulaire trop importante et l'organisation en un véritable réseau de cellules reliées par les NETs a rendu la tâche trop complexe. Nous nous sommes donc orientés vers un comptage de points (ou "*point counting*" en anglais) qui avait déjà prouvé son efficacité pour d'autres manipulations dans notre laboratoire.

L'ADN étant le composant principal des NETs, différents colorants ont été utilisés pour les visualiser par fluorescence (e.g. DAPI, propidium iodide, Sytox Orange) (70, 168, 183). Des anticorps visant d'autres composants des NETs (e.g. MPO, élastase, histone) (171, 184, 185) peuvent être associés à la coloration de l'ADN afin d'améliorer la visualisation. La technique se basant sur ces anticorps apparaît comme le 1^{er} choix depuis qu'il a été démontré que des peptides antimicrobiens également associés aux NETs (e.g. cathelicidine LL-37) peuvent bloquer les sites de liaison des colorants génétiques et entraver la bonne visualisation des NETs (186).

La microscopie à fluorescence a 2 limitations principales : tout d'abord, les résultats peuvent être biaisés par l'observateur. Les critères (e.g. paramètre de fluorescence tel que le contraste) doivent être précisément définis au préalable et scrupuleusement respectés. L'étude de nombreux échantillons implique plusieurs jours de récolte des données et il faut que l'observateur applique à chaque jour les mêmes critères avec la même rigueur. Deuxièmement, cette technique ne permet pas une étude rapide d'un large nombre de cellules. Des systèmes automatisés font leur apparition dans la recherche afin de faciliter la quantification de la formation NETs. L'un d'entre eux est une méthode de spectrofluorimétrie. Elle est basée sur une coloration de l'ADN permettant la visualisation des cellules mortes et de l'ADN libéré par les neutrophiles et la mesure de la fluorescence émise après excitation des électrons avec un rayon de lumière. Nous avons tenté cette technique dans notre laboratoire en utilisant du Sytox orange, malheureusement des problèmes pour établir une courbe standard ont été rencontrés et la difficulté à obtenir des résultats répétables nous a forcé à nous orienter vers d'autres solutions.

Via un dosage précis, une technique employant une nucléase micrococcalle et un lecteur de fluorescence a été mise au point (71). L'enzyme en question sépare l'ADN extracellulaire libéré par le neutrophile et ainsi la libère dans le surnageant. L'ADN est alors quantifié en utilisant un marqueur nucléaire fluorescent, le Picogreen et ce à une plus grande échelle que les autres techniques énoncées précédemment. Cependant, cette technique n'est pas encore assez sensible pour détecter des quantités relativement faibles de NETs (à savoir <20%), contrairement à l'évaluation microscopique employant des anticorps. Il apparaît donc que l'association des 2 techniques (emploi de la nucléase micrococcalle avec le lecteur de fluorescence et évaluation microscopique) soit la meilleure solution à date (187).

3. Durée de vie des LDGs

Une étude réalisée chez des patients en sepsis suggère que les LDGs chez ces derniers présentent une vie allongée (137). Cette caractéristique des LDGs amplifierait le recrutement et la persistance neutrophilique. Nous avons donc souhaité évaluer le pourcentage de LDGs en apoptose par rapport aux NDNs. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur les critères énoncés par Brazil et al (188), à savoir un noyau qui se fragmente en petites boules lisses d'aspect noir (condensation de la chromatine) (figure 7A) afin d'identifier les neutrophiles apoptotiques. Dans une étude préalable réalisée dans notre laboratoire, le comptage des cellules avec ces critères corrélait fortement avec le marquage des cellules apoptotiques avec l'annexine V (189).

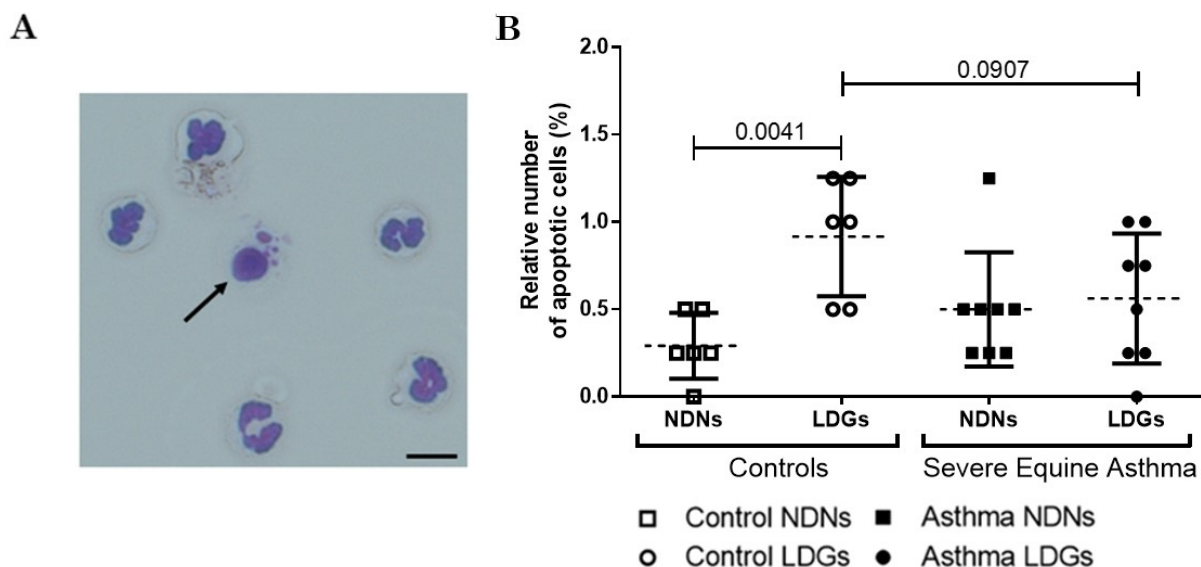


Figure 7 : Taux d'apoptose dans chaque couche de cellules.

A. Photographie d'une lame de NDNs (x400, colorés avec Protocol Hema 3) (barre d'échelle = 10 μ m). Le NDN apoptotique est indiqué par une flèche (fragmentation du noyau en boules lisses et condensation de la chromatine). **B.** Pourcentage de cellules apoptotiques dans chaque couche de cellules chez les 2 groupes de chevaux (contrôles et asthmatiques). Chaque symbole représente un seul animal (moyenne \pm SEM).

Selon nos résultats, on constate que chez les chevaux sains le taux d'apoptose des LDGs est significativement supérieur à celui des NDNs ($0.92 \pm 0.14\%$ et $0.29 \pm 0.08\%$, respectivement, moyenne \pm SEM, figure 7B). Ces résultats sont contraires à ceux rapportés chez les patients en sepsis (137). Par contre, on constate que cette différence significative disparaît chez les chevaux asthmatiques ($0.56 \pm 0.13\%$ pour les LDGs et $0.50 \pm 0.12\%$ pour les NDNs, $p = 0.5165$). Plus précisément, il y a une tendance indiquant que les LDGs des chevaux asthmatiques ont un taux d'apoptose inférieur à ceux des chevaux sains.

Il se peut que l'apoptose retardée soit une conséquence de la maladie et donc une propriété extrinsèque des LDGs des chevaux asthmatiques. Néanmoins ce point a besoin d'être approfondi pour différentes raisons. Tout d'abord, dans la couche de faible densité, nous ne sommes pas capables de différencier les LDGs en apoptose des cellules mononucléées qui auraient également déclenché ce processus de mort cellulaire. Il se peut donc que notre évaluation surestime le taux d'apoptose des LDGs dans les 2 groupes de chevaux.

4. LDGs et neutrophilie pulmonaire

L'examen cytologique sur les fluides de LBA est systématiquement réalisé pour le diagnostic de l'asthme équin sévère. La technique consiste en l'insertion d'un endoscope dans un des naseaux du cheval (sous sédation) et progression jusqu'aux bronchioles pour les laver (ainsi que les alvéoles) avec une quantité définie de solution saline isotonique (500 ml). L'asthme équin sévère est caractérisé par une neutrophilie du LBA et, en accord avec le dernier consensus de l'ACVIM (163), un cheval est considéré comme asthmatique sévère si le pourcentage de neutrophiles est supérieur à 25%.

Une fois encore, il n'y avait pas de corrélation entre le pourcentage de neutrophiles dans le LBA et le pourcentage de LDGs circulants. Cela suggère que les LDGs ne sont pas un biomarqueur convenable de l'inflammation pulmonaire dans le cas de l'asthme équin sévère.

5. LDGs et neutrophilie sanguine

Le taux de neutrophile sanguin a été mesuré dans le sang des chevaux avec un analyseur d'hématologie ADVIA 120. Dans le cas présent, nous avons observé une corrélation positive entre le pourcentage de LDGs circulants et le comptage de neutrophiles sanguins ($r = 0.62$, $p=0.035$). Cette observation est en accord avec le profil pro-inflammatoire augmenté des LDGs qui sécrètent plus de cytokines et donc augmente la mobilisation neutrophilique à partir de la moelle osseuse dans les vaisseaux sanguins (129).

6. Comparaison comptage visuel et tri par cytométrie de flux

L'anticorps DH24a est fréquemment employé dans notre laboratoire afin de séparer les neutrophiles équins, en raison de sa spécificité pour cette cellule chez le cheval. Le marqueur cible le CD90 chez le chien, mais la spécificité pour ce récepteur chez le cheval reste à confirmer. Cet anticorps a été utilisé dans nos manipulations pour séparer les LDGs des cellules mononucléées du sang.

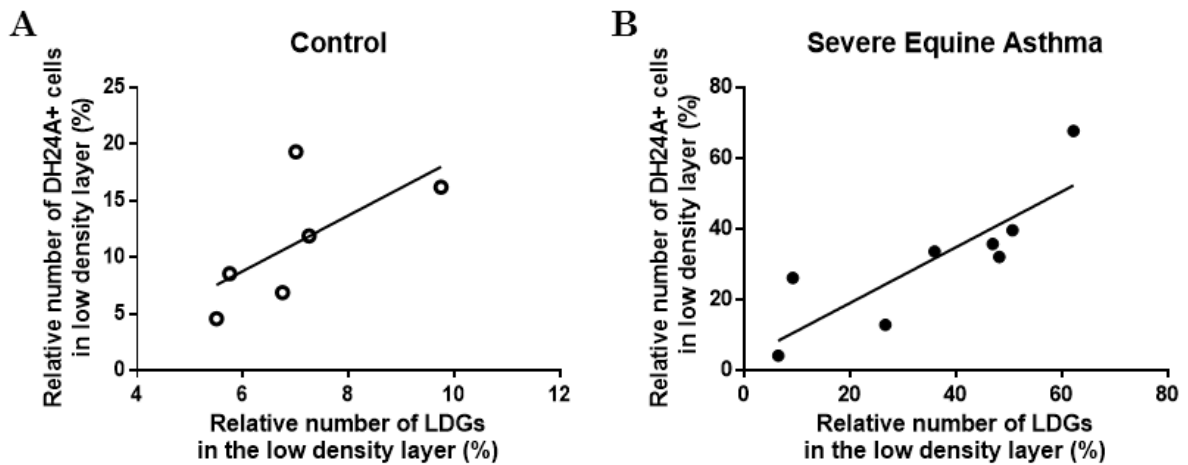


Figure 8 : Corrélation entre les pourcentages de LDGs comptés à la cytométrie de flux et à la microscopie optique chez les chevaux contrôles (A) et asthmatiques (B).

On constate qu'il y a une corrélation significative ($r = 0.84$ et $p = 0.0095$, Figure 8B) chez les chevaux asthmatiques sévères entre le pourcentage de LDGs circulants et le pourcentage de cellules marquées par l'anticorps DH24A. Chez les chevaux sains, la corrélation est moindre et non-significative ($r = 0.66$ et $p = 0.1571$, Figure 8A). Ces données renforcent l'idée que l'anticorps DH24A marque spécifiquement les neutrophiles équins.

PARTIE D : CONCLUSION &
PERSPECTIVES



Conclusion & Perspectives

En conclusion, les résultats de ce mémoire développent la notion de LDGs pour la première fois en médecine vétérinaire dans le cadre d'une maladie inflammatoire se développant naturellement. L'ensemble de nos données suggèrent que :

- Les LDGs sont présents en quantité augmentée dans le sang de chevaux asthmatiques ;
- Ils sont plus petits que les NDNs ;
- Ils expriment plus de récepteurs du fMLP dans leurs granules que les NDNs ;
- Ils sont une population majoritairement mature ;
- Ils produisent plus de NETs que les NDNs ;
- Ils semblent être préactivés et donc plus sensibles aux stimuli pro-inflammatoires.

Comme énoncé précédemment, plusieurs questions sur les LDGs restent encore sans réponse. Plusieurs hypothèses ont été émises et nos résultats permettent de pencher pour certaines d'entre elles. Le fait que nos observations se retrouvent aussi bien chez les chevaux sains que chez les asthmatiques nous amène à voir ces caractéristiques comme étant intrinsèques aux LDGs. Aussi l'hypothèse qu'ils représentent un stade immature de cellules progénitrices des NDNs semble peu probable à la lueur de nos résultats en raison de la morphologie de leur noyau et l'importance de récepteurs du fMLP dans leurs granules. De plus, nos résultats (en accord d'autres études) soulignent bien que les LDGs sont présents physiologiquement dans le sang. À l'avenir, il sera intéressant de comparer les observations faites chez les chevaux sains par rapport aux animaux atteints, notamment au niveau de la génomique.

Notre laboratoire s'intéresse au rôle des neutrophiles dans l'inflammation asthmatique et au remodelage des voies respiratoires (fibrose péribronchiolaire, hyperplasie/hypertrophie des cellules musculaires lisses et atteintes de l'épithélium) qui s'opère chez les chevaux atteints d'asthme équin sévère. Ces 2 éléments semblent de plus en plus interreliés, mais la nature de cette relation reste encore incomplètement élucidée. Les LDGs et leurs NETs apparaissent comme un élément de la physiopathologie de l'asthme équin sévère. Une perspective pour l'avenir serait de mettre des cellules musculaires lisses bronchiques en culture avec des LDGs et/ou des NDNs stimulés et ainsi voir l'impact des NETs sur les cellules. L'effet cytotoxique des NETs est déjà rapporté pour les cellules épithéliales et endothéliales alvéolaires (172) et des manipulations préalables dans notre laboratoire laissent penser que cet effet pourrait se retrouver également au niveau de la musculature lisse bronchique. D'autres paramètres à

évaluer seraient la prolifération des cellules ou encore l'analyse des protéines contractiles exprimées telles que l'actine ou encore la desmine. Une récente étude réalisée sur du tissu pulmonaire humain montre que les NETs peuvent induire l'activation de fibroblastes pulmonaires et leur différenciation en myofibroblaste (190). De plus, en leur présence, il apparait que les myofibroblastes exprimaient plus de facteurs de croissance et qu'ils produisaient plus de collagène qu'ils ne proliféraient (190). Cela suggère que les LDGs et les NETs pourraient jouer un rôle clef dans l'obstruction des voies respiratoires en cas d'inflammation asthmatique et ceux à 2 niveaux :

- Directement en favorisant le remodelage tissulaire en brisant l'équilibre au niveau de la balance « dégradation/réparation » ;
- Indirectement via l'augmentation du recrutement neutrophilique (élément délétère en cas d'inflammation chronique comme énoncé précédemment), mais également en facilitant l'accumulation de mucus dans les voies respiratoires.

Il serait intéressant dans le futur d'étudier la protéomique des LDGs pour confirmer leurs différents effets pro-inflammatoires dans le cas de l'inflammation asthmatique ou encore de les évaluer au niveau de la moelle osseuse pour percer le mystère de leur origine. Mais pour toutes ces expériences énoncées ci-dessus, il est important en premier temps d'établir un protocole d'isolation efficace des LDGs. Par la suite, l'impact de différents traitements tels que la corticothérapie sur les LDGs pourra être évalué.

BIBLIOGRAPHIE



1. Machiavel N. *Pensieri*, II, 9.
2. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Robbins SL. *Robbins basic pathology*. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2013. xii, 910 p. p.
3. Leise BS, Yin C, Pettigrew A, Belknap JK. Proinflammatory cytokine responses of cultured equine keratinocytes to bacterial pathogen-associated molecular pattern motifs. *Equine Vet J*. 2010;42(4):294-303.
4. Declue AE, Johnson PJ, Day JL, Amorim JR, Honaker AR. Pathogen associated molecular pattern motifs from Gram-positive and Gram-negative bacteria induce different inflammatory mediator profiles in equine blood. *Vet J*. 2012;192(3):455-60.
5. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*. 1997;9(1):4-9.
6. Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*. 2003;15(4):396-401.
7. Oppenheim JJ, Tewary P, de la Rosa G, Yang D. Alarmins initiate host defense. *Adv Exp Med Biol*. 2007;601:185-94.
8. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2007;81(1):1-5.
9. Ito T. PAMPs and DAMPs as triggers for DIC. *J Intensive Care*. 2014;2(1):67.
10. Tsai SY, Segovia JA, Chang TH, Morris IR, Berton MT, Tessier PA, et al. DAMP molecule S100A9 acts as a molecular pattern to enhance inflammation during influenza A virus infection: role of DDX21-TRIF-TLR4-MyD88 pathway. *PLoS Pathog*. 2014;10(1):e1003848.
11. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20.
12. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007;449(7164):819-26.
13. Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*. 2008;321(5891):970-4.
14. Silva MT. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *Journal of Leukocyte Biology*. 2009;87(1):93-106.
15. Perretti M, Solito E. Annexin 1 and neutrophil apoptosis. *Biochem Soc Trans*. 2004;32(Pt3):507-10.
16. Guyton AC, Hall JE. *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. Thirteenth edition. ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016. xix, 1145 pages p.

17. Smith BP. Large animal internal medicine. Fifth edition. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Mosby; 2015. xlv, 1661 pages, 14 pages de planches p.
18. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 1997;89(10):3503-21.
19. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:459-89.
20. Mestas J, Hughes CCW. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology*. 2004;172(5):2731-8.
21. Harvey JW. Veterinary hematology : a diagnostic guide and color atlas. St. Louis, Mo.: Elsevier/Saunders; 2012. viii, 360 pages p.
22. Tizard IR. Veterinary immunology. 9th ed. St. Louis, Mo.: Elsevier/Saunders; 2013. xiii, 551 p. p.
23. Mauer AM, Athens JW, Ashenbrucker H, Cartwright GE, Wintrobe MM. Leukokinetic Studies. Ii. A Method for Labeling Granulocytes in Vitro with Radioactive Diisopropylfluorophosphate (Dfp). *J Clin Invest*. 1960;39(9):1481-6.
24. Wiggs BR, English D, Quinlan WM, Doyle NA, Hogg JC, Doerschuk CM. Contributions of capillary pathway size and neutrophil deformability to neutrophil transit through rabbit lungs. *Journal of applied physiology*. 1994;77(1):463-70.
25. Brown GM, Brown DM, Donaldson K, Drost E, MacNee W. Neutrophil sequestration in rat lungs. *Thorax*. 1995;50(6):661-7.
26. Doerschuk CM. Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs. *Microcirculation*. 2001;8(2):71-88.
27. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(3):159-75.
28. Kreisel D, Nava RG, Li W, Zinselmeyer BH, Wang B, Lai J, et al. In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(42):18073-8.
29. Peters AM. Just how big is the pulmonary granulocyte pool? *Clin Sci (Lond)*. 1998;94(1):7-19.
30. Looney MR, Thornton EE, Sen D, Lamm WJ, Glenn RW, Krummel MF. Stabilized imaging of immune surveillance in the mouse lung. *Nat Methods*. 2011;8(1):91-6.
31. Ussov WY, Peters AM, Savill J, Pusey CD, Gaskin G, Hodgson HJ, et al. Relationship between granulocyte activation, pulmonary granulocyte kinetics and alveolar permeability in extrapulmonary inflammatory disease. *Clin Sci (Lond)*. 1996;91(3):329-35.

32. Ussov WY, Peters AM, Chapman PT, Ttofi A, Mason JC, Haskard DO, et al. Pulmonary granulocyte kinetics in relation to endothelial and granulocyte activation. *Clin Sci (Lond)*. 1999;96(5):525-31.
33. Athens JW, Haab OP, Raab SO, Mauer AM, Ashenbrucker H, Cartwright GE, et al. Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. *J Clin Invest*. 1961;40:989-95.
34. Day RB, Link DC. Regulation of neutrophil trafficking from the bone marrow. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(9):1415-23.
35. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010;33(5):657-70.
36. Hooman H, Rashidi M, JCN M. Granulocytic Maturation Diagram 2012 [updated 2012]. Available from: <http://hematologyoutlines.com/>.
37. Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest*. 2010;120(7):2423-31.
38. Hechtman DH, Cybulsky MI, Fuchs HJ, Baker JB, Gimbrone MA, Jr. Intravascular IL-8. Inhibitor of polymorphonuclear leukocyte accumulation at sites of acute inflammation. *J Immunol*. 1991;147(3):883-92.
39. Furze RC, Rankin SM. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*. 2008;125(3):281-8.
40. Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity*. 2003;19(4):583-93.
41. Furze RC, Rankin SM. The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *FASEB J*. 2008;22(9):3111-9.
42. Rankin SM. The bone marrow: a site of neutrophil clearance. *J Leukoc Biol*. 2010;88(2):241-51.
43. Abkowitz JL, Robinson AE, Kale S, Long MW, Chen J. Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. *Blood*. 2003;102(4):1249-53.
44. Savill J, Haslett C. Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. *Semin Cell Biol*. 1995;6(6):385-93.
45. Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol*. 1997;61(4):375-80.
46. Tak T, Tesselaar K, Pillay J, Borghans JA, Koenderman L. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J Leukoc Biol*. 2013;94(4):595-601.
47. Dresch C, Najean Y, Beauchet J. In vitro ⁵¹Cr and ³²P-DFP labeling of granulocytes in man. *J Nucl Med*. 1971;12(12):774-84.

48. Pillay J, Ramakers BP, Kamp VM, Loi AL, Lam SW, Hietbrink F, et al. Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia. *J Leukoc Biol.* 2010;88(1):211-20.
49. Watson F, Robinson JJ, Edwards SW. Neutrophil function in whole blood and after purification: changes in receptor expression, oxidase activity and responsiveness to cytokines. *Biosci Rep.* 1992;12(2):123-33.
50. Tofts PS, Chevassut T, Cutajar M, Dowell NG, Peters AM. Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood.* 2011;117(22):6050-2; author reply 3-4.
51. Liles WC, Dale DC, Klebanoff SJ. Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. *Blood.* 1995;86(8):3181-8.
52. Marwick JA, Dorward DA, Lucas CD, Jones KO, Sheldrake TA, Fox S, et al. Oxygen levels determine the ability of glucocorticoids to influence neutrophil survival in inflammatory environments. *J Leukoc Biol.* 2013;94(6):1285-92.
53. Mathias JR, Perrin BJ, Liu TX, Kanki J, Look AT, Huttenlocher A. Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. *J Leukoc Biol.* 2006;80(6):1281-8.
54. Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature.* 2007;447(7146):869-74.
55. Lee WL, Harrison RE, Grinstein S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection.* 2003;5(14):1299-306.
56. Stuart LM, Ezekowitz RA. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity.* 2005;22(5):539-50.
57. Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2002;14(1):136-45.
58. Krauss JC, PooH, Xue W, Mayo-Bond L, Todd RF, 3rd, Petty HR. Reconstitution of antibody-dependent phagocytosis in fibroblasts expressing Fc gamma receptor IIIB and the complement receptor type 3. *J Immunol.* 1994;153(4):1769-77.
59. Hunter S, Kamoun M, Schreiber AD. Transfection of an Fc gamma receptor cDNA induces T cells to become phagocytic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(21):10232-6.
60. Lowry MB, Duchemin AM, Coggeshall KM, Robinson JM, Anderson CL. Chimeric receptors composed of phosphoinositide 3-kinase domains and Fc gamma receptor ligand-binding domains mediate phagocytosis in COS fibroblasts. *J Biol Chem.* 1998;273(38):24513-20.
61. Borregaard N, Sorensen OE, Theilgaard-Monch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* 2007;28(8):340-5.
62. Barrowman MM, Cockcroft S, Gomperts BD. Differential control of azurophilic and specific granule exocytosis in Sendai-virus-permeabilized rabbit neutrophils. *J Physiol.* 1987;383:115-24.

63. Lew PD, Monod A, Waldvogel FA, Dewald B, Baggiolini M, Pozzan T. Quantitative analysis of the cytosolic free calcium dependency of exocytosis from three subcellular compartments in intact human neutrophils. *J Cell Biol.* 1986;102(6):2197-204.
64. Witko-Sarsat V, Cramer EM, Hieblot C, Guichard J, Nusbaum P, Lopez S, et al. Presence of proteinase 3 in secretory vesicles: evidence of a novel, highly mobilizable intracellular pool distinct from azurophil granules. *Blood.* 1999;94(7):2487-96.
65. Gautam N, Olofsson AM, Herwald H, Iversen LF, Lundgren-Akerlund E, Hedqvist P, et al. Heparin-binding protein (HBP/CAP37): a missing link in neutrophil-evoked alteration of vascular permeability. *Nat Med.* 2001;7(10):1123-7.
66. Chertov O, Ueda H, Xu LL, Tani K, Murphy WJ, Wang JM, et al. Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. *J Exp Med.* 1997;186(5):739-47.
67. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection.* 2003;5(14):1317-27.
68. Perera NC, Wiesmuller KH, Larsen MT, Schacher B, Eickholz P, Borregaard N, et al. NSP4 is stored in azurophil granules and released by activated neutrophils as active endoprotease with restricted specificity. *J Immunol.* 2013;191(5):2700-7.
69. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(3):173-82.
70. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-5.
71. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007;176(2):231-41.
72. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010;191(3):677-91.
73. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med.* 2010;207(9):1853-62.
74. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2009;16(11):1438-44.
75. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BNV, Zbytnuik LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature Medicine.* 2012;18(9):1386-93.
76. Miyata T, Fan X. A second hit for TMA. *Blood.* 2012;120(6):1152-4.

77. Cara DC, Kubes P. Intravital microscopy as a tool for studying recruitment and chemotaxis. *Methods Mol Biol.* 2004;239:123-32.
78. Menezes GB, Lee WY, Zhou H, Waterhouse CC, Cara DC, Kubes P. Selective down-regulation of neutrophil Mac-1 in endotoxemic hepatic microcirculation via IL-10. *J Immunol.* 2009;183(11):7557-68.
79. Hugo V. *Les travailleurs de la mer.* Paris: Hetzel; 1866.
80. Sundd P, Pospieszalska MK, Ley K. Neutrophil rolling at high shear: flattening, catch bond behavior, tethers and slings. *Mol Immunol.* 2013;55(1):59-69.
81. Sundd P, Gutierrez E, Koltsova EK, Kuwano Y, Fukuda S, Pospieszalska MK, et al. 'Slings' enable neutrophil rolling at high shear. *Nature.* 2012;488(7411):399-403.
82. Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med.* 2006;203(12):2569-75.
83. Vestweber D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(11):692-704.
84. Sanchez-Madrid F, Barreiro O. Leukocytes whisper to endothelial guards. *Blood.* 2009;113(24):6048-9.
85. Szabady RL, McCormick BA. Control of neutrophil inflammation at mucosal surfaces by secreted epithelial products. *Front Immunol.* 2013;4:220.
86. Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol Today.* 1992;13(3):93-100.
87. Bunting M, Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving beta 2 integrins and selectin ligands. *Curr Opin Hematol.* 2002;9(1):30-5.
88. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):678-89.
89. Jenne CN, Wong CH, Zemp FJ, McDonald B, Rahman MM, Forsyth PA, et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe.* 2013;13(2):169-80.
90. Burns AR, Smith CW, Walker DC. Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiol Rev.* 2003;83(2):309-36.
91. Carman CV, Sage PT, Sciuto TE, de la Fuente MA, Geha RS, Ochs HD, et al. Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity.* 2007;26(6):784-97.

92. Woodfin A, Voisin MB, Beyrau M, Colom B, Caille D, Diapouli FM, et al. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat Immunol.* 2011;12(8):761-9.
93. Le'Negrata G, Rostagno P, Auburger P, Rossi B, Hofman P. Downregulation of caspases and Fas ligand expression, and increased lifespan of neutrophils after transmigration across intestinal epithelium. *Cell Death Differ.* 2003;10(2):153-62.
94. Hu M, Lin X, Du Q, Miller EJ, Wang P, Simms HH. Regulation of polymorphonuclear leukocyte apoptosis: role of lung endothelium-epithelium bilayer transmigration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;288(2):L266-74.
95. Fullerton JN, O'Brien AJ, Gilroy DW. Pathways mediating resolution of inflammation: when enough is too much. *J Pathol.* 2013;231(1):8-20.
96. Zhang J, He J, Xia J, Chen Z, Chen X. Delayed apoptosis by neutrophils from COPD patients is associated with altered Bak, Bcl-xl, and Mcl-1 mRNA expression. *Diagn Pathol.* 2012;7:65.
97. El Kebir D, Filep JG. Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation. *ScientificWorldJournal.* 2010;10:1731-48.
98. West JB, West JB. *Pulmonary pathophysiology : the essentials.* Eighth edition ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2013. viii, 183 pages p.
99. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(5 Pt 1):1532-9.
100. Sur S, Crotty TB, Kephart GM, Hyma BA, Colby TV, Reed CE, et al. Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? *Am Rev Respir Dis.* 1993;148(3):713-9.
101. Martin RJ, Cicutto LC, Smith HR, Ballard RD, Szeffler SJ. Airways inflammation in nocturnal asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1991;143(2):351-7.
102. Wenzel SE, Szeffler SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156(3 Pt 1):737-43.
103. Silvestri M, Bontempelli M, Giacomelli M, Malerba M, Rossi GA, Di Stefano A, et al. High serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-8 in severe asthma: markers of systemic inflammation? *Clin Exp Allergy.* 2006;36(11):1373-81.
104. Shaw DE, Berry MA, Hargadon B, McKenna S, Shelley MJ, Green RH, et al. Association between neutrophilic airway inflammation and airflow limitation in adults with asthma. *Chest.* 2007;132(6):1871-5.
105. Cowan DC, Cowan JO, Palmay R, Williamson A, Taylor DR. Effects of steroid therapy on inflammatory cell subtypes in asthma. *Thorax.* 2010;65(5):384-90.

106. Contoli M, Baraldo S, Marku B, Casolari P, Marwick JA, Turato G, et al. Fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease: 5-year follow-up. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(4):830-7.
107. Gupta S, Siddiqui S, Haldar P, Entwisle JJ, Mawby D, Wardlaw AJ, et al. Quantitative analysis of high-resolution computed tomography scans in severe asthma subphenotypes. *Thorax*. 2010;65(9):775-81.
108. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(3):1001-8.
109. Qiu Y, Zhu J, Bandi V, Guntupalli KK, Jeffery PK. Bronchial mucosal inflammation and upregulation of CXC chemoattractants and receptors in severe exacerbations of asthma. *Thorax*. 2007;62(6):475-82.
110. Carroll NG, Mutavdzic S, James AL. Increased mast cells and neutrophils in submucosal mucous glands and mucus plugging in patients with asthma. *Thorax*. 2002;57(8):677-82.
111. Baraldo S. Neutrophilic infiltration within the airway smooth muscle in patients with COPD. *Thorax*. 2004;59(4):308-12.
112. Silva PL, Passaro CP, Cagido VR, Bozza M, Dolhnikoff M, Negri EM, et al. Impact of lung remodelling on respiratory mechanics in a model of severe allergic inflammation. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008;160(3):239-48.
113. Bazzoni F, Tamassia N, Rossato M, Cassatella MA. Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: lessons from neutrophils. *Eur J Immunol*. 2010;40(9):2360-8.
114. Suratt BT, Young SK, Lieber J, Nick JA, Henson PM, Worthen GS. Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;281(4):L913-21.
115. Hirano Y, Aziz M, Wang P. Role of reverse transendothelial migration of neutrophils in inflammation. *Biol Chem*. 2016;397(6):497-506.
116. Nourshargh S, Marelli-Berg FM. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol*. 2005;26(3):157-65.
117. Hartl D, Krauss-Etschmann S, Koller B, Hordijk PL, Kuijpers TW, Hoffmann F, et al. Infiltrated Neutrophils Acquire Novel Chemokine Receptor Expression and Chemokine Responsiveness in Chronic Inflammatory Lung Diseases. *The Journal of Immunology*. 2008;181(11):8053-67.
118. Dixon G, Elks PM, Loynes CA, Whyte MK, Renshaw SA. A method for the in vivo measurement of zebrafish tissue neutrophil lifespan. *ISRN Hematol*. 2012;2012:915868.

119. McGettrick HM, Lord JM, Wang KQ, Rainger GE, Buckley CD, Nash GB. Chemokine- and adhesion-dependent survival of neutrophils after transmigration through cytokine-stimulated endothelium. *J Leukoc Biol.* 2006;79(4):779-88.
120. Allen C, Thornton P, Denes A, McColl BW, Pierozynski A, Monestier M, et al. Neutrophil cerebrovascular transmigration triggers rapid neurotoxicity through release of proteases associated with decondensed DNA. *J Immunol.* 2012;189(1):381-92.
121. Buckley CD, Ross EA, McGettrick HM, Osborne CE, Haworth O, Schmutz C, et al. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J Leukoc Biol.* 2006;79(2):303-11.
122. Chakravarti A, Allaey I, Poubelle PE. [Neutrophils and immunity: is it innate or acquired?]. *Med Sci (Paris).* 2007;23(10):862-7.
123. Tsuda Y, Takahashi H, Kobayashi M, Hanafusa T, Herndon DN, Suzuki F. Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity.* 2004;21(2):215-26.
124. Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers JW, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest.* 2012;122(1):327-36.
125. Kamp VM, Pillay J, Lammers JW, Pickkers P, Ulfman LH, Koenderman L. Human suppressive neutrophils CD16bright/CD62Ldim exhibit decreased adhesion. *J Leukoc Biol.* 2012;92(5):1011-20.
126. Hacbarth E, Kajdacsy-Balla A. Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever. *Arthritis Rheum.* 1986;29(11):1334-42.
127. Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med.* 2003;197(6):711-23.
128. Nakou M, Knowlton N, Frank MB, Bertias G, Osban J, Sandel CE, et al. Gene expression in systemic lupus erythematosus: bone marrow analysis differentiates active from inactive disease and reveals apoptosis and granulopoiesis signatures. *Arthritis Rheum.* 2008;58(11):3541-9.
129. Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, Thacker SG, Anderson M, Sandy AR, et al. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J Immunol.* 2010;184(6):3284-97.
130. Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg.* 2005;34(5):415-23.
131. Lennon DP, Caplan AI. Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* 2006;34(11):1604-5.

132. Pountos I, Corscadden D, Emery P, Giannoudis PV. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury*. 2007;38 Suppl 4:S23-33.
133. Dumitru CA, Moses K, Trellakis S, Lang S, Brandau S. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(8):1155-67.
134. Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin Immunopathol*. 2013;35(4):455-63.
135. Pillay J, Tak T, Kamp VM, Koenderman L. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(20):3813-27.
136. Nair KS, Zingde SM. Adhesion of neutrophils to fibronectin: role of the cd66 antigens. *Cell Immunol*. 2001;208(2):96-106.
137. Drifte G, Dunn-Siegrist I, Tissieres P, Pugin J. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*. 2013;41(3):820-32.
138. Cloke T, Munder M, Taylor G, Muller I, Kropf P. Characterization of a novel population of low-density granulocytes associated with disease severity in HIV-1 infection. *PLoS One*. 2012;7(11):e48939.
139. Cloke T, Munder M, Bergin P, Herath S, Modolell M, Taylor G, et al. Phenotypic alteration of neutrophils in the blood of HIV seropositive patients. *PLoS One*. 2013;8(9):e72034.
140. Vasconcelos ZF, Dos Santos BM, Farache J, Palmeira TS, Areal RB, Cunha JM, et al. G-CSF-treated granulocytes inhibit acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2006;107(5):2192-9.
141. Ssemaganda A, Kindinger L, Bergin P, Nielsen L, Mpendo J, Ssetaala A, et al. Characterization of neutrophil subsets in healthy human pregnancies. *PLoS One*. 2014;9(2):e85696.
142. Luyckx A, Schouppe E, Rutgeerts O, Lenaerts C, Fevery S, Devos T, et al. G-CSF stem cell mobilization in human donors induces polymorphonuclear and mononuclear myeloid-derived suppressor cells. *Clin Immunol*. 2012;143(1):83-7.
143. Scapini P, Cassatella MA. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*. 2014;124(5):710-9.
144. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2011;187(1):538-52.
145. dos Santos G, Kutuzov MA, Ridge KM. The inflammasome in lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;303(8):L627-33.

146. Liu CL, Tangsombatvisit S, Rosenberg JM, Mandelbaum G, Gillespie EC, Gozani OP, et al. Specific post-translational histone modifications of neutrophil extracellular traps as immunogens and potential targets of lupus autoantibodies. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(1):R25.
147. Neeli I, Dwivedi N, Khan S, Radic M. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J Innate Immun.* 2009;1(3):194-201.
148. Leffler J, Martin M, Gullstrand B, Tyden H, Lood C, Truedsson L, et al. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol.* 2012;188(7):3522-31.
149. Hakkim A, Fuchs TA, Martinez NE, Hess S, Prinz H, Zychlinsky A, et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol.* 2011;7(2):75-7.
150. Leffler J, Gullstrand B, Jonsen A, Nilsson JA, Martin M, Blom AM, et al. Degradation of neutrophil extracellular traps co-varies with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(4):R84.
151. Singh N, Traisak P, Martin KA, Kaplan MJ, Cohen PL, Denny MF. Genomic alterations in abnormal neutrophils isolated from adult patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(4):R165.
152. Rocha BC, Marques PE, Leoratti FM, Junqueira C, Pereira DB, Antonelli LR, et al. Type I Interferon Transcriptional Signature in Neutrophils and Low-Density Granulocytes Are Associated with Tissue Damage in Malaria. *Cell Rep.* 2015;13(12):2829-41.
153. Deng Y, Ye J, Luo Q, Huang Z, Peng Y, Xiong G, et al. Low-Density Granulocytes Are Elevated in Mycobacterial Infection and Associated with the Severity of Tuberculosis. *PLoS One.* 2016;11(4):e0153567.
154. Zhang S, Shen H, Shu X, Peng Q, Wang G. Abnormally increased low-density granulocytes in peripheral blood mononuclear cells are associated with interstitial lung disease in dermatomyositis. *Mod Rheumatol.* 2016:1-8.
155. Denny MF, Thacker S, Mehta H, Somers EC, Dodick T, Barrat FJ, et al. Interferon-alpha promotes abnormal vasculogenesis in lupus: a potential pathway for premature atherosclerosis. *Blood.* 2007;110(8):2907-15.
156. Rajagopalan S, Somers EC, Brook RD, Kehrer C, Pfenninger D, Lewis E, et al. Endothelial cell apoptosis in systemic lupus erythematosus: a common pathway for abnormal vascular function and thrombosis propensity. *Blood.* 2004;103(10):3677-83.
157. Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, Wang JY, Riblett M, Yalavarthi S, et al. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol.* 2011;187(1):490-500.

158. Lood C, Blanco LP, Purmalek MM, Carmona-Rivera C, De Ravin SS, Smith CK, et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat Med*. 2016;22(2):146-53.
159. Hoffmann MH, Bruns H, Backdahl L, Neregard P, Niederreiter B, Herrmann M, et al. The cathelicidins LL-37 and rCRAMP are associated with pathogenic events of arthritis in humans and rats. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(7):1239-48.
160. Porntrakulpipat S, Depner KR, Moennig V. Are low-density granulocytes the major target cells of classical swine fever virus in the peripheral blood? *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2001;48(8):593-602.
161. Morisaki T, Goya T, Ishimitsu T, Torisu M. The increase of low density subpopulations and CD10 (CALLA) negative neutrophils in severely infected patients. *Surg Today*. 1992;22(4):322-7.
162. Fu J, Tobin MC, Thomas LL. Neutrophil-like low-density granulocytes are elevated in patients with moderate to severe persistent asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014;113(6):635-40 e2.
163. Couetil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Leguillette R, Richard EA. Inflammatory Airway Disease of Horses--Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med*. 2016;30(2):503-15.
164. Bullone M, Lavoie JP. Asthma "of horses and men"--how can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences? *Mol Immunol*. 2015;66(1):97-105.
165. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology*. 2011;16(7):1027-46.
166. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*. 2009;15(6):623-5.
167. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2013;5(178):178ra40.
168. Narasaraju T, Yang E, Samy RP, Ng HH, Poh WP, Liew AA, et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am J Pathol*. 2011;179(1):199-210.
169. Cortjens B, de Boer OJ, de Jong R, Antonis AF, Sabogal Pineros YS, Lutter R, et al. Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease. *J Pathol*. 2016;238(3):401-11.
170. Cote O, Clark ME, Viel L, Labbe G, Seah SY, Khan MA, et al. Secretoglobin 1A1 and 1A1A differentially regulate neutrophil reactive oxygen species production, phagocytosis and extracellular trap formation. *PLoS One*. 2014;9(4):e96217.

171. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):e1000639.
172. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One.* 2012;7(2):e32366.
173. Thomas GM, Carbo C, Curtis BR, Martinod K, Mazo IB, Schatzberg D, et al. Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. *Blood.* 2012;119(26):6335-43.
174. Rossaint J, Herter JM, Van Aken H, Napirei M, Doring Y, Weber C, et al. Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation. *Blood.* 2014;123(16):2573-84.
175. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest.* 2012;122(7):2661-71.
176. Grabcanovic-Musija F, Obermayer A, Stoiber W, Krautgartner WD, Steinbacher P, Winterberg N, et al. Neutrophil extracellular trap (NET) formation characterises stable and exacerbated COPD and correlates with airflow limitation. *Respir Res.* 2015;16:59.
177. Kabithe E, Hillegas J, Stokol T, Moore J, Wagner B. Monoclonal antibodies to equine CD14. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010;138(1-2):149-53.
178. Duran MC, Willenbrock S, Carlson R, Feige K, Nolte I, Murua Escobar H. Enhanced protocol for CD14+ cell enrichment from equine peripheral blood via anti-human CD14 mAb and automated magnetic activated cell sorting. *Equine Vet J.* 2013;45(2):249-53.
179. Touraine JL, Hadden JW, Touraine F, Hadden EM, Estensen R, Good RA. Phorbol myristate acetate: a mitogen selective for a T-lymphocyte subpopulation. *J Exp Med.* 1977;145(2):460-5.
180. Suzawa T, Hyodo S, Kishi T, Kashiwa H, Karakawa T, Kittaka E, et al. Comparison of phorbol myristate acetate and phytohaemagglutinin as stimulators of in vitro T lymphocyte colony formation of human peripheral blood lymphocytes. I. Surface markers of colony cells. *Immunology.* 1984;53(3):499-505.
181. Chow OA, von Kockritz-Blickwede M, Bright AT, Hensler ME, Zinkernagel AS, Cogen AL, et al. Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps. *Cell Host Microbe.* 2010;8(5):445-54.
182. Takashiba S, Van Dyke TE, Amar S, Murayama Y, Soskolne AW, Shapira L. Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor kappaB. *Infect Immun.* 1999;67(11):5573-8.

183. Pilszczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*. 2010;185(12):7413-25.
184. Gavillet M, Martinod K, Renella R, Harris C, Shapiro NI, Wagner DD, et al. Flow cytometric assay for direct quantification of neutrophil extracellular traps in blood samples. *Am J Hematol*. 2015;90(12):1155-8.
185. Brinkmann V, Goosmann C, Kuhn LI, Zychlinsky A. Automatic quantification of in vitro NET formation. *Front Immunol*. 2012;3:413.
186. Neumann A, Vollger L, Berends ET, Molhoek EM, Stapels DA, Midon M, et al. Novel role of the antimicrobial peptide LL-37 in the protection of neutrophil extracellular traps against degradation by bacterial nucleases. *J Innate Immun*. 2014;6(6):860-8.
187. von Köckritz-Blickwede M, CO, Ghochani M., Nizet V. . Visualization and functional evaluation of phagocyte extracellular traps. *Methods in Microbiology C*. 2010;37.
188. Brazil TJ, Dixon PM, Haslett C, Murray J, McGorum BC. Constitutive apoptosis in equine peripheral blood neutrophils in vitro. *Vet J*. 2014;202(3):536-42.
189. Murcia RY, Vargas A, Lavoie JP. The Interleukin-17 Induced Activation and Increased Survival of Equine Neutrophils Is Insensitive to Glucocorticoids. *PLoS One*. 2016;11(5):e0154755.
190. Chrysanthopoulou A, Mitroulis I, Apostolidou E, Arelaki S, Mikroulis D, Konstantinidis T, et al. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *J Pathol*. 2014;233(3):294-307.