

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

- Orientation:** Médecine vétérinaire
- Titre de la thèse en français :** Caractérisation fonctionnelle et moléculaire de maladies inflammatoires du poumon chez le cheval de sport
- Titre de la thèse en anglais :** Pulmonary function tests and molecular markers in athletic horses with inflammatory lung diseases
- Candidat :** Laurent COUËTIL
- Promoteur :** Professeur Pierre LEKEUX
- Co-promoteur :** Docteur Tatiana ART
- Département et Service :** Département des Sciences fonctionnelles, Service de Physiologie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique
- Date de la défense publique :** 4 octobre 2006
- Composition du Jury :**
- Membres extérieurs à la faculté :*
Professeur G. Van Loon, département de Médecine interne et Biologie clinique des grands Animaux, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Gand, Belgique, Professeur R. Louis, Département des Sciences cliniques, Pneumologie-Allergologie, Faculté de Médecine, Université de Liège
- Membres internes à la faculté de Médecine vétérinaire :*
Professeur H. Amory, Dr T. Art, Dr F. Bureau, Professeur D. Desmecht, Professeur J.M. Godeau, Professeur P. Lekeux, Professeur D. Serteyn, Dr E. Van Erck, Dr D. Votion

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

Les chevaux peuvent réaliser une très grande diversité d'activités physiques : des courses, qui nécessitent l'utilisation de leur capacité respiratoire maximale, à des efforts de plus faible intensité tels que la randonnée. La ventilation et le débit cardiaque augmentent de manière linéaire avec l'exercice. La consommation en oxygène va également augmenter avec l'accroissement de l'intensité du travail jusqu'à atteindre un plafond tandis que l'intensité de l'effort, la ventilation et le débit cardiaque peuvent encore pour-

suivre leur progression (Art et Lekeux, 1989 ; Rose et Hodgson, 1994 ; Art et Lekeux, 1995). Cependant lors d'un effort intense, alors que la ventilation s'accroît, les échanges gazeux se détériorent progressivement, induisant une hypoxémie et une hypercapnie induites par l'exercice (Bayly *et al.*, 1989 ; Hopkins *et al.*, 1998). L'importance de cette hypoxémie induite par l'exercice s'aggrave avec l'entraînement (Christley *et al.*, 1997). Le développement d'une maladie respiratoire risque donc de limiter l'aptitude à l'effort. Le degré de perturbation de l'effort physique induit par l'affection respi-

ratoire va dépendre de la gravité de la maladie et de l'intensité de l'exercice. Les chevaux de course utilisent 100 % de leur capacité respiratoire, et de ce fait, des affections respiratoires même mineures peuvent perturber les échanges gazeux sanguins et induire l'apparition de contre-performances. Il n'est donc pas surprenant que les maladies respiratoires soient une cause fréquente de baisses de performances et qu'elles représentent la troisième cause de jours de travail perdus après les affections de l'appareil locomoteur et les coliques (Wineland, 1998). En revanche, les chevaux de loisir en

promenade n'utilisent qu'une petite fraction de leur capacité respiratoire et seules des maladies respiratoires sévères peuvent affecter leur performance. De ce fait, le type de travail réalisé par le cheval doit être pris en considération dans le choix du test utilisé pour diagnostiquer une maladie respiratoire. Les maladies inflammatoires du système respiratoire telles que la pousse et la maladie inflammatoire des petites voies respiratoires (*inflammatory airway disease* ou IAD) se développent de manière insidieuse, sont chroniques et représentent un défi diagnostique pour les vétérinaires. Des tests très sensibles seront nécessaires pour déterminer l'impact d'une affection respiratoire telle que l'IAD sur la fonction pulmonaire et les performances d'un cheval de course, des tests moins sensibles seront requis pour détecter l'effet de la pousse chez des chevaux de loisir. De surcroît, il est indispensable que ces tests diagnostiques soient spécifiques aux affections respiratoires puisqu'une multitude d'autres affections peuvent être à l'origine de contre-performances.

L'hypothèse centrale de nos études était que l'inflammation respiratoire contribue au développement d'obstruction périphérique induisant la détérioration des échanges gazeux et la baisse des performances. Le but des expériences décrites dans ce travail fut de développer des tests sensibles pour la détection d'échanges gazeux anormaux et de sub-obstruction aérienne et de comparer les résultats ainsi obtenus à certains marqueurs de l'inflammation.

RÉSULTATS

Au cours de la première étude, il a été montré que les chevaux souffrant d'IAD et d'hémorragie pulmonaire

induite par l'exercice avaient une hypoxémie induite par l'exercice plus prononcée que les chevaux sains de contrôle. L'autre élément significatif était que la cytologie du lavage broncho-alvéolaire (LBA) indiquait une inflammation de type neutrophilique chez les chevaux atteints d'IAD et des taux élevés d'hémosidérophages chez les chevaux souffrant d'hémorragie pulmonaire. Ces chevaux atteints d'une affection modérée avaient un examen clinique et des analyses sanguines normaux. Ainsi, une maladie pulmonaire subclinique ou de faible intensité peut perturber les échanges gazeux respiratoires et induire des contre-performances chez les chevaux à l'effort intense. La mesure des gaz sanguins pendant un test d'effort standardisé s'est avéré être un test très sensible dans la détection précoce des maladies pulmonaires. Associé à l'analyse cytologique du LBA, celui-ci a permis d'établir un diagnostic spécifique. Le caractère relativement peu invasif de ce test, qui ne nécessite que le cathétérisme de l'artère transverse de la face, fait qu'il peut être proposé pour des chevaux en clientèle.

L'obstruction des voies respiratoires périphériques est une cause fréquente de l'inadéquation du rapport ventilation/perfusion qui peut provoquer des anomalies des échanges gazeux. Les tests de mécanique pulmonaire standards, réalisés en respiration spontanée, ont été largement utilisés pour évaluer le degré d'obstruction en particulier chez les chevaux poussifs. Cependant le problème majeur de cette technique est son manque de sensibilité, ainsi qu'un défaut de spécificité pour les maladies pulmonaires puisqu'elle est aussi influencée par la mécanique des voies respiratoires proximales. Nous avons trouvé que

l'expiration forcée (FE) était un test très sensible qui permettait la détection d'obstructions des voies respiratoires périphériques chez des chevaux avec des obstructions aériennes spontanées ou induites de manière expérimentale. Par exemple, chez des chevaux atteints de pousse en phase de rémission, la FE a permis de démontrer la persistance de signes d'obstruction aérienne alors que les tests de mécanique pulmonaire standards et les signes cliniques se situaient dans les normes. Chez des chevaux atteints de maladies respiratoires modérées telles que l'IAD, la FE a permis de mettre en évidence la présence d'obstruction des voies respiratoires alors que la seule anomalie détectée par les tests de mécanique pulmonaire standards était une légère augmentation de la résistance pulmonaire (R_L). La manœuvre de FE nécessite la mise en place d'une sonde nasotrachéale ce qui permet d'éviter que des anomalies des voies respiratoires proximales ne viennent perturber les résultats. L'examen de la courbe de FE montre que la partie de la courbe générée en fin d'expiration telle que le débit moyen de fin d'expiration ($FEF_{75-95\%}$) constitue le paramètre le plus sensible aux obstructions mineures des voies aériennes.

L'analyse du liquide de LBA est aussi un outil utile dans le diagnostic des maladies pulmonaires. Chez les chevaux atteints de pousse, l'afflux de neutrophiles vers la lumière des voies aériennes peut être détecté dès la cinquième heure qui suit l'exposition à l'allergène. Nous avons trouvé que la sévérité de l'inflammation neutrophilique dans le LBA des chevaux atteints de pousse était proportionnelle à la sévérité de l'obstruction aérienne. Cependant la neutrophilie du LBA est peu spécifique de la pousse puis-

que des chevaux atteints d'IAD ou d'une infection respiratoire bactérienne peuvent également présenter une importante neutrophilie aérienne. De plus, chez les chevaux poussifs placés dans un environnement pauvre en poussière pendant une durée suffisamment longue, le LBA redevient normal dans la plupart des cas. Les neutrophiles, les macrophages alvéolaires, les lymphocytes et les autres cellules inflammatoires exercent leur action en larguant des médiateurs de l'inflammation. On associe généralement l'augmentation du nombre de cellules inflammatoires à des inflammations respiratoires importantes. Mais la production des médiateurs de l'inflammation dépend du degré d'activation cellulaire. Se baser uniquement sur des comptages cellulaires pour évaluer la sévérité de l'inflammation est simpliste et par conséquent inexact. Une quantification des médiateurs de l'inflammation serait plus adéquate, cependant une sélection appropriée est difficile du fait de leur nombre important ainsi que de leurs possibles interactions. Des facteurs de transcription tels que NF- κ B, AP-1 et d'autres semblent jouer un rôle central dans l'initiation et le maintien de l'inflammation des voies respiratoires chez les asthmatiques. Chez les chevaux, NF- κ B est surexprimé dans les cellules bronchiques des poussifs en crise et le niveau d'activité de NF- κ B est fortement corrélé avec le degré de dysfonction pulmonaire. Nous avons découvert deux autres facteurs de transcription AP-1 et CREB qui pouvaient également être utilisés comme marqueurs de l'inflammation respiratoire chez les chevaux atteints de pousse. L'activité de AP-1 et de CREB semblait évoluer de manière opposée, suggérant des interactions entre les

voies moléculaires de signalisation.

Les glucocorticoïdes (GC), qu'ils soient administrés par voie systémique ou par voie orale, sont efficaces dans le traitement de l'obstruction aérienne et de l'inflammation pulmonaire chez les chevaux souffrant de pousse. Nous avons confirmé que l'administration d'une faible dose de béclo méthasone pendant 10 jours était suffisante pour améliorer la fonction pulmonaire des chevaux poussifs maintenus dans un environnement contenant du foin moisie. Cependant les effets sur les symptômes cliniques n'étaient pas statistiquement significatifs. De surcroît, l'amélioration de la fonction pulmonaire n'était pas associée à une réduction des taux de neutrophiles dans le LBA. Nous avons supposé que si la fonction pulmonaire était améliorée suite à une inhalation de béclo méthasone alors que les comptages cellulaires restaient inchangés dans le LBA, alors l'activité de NF- κ B ou de AP-1 devait être réduite, comme cela a été mis en évidence chez les asthmatiques humains. Nous avons toutefois constaté que ni l'activité de NF- κ B ni celle de AP-1 n'étaient modifiées par le traitement aux GC.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous avons démontré que les effets des maladies inflammatoires sur la fonction pulmonaire chez le cheval peuvent être évalués de manière sensible par la mesure des gaz sanguins artériels au cours de l'effort et par la réalisation de tests de FE. Ces tests fonctionnels devraient être utilisés en conjonction avec l'examen clinique et cytologique du système respiratoire afin d'en établir le diagnostic avec exactitude et déterminer l'impact de

ces maladies sur les performances sportives des chevaux. Cependant, la relation existant entre la sévérité des maladies inflammatoires et la qualité des échanges gazeux au cours de l'effort intense reste méconnue. La nature de cette relation pourrait être étudiée en évaluant l'effet des traitements de l'IAD sur les échanges gazeux et le degré d'obstruction des petites voies respiratoires.

Jusqu'à présent, le système utilisé pour induire les expirations forcées est un prototype et n'est pas commercialement disponible. La version actuelle est volumineuse et nécessite un équipement supplémentaire tel qu'un appareil de ventilation mécanique et un capnographe. Ces différentes contraintes font que cette technique est actuellement inadaptée pour des études de terrain ou pour la plupart des cliniques équinées. Des études futures devraient avoir pour objectif de développer des versions plus compactes, portables et utilisables en pratique.

Enfin, les facteurs transcriptionnels semblent jouer un rôle dans la pathogenèse de la pousse et leur activation dans les cellules bronchiques pourrait être utilisée comme marqueur biologique de l'inflammation pulmonaire. Au cours d'études ultérieures, l'évaluation des effets des corticoïdes sur l'activité des facteurs de transcription dans les voies respiratoires des chevaux atteints de pousse devrait inclure la mesure de l'expression des médiateurs de l'inflammation et si possible comparer les effets de différentes doses de corticoïdes sur ces variables.

Il existe encore de nombreuses questions fondamentales sans réponse concernant les maladies inflammatoires du système respiratoire du cheval. Par

exemple, est-ce que les chevaux atteints d'IAD ont un risque important de souffrir de la pouffe par la suite ou s'agit-il de deux maladies différentes sur le plan de la pathogenèse ? Est-ce que l'obstruction des petites voies respiratoires chez les chevaux pouffifs en rémission est réversible

ou est-ce que le remaniement tissulaire est permanent ? Quels sont les mécanismes moléculaires orchestrant l'inflammation pulmonaire ? Quelles sont les meilleures stratégies de prévention et de traitement des maladies inflammatoires pulmonaires ?

Nous espérons que les outils diagnos-

tic développés lors de ce travail vont contribuer à mieux définir le phénotype des chevaux souffrant d'IAD et de pouffe et ainsi aider à répondre aux nombreuses questions fondamentales qui restent posées.

REFERENCES

- ART T., LEKEUX P. Work of breathing in exercising ponies. *Res. Vet. Sci.*, 1989, **46**, 49-53.
- ART T., LEKEUX P. Ventilatory and arterial blood gas tension adjustments to strenuous exercise in standardbreds. *Am. J. Vet. Res.*, 1995, **56**, 1332-1337.
- BAYLY W.M., HODGSON D.R., SCHULTZ A., DEMPSEY J., GOLLNICK P.D. Exercise-induced hypercapnia in the horse. *J. Appl. Physiol.*, 1989, **67**, 1966.
- CHRISTLEY R.M., HODGSON D.R., EVANS D.L., ROSE R.J. Effects of training on the development of exercise-induced arterial hypoxemia in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1997, **58**, 653-657.
- HOPKINS S., BAYLY W., SLOCOMBE R., WAGNER H., WAGNER P. Effect of prolonged heavy exercise on pulmonary gas exchange in horses. *J. Appl. Physiol.*, 1998, **84**, 1723-1730.
- ROSE R., HODGSON D. Investigation of poor performance. In : Hodgson D., Rose R. (Eds.), *The Athletic Horse*. WB Saunders : Philadelphia, 1994, 259-266.
- WINELAND N. The National Animal Health Monitoring System, the Equine '98 Study, Part II: Baseline reference of 1998 equine health and management. [en ligne] (Septembre 1998) Adresse URL : <http://www.aphis.gov/vs/ceah/ncahs/nahms/equine/equine98/eq98pt2.pdf> Consulté le 15/05/06.
- PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE**
- COUËTIL L.L., ART T., DE MOFFARTS B., BECKER M., MÉLOTTE D., JASPAR F., BUREAU F., LEKEUX P. DNA binding activity of transcription factors in bronchial cells of horses with recurrent airway obstruction. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2006, **113**, 11-20.
- COUËTIL L.L., ART T., DE MOFFARTS B., BECKER M., MÉLOTTE D., JASPAR F., BUREAU F., LEKEUX P. Effect of beclomethasone dipropionate and dexamethasone isonicotinate on lung function, bronchoalveolar lavage fluid cytology and transcription factors expression in airways of horses with recurrent airway obstruction. *J. Vet. Intern. Med.*, 2006, **20**, 399-406.
- COUËTIL L.L., ROSENTHAL F.S., DENICOLA D.B., CHILCOAT C.D. Clinical signs, evaluation of bronchoalveolar lavage fluid, and assessment of pulmonary function in horses with inflammatory respiratory disease. *Am. J. Vet. Res.*, 2001, **62**, 538-546.
- COUËTIL L.L., ROSENTHAL F.S., SIMPSON C.M. Forced expiration: a test for airflow obstruction in horses. *J. Appl. Physiol.*, 2000, **88**, 1870-1879.
- COUËTIL L.L., DENICOLA D. Blood gas, plasma lactate and bronchoalveolar lavage cytology analysis in racehorses with respiratory disease. *Equine Vet. J. Suppl.*, 1999, **30**, 77-82.
- COUËTIL L.L., HINCHCLIFF K. Non-infectious diseases of the lower respiratory tract. In : Hinchcliff K., Kaneps A., Geor R. (Eds), *Equine sports medicine and surgery : basic and clinical sciences of the equine athlete*. Saunders : Edinburgh, 2004, 613-656.
- COUËTIL L.L. Diagnosis of inflammatory airway disease in horses and effects on performance. In : Proceedings of the Purina Mills Veterinary Conference, Equine Sports Nutrition and Medicine, St. Louis, MO, 2003, 25-29.
- COUËTIL L.L. Therapeutic strategies for inflammatory airway disease in horses. In : Proceedings of the Purina Mills Veterinary Conference, Equine Sports Nutrition and Medicine, St. Louis, MO, 2003, 30-36.
- COUËTIL L.L. Inflammatory airway disease: cough, poor performance, mucus in the airways. What is so important about that? In : Proceedings of 48th American Association of the Equine Practitioners Convention, Orlando, FL, 2002, 297-298.
- COUËTIL L.L. Aerosol medications for the management of inflammatory airway disease in the horse. In : Proceedings of the American College of Internal Medicine Forum, Dallas, TX, May 2002, 716-718.
- COUËTIL L.L. Forced expiration in the horse. In : Proceedings of

- the American College of Internal Medicine Forum, Seattle, WA, 2000, 233-234.
- ART T., KIRSCHVINK N., DE MOFFARTS B., COUËTIL L.L., GUSTIN P., LEKEUX P. Matrix metalloproteases in bronchoalveolar lavage from healthy and RAO horses in crisis and in remission. In : Proceedings of the 3rd World Equine Airway Symposium, Ithaca, New York, 2005, 109.
- COUËTIL L.L., ART T., BUREAU F., LEKEUX P. Activator protein-1 activity in bronchial brushing samples from horses with recurrent airway obstruction. In: Proceedings of the 22nd Veterinary Respiratory Symposium of the Comparative Respiratory Society, Montreal, Canada, 2004, 63.
- COUËTIL L.L. Inflammatory airway disease and clinical exercise testing. In: Proceedings of the Dorothy R. Havemeyer Foundation Symposium on IAD, Boston, MA, 2002, 32.
- COUËTIL L.L., DENICOLA D.B., ROSENTHAL F.S. Clinical signs, airway cytology, and lung function in horses with inflammatory airway disease. In: Proceedings of the 6th Congress of the World Equine Veterinary Association, Paris, France, 1999.
- COUËTIL L.L., DENICOLA D. Blood gas, plasma lactate and bronchoalveolar lavage cytology analysis in racehorses with respiratory disease. In: Proceedings of the 5th International Conference on Equine Exercise Physiology, Utsunomiya, Japan, 1998, 35.
- COUËTIL L.L., SIMPSON C.M., ROSENTHAL F.S. Forced expiration: a new test of lung function in horses. In: Proceedings of the World Equine Airways Symposium, Guelph, Canada, 1998, 1.

REMERCIEMENTS

In part supported by the state of Indiana and the Purdue University School of Veterinary Medicine Research account funded by the total wager tax.