



HAL
open science

Influence du foin "à la vapeur" sur la réponse immune de chevaux asthmatiques : du challenge d'exposition (in vivo) à la stimulation (in vitro) des macrophages alvéolaires.

Marie Orard

► To cite this version:

Marie Orard. Influence du foin "à la vapeur" sur la réponse immune de chevaux asthmatiques : du challenge d'exposition (in vivo) à la stimulation (in vitro) des macrophages alvéolaires.. Biologie animale. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMC271 . tel-02159559

HAL Id: tel-02159559

<https://theses.hal.science/tel-02159559>

Submitted on 18 Jun 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Influence du foin "à la vapeur" sur la réponse immune de chevaux asthmatiques: du challenge d'exposition (in vivo) à la stimulation (in vitro) des macrophages alvéolaires.

**Présentée et soutenue par
Marie ORARD**

**Thèse soutenue publiquement le 17/12/2018
devant le jury composé de**

M. FRANÇOIS-XAVIER BLANC	Professeur des universités PraticienHosp, CHU de Nantes	Rapporteur du jury
Mme NATHALIE KIRSCHVINK	Professeur, Université de Namur	Rapporteur du jury
M. JEAN-CLAUDE DESFONTIS	Professeur des universités, École Nationale Vétérinaire de Nantes	Président du jury
Mme SYLVIE LECOLLINET	Chargé de recherche à l'INRA, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort	Membre du jury
Mme MAGALI DEMOOR	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Directeur de thèse
M. ERIC RICHARD	Docteur Vétérinaire, Laboratoire Duncombe Caen	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par MAGALI DEMOOR et ERIC RICHARD, Biologie, Génétique et Thérapies Ostéo-Articulaires et Respiratoires



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



Ce qui signifie le mot recherche ? Vivre pleinement la question.

Edgar Morin

En vivant pleinement ma question, j'espère avoir éclairé pour d'autres le chemin sur lequel j'ai trébuché.

Ce travail de thèse a été mené au sein de l'équipe MECIIR (MÉcanisme et Contrôle des Infections et Inflammation Respiratoire) du laboratoire BioTARGEN (Biologie, Génétique, et thérapies ostéoArticulaires et Respiratoires).



Mon contrat doctoral a été financé par l'entreprise HayGain.



L'ensemble des travaux ont également été menés à bien grâce au soutien financier de LABÉO et d'ONIRIS Nantes.



Remerciements

A mes encadrants de thèse,

Magali Demoor pour avoir accepté de diriger cette thèse et pour sa rigueur administrative. Merci pour vos conseils et vos relectures.

Eric Richard, bien plus que mon co-directeur de thèse. Je souhaiterais te remercier profondément pour m'avoir donné la chance d'arriver jusqu'ici en me proposant cette thèse. Depuis 5 ans tu as souvent cru en moi bien plus que je n'y croyais. Merci pour ton encadrement scientifique, tes précieux conseils, ta disponibilité et ta patience pour tout ce que tu m'as appris.

A mes encadrantes techniques mais bien plus,

Erika Hue, un grand merci pour ton aide, ta disponibilité, tes nombreuses relectures et pour ton soutien et ton implication sans faille à mes côtés auprès des chevaux, lors du challenge ou lors des analyses au laboratoire.

Marie-Pierre Toquet, merci pour ta bonne humeur, ton organisation, ton aide au cours de cette thèse et bien sûr pour tes petits gâteaux dont seule toi as le secret pour rendre chaque moment beaucoup plus agréable, au milieu des chevaux ou au labo, j'ai beaucoup aimé travailler avec toi.

A Anne Couroucé et à Céline Bizon,

Pour m'avoir accompagnée durant la réalisation du challenge et bien plus... Pour tout le travail en amont et l'organisation. Merci pour votre bonne humeur et votre implication dans cette étude. Merci à Céline et Laurent bien sûr pour votre accueil à Sobidain, dans votre petite famille et pour ces galops magiques le long de l'Erdre.

Aux membres du jury

Merci aux Professeurs Francois-Xavier Blanc et Nathalie Kirschvink, pour l'intérêt porté à mon sujet et pour avoir eu la gentillesse d'accepter d'évaluer mon travail.

Merci au Professeur Jean-Claude Desfontis et à Sylvie Lecollinet pour avoir accepté d'être membres du jury et m'avoir conseillée lors des comités de suivi de thèse.

Aux membres de mon CSI,

Merci à Fabrice Audigié, Mickael Aubert et Simon Body pour votre regard extérieur sur mon travail et pour vos conseils scientifiques et professionnels.

A LABÉO,

Merci à Romain Paillot et Stéphane Pronost, pour vos précieux conseils scientifiques et votre passion de la recherche.

Merci à Guillaume Fortier et Pierre-Hugues Pitel,

Un grand merci aux différents services de LABÉO pour leur collaboration et leur implication dans ce projet. Merci de m'avoir formée avec beaucoup de patience et de rigueur aux différentes méthodologies. Merci aux services de bactériologie alimentaire, de chimie alimentaire, de chimie de l'environnement, de parasitologie, d'immunologie, de biochimie et de cytologie.

A ONIRIS,

Un grand merci à Yassine Mallem pour nous avoir fait une place au sein des laboratoires d'ONIRIS Nantes.

Et merci aux étudiants vétérinaires d'ONIRIS Nantes qui ont aidé lors des prélèvements sur les chevaux. Merci pour votre implication et votre aide sur le challenge.

A la team HayGain,

Tout d'abord un grand merci pour avoir rendu possible la réalisation de cette thèse en acceptant de la financer.

Merci à Brian, fondateur de l'entreprise HayGain, parti trop tôt, qui passionné par la santé équine m'a donné la chance d'intégrer son entreprise afin de faire évoluer la recherche et le développement au sein de HayGain France.

A Leah pour ta bonne humeur, ton amitié, au bureau ou sur les concours avec le stand HayGain, travailler et papoter avec toi a été un plaisir.

A Becky James pour avoir supervisé de l'Angleterre le bon déroulement de la thèse.

A Meriel,

Merci pour vos conseils scientifiques sur le projet lors de nos rencontres franco-anglaises

A mes collaborateurs trans-Atlantique,

Laurent Couëtil, merci pour votre accueil au sein de votre équipe à l'université de Purdue. Et merci pour vos précieux conseils.

Merci à Katy Ivester pour m'avoir formée à la réalisation des prélèvements de poussières respirables et inhalables et fait participer aux prélèvements sur les chevaux de courses. De longues heures de surveillance dans la bonne ambiance des écuries.

Un grand merci à Sandy Taylor pour ton accueil. De très beaux souvenirs entre Chicago et le lac Michigan. Bien sûr une pensée pour Lola, Simon et Norman.

Aux propriétaires de chevaux,

Un grand merci à vous pour avoir accepté de nous confier vos chevaux pour la réalisation du challenge, merci pour votre confiance et pour avoir permis la réalisation de cette étude.

Aux principaux concernés à 4 pattes,

Sissi, Sinsemillia, Trotline, Chelby, Chicago, Balzac, Amastris, Zaard..., Mandane, Médée, Urska et bien sûr Marcus.

A mes collègues et amis,

Merci à Stéphanie pour ton soutien et pour nos pauses confidentes.

Merci à Clovis pour ta bienveillance et tes connaissances improbables dans tous les domaines.

A mes coloc' de bureau, Côme merci pour ton soutien et ton aide ou plutôt ta patience pour m'expliquer l'utilisation de l'xCeLLigence ou l'IncuCyte..., merci à Bastien, Romain et Clément pour votre bonne humeur. Sans oublier Thomas, notre spécialiste des formalités administratives.

A Gabrielle, bon courage pour la suite.

A mes amis, à ma famille,

Mes piliers, merci d'avoir toujours été là pour moi.

A tous ceux à qui je pense mais que je n'ai pas cité,

Vous qui avez partagé ma vie ou croisé mon chemin, et qui, par un bout de vous, m'avez permis d'être ce que je suis aujourd'hui.

Sommaire

REMERCIEMENTS	
SOMMAIRE.....	
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	
FORMATIONS.....	
LISTE DES ABREVIATIONS	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION.....	3
<hr/>	
I. L'APPAREIL RESPIRATOIRE DU CHEVAL	3
1. Les voies respiratoires supérieures	3
1.1. Les naseaux	3
1.2. Les poches gutturales.....	5
1.3. Le pharynx	5
1.4. Le larynx	6
1.5. La trachée.....	7
2. Les voies respiratoires profondes	7
2.1. Les poumons	7
2.2. Les bronches et les bronchioles.....	8
2.3. Les alvéoles pulmonaires.....	9
II. L'ASTHME SEVERE DU CHEVAL	11
1. Historique.....	11
2. Epidémiologie.....	14
3. Présentation clinique	14
3.1. L'hyperréactivité bronchique	16
3.2. La bronchoconstriction.....	16
3.3. Le remodelage des voies respiratoires	17
4. Diagnostic de l'asthme équin sévère	18
4.1. Diagnostic clinique	18
4.2. Endoscopie des voies respiratoires	19
4.3. Cytologie du lavage broncho-alvéolaire	19
III. ETIOLOGIE DE L'ASTHME EQUIN	23
1. Facteurs de l'Hôte	23
2. Facteurs environnementaux	23
2.1. L'environnement au sein des écuries	24
2.2. Le foin.....	26
2.2.1. Les moisissures.....	26
2.2.2. Le β -D glucane.....	28
2.2.3. Les endotoxines	28

2.2.4. Effet synergique des différents antigènes.....	30
2.3. Dépôt dans les voies respiratoires.....	30
3. Facteurs bactériens et viraux	32
4. Autres facteurs environnementaux	33
IV. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ASTHME.....	35
1. La réaction d'hypersensibilité	35
2. Initiation de la réponse inflammatoire	37
3. La réponse immunitaire pulmonaire.....	38
3.1. Les acteurs cellulaires au niveau du poumon.....	38
3.1.1. Les cellules épithéliales, cellules musculaires lisses et cellules parenchymateuses.....	39
3.1.2. Les granulocytes.....	40
3.1.3. Les mastocytes.....	43
3.1.4. Les lymphocytes.....	43
3.1.5. Les cellules dendritiques	46
3.1.6. Les macrophages.....	46
3.1.6.1. Origine des macrophages.....	47
3.1.6.2. Les macrophages pulmonaires.....	48
3.1.6.3. L'activation des macrophages.....	49
3.1.6.4. La polarisation des macrophages.....	50
3.1.6.5. Les macrophages alvéolaires dans la régulation de l'asthme	53
3.1.6.6. Interrogations et potentielles applications thérapeutiques	55
4. La réponse systémique.....	56
V. TRAITEMENTS DE L'ASTHME EQUIN SEVERE.....	59
1. Thérapie médicamenteuse.....	59
1.1. Anti-inflammatoires	59
1.2. Les bronchodilatateurs	60
1.3. Les médecines alternatives	62
2. Gestion de l'environnement du cheval	62
2.1. Diminuer la concentration en poussière issue du foin	62
2.2. Diminuer la poussière au sein de l'écurie.....	63
VI. LE CHEVAL COMME MODELE DE RECHERCHE POUR L'HOMME.....	67
1. Avantage du modèle équin	67
2. Les inconvénients du modèle équin pour l'asthme humain	69
HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	71
<hr/>	
PARTIE I. INFLUENCE DU FOIN « A LA VAPEUR » SUR LA REPOSE SYSTEMIQUE ET RESPIRATOIRE DES CHEVAUX AES	75
A. Mise en place du challenge <i>in vivo</i> et analyse du foin	77
A.1. Matériel et méthodes	77
A.1.1. Animaux	77
A.1.2. Design de l'étude	77
A.1.3. Prélèvements effectués sur les chevaux	78
A.1.4. Caractérisation du foin et de la qualité de l'air	79
A.1.4.1. Bactériologie et mycologie du foin	79
A.1.4.2. Valeurs nutritionnelles.....	80
A.1.4.3. Particules respirables et inhalables	82
A.1.4.4. Endotoxines	83
A.1.4.5. (1→3)- β-D-glucane.....	84
A.1.5. Analyses statistiques	84
A.2. Résultats	84
A.2.1. Caractérisation du foin.....	84
A.2.2. Particules respirables et inhalables.....	85
A.2.3. Endotoxines et β-D-glucane	86
B. Réponse systémique immunitaire des chevaux AES stimulés avec du foin "à la vapeur" ou non	86

B.1. Matériel et méthodes	86
B.1.1. Isolement des PBMC	86
B.1.2. Extraction des ARN et synthèse de l'ADN complémentaire	87
B.1.3. Expression des ARNm des cytokines du sang	89
B.1.3.1. Présentation de la lame OpenArray	89
B.1.3.2. Pré-amplification des ADNc	89
B.1.3.3. Distribution des échantillons sur lame OpenArray®	90
B.1.3.4. Nanoscale PCR sur lame OpenArray	90
B.1.3.5. Réalisation des qPCR	91
B.1.4. Analyse des données	91
B.1.5. Dosage des cytokines sériques	92
B.1.5.1. Dosage des cytokines avec le Milliplex® Map kit	92
B.1.5.2. Dosage des cytokines sériques par technique ELISA	93
B.1.6. Analyses statistiques	94
B.2. Résultats	94
C. Réponse respiratoire au challenge d'exposition in vivo à du foin "à la vapeur" ou non	96
C.1. Réponses clinique, cytologique et immunitaire au niveau du LBA	97
C.1.1. Matériel et méthodes	97
C.1.1.1. Recherche de virus dans les écouvillons naso-pharyngés	97
C.1.1.2. Analyse cytologique	97
C.1.1.3. Extraction des ARN et synthèse de l'ADN complémentaire	98
C.1.1.4. Expression génique des cytokines dans le LBA	98
C.1.1.5. Analyse des données	99
C.1.2. Examen clinique respiratoire	99
C.1.3. Profils cytologique et cytokinique des LBA	100
C.2. Réponse immunitaire des macrophages alvéolaires	104
C.2.1. Matériel et méthodes	105
C.2.1.1. Isolement des macrophages alvéolaires équins	105
C.2.1.2. Expression génique des cytokines des MA	105
C.2.1.3. Analyses statistiques	106
C.2.2. Résultats	106
D. Discussion partielle	108
D.1. Chevaux	108
D.2. Design de l'étude	109
D.3. Caractérisation du foin	110
D.4. Scores cliniques et inflammation	111
D.5. Réponse immunitaire systémique	112
D.6. Réponse immunitaire dans le poumon	115
D.6.1. Réponse immunitaire évaluée dans le LBA	115
D.6.2. Réponse immunitaire des macrophages alvéolaires	116
E. Conclusion partielle	118
PARTIE II. CARACTERISATION ET STIMULATION <i>IN VITRO</i> DES MACROPHAGES ALVEOLAIRES EQUINS	121
Avant-propos	123
A. Caractérisation du stimulant (HDS) et développement des techniques de culture cellulaire	125
A.1. Caractérisation des suspensions de foin (HDS)	125
A.1.1. Matériel et méthodes	125
A.1.1.1. Hay Dust Suspension (HDS)	125
A.1.1.2. Quantification des poussières respirables et inhalables	125
A.1.1.3. Concentration en bactéries et moisissures des HDS	126
A.1.1.4. Teneur en endotoxines et β -D-Glucane	127
A.1.1.5. Analyses statistiques	127
A.1.2. Résultats	127
A.1.2.1. Teneur en particules respirables et inhalables	127

A.1.2.2. Teneurs en bactéries et moisissures	130
A.1.2.3. Teneur en β -D-glucane et en endotoxines.....	130
A.1.3. Discussion partielle	131
A.2. Mise en place des techniques de culture pour les macrophages	131
A.2.1. Développement des techniques sur les macrophages murins	131
A.2.1.1. Culture des RAW264-7.....	131
A.2.1.2. Stimulation des RAW264-7	132
A.2.1.3. Suivi par impedancemétrie et microscopie en temps réel	132
A.2.1.4. Activité de phagocytose des macrophages murins stimulés	133
A.2.1.5. Analyses statistiques.....	134
A.2.2. Résultats.....	134
A.2.2.1. Réponse des RAW264-7 aux antigènes standards	134
A.2.2.2. Réponse des RAW264-7 aux HDS au cours du temps	142
A.2.3. Discussion.....	144
B. Caractérisation et stimulation <i>in vitro</i> des macrophages alvéolaires équinés	149
B.1. Matériel et méthodes	149
B.1.1. Isolement des macrophages alvéolaires	149
B.1.2. Immunophénotypage.....	149
B.1.3. Capacité de phagocytose et de macropinocytose de la population R1.....	150
B.1.4. Stimulation <i>in vitro</i> des macrophages alvéolaires.....	151
B.1.5. Réponse protéique des macrophages alvéolaires stimulés.....	152
B.2. Résultats.....	152
B.2.1. Caractérisation de la population de macrophages alvéolaires.....	152
B.2.2. Comparaison de l'activité de phagocytose et de macropinocytose des MA isolés des chevaux AES et CTL	156
B.2.2.1. Activité de phagocytose.....	156
B.2.2.2. Activité de macropinocytose	160
B.2.3. Réponse à une stimulation <i>in vitro</i> des MA issus de chevaux préalablement challengés <i>in vivo</i>	163
B.2.3.1. Stimulation <i>in vitro</i> des MA « naïfs »	163
B.2.3.2. Stimulation <i>in vitro</i> des MA préalablement « challengés » <i>in vivo</i>	167
C. Discussion partielle	169
C.1. Population des macrophages.....	169
C.2. Comparaison de l'activité de phagocytose et de macropinocytose des MA de chevaux AES et CTL après stimulation <i>in vitro</i>	171
C.3. Effet d'un challenge <i>in vivo</i> préalable sur la réponse à une stimulation <i>in vitro</i> des MA	175
D. Conclusion partielle	176
DISCUSSION GENERALE	177
CONCLUSIONS GENERALES.....	181
PERSPECTIVES	185
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	187

Annexe 1 : Grille d'évaluation de la santé respiratoire des chevaux	
Annexe 2 : Fiche suivi des chevaux au cours du challenge	
Annexe 3 : Article 1 (accepté pour publication).....	
Annexe 4 : Article 2 (en préparation).....	
Annexe 5 : Article Orard et <i>al.</i> , 2015.....	
Annexe 6 : Article soumis pour publication le 20/07/2018	
Annexe 7 : Abstract, communication orale (AVEF, le 7 novembre 2018, Bordeaux, France)	
Annexe 8 : Abstract, communication orale (WEAS, le 15 juillet 2017, Copenhague, Danemark).....	
Annexe 9 : Abstract, communication orale (The Dorothy Russel Havemeyer Foundation IAD Workshop, le 13 octobre 2014, Cabourg, France)	

Liste des publications et communications

Articles acceptés dans des revues internationales à comité de lecture :

Marie Orard, Erika Hue, Anne Couroucé, Céline Bizon-Mercier, Marie Pierre Toquet, Meriel Moore-Colyer, Laurent Couëtil, Stéphane Pronost, Romain Paillot, Magali Demoor, Eric A. Richard. *The influence of hay steaming on clinical signs and airway immune response in severe asthmatic horses. BMC Vet Res.* 2018. (Annexe 3)

Marie Orard, Marianne Depecker, Erika Hue, Pierre-Hugues Pitel, Anne Couroucé-Malblanc, Eric A. Richard. *Influence of bronchoalveolar lavage volume on cytological profiles and subsequent diagnosis of inflammatory airway disease in horses. Vet J.* (2015). (Annexe 5)

Articles en révision dans une revue internationale à comité de lecture:

Erika Hue, Marie Orard, Marie-Pierre Toquet, Marianne Depecker, Anne Couroucé, Stéphane Pronost, Romain Paillot, Eric A. Richard. *Asymmetrical pulmonary cytokine profiles are linked to bronchoalveolar lavage fluid cytology of horses with mild equine asthma. Vet Immunol Immunopathol.* (en révision depuis le 22/09/2018). (Annexe 6)

Communications orales

Marie Orard, Erika Hue, Anne.Couroucé, Céline Bizon-Mercier, Marie Pierre Toquet, Meriel Moore-Colyer, Laurent Couëtil, Stéphane Pronost, Romain Paillot, Magali Demoor, Eric A. Richard. *La purification du foin a-t-elle une influence sur les signes cliniques et la réponse immune des chevaux atteints d'asthme sévère ?* Communication orale au congrès de l'AVEF 2018, Bordeaux, France. (Annexe 7)

Marie Orard, Erika Hue, Marilyne Guillamin, Meriel Moore-Colyer, Anne Couroucé-Malblanc, Laurent Couëtil, Magali Demoor, Eric A. Richard. *Hay dust particles measured by flow cytometry in steamed versus dry hay.* Communication orale au congrès du WEAS 2017, Copenhague, Danemark. (Annexe 8)

Marie Orard, Marianne Depecker, Erika Hue, Marie Pierre Toquet, Anne Couroucé-Malblanc, Eric A. Richard. *Effect of bronchoalveolar lavage volume on cytological results and subsequent IAD diagnosis*. Communication orale, 2nd Havemeyer IAD Workshop, 2014, Cabourg, France.
(Annexe 9)

Formations

Formations suivies à l'école doctorale :

2018 :

- « Structure et fonctionnement de l'enseignement supérieur et de la recherche » : (3h)
- « Financement et management des projets de recherche » : (12h)

2016 :

- « Initiation au logiciel de gestion des références bibliographiques Zotero » : (6h)

Formations techniques suivies au laboratoire :

2018 :

- Formation à l'utilisation du logiciel d'imagerie NIS-AR : (6h)
- Utilisation du Multisizer™ 4 (Beckman Coulter) : (4h)

2017 :

- Utilisation de la technologie Luminex (MagPix) : (6h)
- Utilisation de la microscopie en temps réel (IncuCyte) : (6h)

Encadrement :

2018 :

- Co-encadrement d'un binôme de deux élèves (collégien et lycéen) dans le cadre du dispositif « Apprentis chercheurs » de l'association l'« Arbre des Connaissances » : (30h)

Liste des abréviations

ACTB: β -Actine	GAPDH: Glyceraldehyde Phosphate Déshydrogénase
ACVIM: « American College of Veterinary Internal Medicine »	GM-CSF: « Granulocyte Colony Stimulating Factor »
ADN (DNA) : Acide désoxyribonucléique	GFP: « Green Fluorescent protein »
ADNc : Acide Désoxyribonucléique Complémentaire	GINA : « Global Initiative for Asthma »
AEM : Asthme Equin Modéré	HDS : « Hay Dust Suspension »
AES (ou sEA) : Asthme Equin Sévère	HDS B: « Hay Dust Suspension » provenant de foin sec
AFNOR : Association française de normalisation	HDS HG : C Hay Dust Suspension » provenant de foin « à la vapeur »
AMPc: Adénosine Monophosphate Cyclique	HG : HayGain (foin “à la vapeur”)
ANOVA : Analyse de Variance	HOARSI : « Relationship of horse owner assessed respiratory signs index »
APC/Cy7 : Allophycocyanin/cyanine dye 7	HVE: Herpes virus équin
ARNm: Acide Ribonucléique messenger	IAD: « Inflammatory Airway Disease »
BP: Bioparticules d' <i>Escherichia coli</i>	IFN : Interféron
BSA : « Bovine Serum Albumin »	IgE : Immunoglobuline E
BTRE : Banque de tissus respiratoires équins	IL: Interleukine
Ca, P, Mn, Zn : Calcium, phosphore, manganèse, Zinc	IL-6R : IL-6 récepteur
CCL : « Chemokine C-C motif ligand »	iNOS : « Inducible Nitric Oxide Synthase »
CD : « Cluster de différenciation »	IOM : « Inhalable Dust Sampling »
CI : « Cell Index »	LBA : Lavage Broncho Alvéolaire
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité	LPS: Lipopolysaccharide
CO ₂ : Dioxyde de carbone	M1 : Macrophage de type 1
COPD: « Chronic Obstructive Pulmonary Disease »	M2 : Macrophage de type 2
CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène	MA : Macrophages Alvéolaires
CpG-ODN : Cytosine-phosphate-guanosine- oligodeoxynucleotides	MADC : Matière Digestible Azotée Cheval
Cq : Quantification Cycle	MCP-1 : « Monocyte Chemoattractant Protein-1 »
Ct : « Cycle Threshold »	MD-2 : Co-récepteur membranaire-2
CTL: Contrôle	MI : Macrophages interstitiels
CXCL : « The chemokine (C-X-C motif) ligand »	miARN: Micro Acide Ribonucléique
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium	MIP : « Macrophage inflammatory protein »
DMSO : Diméthylsulfoxyde	MM : Matière minérale
DNMT : « DNA methyltransferase »	Mo-AM : « Monocyte-derived alveolar macrophages »
DP: déplacement du pelvis	MS : Matière sèche
EDTA : Ethylène diamine tétraacétique	MyD88 : « Myeloid differentiation primary response 88 »
ELISA : « Enzyme-linked immunosorbent assay »	NED : N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride
ENP : Ecouvillon naso-pharyngé	NF- κ B : « Nuclear Factor-Kappa B »
ERAV: Equine Rhinitis A Virus	NK: « Natural Killer »
ERBV: Equine Rhinitis B virus	
FITC : « Fluorescein-5-isothiocyanate »	
FSC : « Forward Scatter »	

NO: « Nitric oxide »
 NS: Non stimulé
 nsPCR: « nanoscale PCR »
 OGA : « Oxytetracycline-Glucose-yeast extract Agar »
 PAMP: « Pathogen Associated Molecular Patterns»
 PBMC : « Peripheral blood mononuclear cells »
 PBS : «Phosphate-buffered saline »
 PC-7 : Phycoerythrin Cyanin 7
 PCA : « Plate Count Agar »
 PET : Polyethylene terephthalate
 PPAR- γ : « Peroxisome proliferator-activated receptor gamma »
 PVC : Polychlorure de vinyle
 qPCR: « Quantitative Polymerase Chain Reaction»
 QTL : « Quantitative trait locus »
 RAO: « Recurrent Airway Obstruction »
 RIN : « RNA Integrity Number »
 ROS : « Reactive Oxygen Species »
 R-PE : R-phycoerythrin
 RPMI : « Roswell Park Memorial Institute medium»
 RSQ : « Risk-screening questionnaire »
 RT-PCR : « Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction »
 SPAOPD: « Summer Pasture-Associated Obstructive Pulmonary Disease »
 Spp. : *Pluralis species*
 SSC : « Side scatter »
 SVF : Serum de Veau Foetal
 TCR : « T cell receptor »
 TGF- β : « Transforming Growth Factor Beta- β »
 Th1 : « lymphocyte T helper 1 »
 Th17 : « lymphocyte T helper 17 »
 Th2 : « lymphocyte T helper 2 »
 TIE: Tyrosine Kinase
 TLR: « Toll Like Receptor »
 TNF- α : « Tumor Necrosis Factor- α »
 TRAM: « Toll-IL-1R (TIR) domain-containing adaptor inducing IFN- β -related adaptor molecule »
 Treg: « lymphocyte T régulateur
 TRIF : « Toll-IL-1R-domain-containing adapter-inducing interferon- β »
 UFC (ou CFU): Unité formant colonies
 UFC : Unité Fourragère Cheval
 VRP: Voies Respiratoires Profondes
 WEAS : « World Equine Airway Symposium »
 β -GUS : Beta-Glucuronidase

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de l'appareil respiratoire du cheval.....	3
Figure 2 : Section sagittale de tête montrant l'anatomie de la cavité nasale.....	4
Figure 3 : Vue latérale des sinus du cheval	5
Figure 4 : Anatomie des voies respiratoires supérieures	6
Figure 5 : Vue endoscopique du larynx.....	7
Figure 6 : Poumons de chevaux.....	8
Figure 7 : Anatomie du lobule pulmonaire et sacs alvéolaires.....	9
Figure 8 : Anatomie d'une bronchiole normale (haut) et bronchospasme (bas).....	17
Figure 9 : Comparaison du muscle lisse d'une bronche entre un cheval atteint d'asthme sévère (A) et un cheval CTL (B).....	18
Figure 10 : Description des grades de mucus trachéal observés selon l'échelle publiée par Gerber et <i>al.</i> , (2004)	19
Figure 11 : Schéma du montage utilisé par Vandenput et <i>al.</i> , (1997) pour standardiser les appréciations qualitative et quantitative des poussières contenues dans divers fourrages et litières.....	24
Figure 12 : Photographies des principales moisissures retrouvées dans les foin, isolées sur gélose Sabouraud et observées en microscopie	27
Figure 13 : Représentation biochimique (A) et schématique (B) du β -D-glucane	28
Figure 14 : Représentation schématique d'un LPS	29
Figure 15 : Dépôt des particules dans les voies respiratoires chez l'homme	31
Figure 16 : Représentation schématique du processus d'hypersensibilité de type I	35
Figure 17 : Représentation schématique de l'effet d'une lésion sur l'épithélium bronchique	38
Figure 18 : Photographie de cellules épithéliales ciliées de LBA équin prises au microscope optique.....	40
Figure 19 : Photographie prise au microscope optique (G x100) et représentation schématique de polynucléaires neutrophiles.....	41
Figure 20 : Photographie prise au microscope optique (G x100) et représentation schématique d'un éosinophile	42
Figure 21 : Photographie prise au microscope optique (G x100) et représentation schématique d'un basophile.....	42

Figure 22 : Photographie prise au microscope optique (G x100) de mastocytes	43
Figure 23 : Photographie prise au microscope optique (G x100) et représentation schématique d'un lymphocyte	44
Figure 24 : Représentation schématique des différentes voies de régulations des LT	45
Figure 25 : Photographie prise au microscope optique (G x50) de macrophage alvéolaire	46
Figure 26: Schéma simplifié des mécanismes de phagocytose et de macropinocytose.	47
Figure 27 : Origine et différenciation des macrophages (d'après Vignery, 2005)	48
Figure 28 : Schéma d'action des différents sous types de macrophages à un allergène	49
Figure 29 : Représentation schématique de la réponse à l'activation de la voie de signalisation TLR4.	50
Figure 30 : Diagramme schématique de l'activation des macrophages en fonction des molécules impliquées dans la polarisation M1/M2 des macrophages	52
Figure 31 : Représentation schématique du mode d'action des bronchodilatateurs	61
Figure 32 : Concentrations en particules dans l'air suivant les conditions d'hébergement et le lieu de prélèvement	66
Figure 33 : Démarche expérimentale	73
Figure 34 : Dispositif pour le prélèvement des poussières respirables et inhalables.....	83
Figure 35 : Teneur en bactéries (A) et moisissures (B) (CFU/g) du foin sec (dry) et du foin « à la vapeur » (steamed).	85
Figure 36 : Isolement des PBMC	86
Figure 37 : Plaques OpenArray	89
Figure 38 : Expression des ARNm dans le sang de chevaux CTL et AES pré et post-challenge	95
Figure 39 : Expression des ARNm des cytokines dans le sang des chevaux CTL et AES pré et post-challenge.....	96
Figure 40: Score clinique (A) et score de mucus trachéal (B) pré et post-challenge	100
Figure 41 : Pourcentage moyen en neutrophiles dans le LBA des chevaux AES et CTL pré et post-challenge.....	102
Figure 42 : Expression des ARNm des cytokines dans le LBA des chevaux CTL et AES pré et post-challenge.....	103
Figure 43 : Corrélation entre l'expression relative des cytokines et la proportion en neutrophiles dans le LBA pré et post-challenge	104

Figure 44 : Expression des ARNm des cytokines des macrophages alvéolaires des chevaux CTL et AES pré et post-challenge.	107
Figure 45 : Expression des ARNm de l'IL-18 par les macrophages alvéolaires des chevaux CTL et AES pré et post-challenge.	108
Figure 46 : Nombre (/µl) de particules respirables (< 5µm) et inhalables (> 5µm) dans les HDS provenant de foin sec (HDS B) et provenant de foin « à la vapeur » (HDS HG), tel que mesuré par cytométrie.	128
Figure 47 : Nombre (/µl) de particules respirables (< 5µm) et inhalables (> 5 µm) dans les HDS avant, 0h, 6h, 24h et 48h post- « à la vapeur », tel que mesuré par cytométrie.	128
Figure 48 : Corrélations entre la teneur en poussières respirables et inhalables mesurées par cytométrie en flux et granulométrie (en haut) et diagramme de Bland-Altman représentant la concordance des résultats entre les deux méthodologies (en bas)..	129
Figure 49 : Teneur (CFU/g) en bactéries et moisissures dans la solution de HDS provenant de foin sec (HDS B) et provenant de foin « à la vapeur » (HDS HG).	130
Figure 50 : Concentration en β-D-glucane (en pg/ml) et en endotoxines (en EU/ml) (log10) dans la solution de HDS provenant de foin sec (HDS B) et provenant de foin « à la vapeur » (HDS HG). ...	130
Figure 51 : Réponse des RAW264-7 à différentes concentrations en LPS.	135
Figure 52 : Réponse des RAW264-7 à la gliotoxine.	137
Figure 53: Réponse des RAW264-7 à la Fumagilline.	139
Figure 54 : Photographies des RAW264-7 en présence des BP prises au microscope à fluorescence (G x40).	140
Figure 55: Réponse des RAW264-7 stimulées 10 bioparticules <i>E.coli</i> par cellule.	141
Figure 56 : Réponse des RAW264-7 stimulées avec les HDS provenant de foin sec et de foin « à la vapeur ».	143
Figure 57 : Caractérisation des cellules isolées.	154
Figure 58 : Dot-plot représentant les proportions de cellules dans la population R1 par cytométrie en flux.	155
Figure 59 : Observation microscopique en temps réel des macrophages alvéolaires en présence de bioparticules d' <i>E.coli</i> couplées à la GFP (10 BP/cellule).	156
Figure 60 : Proportion de cellules CD14 ⁺ et CD206 ⁺ dans la population R1 suivant le statut du cheval.	157
Figure 61 : Activité de phagocytose de la population R1 (CD14 ⁺ et CD14 ⁻) selon le statut du cheval.	158

Figure 62 : Activité de phagocytose de la population R1 (CD206 ⁺ et CD206 ⁻) selon le statut du cheval	159
Figure 63 : Effet des bioparticules d' <i>E.coli</i> sur l'expression du CD14 (A) et du CD206 (B) à la surface des MA.	160
Figure 64 : Activité de macropinocytose de l'ensemble de la population R1 (CD14 ⁺ et CD14 ⁻) selon le statut du cheval.....	161
Figure 65 : Activité de macropinocytose de l'ensemble de la population R1 (CD206 ⁺ et CD206 ⁻) selon le statut du cheval	162
Figure 66 : Effet de la BSA sur l'expression du CD14 et du CD206 à la surface des MA	163
Figure 67 : Observation microscopique des macrophages alvéolaires stimulés isolés J-2 pré- challenge HG et stimulés <i>in vitro</i> avec du LPS, des solutions de HDS provenant de foin sec (HDS B) et de foin « à la vapeur » (HDS HG).	164
Figure 68 : Courbes d'impédance des macrophages alvéolaires de chevaux CTL stimulés avec du LPS (500 ng/ml), de la fumagilline (4 µg/ml), de l'HDS provenant de foin sec (HDS B) et de foin « à la vapeur » (HDS HG) (5µl/ml) et des BP (10 BP/cellule).	165
Figure 69 : Concentration en NO (µM) sécrétée par les macrophages alvéolaires équins de chevaux CTL et AES, 6h après stimulation <i>in vitro</i> avec du LPS, de la fumagilline, de l'HDS provenant de foin sec (HDS B) et provenant de foin « à la vapeur » (HDS HG).	166
Figure 70 : Concentrations protéiques des cytokines dans les surnageants de culture des MA « naïfs », non stimulés (NS), 6h post stimulation avec du LPS (500 ng/ml) et des HDS provenant de foin sec (HDS B) et provenant de foin « à la vapeur » (HDS HG).	166
Figure 71 : Observations microscopiques en temps réel des MA isolés de chevaux CTL et AES à J-2 et J+5 post-challenge <i>in vivo</i> au foin « à la vapeur » et au foin sec, stimulés <i>in vitro</i> avec la solution de HDS provenant de foin sec (HDS B). Photos prises 3h post-stimulation <i>in vitro</i>	168
Figure 72 : Taille des macrophages alvéolaires stimulés <i>in vitro</i> avec la solution de HDS provenant de foin sec (HDS B).	169
Figure 73 : Synthèse des résultats obtenus	183

Liste des tableaux

Tableau 1 : Signes cliniques des chevaux IAD et RAO	15
Tableau 2 : Diagnostic de l'asthme chez le cheval	21
Tableau 3 : Marqueurs des macrophages	52
Tableau 4 : Liste et utilisation des bronchodilatateurs pour le traitement de l'AES	61
Tableau 5 : Efficacité des différents traitements de l'asthme chez l'Homme, le cheval et les souris. ...	69
Tableau 6 : Valeurs nutritionnelles dans le foin pré et post-purification	84
Tableau 7: Séquences nucléiques des amorces et sondes spécifiques équinées utilisées pour les PCR en temps réel et en OpenArray	87
Tableau 8: Préparation des anticorps de capture	93
Tableau 9: Préparation des anticorps de détection	93
Tableau 10: Reconstitution des standards	93
Tableau 11 : Cytologie du LBA pré et post-challenge chez les chevaux CTL et AES	101
Tableau 12 : Nombre de particules respirables et inhalables (μl) suivant la méthodologie	129
Tableau 13 : Liste des anticorps et conditions d'utilisation	149

Avant-propos

Le terme « asthme équin » a été proposé par Jean-Pierre Lavoie (2015) puis recommandé lors de la révision de la déclaration de consensus de l'« American College of Veterinary Internal Medicine » ACVIM (Couëtil et *al.*, 2016). Cette nomenclature permet de regrouper l'inflammation des voies respiratoires (IAD), l'obstruction récurrente des voies respiratoires (RAO) et l'obstruction des voies respiratoires associée au pâturage (SPAOPD). L'asthme équin sévère est développé par des chevaux adultes avec une prévalence qui augmente avec l'âge. La prévalence de l'asthme équin sévère (AES) est d'environ 14% dans l'hémisphère nord (Hotchkiss et *al.*, 2007) et l'incidence et la sévérité de la maladie augmentent avec l'âge pouvant précipiter la fin de carrière des chevaux de sport.

Le déclenchement de la maladie est favorisé par le confinement des chevaux en écuries et l'exposition aux poussières notamment contenues dans le foin et la litière (Robinson, 2001).

Les affections respiratoires sont la 2^{ème} cause majeure de contre-performance chez le cheval après les affections locomotrices. Les premiers signes sont souvent discrets avec de la toux occasionnelle et/ou durant l'exercice, du jetage discret ou des difficultés à récupérer après l'effort. Les premiers signes cliniques ne sont pas forcément évocateurs de l'asthme équin, il est ainsi nécessaire d'approfondir les investigations en réalisant un lavage broncho-alvéolaire permettant un diagnostic fiable.

En cas de crise d'asthme, l'objectif premier est de diminuer l'inflammation grâce à l'action combinée de corticostéroïdes et de bronchodilatateur. Sur le long terme, le traitement de l'asthme consiste à réduire l'exposition aux poussières et aux différents antigènes présents dans l'environnement des écuries, tels que le foin ou la paille ce qui peut devenir une contrainte organisationnelle pour les éleveurs et propriétaires. Ainsi la gestion de l'asthme chez le cheval peut être contraignante et coûteuse ce qui en fait un sujet d'étude d'importance pour la filière équine.

Le traitement préventif de l'asthme équin est alors une piste intéressante à investiguer. Depuis quelques années, HayGain commercialise des « purificateurs » de foin qui visent à traiter le foin « à la vapeur ». L'efficacité du système à diminuer significativement la teneur en moisissures, bactéries, levures et poussières inhalables et respirables a été démontrée (Moore-Colyer 1996, Moore-Colyer et *al.*, 2014). Cependant aucune étude n'a encore investigué l'effet de purifier le foin « à la vapeur » sur la réponse immunitaire de chevaux atteints d'asthme sévère.

De plus, malgré la fréquence de ces affections, la physiopathologie de l'asthme n'est pas clairement définie. Une réponse inadaptée de l'immunité innée pourrait être à l'origine de l'exacerbation de la maladie. Cette dernière fait intervenir divers acteurs physiques, chimiques, cellulaires et moléculaires en réponse à une stimulation antigénique. Au niveau des poumons, les macrophages alvéolaires constituent la première ligne de défense immunitaire, cependant ils sont très peu étudiés dans le cas de l'asthme équin.

Le travail réalisé durant cette thèse s'inscrit dans un projet plus global visant notamment à répondre aux interrogations soulevées lors du 2nd « Workshop on Inflammatory Airway Disease » (2016). En effet, une des préoccupations majeures est le rôle de l'environnement du cheval dans l'asthme équin et l'influence du foin dans l'induction et/ou le maintien de l'asthme chez le cheval. La physiopathologie de l'asthme avec l'étude de la réponse inflammatoire et immunitaire est aussi un axe dominant dans la recherche sur l'asthme équin.

La première partie de ce manuscrit présente une revue de bibliographie sur l'asthme et sa physiopathologie. La seconde partie présente les travaux expérimentaux réalisés. Ces derniers s'articulent en deux axes. Le premier axe vise à caractériser la réponse immunitaire locale et systémique des chevaux asthmatiques en réponse à un challenge d'exposition *in vivo* à du foin soumis ou non « à la vapeur ». Cet axe présente donc la mise en place du challenge expérimental *in vivo*, la collecte des échantillons et l'étude de la réponse immunitaire locale et systémique suite au challenge. Le second axe se concentre sur l'étude de la réponse immunitaire des macrophages alvéolaires primaires stimulés *in vitro* avec des extraits de foin soumis ou non « à la vapeur ».

Ces deux axes s'intéressent spécifiquement à l'effet du foin au niveau de l'animal lui-même et au niveau des macrophages alvéolaires.

Introduction

I. L'appareil respiratoire du cheval

De tous les organes, le tractus respiratoire présente la plus large et la plus délicate surface pouvant être en contact avec des agents présents dans l'air ambiant (Vandenput, 1997).

L'appareil respiratoire permet de fournir l'oxygène indispensable aux processus de métabolismes énergétiques et d'oxygénation du sang afin d'alimenter les différents tissus musculosquelettiques. L'appareil respiratoire est formé de 3 parties : les voies supérieures, intermédiaires et profondes (Sevestre & Rosier, 1983; Loving, 2012) (Figure 1).

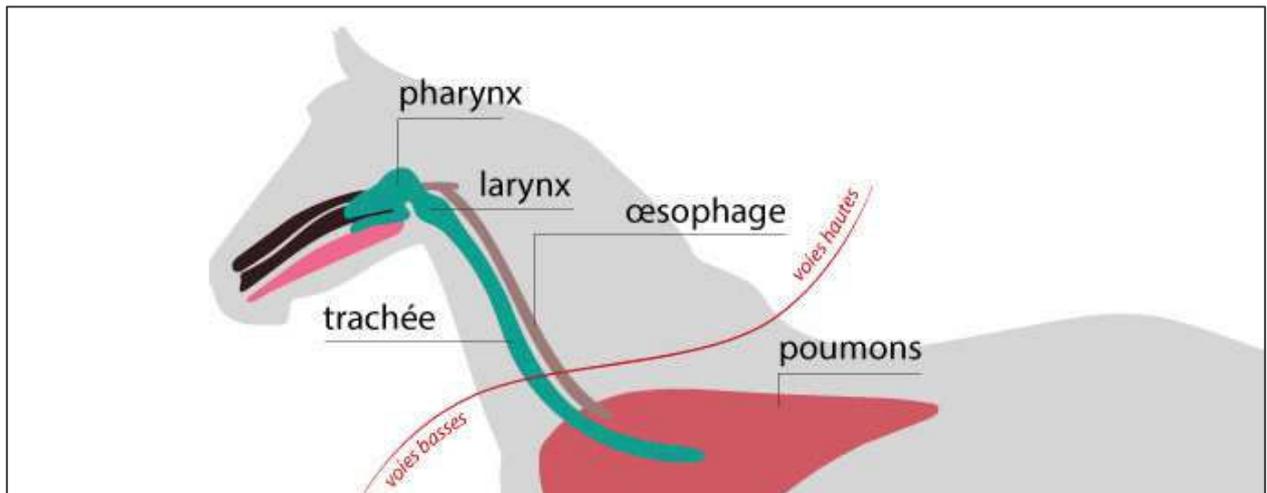


Figure 1 : Schéma de l'appareil respiratoire du cheval (d'après www.audevard.com)

1. Les voies respiratoires supérieures

1.1. Les naseaux

Il s'agit de la voie d'entrée de l'air. Les naseaux sont dilatables et peuvent s'ouvrir très largement lors d'un effort afin de faciliter le flux d'air en augmentant le débit aspiré et en diminuant les résistances au passage de l'air (Marlin & Deaton., 2007). Les naseaux sont constitués d'un orifice de terminaison du canal lacrymal et, à l'intérieur de la commissure

supérieure, d'un profond diverticule cutané dont la fonction est probablement de filtrer la poussière inspirée par les naseaux (Chavry et *al.*, 2001).

L'air inspiré passe ensuite dans les cavités nasales (Figure 2), séparées l'une de l'autre par un septum nasal. Ces cavités permettent de purifier, d'humidifier et de réchauffer l'air à son entrée dans les voies respiratoires supérieures (Michel, 2011).

Elles sont divisées dans le sens de la longueur par deux cornets nasaux et en trois espaces étroits appelés les méats (dorsal, moyen, ventral). Le méat ventral forme un canal direct entre les narines et le pharynx. C'est par ce méat qu'est introduite la sonde pour les examens endoscopiques et gastroscopique.

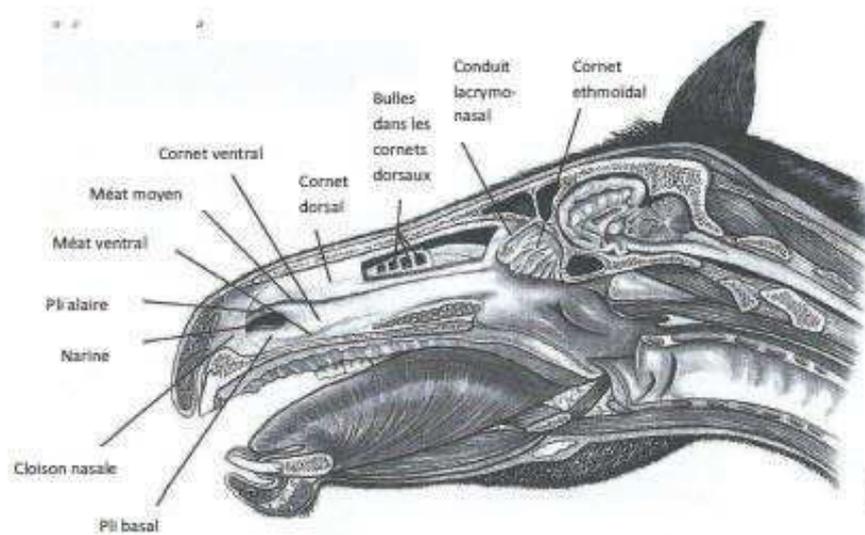


Figure 2 : Section sagittale de tête montrant l'anatomie de la cavité nasale (d'après Riegel, 2002)

Les cavités nasales sont complétées par des cavités intra-osseuses appelées sinus. Le cheval possède de chaque côté cinq sinus, le sinus frontal, le sinus maxillaire supérieur, le sinus maxillaire inférieur et deux plus petits et plus profonds, le sinus sphéno-palatin et le sinus ethmoïdal (Figure 3).

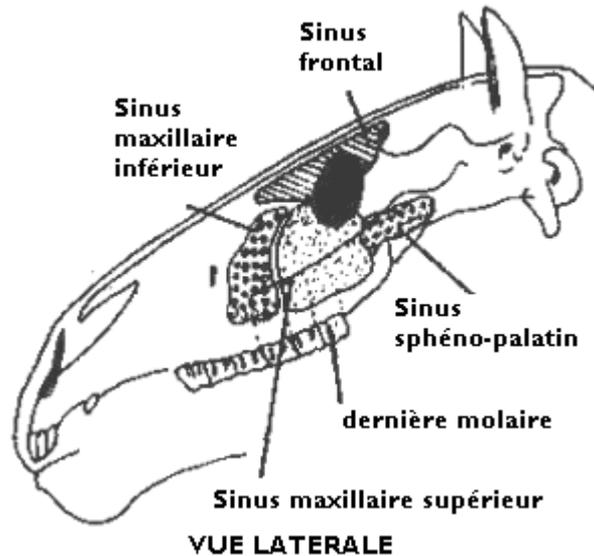


Figure 3 : Vue latérale des sinus du cheval (d'après www.galopin-fr.net)

1.2. Les poches gutturales

Elles ont une capacité de 300 à 500 millilitres d'air lors de l'expiration et de la déglutition. Parmi les mammifères, seuls les équidés en possèdent mais leur fonction n'est pas bien connue. Cependant elles ne semblent pas influencer directement le passage de l'air dans les voies respiratoires (Riegel, 2002). En revanche, ces poches peuvent être le lieu de graves infections fongiques ou bactériennes telle que la gourme (Boyle et *al.*, 2018)

1.3. Le pharynx

L'air arrive ensuite au niveau du pharynx qui représente le carrefour des voies respiratoires et digestives. Il permet de transmettre l'air au larynx. Le pharynx mesure environ 15 cm de longueur chez le cheval adulte. Il est divisé en 3 parties (Figure 4) :

- Le nasopharynx : partie située dorsalement au palais mou. Il a un rôle uniquement respiratoire. C'est la partie la plus vaste du pharynx. Sa muqueuse est tapissée de récepteurs principalement tactiles qui permettent de protéger les voies respiratoires.
- L'oropharynx : partie située ventralement au palais mou dans la continuité de la bouche. Il fait suite à la cavité buccale et permet le passage du bol alimentaire
- La partie laryngée du pharynx : partie caudale à l'oropharynx s'étendant de la base de l'épiglotte à l'entrée de l'œsophage.

Lors de l'inspiration, l'épiglotte et les aryténoïdes sont espacés pour permettre le passage de l'air entre le nasopharynx et le larynx. De plus, les chevaux ne peuvent respirer que par les naseaux. En effet la cavité buccale et le pharynx sont séparés par un voile, le palais mou, sauf au moment de la déglutition (Michel, 2011).

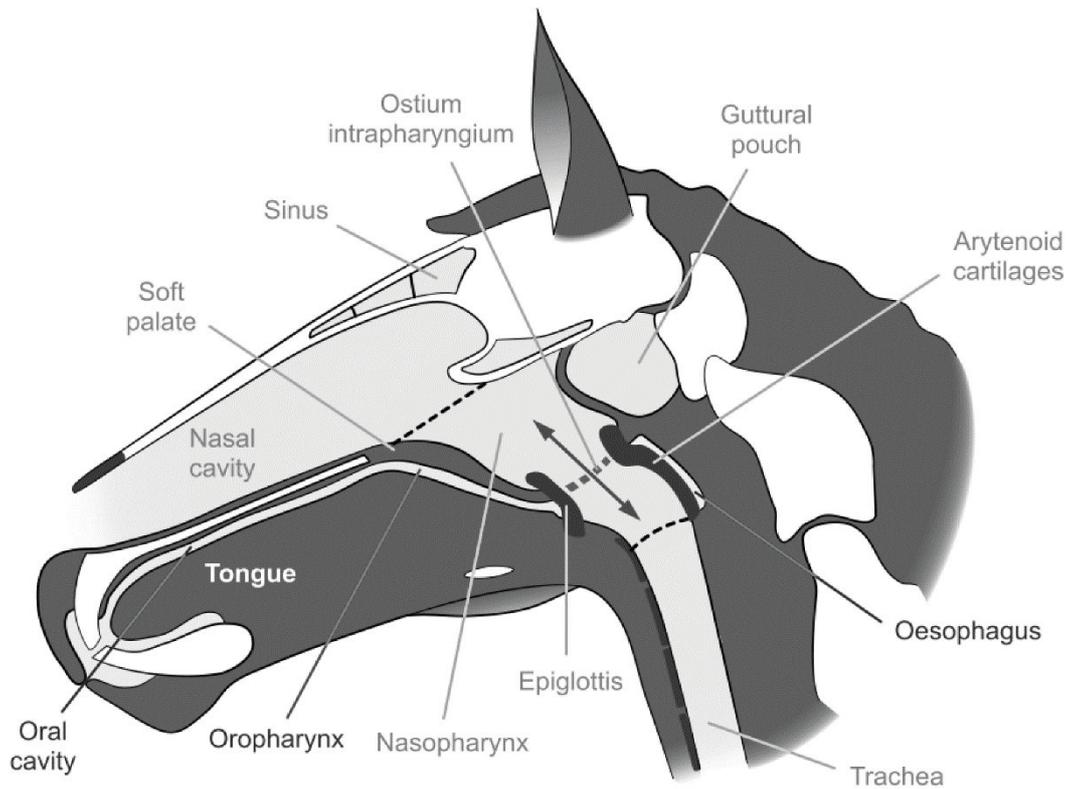


Figure 4 : Anatomie des voies respiratoires supérieures (d'après www.davisfamilyreunion.us)

1.4. Le larynx

Le larynx est une structure tubulaire courte qui relie le pharynx et la trachée. Il est constitué d'un ensemble de cartilages. Le larynx présente une partie moyenne qui est rétrécie au niveau de la glotte, par la proéminence des cordes vocales et la base des cartilages aryténoïdes. Cette glotte s'ouvre largement pendant l'inspiration et se referme légèrement pendant l'expiration (Michel, 2011). En avant de la glotte, se trouve le vestibule qui est bordé de chaque côté par les plis ary-épiglottiques. Chez les chevaux, la muqueuse laryngée forme de chaque côté une évagination entre ce pli et la corde vocale formant le ventricule (Figure 5).

Le larynx joue trois rôles principaux : la régulation d'entrée d'air dans les voies respiratoires, le blocage du passage de nourriture ou de liquide dans la trachée lors de la déglutition et la phonation.

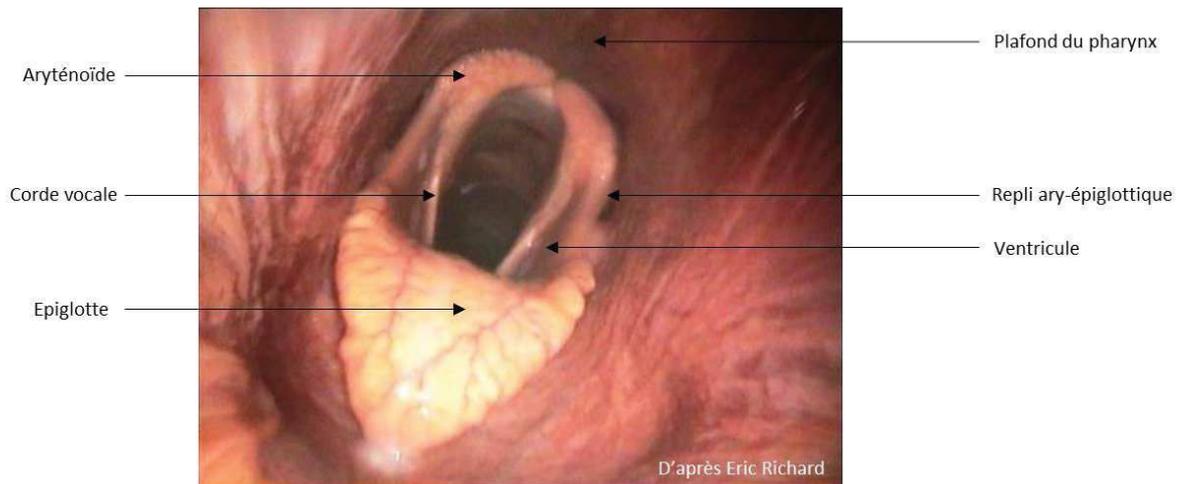


Figure 5 : Vue endoscopique du larynx

1.5. La trachée

La trachée relie le larynx aux bronches des poumons. Elle mesure environ 70 cm de long pour un diamètre de 5 cm (Barone, 2010 ; Montané et *al.*, 1972). Elle est flexible et élastique. Le muscle lisse trachéal complète la paroi trachéale, et une membrane fibro-élastique enveloppe les anneaux trachéaux et le muscle. Lorsque ce muscle se contracte, le diamètre de la trachée diminue (Riegel, 2007).

La muqueuse de la trachée est composée d'un épithélium cilié. Les cils vibratiles et le mucus permettent de remonter les poussières contenues dans l'air jusqu'au pharynx afin de permettre au cheval de les avaler (Marlin & Deaton., 2007). La trachée se divise ensuite en deux bronches principales qui se subdivisent en bronchioles au niveau des poumons.

2. Les voies respiratoires profondes

2.1. Les poumons

Les poumons constituent les organes indispensables à la respiration. Les poumons du cheval sont des organes volumineux et massifs qui occupent la plus grande partie de la cage thoracique. Les poumons sont légèrement asymétriques avec une prépondérance du poumon droit (Montané et *al.*, 1972). Le poumon gauche est composé de 2 lobes tandis que le poumon droit est divisé en 3 lobes.

Le tissu pulmonaire est mou, d'aspect spongieux et élastique (Figure 6).

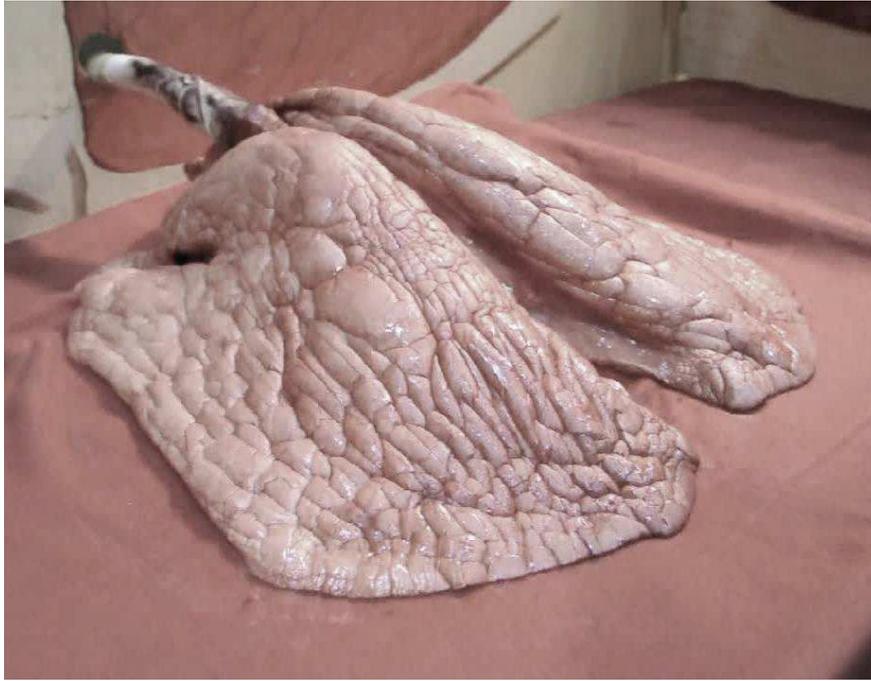


Figure 6 : Poumons de cheval (www.commonswikimedia.org)

Les poumons sont composés de nombreux vaisseaux sanguins et aériens, dont les extrémités forment les alvéoles qui représentent la zone physiologiquement active pour les échanges gazeux. Ils peuvent contenir jusqu'à 50 litres d'air chez le cheval, contre 6 litres chez l'homme (Saute, 2018).

2.2. Les bronches et les bronchioles

Les deux bronches se ramifient ensuite dans les poumons depuis la trachée jusqu'aux lobes pulmonaires. Leur rôle est de distribuer l'air à chaque poumon par l'intermédiaire des bronchioles (Figure 7). L'ensemble des bronches constitue l'arbre bronchique et leur distribution détermine l'architecture des poumons (Barone, 2010). Chez le cheval, il existe jusqu'à 38 à 43 générations de bronches et de bronchioles. Comme chez l'homme, des échanges gazeux se réalisent au niveau des dernières divisions des bronchioles, mais les bronchioles respiratoires sont moins développées (Marlin, 2002).

L'ensemble des bronches est tapissé d'un épithélium pseudo-stratifié constitué de cellules caliciformes qui produisent des mucines et de cellules ciliées. Les mucines forment une part importante de la couche mucoïde qui tapisse les voies respiratoires (Marlin & Deaton, 2007).

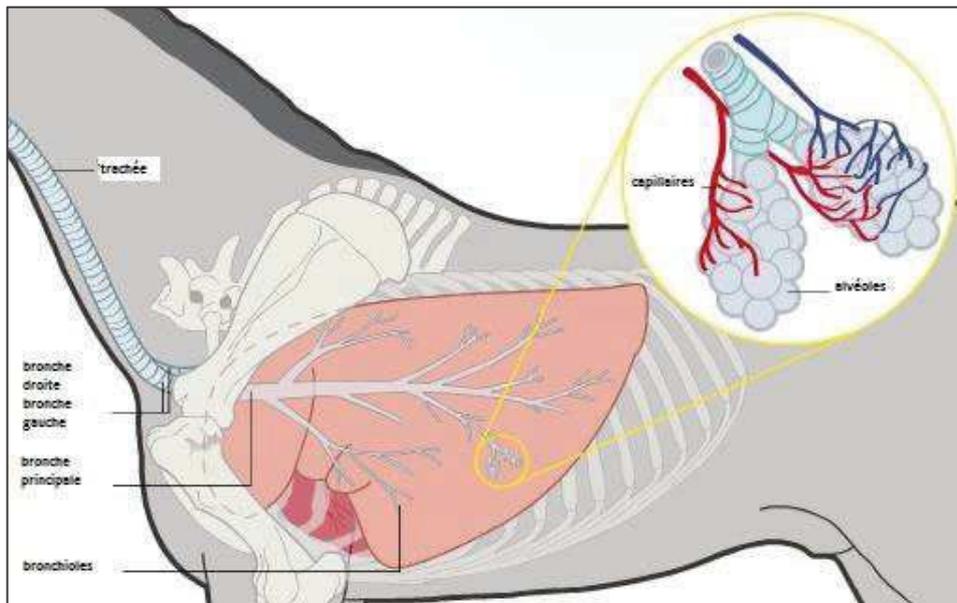


Figure 7 : Anatomie du lobule pulmonaire et sacs alvéolaires (d'après www.tempestitalia.com)

2.3. Les alvéoles pulmonaires

Les alvéoles pulmonaires représentent la zone d'échange de l'oxygène entre l'air et le sang au niveau des poumons. La surface d'échange est de 11 cm² par gramme de poids corporel chez le cheval (Sevestre & Rosier, 1983), soit une surface totale de 2 500 cm² chez un cheval de course de taille moyenne (Marlin, 2002).

Au cours de l'inspiration, les alvéoles se remplissent d'air puis se vident au cours de l'expiration. Les mouvements inspiratoires et expiratoires sont involontaires et se produisent grâce aux muscles respiratoires dont le diaphragme est un élément essentiel.

II. L'asthme sévère du cheval

L'asthme est un trouble inflammatoire des voies respiratoires qui affecte 300 millions d'individus à travers le monde (World Health Organization-WHO, 2007). L'asthme équin est davantage rencontré chez les chevaux de l'hémisphère nord. Des études ont montré une prévalence variant de 2 à 80% (Bracher *et al.*, 1991 ; Winder *et al.*, 1987) suivant les critères d'inclusion choisis ce qui en fait la maladie chronique respiratoire la plus commune chez les chevaux adultes au box.

Le cheval est exposé à environ 30 millions de litres d'air chaque année (Art & Lekeux, 2004), ce qui constitue un risque d'exposition des poumons aux particules de l'air, pouvant impacter la santé du cheval. En dehors des causes infectieuses, l'inflammation des voies respiratoires profondes chez le cheval peut directement être causée ou exacerbée par l'inhalation des poussières respirables.

Ainsi, l'asthme est défini par un groupe d'experts internationaux chez l'Homme (Workshop report Global Initiative for Asthma GINA, 2018) comme « une maladie hétérogène, généralement caractérisée par une inflammation chronique des voies aériennes. Elle est définie par l'histoire clinique des symptômes respiratoires (tels que la respiration sifflante, l'essoufflement, l'oppression thoracique et la toux) qui varient au fil du temps et en intensité, et par la diminution variable du débit d'air expiratoire. Ces épisodes sont souvent associés à une obstruction extensive de degré variable, souvent réversibles spontanément ou sous l'effet d'un traitement.

Par ailleurs, la définition présentée ci-dessus ne semble pas totalement satisfaisante car elle ne prend pas en compte les facteurs étiologiques qui déclenchent les crises d'asthme, en particulier l'allergie. Comme chez l'homme, l'asthme équin se caractérise par une inflammation des voies respiratoires profondes et une bronchoconstriction associée le plus souvent à de la toux. Cette nouvelle terminologie a vocation à favoriser une meilleure compréhension entre les vétérinaires et les propriétaires et utilisateurs de chevaux, notamment (Bond *et al.*, 2018).

1. Historique

Depuis l'Antiquité, les chevaux développent un syndrome respiratoire causant de la toux et de la contre-performance.

Dès 1745, des similitudes sont reconnues entre l'asthme de l'homme et la « pousse » du cheval caractérisée par une « peine à respirer ». Les grecs considéraient comme poussifs les chevaux ayant les poumons « ulcérés », « rompus » et « plein de boue » (pour revue Degueurce, 2009). En 1963, la pousse est définie comme « coup de vent », ou « courte haleine » pour désigner une difficulté de l'acte respiratoire, qui était compatible, avec les signes cliniques et l'affectation des aptitudes de travail du cheval (pour revue Degueurce, 2009). À cette époque, les causes de la pousse n'étaient pas clairement définies. De multiples causes telles que l'ingestion d'aliments « trop chauds » comme le vieux foin, l'ingestion de foin donné en excès, ou encore le repos trop marqué qui aurait conduit à l'accumulation de « flegmes et d'humeurs superflus » dans tout le corps du cheval, et particulièrement le poumon étaient envisagées comme facteurs de risque potentiels. De plus, en 1771, Vitet avait observé que la pousse était accompagnée de nombreuses lésions organiques telles que des abcès pulmonaires, de la bronchite chronique mais surtout de l'emphysème (pour revue Degueurce, 2009). Ces observations ont par la suite été précisées par les connaissances anatomiques dans le domaine de la médecine vétérinaire. D'autres termes ont ensuite été utilisés tels que l'emphysème pulmonaire, la bronchite chronique ou encore la COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease), terme utilisé en médecine humaine pour désigner une maladie inflammatoire pulmonaire touchant les fumeurs, mais présentant une physiopathologie et une évolution très différente de la pathologie observée chez le cheval (Robinson, 2001).

Cependant la distinction entre l'inflammation des voies respiratoires profondes du jeune cheval et l'inflammation respiratoire chronique était peu claire. Lors du workshop international de Michigan en 2000 sur les maladies inflammatoires des voies respiratoires (Robinson, 2001), il a été reconnu que le terme COPD n'était pas approprié pour décrire toutes les formes d'inflammation chronique des voies respiratoires. Ainsi une nouvelle terminologie, faisant la distinction entre le syndrome affectant essentiellement les jeunes chevaux contre performants, appelé « Inflammatory Airway Disease » (IAD) et l'obstruction récurrente des voies respiratoires touchant le cheval adulte, « Recurrent Airway Obstruction » (RAO) (Robinson, 2001) a été proposée. Le terme d'IAD était utilisé pour décrire un état avec des signes respiratoires modérés et l'absence de détresse respiratoire au repos. Le terme RAO définissait les chevaux adultes avec des signes cliniques sévères et récurrents comme une détresse respiratoire au repos, une toux et une intolérance à l'effort. Cette nomenclature a été effective jusqu'à la révision du consensus de l'ACVIM (American College of Veterinary Internal Medicine) sur l'IAD en 2016 (Couëtil et *al.*, 2016).

Un édit de Jean Pierre Lavoie en 2015 suggérait que les chevaux souffrant d'IAD ou de RAO, ayant des signes cliniques communs tels que l'accumulation de mucus, devaient être regroupés sous un même syndrome, le syndrome de l'asthme chez le cheval. Cette proposition a ensuite été défendue lors de la révision de la déclaration de consensus ACVIM. Mieux caractérisés qu'en 1745, les symptômes observés présentent de nombreuses similitudes avec l'asthme humain. Ainsi lors du 6^{ème} « World Equine Airway Symposium » WEAS (2017), l'utilisation du terme d'asthme équin a été définitivement adoptée après vérification de la concordance entre ce qu'on appelait IAD et RAO avec le terme d'asthme utilisé en médecine humaine.

Actuellement ce terme se limite essentiellement à la sévérité clinique de la maladie avec une distinction entre asthme équin « modéré » et asthme équin « sévère », mais d'autres éléments seront nécessaires afin d'inclure de nouveaux critères de classification tels que la voie pathogénique ou les paramètres immunologiques (Bond et *al.*, 2018). Même si l'IAD touche plutôt des jeunes chevaux à l'exercice, et la RAO des chevaux matures aucun caractère évolutif de la pathologie ne peut actuellement être conclu, malgré les différents phénotypes observés dans le syndrome de l'asthme équin. Effectivement un cheval souffrant d'IAD ne développera pas nécessairement de RAO par la suite (Bosshard & Gerber, 2014). En médecine humaine, plusieurs phénotypes sont définis. Tout d'abord l'asthme allergique qui est généralement associé à un historique familial d'allergie (Moore et *al.*, 2010). Les patients révèlent souvent une réponse inflammatoire éosinophilique avec une réponse favorable aux corticostéroïdes. Dans le cas de l'IAD chez le cheval, le foin, les particules de poussières, les endotoxines favorisent le déclenchement de l'IAD. Cependant, la pathogénie de l'IAD n'est pas suffisamment décrite mais contrairement au cas de l'homme, la présence d'éosinophiles dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA) n'est pas toujours détectée excepté chez certains jeunes chevaux exposés à la poussière (Ivester et *al.*, 2014 ; Riihimäki et *al.*, 2008). Une tendance atopique a aussi été décrite chez l'homme. Le degré d'atopie de patients et de sujets contrôles était évalué en mesurant le taux d'IgE total ainsi que les taux d'IgE spécifiques aux allergènes les plus courants (chat, chien, graminées, acariens, moisissures...). Les résultats de l'analyse ont montré que le risque d'asthme augmentait de manière significative avec le taux d'IgE total. En répartissant les patients en quatre groupes selon leur taux d'IgE total, il apparaît que ceux du quatrième quartile triplent leur risque d'asthme par rapport à ceux du premier quartile (Jaakkola et *al.*, 2006). Enfin, le phénotype d'asthme le plus commun chez l'Homme est l'asthme non-allergique. Ce phénotype apparaît plutôt à l'âge adulte sans association apparente avec un allergène et semble caractérisé par une réponse immunitaire mixte de type Th1-Th2. Cette

réponse est aussi observée chez les chevaux IAD et RAO (Ainsworth et *al.*, 2003 ; Lavoie et *al.*, 2001).

Il a ainsi été conclu que l'asthme équin modéré et l'asthme équin sévère pouvaient représenter des modèles biologiquement appropriés de l'asthme allergique et de l'asthme non allergique décrits chez l'Homme (Bond et *al.*, 2018).

2. Epidémiologie

La prévalence de l'asthme équin sévère (AES) est variable suivant les régions du monde et touche principalement les chevaux de l'hémisphère nord fréquemment logés à l'intérieur et nourris avec du foin. En revanche, l'asthme associé au pâturage d'été, le SPAOPD « Summer Pasture Associated Obstructive Pulmonary Disease », similaire à l'asthme sévère est plus retrouvé dans les pays de l'hémisphère sud où il fait chaud et sec (Costa et *al.*, 2000 ; Seahorn & Beadle, 1993). Lors d'une étude épidémiologique menée par Hotchkiss et *al.*, (2007), la prévalence de la maladie au Royaume-Uni a été estimée à 14%, basée sur les résultats d'une enquête envoyée aux propriétaires (RSQ : « Risk, Screening Questionnaire »), ce qui est représentatif des pays de l'hémisphère nord (Hotchkiss et *al.*, 2007). De plus, il semblerait que le risque de développer de l'AES soit associé à l'âge, à la race et à la saison (Couëtil, 2008). En effet cette maladie semble affecter les chevaux de plus de quatre ans avec une prévalence qui augmente avec l'âge (Couëtil, 2008).

L'AES du cheval est la maladie chronique la plus fréquemment rencontrée chez les chevaux adultes au box.

3. Présentation clinique

Même si les chevaux atteints d'IAD et de RAO sont maintenant regroupés sous un même syndrome qu'est l'asthme équin, la présentation clinique de ces deux phénotypes présente quelques différences comme le montre le Tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1 : Signes cliniques des chevaux IAD et RAO (d'après Couëtil et *al.*, 2016)

		Syndrome de l'asthme équin	
Caractéristiques		IAD (Asthme équin modéré : AEM)	RAO (Asthme équin sévère : AES)
Présentation clinique	Age du sujet	Jeune en général mais peut être observé à tout âge	Généralement > 7ans
	Signes cliniques	Toux occasionnelle Contre-performance Pas d'effort respiratoire au repos Signes chroniques (au moins 4 semaines)	Toux fréquente et régulière Intolérance à l'exercice Augmentation de l'effort respiratoire au repos Les signes cliniques et leur sévérité peuvent varier
	Durée	Amélioration spontanée ou avec traitement. Risque de récurrence faible	Généralement amélioration avec une gestion contrôlée de l'environnement. Pas de traitement curatif mais contrôle des symptômes
	Historique	Exposition à un environnement allergisant	Exposition à des poussières ou allergènes dans les écuries ou à l'extérieur. Quelques historiques familiaux Signes cliniques pouvant être saisonniers
Confirmation du diagnostic	Endoscopie des voies respiratoires	Mucus trachéal (> 1 pour les chevaux de courses et > 2 pour les chevaux de sport ou loisir)	Excès de mucus
	Cytologie du LBA	Augmentation modérée de la neutrophilie	Augmentation modérée ou sévère de la neutrophilie
	Fonction pulmonaire	DP _{max} < 10 cm H ₂ O Flux d'air limité	Flux d'air limité de manière modérée ou sévère au cours de l'exacerbation de la maladie DP _{max} > 15 cm H ₂ O Paramètres réversibles avec un bronchodilatateur ou un changement d'environnement Hypersensibilité pulmonaire

DP_{min} et DP_{max} : Déplacements, minimal et maximal du pelvis

Les signes cliniques de l'AES sont assez bien caractérisés et répertoriés dans la littérature (Leguillette, 2003 ; Robinson, 2001). Les signes cliniques sont récurrents, réversibles et varient en fonction de la sévérité de la maladie et de l'exposition aux antigènes présents dans l'environnement du cheval. Les phases de crise et de rémission se succèdent au cours du temps. La disparition des signes cliniques est visible dans la plupart des cas en 4 à 24 jours (Thompson & McPherson, 1984) dès lors que les chevaux sont placés dans un environnement contrôlé ou remis au pré (Couëtil et *al.*, 2001). De plus, les signes cliniques varient en fonction de la sévérité de la maladie. Les animaux les moins sévèrement atteints présentent généralement une

intolérance à l'exercice, une prolongation du temps de récupération post-effort, et de la toux liée ou non à l'exercice. Pour les cas les plus sévères, des signes de détresse respiratoire au repos, une dyspnée expiratoire et parfois une fréquence respiratoire augmentée sont observés.

3.1. L'hyperréactivité bronchique

L'hyperréactivité bronchique se traduit comme une réponse exagérée des voies respiratoires en réponse à un stimulus. Ces stimuli ne devraient pas causer de détresse respiratoire chez un cheval sain mais ont pour conséquences une bronchoconstriction et des difficultés respiratoires importantes chez le cheval sensible (Robinson, 2007). Le degré de l'hyperréactivité bronchique est souvent proportionnel à celui de la sévérité de la maladie chez l'homme (Mihalache & Fitting, 2014) et le cheval (Couëtil et *al.*, 2006). L'hyperréactivité est causée par une hypertrophie de l'épithélium et par les cellules productrices de mucus qui vont provoquer un épaissement de la paroi. Ainsi une contraction minimale du muscle lisse suffira à rétrécir de manière importante le diamètre bronchique.

3.2. La bronchoconstriction

La diminution rapide de la résistance pulmonaire par l'administration de bronchodilatateur, chez les chevaux atteints d'AES, démontre que la contraction des muscles lisses des voies aériennes est l'une des causes majeures de l'obstruction des voies respiratoires (Broadstone et *al.*, 1988 ; Olszewski et *al.*, 1999). En période d'exacerbation, le muscle lisse bronchique se contracte et une diminution significative du diamètre des bronches est observée (Figure 8). L'air passe donc plus difficilement au niveau des bronches. Le bronchospasme résulte à la fois de l'action directe des médiateurs inflammatoires sur les muscles lisses et de l'action indirecte exercée par le système nerveux autonome (Robinson et *al.*, 1996).

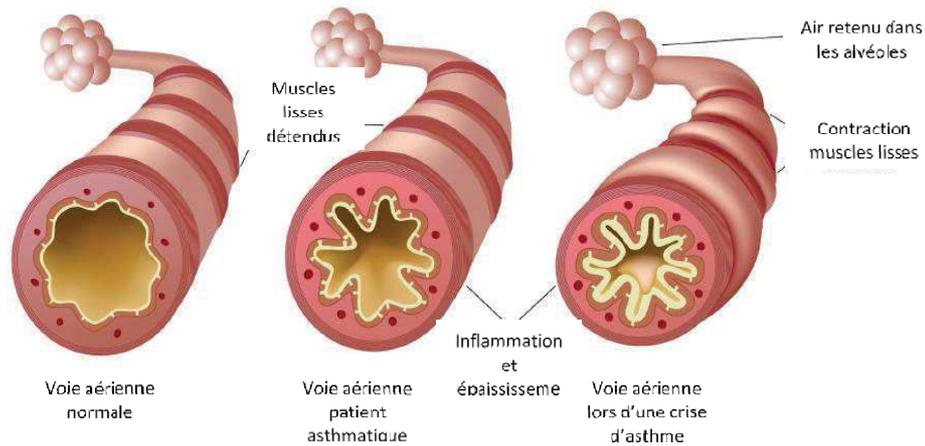
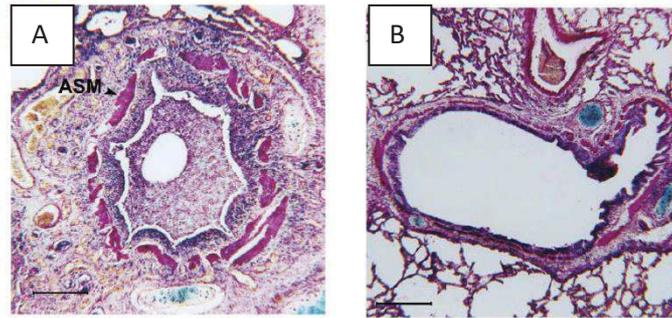


Figure 8 : Anatomie d'une bronchiole normale (haut) et bronchospasme (bas) (d'après www.attentivasthme.ca)

3.3. Le remodelage des voies respiratoires

Chez le cheval asthmatique, l'inflammation des voies respiratoires profondes se définit par un remodelage des voies respiratoires correspondant aux changements structuraux pulmonaires observés. Plusieurs modifications structurales et physiologiques telles que l'augmentation du muscle lisse, ou l'accumulation des cellules inflammatoires conduisent à la diminution de la fonction respiratoire. L'hypertrophie du muscle lisse participe à l'obstruction des voies respiratoires par la diminution du diamètre de la lumière, mais aussi en augmentant la force de contraction musculaire (Herszberg et *al.*, 2006). Leclere et *al.*, (2011a) ont étudié l'effet d'une exposition antigénique sur le remodelage du muscle lisse des voies respiratoires. Ils ont montré que les chevaux AES ont deux fois plus de cellules musculaires lisses que les chevaux contrôles (CTL). Cette masse accrue est maintenue dans un équilibre dynamique par un renouvellement cellulaire élevé, suggérant que le ciblage de la prolifération des muscles lisses pourrait être efficace pour réduire le remodelage chronique (Leclere et *al.*, 2011a). Ce remodelage est comparable à celui observé chez les patients asthmatiques et contribuerait à l'hyperréactivité des voies respiratoires (Herszberg et *al.*, 2006 ; Robinson, 2001). De plus, différentes études chez l'Homme ont montré que le degré de remodelage est lié à la sévérité de l'asthme et non à la durée de la maladie (Chetta et *al.*, 1997 ; James et *al.*, 2009) (Figure 9).



ASM = Muscle lisse des voies respiratoires

Figure 9 : Comparaison du muscle lisse d'une bronche entre un cheval atteint d'asthme sévère (A) et un cheval CTL (B) (d'après Herszenberg et *al.*, 2006)

4. Diagnostic de l'asthme équin sévère

4.1. Diagnostic clinique

Il est possible de faire une suspicion clinique préliminaire basée sur l'historique du cheval et les signes cliniques observés (Robinson, 2001). Cependant, une évaluation supplémentaire est nécessaire afin de confirmer le statut d'asthmatique sévère du cheval. Les études précédentes ont montré que les examens cliniques ont une faible sensibilité pour le diagnostic de l'AES (Couëtil et *al.*, 2001). Les signes cliniques rapportés par les propriétaires de chevaux asthmatiques sont des épisodes de toux, un écoulement nasal séreux, une augmentation du mouvement expiratoire, une intolérance à l'exercice et une dilatation des naseaux. Un examen physique complet devrait être effectué dans tous les cas de suspicion d'asthme chez un cheval afin d'éliminer toute cause additionnelle de maladies respiratoires. De plus, une auscultation au sac permet la mise en évidence de sifflements et/ou crépitements durant l'auscultation thoracique (Tesarowski et *al.*, 1996). Les sifflements témoignent d'un passage forcé de l'air au niveau des voies respiratoires. Les crépitements sont dus à l'accumulation de mucus au niveau des poumons. Ce mucus va former des films qui vont mousser avec le passage de l'air et sécher par endroits formant alors des milliers de petites bulles qui contiennent chacune une portion d'air humide totalement indépendante de l'air respiré. Certaines bloquent complètement une alvéole et isolent tout une zone. Ces petites poches d'air peuvent s'éclater sous la pression, provoquant alors un crépitement audible à l'auscultation. L'hypertrophie du muscle abdominal externe oblique génère la formation d'une ligne de pouce toujours observée chez les chevaux atteints d'AES. Cette ligne de pouce reflète l'importance du travail fourni lors de l'expiration. Une grille de scores cliniques a été suggérée permettant de noter la sévérité des signes cliniques

(Tesarowski et *al.*, 1996). Cette grille prend en compte les éléments de l'auscultation clinique à savoir, la fréquence respiratoire, l'écoulement nasal, la caractérisation de la ligne de pousse, la dilatation excessive ou non des naseaux, la présence ou non de crépitements, toux, sifflement et les bruits trachéaux gradés entre 0 et 3 suivant leur intensité. La combinaison de ces différents paramètres permet d'obtenir un score sur 25.

Les scores cliniques ont été développés afin d'évaluer la fonction respiratoire et donc la sévérité de l'obstruction des voies respiratoires (Robinson, 2001). Ces scores sont basés sur la notation des signes cliniques les plus courants présents lors de la phase d'exacerbation (toux, dilatation des naseaux, jetage nasal, pousse abdominale, pompage de l'anus).

4.2. Endoscopie des voies respiratoires

L'endoscopie des voies respiratoires supérieures puis profondes constitue un examen de routine dans l'évaluation des problèmes respiratoires chez le cheval.

Dans le cas de l'AES, l'endoscopie permet de révéler une accumulation de mucus dans la trachée ainsi qu'un épaissement de la muqueuse au niveau de la carène. Le score de mucus peut être gradé grâce à la grille validée par Gerber et *al.*, (2004a) (Figure 10).

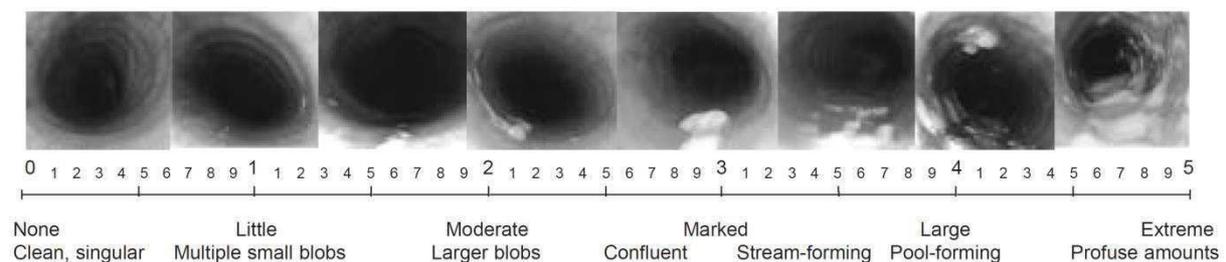


Figure 10 : Description des grades de mucus trachéal observés selon l'échelle publiée par Gerber et *al.*, (2004a) 0: pas de mucus visible; 1: simple ou multiples amas de mucus; 2: grands amas muqueux; 3: filet de mucus; 4 : large filet muqueux, 5: forte abondance de mucus

4.3. Cytologie du lavage broncho-alvéolaire

La cytologie du lavage bronchoalvéolaire (LBA) est considérée comme un des examens complémentaires les plus utiles afin de mettre en évidence l'inflammation des voies respiratoires (Dixon et *al.*, 1995). Le LBA permet de « laver » les alvéoles et ainsi de récupérer les cellules qui recouvrent les voies respiratoires profondes périphériques et les alvéoles. Il est

recommandé d'instiller un volume compris entre 250 et 500 ml d'eau isotonique stérile *via* un endoscope ou une sonde (Robinson, 2001). Le volume de lavage récupéré représente entre 50 et 70% du volume instillé chez les chevaux CTL (McGorum et *al.*, 1993a). Il a été montré que la cytologie d'un LBA est représentative du poumon prélevé et qu'il existe une bonne corrélation entre les résultats cytologiques de LBA issus de différentes zones des poumons et l'AES (McGorum et *al.*, 1993a). La cytologie du LBA est indispensable au diagnostic définitif de l'asthme équin (Couëtil, 2016 ; McGorum et *al.*, 1993a, Robinson 2001). De plus, il est recommandé de réaliser un LBA dans les deux poumons. En effet, notre équipe a montré que les proportions cytologiques sont plus importantes dans le LBA du poumon droit que dans le poumon gauche (Depecker et *al.*, 2014).

D'après la dernière déclaration de consensus de l'ACVIM, un pourcentage en neutrophiles supérieur à 25% et un grade de mucus trachéal supérieur à 2/5 caractérisent un cheval atteint d'AES (Couëtil et *al.*, 2016). En pratique, un comptage supérieur à 10% confirme avec certitude le diagnostic s'il y a présence de signes cliniques caractéristiques (Picandet et *al.*, 2003). En effet, l'augmentation de la neutrophilie ne permet pas à elle seule de conclure sur le diagnostic de l'AES. Holcombe et *al.*, (2001) ont montré que comme les chevaux atteints d'AES, les chevaux sains au box avaient un pourcentage en neutrophiles supérieur à 10 %. Dans ce cas, la seule cytologie du LBA n'est pas suffisante et doit s'appuyer sur l'historique du cheval et les différents signes cliniques. Ainsi, les résultats cytologiques du LBA doivent être interprétés dans le contexte clinique du cheval. Enfin, il est important de prendre en compte le fait que la maladie est un processus dynamique, les signes cliniques peuvent évoluer ou quasiment disparaître lors des périodes de rémission (Miskovic et *al.*, 2007 ; Robinson et *al.*, 2003) (Tableau 2).

Tableau 2 : Diagnostic de l'asthme chez le cheval (d'après Lavoie, 2007)

Signalement	Age > 7ans Pas de prédisposition de sexe ni de race
Anamnèse	Problèmes respiratoires > 3 mois Périodes d'exacerbation des signes cliniques Réversibilité des signes cliniques par des bronchodilateurs, des corticostéroïdes ou la mise au pré
Signes cliniques	Absence de fièvre, cheval alerte en l'absence de détresse respiratoire Détresse respiratoire ; difficulté surtout expiratoire, pousse abdominale marquée, ligne de pousse Auscultation thoracique : sifflements et crépitements
Cytologie du LBA	Phase d'exacerbation clinique : > 25% neutrophiles Phase de rémission clinique : cytologie normale
Radiographies thoraciques	Non utilisées en pratique Utiles pour l'exclusion d'autres pathologies (pneumonie, néoplasie) En général : poumons normaux, parfois présence d'une densification pulmonaire broncho-interstitielle, de signes d'hyperinflation ou de bulles emphysémateuses Cas sévère : Bronchiectasie

III. Etiologie de l'asthme équin

L'étiologie de l'asthme équin est encore discutée mais il semblerait que le déclenchement de l'AES chez le cheval soit directement lié à son environnement. Cependant, quelques études ont aussi investigué la composante héréditaire de l'asthme.

1. Facteurs de l'Hôte

Plusieurs études ont montré une implication génétique sur la sensibilité des chevaux à développer de l'asthme. Une étude a montré que le risque que la descendance soit atteinte d'asthme est 3,2 fois plus élevé avec un parent atteint et 4,6 fois plus élevé quand les deux parents sont atteints d'AES (Marti et *al.*, 1991). D'autres études ont aussi montré une prédisposition des chevaux pur-sang et Lipizzan (Gerber, 1989 ; Marti et *al.*, 1991). Un questionnaire standardisé basé sur le relevé des signes cliniques par les propriétaires (« Horse Owner Assessed respiratory Signs Index » HOARSI) a permis de tester la descendance de 2 étalons pur-sang atteints d'AES. Le risque de développer de l'asthme chez leur descendance augmente de 4,1 à 5,5 fois comparé aux chevaux contrôles sans lien connu (Jost et *al.*, 2007). De plus des études ont utilisé des panels de marqueurs microsatellites chez les demi-frères de chevaux de race pur-sang. Cela a permis d'identifier une séquence d'intérêt (« Quantitative trait locus » QTL) sur le chromosome 13 (Jost et *al.*, 2007 ; Schnider et *al.*, 2017 ; Swinburne et *al.*, 2009;). Selon les auteurs, cette région pourrait avoir un rôle dans la régulation de la sensibilité des chevaux à l'asthme dans certaines familles de chevaux pour lesquelles la prévalence est élevée. D'autres études sont nécessaires afin de confirmer l'effet de la génétique dans le développement de l'AES.

2. Facteurs environnementaux

Tout agent « agresseur » pour le système respiratoire pourrait être à l'origine de l'initiation de maladies pulmonaires obstructives (Denys, 2011).

Beaucoup de chevaux vivent en box souvent peu ou mal ventilé, sur paille et mangent du foin sec. Le système respiratoire du cheval est ainsi quotidiennement soumis à une grande quantité de poussières. L'inhalation de débris organiques provenant majoritairement du foin et des

litières sont un des facteurs prédisposant de l'initiation et/ou du maintien de l'asthme chez le cheval au box.

2.1. L'environnement au sein des écuries

Les particules inhalées au sein d'une écurie sont constituées d'un mélange complexe de matériels organiques et inorganiques. L'alimentation et la litière constituent les principales sources de poussières dans une écurie, notamment si elles sont de mauvaise qualité voire moisies. De plus, le nettoyage des écuries est le moment où les poussières augmentent de l'ordre de 10-15 mg/m³ dont 20 à 60% sont des poussières respirables. Le cheval inhale alors 12 millions de particules à chaque inspiration (Art & Lekeux., 2004). La qualité de l'air respiré est fonction de la charge totale en poussières, la quantité de poussières respirables et la composition des poussières.

La qualité de l'air des chevaux dans une écurie peut être mesurée et quantifiée en terme de quantité de poussières totales, de quantité de poussières respirables et de composition de la poussière. Les mesures peuvent être réalisées dans l'environnement du cheval (Woods et *al.*, 1993), dans le foin et la litière (Vandenput et *al.*, 1997). Plusieurs techniques sont utilisées afin de déterminer la concentration en particules respirables et inhalables. Tout d'abord, il existe des compteurs de particules qui permettent d'apprécier de manière globale la qualité de l'air environnant du cheval. Une autre méthode permet d'identifier précisément toutes les particules en fonction de leur taille dans le foin ou la litière (Figure 11). Cette procédure doit être standardisée et bien réalisée afin d'obtenir des informations fiables (Vandenput et *al.*, 1997).

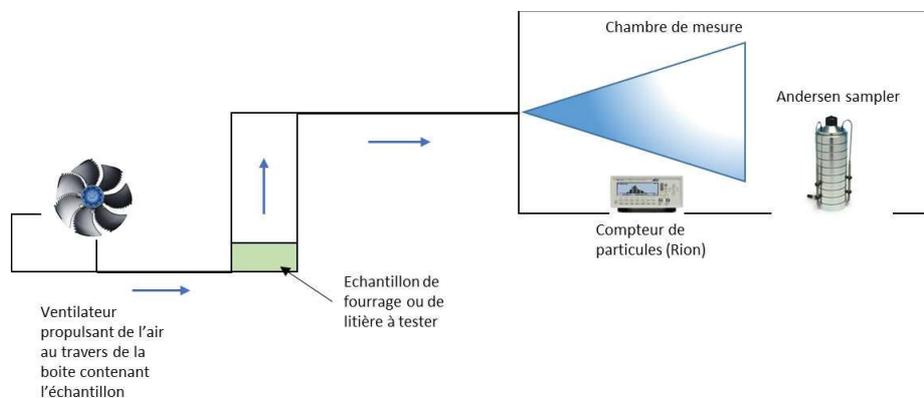


Figure 11 : Schéma du montage utilisé par Vandenput et *al.*, (1997) pour standardiser les appréciations qualitative et quantitative des poussières contenues dans divers fourrages et litières

Certains équipements permettent de mesurer la teneur en poussières au sein d'un bâtiment et d'autres permettent de mesurer la poussière contenue dans du foin ou encore de mesurer les particules présentes dans la zone respiratoire du cheval. Davison et *al.*, (2017), ont évalué la concentration et la taille des poussières dans une écurie grâce au DustTrakTM. Cet instrument permet de mesurer instantanément la concentration et la taille des particules dans les box. Ils ont ainsi montré que la concentration en particules varie selon la saison et le moment de la journée (Davison et *al.*, 2017). L'effet de la saison a été confirmée par Riihimäki et *al.*, 2008, qui ont montré qu'il y a plus de particules fines le matin en période estivale tandis que la concentration en particules est plus importante le soir en hiver (Riihimäki et *al.*, 2008).

Pour la mesure de particules dans un foin, plusieurs méthodes peuvent être utilisées comme l'utilisation de « personal sampler » qui sont des pompes portatives avec filtre permettant de collecter les particules respirables (Auger & Moore-Colyer, 2017). Une autre méthode est de collecter les poussières de foin par agitation et de récupérer les différentes fractions de poussières en utilisant une colonne de tamis. Les poussières sont ensuite mises en suspension et analysées par comptage manuel sur hémocytomètre et par compteur cellulaire électronique (Baker System 9120) (Pirie et *al.*, 2002a).

Enfin, le cheval passe de longues périodes avec les naseaux plongés dans la litière ou le foin. Aussi il est intéressant de pouvoir mesurer la teneur en poussières au niveau de la zone respiratoire des chevaux. Berndt et *al.* (2010), ont mis en place un dispositif de pompe reliées à des cassettes contenant des filtres différents selon la taille des particules à collecter. Ce système est placé sur le cheval sous surveillance qui devra le porter pendant environ 4 h. Les pompes ont un débit de 2 L/min pour la collecte des particules inhalables (< 100 µm) et de 2,5 L/min pour les particules respirables (< 5 µm) (Ivester et *al.*, 2014). Il a d'ailleurs été montré que la concentration en poussière est supérieure dans la zone respirable comparé au reste du box (Ivester et *al.*, 2014 ; Woods et *al.*, 1993). En plus de l'analyse des poussières, une étude récente a investigué la qualité microbiologique de plusieurs écuries pendant 3 ans. Cette étude a montré que les centres ayant beaucoup de chevaux et ayant des box paillés sont les plus contaminés avec la présence de *E. coli*, *Staphylococcus* spp., actinomycètes, et de moisissures (Wolny-Koładka, 2018).

2.2. Le foin

Les fourrages de mauvaise qualité ainsi que la litière des chevaux sont connus comme étant les initiateurs majeurs des inflammations respiratoires notamment dans le cas de l'AES (Deaton et *al.*, 2007 ; Pirie et *al.*, 2003a). L'incidence de la maladie apparait reliée au mode d'hébergement du cheval et touche ainsi majoritairement les chevaux en box nourris avec du foin. Holcombe et *al.*, 2001 ont d'ailleurs montré une augmentation du pourcentage en neutrophiles dans le LBA chez les chevaux atteints d'AES ou non placés au box et nourris au foin. Plusieurs études ont montré que le foin a une plus grande incidence que la litière sur la teneur en poussière respirables (Robinson, 2001 ; Webster et *al.*, 1987). Il a été montré que la teneur en particules respirables d'un foin moisi et d'un foin de bonne qualité était respectivement de 60,88 et $6,3 \times 10^4$ particules/litre d'air alors que la teneur en particules respirables du copeau et de la paille de bonne qualité était respectivement de 3,15 et $1,16 \times 10^4$ particules/litre d'air (Vandenput et *al.*, 1997).

Le foin peut contenir un mélange complexe de divers composants tels que des spores de champignons, des endotoxines, des β -D-glucanes ou de petites particules capables d'atteindre les alvéoles pulmonaires (Rylander, 2002). Des études ont montré que des chevaux souffrant d'AES, nourris au foin, développaient des signes cliniques typiques de l'AES, incluant une inflammation des voies respiratoires caractérisée par une neutrophilie pulmonaire et une accumulation de mucus trachéal (Derksen et *al.*, 1985 ; Tesarowski et *al.*, 1996). En revanche des chevaux « contrôles » exposés à du foin ont déclenché aussi une neutrophilie pulmonaire mais moindre que celle observée chez les chevaux asthmatiques sans aucun autre signe typique de l'asthme du cheval (Pirie et *al.*, 2002b). La manière de distribuer le foin peut aussi influencer le risque d'inflammation des voies respiratoires. Il est notamment préférable que le foin soit distribué au sol plutôt qu'en hauteur afin d'éviter que les particules descendent dans les voies respiratoires du cheval (Ivester, et *al.* 2012 ; Racklyeft, 1990), il peut aussi être trempé ou purifié « à la vapeur » (James & Moore-Colyer, 2010) afin d'éliminer les poussières et allergènes qu'il contient.

2.2.1. Les moisissures

La contribution des moisissures à l'initiation des inflammations respiratoires est reconnue. En effet, il a été montré que leurs différents composés (allergènes, glucanes, protéases et mycotoxines) provoquent une inflammation respiratoire que ce soit chez l'homme ou chez les

animaux (Le Bâcle & Bonnafé, 2013 ; McGorum *et al.*, 1993b). L'environnement des écuries contient une grande quantité de champignons aéroènes (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*) (Figure 12) et d'actinomycètes thermophiles (*Thermoactinomyces vulgaris*), que ce soit dans la litière ou dans le foin (Crichlow *et al.*, 1980 ; Pirie *et al.*, 2003a). Certains champignons tels qu'*Aspergillus fumigatus* sont capables de provoquer des dommages directs sur l'épithélium respiratoire, en rompant les jonctions serrées et en augmentant la perméabilité de l'épithélium par l'activation de protéases (Pirie *et al.*, 2003b). D'autres libèrent leurs spores, notamment sous l'effet des mouvements d'air dans les écuries lors du nettoyage. Il a notamment été montré que le β -D-glucane, un composé de la paroi cellulaire des moisissures, des levures et de certaines bactéries, peut induire une réponse inflammatoire se traduisant par une activation de la phagocytose par les macrophages ainsi qu'une réponse pro-inflammatoire (Douwes, 2005 ; Kim *et al.*, 2011).

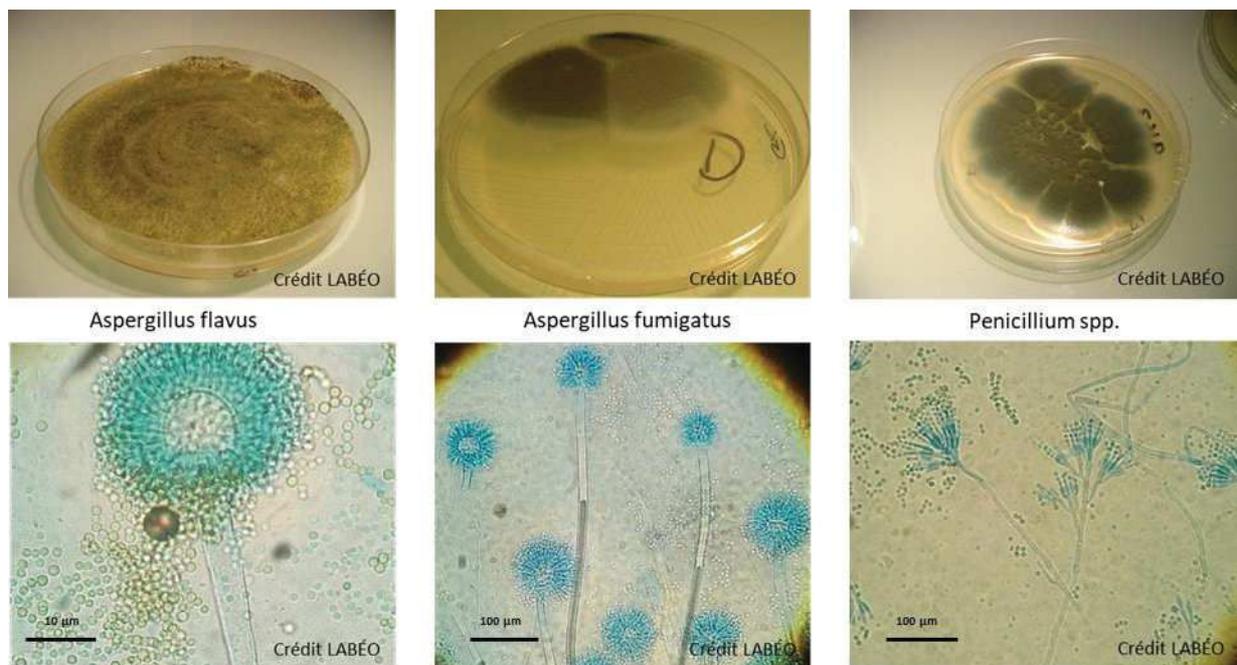


Figure 12 : Photographies des principales moisissures retrouvées dans les foin, isolées sur gélose Sabouraud et observées en microscopie (G x40)

McGorum *et al.*, (1993b) ont montré que l'inhalation d'extraits d'*Aspergillus fumigatus* ou de *Faenia rectivirgula* induit une neutrophilie pulmonaire associée à des dysfonctionnements pulmonaires chez les chevaux atteints d'AES asymptomatiques mais pas chez les contrôles, contrairement à Derksen *et al.*, (1988) qui a également montré une augmentation de la neutrophilie chez les chevaux contrôles et asthmatiques en réponse à *Faenia rectivirgula*.

Cependant, la neutrophilie observée chez les chevaux CTL était sûrement dû à une administration excessive de *M. faeni* (McGorum et al., 1993b).

2.2.2. Le β -D glucane

Les β -D-glucanes sont des composants de la paroi des champignons (*Aspergillus spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium spp.*, ect...) (Figure 13). Il a été montré que le β -D-glucane induit une réponse inflammatoire des voies aériennes par des mécanismes non spécifiques, par activation du processus de phagocytose par les macrophages et induction d'une réponse immunitaire pro-inflammatoire (Beeler-Marfisi et al., 2010). Ils peuvent induire une réponse inflammatoire des voies respiratoires par des mécanismes non-spécifiques notamment chez les chevaux lorsqu'ils sont présents en quantité élevée dans le foin (Pirie et al., 2002c).

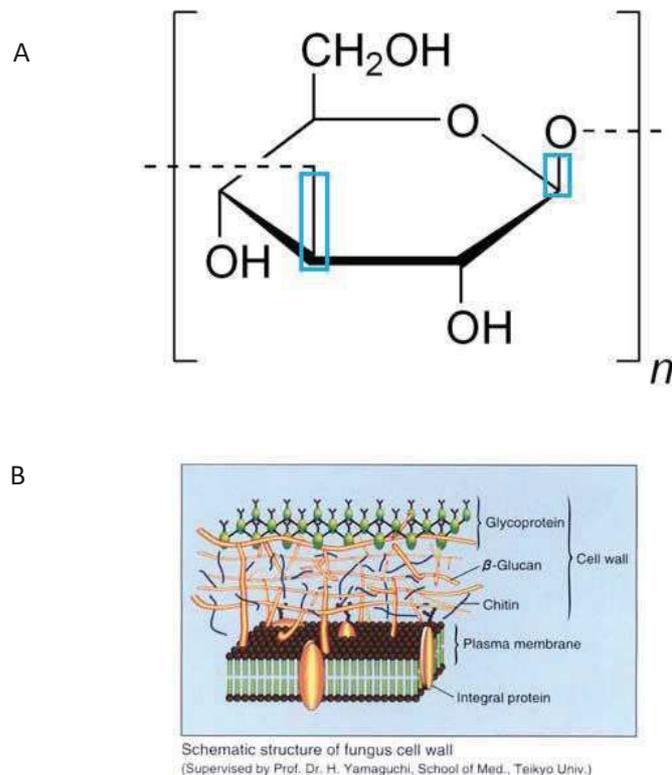


Figure 13 : Représentation biochimique (A) et schématique (B) du β -D-glucane (d'après www.encyclopedie-environnement.org)

2.2.3. Les endotoxines

Les endotoxines ou lipopolysaccharides (LPS) sont issues de la membrane externe des bactéries gram (-). Ce sont des toxines libérées lors de la lyse des bactéries. Il existe plus de structure de

LPS que d'espèces bactériennes. Les LPS sont constitués principalement de 3 parties (Figure 14):

- une molécule polysaccharidique O-spécifique
- un noyau servant de molécule d'ancrage
- une entité lipidique (Lipide A)

La toxicité de la molécule au niveau des voies respiratoires, est associée au lipide A tandis que la partie polysaccharide est immunogène pour l'hôte (Prescot, 1995).

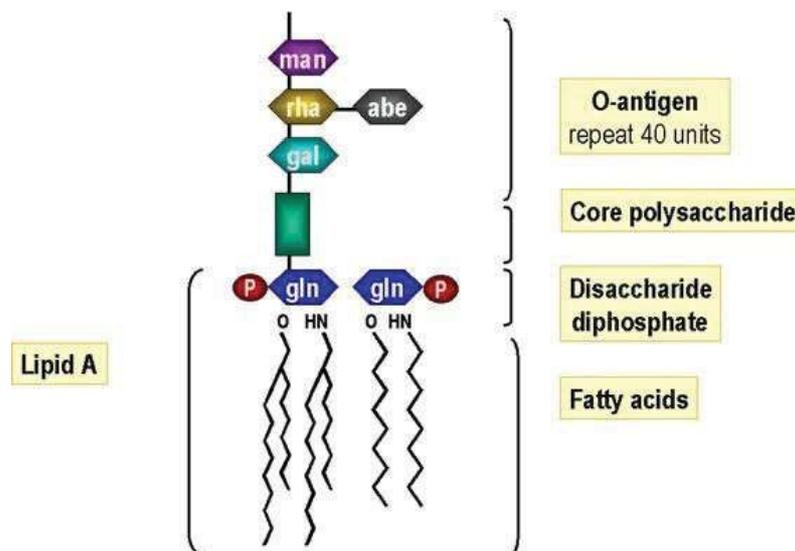


Figure 14 : Représentation schématique d'un LPS (d'après www.campus.cerimes.fr)

L'inhalation d'endotoxines par les humains ou les animaux induit une inflammation pulmonaire. Des travaux ont d'ailleurs montré que l'inhalation d'endotoxines induit une neutrophilie pulmonaire dose-dépendante chez tous les chevaux atteints ou non d'AES, alors qu'une obstruction significative des voies respiratoires n'apparaît que chez les chevaux atteints d'AES (Pirie et *al.*, 2001 ; 2003b). En effet, la stimulation des chevaux avec de la poussière déplétée en LPS induit une réponse neutrophilique atténuée par rapport à la réponse observée en présence de HDS total. (Pirie et *al.*, 2003a).

Une étude a montré que la teneur en endotoxines dans l'air était supérieure à 50 EU/m³ pour 90,5 % (82/91) des prélèvements, effectués grâce à des « personnel sampler » placées sur le personnel des écuries au moments des activités en présence des chevaux, dans des écuries paillées où les chevaux étaient nourris avec du foin ; et 85,7 % des échantillons avaient des valeurs supérieures à 200 EU/m³ (Samadi et *al.*, 2009). A ce jour, il n'existe pas de valeur seuil

internationalement validée pour l'exposition aux endotoxines, tant chez l'homme que le cheval. Seuls les Pays-Bas se sont dotés d'une valeur limite d'exposition professionnelle fixée à 90 EU/m³ depuis juillet 2010 (DECOS, 2010). Une irritation respiratoire est observée chez l'homme pour une concentration de 50 EU/m³ (Zock et *al.*, 1998).

2.2.4. Effet synergique des différents antigènes

Si plusieurs auteurs ont investigué les effets de ces différents antigènes de manière séparée, certains ont aussi étudié l'action synergique de ces différents facteurs étiologiques. Pirie et *al.*, (2003a) ont montré, une association entre la sévérité de la réponse neutrophilique pulmonaire des chevaux asthmatiques avec l'exposition au β -D-glucane et à la concentration aux spores de moisissures présentes dans les suspensions de poussières de foin « Hay Dust Suspensions » HDS (Pirie et *al.*, 2002b). De plus, Beeler-Marsifi et *al.*, (2010) ont provoqué une crise d'asthme chez un cheval sensible suite à l'inhalation d'une solution combinant des spores fongiques, des lipopolysaccharides et des spores de microsphères. Cette étude confirme que l'action combinée de plusieurs antigènes induit l'AES chez le cheval.

2.3. Dépôt dans les voies respiratoires

L'impact des particules au niveau des voies respiratoires est partiellement déterminé par la taille des particules. L'« American Conference of Governmental Industrial Hygienist » décrit 3 fractions de particules : la fraction inhalable, la fraction thoracique et la fraction respirable. Les particules inhalables regroupent les particules thoraciques avec un diamètre compris entre 5 et 10 μ m. Ces particules sont moins dangereuses que les particules respirables puisque qu'elles ne peuvent pas atteindre les régions les plus distales du poumon.

Les particules respirables sont de toutes petites particules (inférieur à 5 μ m de diamètre) capables d'être inspirées jusque dans les bronchioles et les alvéoles pulmonaires (Vincent, 2005). Cette fraction est considérée comme un indicateur approprié pour évaluer le risque de contamination des voies respiratoires équines au sein d'une écurie (Woods et *al.*, 1993). Ces petites particules vont s'accumuler en atteignant les régions les plus distales du poumon. Les macrophages vont alors les prendre en charge et orienter la réponse immunitaire suivant l'origine du stimulus (Cf. 3.1.6.4). Chez certains chevaux, la réaction est exacerbée et provoque une production accrue de mucus, un épaissement de la muqueuse pulmonaire et une bronchoconstriction.

Après leur inhalation, les particules se déposent plus ou moins loin dans les voies respiratoires en fonction de leur taille. Les particules inhalables ($< 100 \mu\text{m}$) atteignent seulement les voies respiratoires supérieures tandis que les particules respirables ($< 5 \mu\text{m}$) atteignent les voies respiratoires profondes ce qui induit une inflammation des voies respiratoires (Clarke, 1992) (Figure 15).

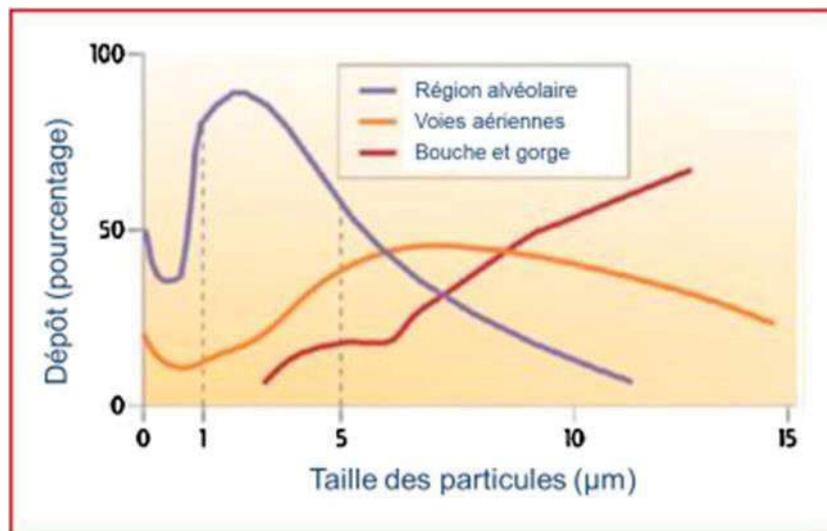


Figure 15 : Dépôt des particules dans les voies respiratoires chez l'homme (d'après Benattia *et al.*, 2015)

Les particules respirables regroupent les spores de moisissures, ou encore les poussières. Le taux de poussière dans le foin peut être de 10 à 15 mg/m^3 contenant 20 à 60 % de particules respirables (Art & Lekeux, 2004). Le processus de nettoyage des écuries double la concentration en poussière dans une écurie ayant une bonne ventilation et augmente de 16,8 fois la teneur en poussière dans le cas d'une écurie mal ventilée (Art & Lekeux, 2004). De plus, le cheval passant la plus grande partie de son temps les naseaux dans la paille ou le foin, la concentration en particules peut être 6 à 7 fois plus importante dans la zone respirable du cheval que dans l'ensemble du box (Woods *et al.*, 1993). Certains auteurs ont étudié la teneur en poussière d'une écurie à différents moments de la journée, et il est recommandé de sortir les chevaux au moment du nettoyage des boxes afin de ne pas les exposer à des concentrations en poussière trop importantes (Crichlow *et al.*, 1980 ; Kirschvink *et al.*, 2002 ; Millerick-May *et al.*, 2011). Les particules déposées dans le tractus respiratoire peuvent être éliminées rapidement en étant acheminées vers la circulation sanguine, vers les ganglions lymphatiques *via* les canaux lymphatiques, puis dirigées vers le tractus gastro-intestinal par le pharynx pour être éliminées par voie extrinsèque, c'est-à-dire par écoulement nasal et éternuement. Lorsqu'elles sont trop nombreuses, les particules ne sont pas toutes éliminées et séjournent au

niveau des voies respiratoires profondes créant de l'inflammation (Millerick-May et *al.*, 2015). Les particules déposées dans la région trachéo-bronchique et dans les voies aériennes supérieures, sont portées par l'escalator mucociliaire vers la bouche. De la trachée aux bronches, des cils mobiles par leur mouvement, permettent d'éliminer les sécrétions. Le mucus et les particules sont alors déglutis vers le tractus gastro-intestinal.

Chez l'Homme, des études portant sur des particules marquées par des isotopes radioactifs montrent que la demi-vie de passage de l'oropharynx vers le tube digestif est de 10 minutes, elle est de l'ordre de 100 minutes pour le transfert des bronches vers l'oropharynx et atteint 8 h pour le passage des bronchioles aux bronches (Labiris & Dolovich, 2003).

3. Facteurs bactériens et viraux

Il n'existe actuellement aucune certitude quant au rôle des bactéries et des virus dans l'étiologie de l'asthme équin et humain, cependant ils pourraient entrainer des lésions nuisant à l'efficacité des systèmes de défense du tractus respiratoire (Leguillette, 2003 ; Rosenthal et *al.*, 2010).

Certaines bactéries telles que *Streptococcus zooepidemicus* et *Actinobacillus/Pasteurella species pluralis (spp.)*, ont été isolées à partir de liquides de lavages trachéaux et associées aux signes cliniques d'asthme équin modéré (AEM). De plus, une quantité importante de bactéries *Streptococcus zooepidemicus* et *Actinobacillus/Pasteurella spp* $> 10^3$ CFU/ml dans le lavage trachéal a été significativement corrélé avec la toux (Christley, 2001) et semble accroître le risque d'AEM (Wood et *al.*, 2005). De plus, l'étude du microbiome des chevaux asthmatiques est d'actualité. Fillion-Bertrand et *al.*, (2018) a montré que les microbiomes bactériens pulmonaires des chevaux sains et AES étaient différents et variaient selon le niveau d'exposition antigénique. Cette différence est d'autant plus marquée lors d'inflammation pulmonaire chez les chevaux AES ce qui suggère que le microbiome pulmonaire est altéré dans l'AES. Cependant le rôle du microbiome dans la perpétuation de l'AES reste encore à investiguer.

L'implication des virus reste à préciser mais une étude a montré que les chevaux positifs à l'herpès virus équin (HVE)-1 ou -4 avaient 5 fois plus de risque de développer de l'AEM (Hoffman et *al.*, 2002). De plus, l'étude longitudinale menée par Doubli-Bounoua et *al.*, (2016) a montré que la toux est significativement associée à la détection d'herpèsvirus équin-2 et du rhinovirus-B par PCR dans le lavage trachéal. Une autre étude, de type cas-contrôle, a montré que 68% des chevaux atteints d'AEM étaient positifs au rhinovirus-A équin contre 32% chez

les chevaux contrôles (Houtsma et *al.*, 2015). De plus, il a été montré chez l'homme qu'une infection virale sévère dans l'enfance pouvait prédisposer au développement de l'asthme une fois adulte (Kusel et *al.*, 2012). Chez le cheval, il a été suggéré que des infections respiratoires passées, telle qu'une infection par rhinovirus, pourraient prédisposer les chevaux au développement de l'AES (Dixon et *al.*, 1995).

Même si l'AES est associé à une concentration élevée de neutrophiles dans le LBA, ceux-ci ne présentent pas la même morphologie que les neutrophiles impliqués dans les processus infectieux (Dixon et *al.*, 1995). En effet, les neutrophiles ne représentent pas une population uniforme, mais plutôt un ensemble de diverses sous-populations fonctionnellement différentes dont le rôle dans le processus inflammatoire varie en fonction de l'étiologie.

Si la voie infectieuse ne semble pas privilégiée dans l'étiologie de l'asthme chez le cheval, il est en revanche suggéré, que des infections respiratoires passées peuvent prédisposer les chevaux au développement de l'AES (Mair & Derksen, 2000). En effet, cela pourrait s'expliquer par l'augmentation de l'absorption de l'antigène à travers la surface épithéliale précédemment endommagée, altérant ainsi la réponse immunitaire et favorisant la rétention des particules antigéniques du fait de l'altération des mécanismes de clairance mucillaire.

4. Autres facteurs environnementaux

L'effet de la saison, a été investigué par plusieurs équipes. L'hiver est souvent considéré comme un facteur de risque d'exacerbation de l'AES (Couëtil & Ward, 2003 ; Hotchkiss et *al.*, 2007 ; Riihimäki et *al.*, 2008). Comme les chevaux passent la majorité de leur temps à l'intérieur, la concentration de moisissures et de poussières inhalables dans l'environnement du cheval augmente durant l'hiver. Cependant, l'aggravation des signes cliniques est aussi rapportée durant les mois d'été (Ward & Couëtil, 2005) même lorsque les chevaux sont gardés dehors la majorité du temps. Bullone & Lavoie, (2015) ont montré que la température et l'humidité, qui sont fortement associées à la concentration en pollen et à la présence de spores dans l'air, ont un effet négatif sur les fonctions pulmonaires des chevaux atteints d'AES en amplifiant l'obstruction des voies respiratoires. La pression pleurale s'améliore significativement quelques jours après une baisse des températures sans autre changement environnemental (Bullone & Lavoie, 2015).

IV. Physiopathologie de l'asthme

1. La réaction d'hypersensibilité

Au point de vue immunologique, la réaction asthmatique allergique chez l'Homme est caractérisée par deux phases. La première phase, appelée phase précoce de la réaction immédiate ou de sensibilisation, survient lorsqu'un allergène pénètre dans les voies respiratoires. Ce dernier est pris en charge par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) puis présenté aux lymphocytes T (Cluster of determination) CD4+ qui vont se différencier en Thelper 2 (Th2), producteurs notamment d'Interleukine-4 (IL-4) qui va induire la production d'Immunoglobuline E (IgE) par les lymphocytes B. Les IgE spécifiques des allergènes vont alors se fixer sur leur récepteur à la surface des mastocytes (Verstraelen et *al.*, 2008). Cela va induire une dégranulation des mastocytes et la libération de médiateurs vaso- et broncho-actifs tels que l'histamine et les prostaglandines dans les minutes suivant l'exposition (Busse et *al.*, 2001), provoquant ainsi la bronchoconstriction et l'obstruction des voies respiratoires. Il s'agit d'une réaction précoce communément appelée hypersensibilité de type I (Figure 16).

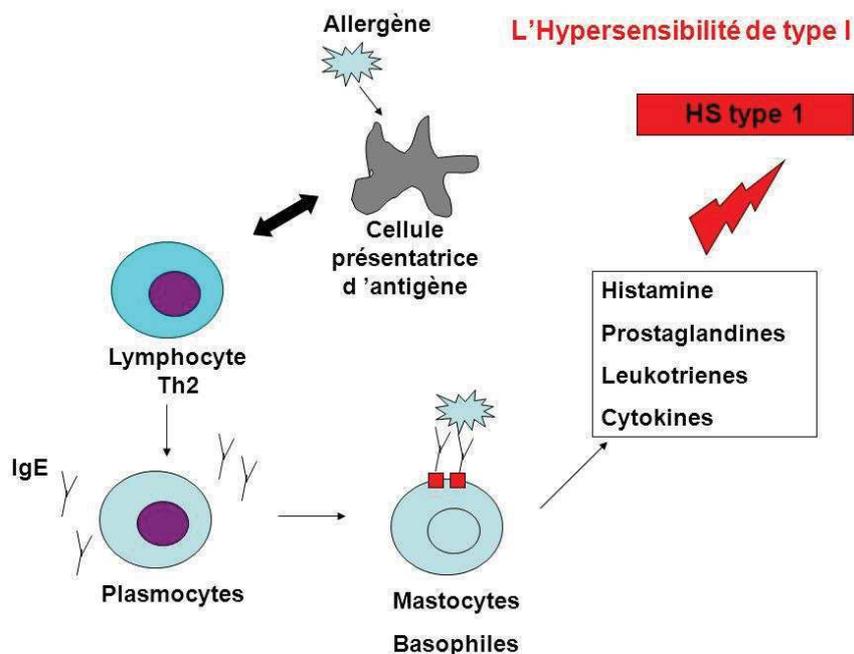


Figure 16 : Représentation schématique du processus d'hypersensibilité de type I (d'après www.slideplayer.fr)

Chez le cheval, le bronchospasme est un élément essentiel dans l'AES, comme l'indique l'amélioration des signes cliniques et de la fonction pulmonaire suite à l'administration de bronchodilatateurs (Deluca et *al.*, 2008). Il est le résultat à la fois des effets directs des médiateurs inflammatoires sur les muscles lisses et des effets indirects exercés *via* le système nerveux autonome (Robinson et *al.*, 1996). La seconde phase, ou phase de réponse tardive, implique également la bronchoconstriction et correspond à une réponse inflammatoire qui survient quelques heures après l'exposition à l'agent ayant causé la crise d'asthme (Horohov et *al.*, 2005). Pendant cette phase, les cellules effectrices telles que les éosinophiles, les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes T sont recrutés vers le poumon (Lemanske & Busse, 2003 ; Metzger, 1985). Ces cellules interagissent ensemble et avec la muqueuse bronchique, ce qui provoque l'exacerbation des symptômes dans les bronches (Bernstein, 2008). Si les symptômes se maintiennent, ils vont altérer les tissus bronchiques. La libération de protéines basiques, de médiateurs lipidiques et de radicaux libres de l'oxygène (ROS) provoque à long terme la déformation de l'épithélium bronchique, ce qui contribue au remodelage bronchique et à l'hyperréactivité des voies respiratoires (Sampson, 2000).

L'accumulation de mucus dans les voies aériennes est une caractéristique constante de l'AES, en général accompagnée de toux (Couëtil, 2016). Elle est associée à l'inflammation neutrophilique des voies respiratoires (Robinson et *al.*, 2003). Lorsque les chevaux atteints d'AES sont mis au pré pendant plusieurs semaines, la majorité des symptômes cliniques se résolvent, notamment le bronchospasme et l'inflammation. Néanmoins l'accumulation de mucus persiste légèrement comparé aux chevaux sains (Jefcoat et *al.*, 2001). La notion de phase précoce dans le cadre de l'asthme du cheval est cependant controversée puisqu'une période de plusieurs heures voire jours en présence des allergènes est nécessaire pour déclencher une bronchoconstriction (Fairbairn et *al.*, 1993). De plus Deaton et *al.*, (2007), ont montré que la nébulisation de suspension de poussières de foin et paille combinés, pendant 2 minutes, entraînait une altération des fonctions respiratoires chez les chevaux CTL contrairement aux chevaux atteints d'AES. En effet, la résistance pulmonaire, la réactance et la fréquence de résonance augmentent 15 minutes après nébulisation chez les chevaux CTL. Une diminution de la proportion de lymphocytes et de macrophages a aussi été observée 10 minutes post-nébulisation chez les chevaux CTL et non chez les chevaux atteints d'AES. En revanche la proportion de neutrophiles augmente significativement 24h post-nébulisation chez les chevaux atteints d'AES tandis que chez les CTL, les paramètres cytologiques sont revenus à leur stade basal.

Ainsi la réaction d'hypersensibilité observée chez les chevaux CTL serait un mécanisme de protection visant à diminuer la quantité de particules atteignant les alvéoles. Ce serait donc ce mécanisme de protection qui serait déficient chez les chevaux atteints d'AES (Deaton et *al.*, 2007).

2. Initiation de la réponse inflammatoire

Les cytokines et les chimiokines sont produites et libérées par les cellules mononucléées sanguines périphériques (PBMC), les macrophages, les lymphocytes, les cellules épithéliales et endothéliales et diverses cellules impliquées dans l'inflammation. Leur rôle est l'attraction et le contrôle de l'état d'activation des cellules du système immunitaire. Elles sont également impliquées dans le remodelage du tissu cicatriciel.

En effet, une lésion de l'épithélium pulmonaire provoque la libération du « Tumor Necrosis Factor- α » (TNF- α) et d'IL-1 β par les macrophages alvéolaires. Ces cytokines attirent les neutrophiles sur le site, ils sont d'ailleurs les principaux témoins de l'inflammation. Le recrutement de ces cellules est très rapide et une neutrophilie pulmonaire est observée dès 5 h après la stimulation (McGorum et *al.*, 1993b). Ils initient aussi les mécanismes à l'origine de la synthèse de nouvelles chimiokines par les cellules épithéliales et endothéliales, à savoir le C-X-C motif Ligand-8 (CXCL-8). L'IL-8 prolonge la réponse inflammatoire et présente un puissant chimiotactisme attirant les neutrophiles. Les cellules épithéliales bronchiques produisent également des IL-1 β , IL-6, IL-8 et « Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor » (GM-CSF), toutes ces cytokines jouant un rôle dans la cascade de l'inflammation (Figure 17).

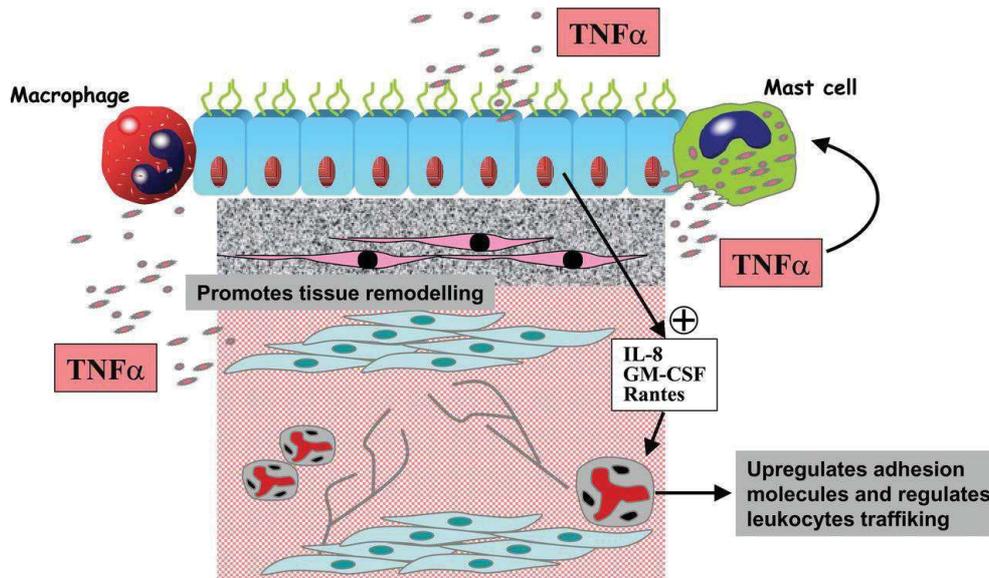


Figure 17 : Représentation schématique de l'effet d'une lésion sur l'épithélium bronchique (d'après Russo et *al.*, 2005)

3. La réponse immunitaire pulmonaire

La première barrière de défense de l'organisme est une barrière physique caractérisée par des mécanismes passifs de l'immunité faisant intervenir des barrières anatomiques, des phénomènes physiques et des acteurs chimiques. Parmi ceux-ci, il y a le filtre nasal, la formation de mucus, l'impaction des particules aéroportées dans les voies respiratoires et l'intervention de plusieurs acteurs cellulaires qui représentent l'immunité innée. L'immunité innée est la première ligne de défense vis-à-vis des agents antigéniques. Elle est mise en jeu immédiatement et est fonctionnelle rapidement mais n'est pas spécifique ni renforcée en cas d'exposition répétée à un antigène.

Les mécanismes de défense non spécifiques incluent des mécanismes mécaniques et cellulaires : l'escalator muco-ciliaire, la toux et la phagocytose permettent l'élimination des particules inhalées. La musculature lisse est à l'origine d'une bronchoconstriction en prévention de l'entrée de nouveaux agents, et la circulation sanguine bronchique fournit les médiateurs et effecteurs de la réponse inflammatoire face à l'agression (Abbas et *al.*, 1996).

3.1. Les acteurs cellulaires au niveau du poumon

L'inflammation des voies aériennes dans l'asthme reflète un déséquilibre dans les interactions, *via* des cibles et des effecteurs multiples, entre les cellules inflammatoires, l'épithélium bronchique et la réponse immunitaire de l'hôte. Les principales cellules de l'immunité innée

sont : les phagocytes tels que les cellules dendritiques, les neutrophiles, les macrophages et les granulocytes comme les mastocytes, les basophiles. Dès qu'une inflammation s'installe au niveau du poumon, un recrutement de neutrophiles, et/ou éosinophiles, et/ou mastocytes est observé (Leguillette, 2003). Les cellules « Natural Killers » NK sont à la limite de la réponse immunitaire innée et adaptative.

Les cellules de la réponse immunitaire adaptative sont les lymphocytes B et T.

3.1.1. Les cellules épithéliales, cellules musculaires lisses et cellules parenchymateuses

D'autres cellules sont aussi investiguées pour leur rôle potentiel dans la régulation de l'inflammation respiratoire et le remodelage tissulaire. Les cellules épithéliales (Figure 18) sont importantes dans de nombreuses maladies de par leur rôle de barrière physique et fonctionnelle vis-à-vis de l'air inhalé et des particules qu'il contient. Les cellules épithéliales ciliées représentent le type cellulaire prépondérant de l'épithélium respiratoire, soit plus de 50% de l'ensemble des cellules épithéliales (Spina, 1998). Les cellules ciliées constituent un stade terminal de différenciation et ont pour origine les cellules basales ou sécrétoires (Ayers & Jeffery, 1988). Leur rôle est d'assurer la clairance mucociliaire qui permet l'élimination des aéro-contaminants et des micro-organismes. L'épithélium bronchique est à la fois impliqué dans les mécanismes de défense de l'hôte et dans la genèse de pathologies inflammatoires touchant les voies aériennes. En effet, les cellules épithéliales bronchiques possèdent une grande variété de récepteurs et produisent de nombreux médiateurs, notamment dans le cas d'inflammation par les poussières inhalées, c'est pourquoi elles pourraient être d'importants modulateurs de la réponse inflammatoire.

Le rôle de barrière intervenant dans la préservation de la muqueuse bronchique est assuré par la cohésion entre les cellules épithéliales permise par l'existence de jonctions intercellulaires.

Des changements structuraux de la paroi des voies respiratoires apparaissent suite aux processus inflammatoires et cicatriciels se produisant dans la pousse. Ces remodelages contribuent à l'obstruction respiratoire car le diamètre de la lumière des voies aériennes diminue. L'accumulation de cellules inflammatoires et l'augmentation de la vascularisation dans les voies respiratoires inflammées contribuent à accentuer le remodelage.

L'hypertrophie musculaire lisse participe à l'obstruction de façon passive en diminuant le diamètre de la lumière, mais aussi en augmentant la force de contraction musculaire, favorisant ainsi la bronchoconstriction (Denys, 2011).

Jusqu'à présent, les cellules musculaires lisses avaient été cantonnées à un rôle régulateur de la ventilation *via* la bronchoconstriction ou la dilatation, mais aujourd'hui de nouvelles études se penchent sur leur capacité à sécréter diverses cytokines, chimiokines et facteurs de croissance, jouant potentiellement un rôle dans la physiopathologie de l'asthme (Begueret et *al.*, 2007 ; Cox et *al.*, 2007).

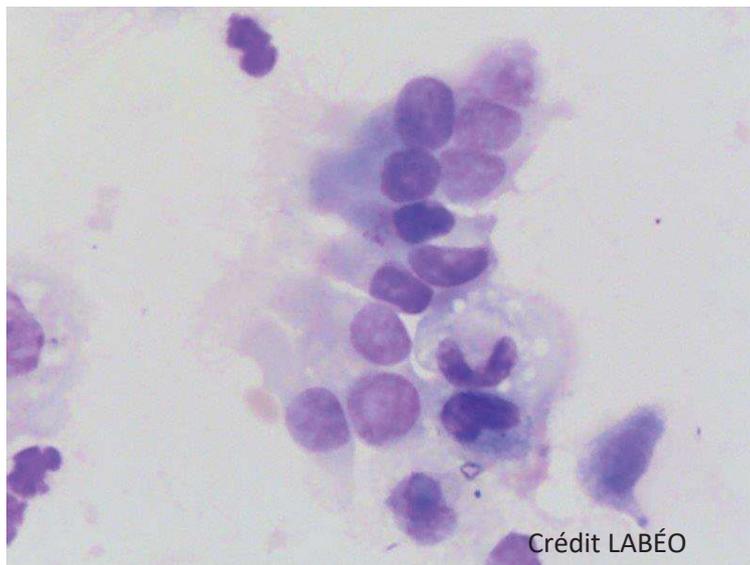


Figure 18 : Photographie de cellules épithéliales ciliées de LBA équin prises au microscope optique (G x50)

3.1.2. Les granulocytes

3.1.2.1. LES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES

Ils présentent un noyau multi-segmenté avec un diamètre variant de 10 à 12 μm . Les neutrophiles sont peu nombreux dans le LBA chez le cheval sain (Robinson, 2003). Chez un cheval cliniquement sain, le pourcentage de neutrophiles dans le LBA est en moyenne de 5% (Viel, 2003). Cependant un poumon n'est pas représentatif de l'autre chez un même cheval, et il a été montré que le pourcentage de neutrophiles est plus élevé dans le LBA du poumon droit comparé au poumon gauche (Depecker et *al.*, 2014). L'apparence des neutrophiles peut changer en fonction de la présence éventuelle d'une inflammation (Hewson & Viel, 2002) (Figure 19). Dans le cas de l'AES, les neutrophiles s'accumulent dans les voies respiratoires dans les 6h suivant une exposition à du foin moisi (Fairbairn et *al.*, 1993, Pirie et *al.*, 2001). Contrairement aux macrophages, les neutrophiles ne peuvent pas avoir une activité soutenue et répétée de phagocytose.

Les neutrophiles produisent également des cytokines pro-inflammatoires, susceptibles de jouer un rôle central dans la pathogénie de l'asthme, en entretenant le recrutement des neutrophiles ou en favorisant l'activité d'autres cellules inflammatoires ou immunitaires (Joubert et *al.*, 2001). Chez le cheval, l'expression des ARNm du TNF- α , de l'IL-1 β et de l'IL-8 par les neutrophiles stimulés ou non a été rapportée plusieurs fois (Nerren et *al.*, 2009 ; Joubert et *al.*, 2008). Il a aussi été montré que l'expression des ARNm de l'IL-10 et de l'IL-1 β est significativement corrélée avec le pourcentage de neutrophiles (Hue et *al.*, 2018 ; en révision) (Annexe 6).

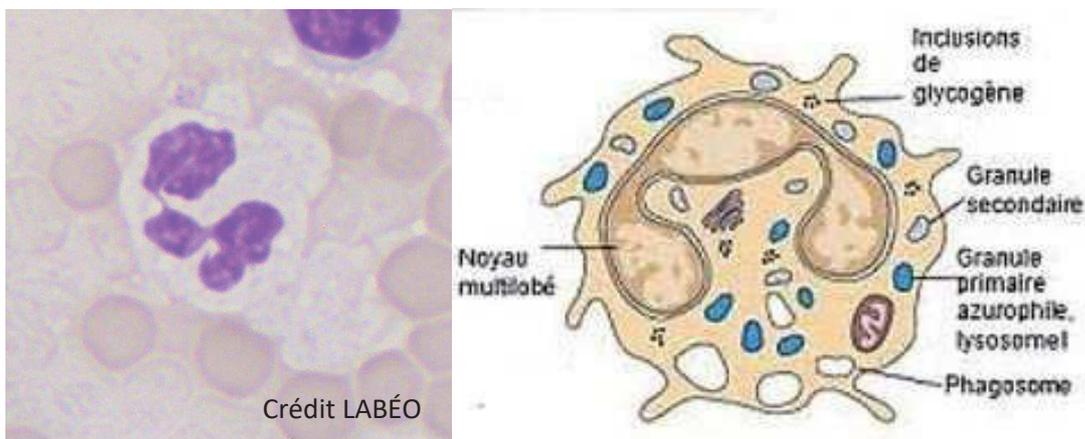


Figure 19 : Photographie prise au microscope optique (G x100) et représentation schématique de polynucléaires neutrophiles (d'après www.acces.ens-lyon.fr)

3.1.2.2. LES EOSINOPHILES

Leur taille varie de 12 à 14 μm (Figure 20). Ils présentent un noyau bilobé ainsi que de nombreuses granules qui se colorent avec de l'éosine. Leur proportion doit être inférieure à 2% dans le LBA.

Leur répartition est surtout tissulaire, seul 1% du nombre total est circulant. Les polynucléaires éosinophiles sont des cellules du système immunitaire innée. Ils participent activement dans les processus inflammatoires ou allergiques. Leur rôle dans la cascade inflammatoire de l'asthme chez l'Homme est connu depuis longtemps (Schleich et *al.*, 2014). Contrairement à l'asthme humain, la présence d'éosinophiles dans le liquide de LBA est chez les chevaux atteints d'AES.

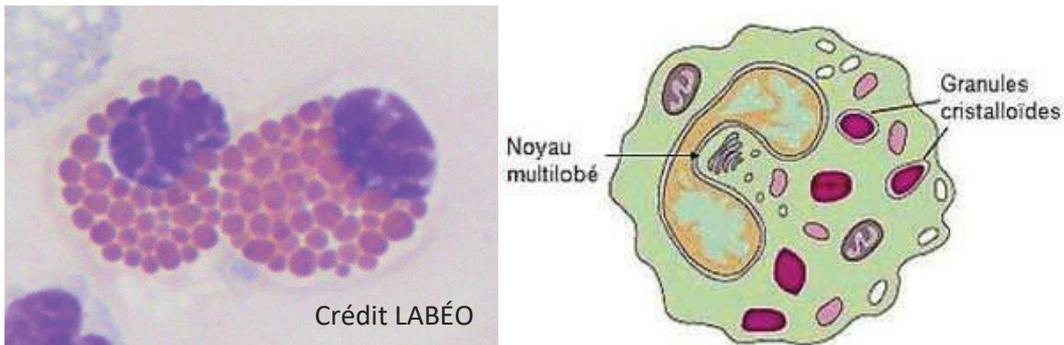


Figure 20 : Photographie prise au microscope optique (G x100) et représentation schématique d'un éosinophile (d'après www.acces.ens-lyon.fr)

3.1.2.3. LES BASOPHILES

Les basophiles comme les mastocytes participent à l'initiation de l'inflammation allergique, par l'intermédiaire de la fixation des IgE spécifiques sur leur récepteur. Ils sont également impliqués dans la différenciation Th2 des lymphocytes T *via* leur sécrétion d'IL-4. Ces cellules sont de taille variable et sont caractérisées par la présence de granulations cytoplasmiques métachromatiques (Hewson & Viel, 2002) (Figure 21).

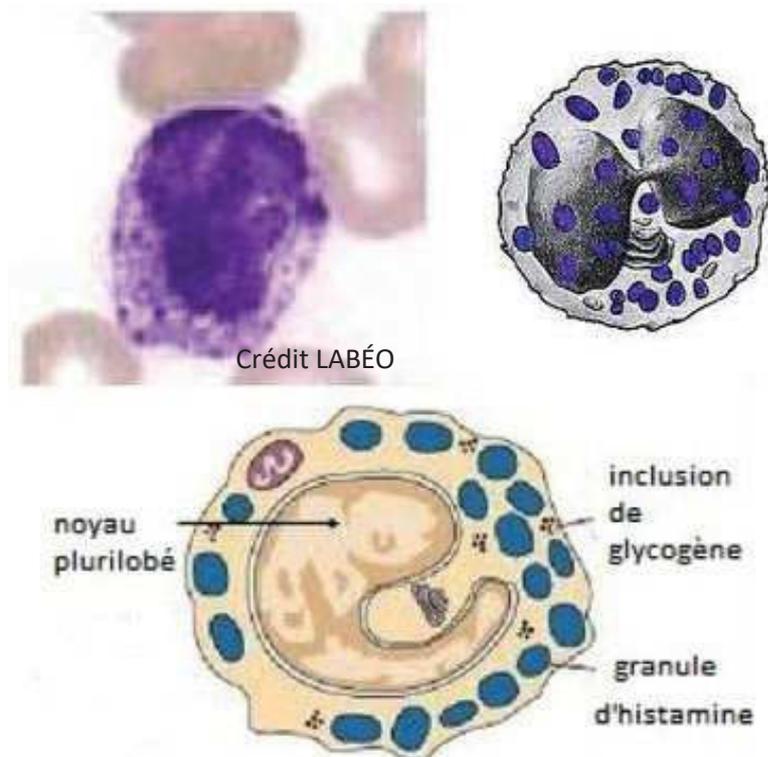


Figure 21 : Photographie prise au microscope optique (G x100) et représentation schématique d'un basophile (d'après www.acces.ens-lyon.fr)

3.1.3. Les mastocytes

Les mastocytes jouent un rôle majeur dans la phase aiguë du processus inflammatoire dans l'asthme allergique. La fixation des antigènes sur le récepteur spécifique *via* l'IgE conduit à leur activation et à la libération de médiateurs inflammatoires, dont l'histamine. Les mastocytes contribuent également à la production de TNF- α dans l'asthme, et donc au recrutement des neutrophiles, des cellules dendritiques et des lymphocytes CD4⁺ (Nakae et *al.*, 2007). Chez le cheval cliniquement sain, la proportion de mastocytes est généralement inférieure à 2 % dans le LBA (Viel, 2003) (Figure 22).

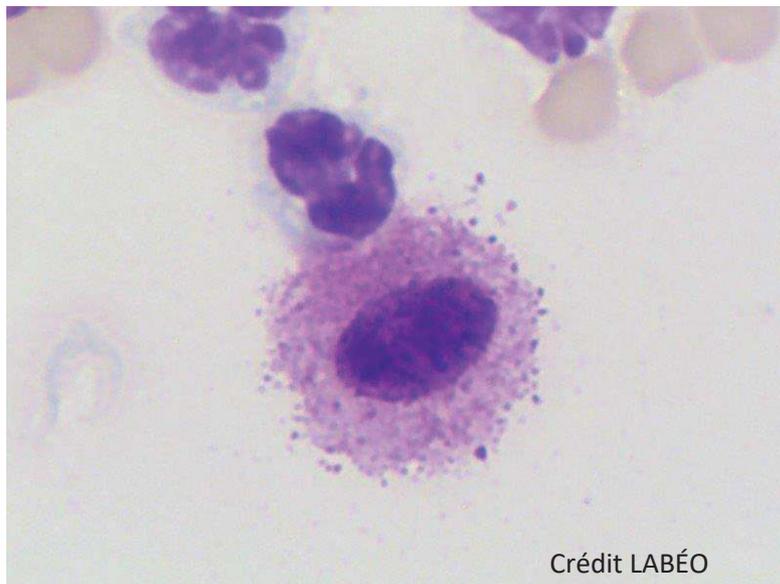


Figure 22 : Photographie prise au microscope optique (G x100) de mastocytes

3.1.4. Les lymphocytes

La population de lymphocytes se compose de lymphocytes B, de lymphocytes T et de cellules « Natural Killer » (NK). Ils sont respectivement responsables de la réponse humorale et cellulaire de l'immunité acquise, assurant l'élimination des agents pathogènes extra- et intracellulaires. Les cellules NK sont des lymphocytes historiquement appelées « cellules tueuses naturelles » en raison de leur capacité à lyser des cellules tumorales ou infectées en l'absence d'immunisation spécifique préalable. Elles ont un rôle de sentinelle au niveau des poumons.

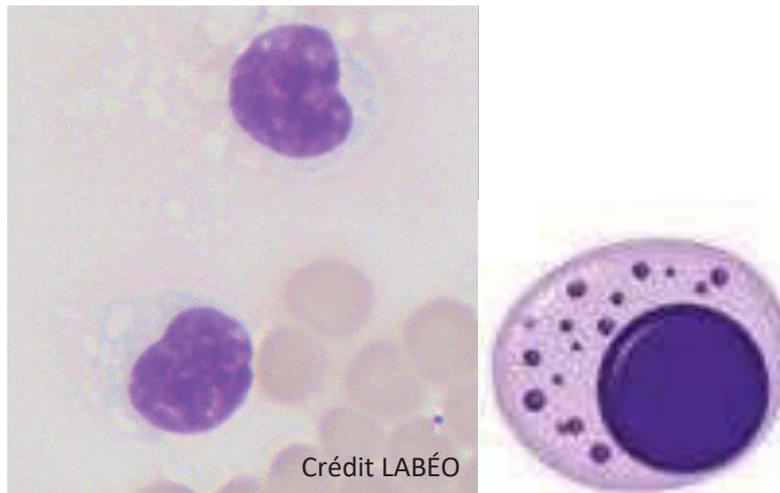


Figure 23 : Photographie prise au microscope optique (G x100) et représentation schématique d'un lymphocyte (d'après www.acces.ens-lyon.fr)

Les lymphocytes sont des cellules présentant un large noyau et un cytoplasme très réduit. Lorsqu'ils sont inactivés, ce sont de petites cellules de 9 μm de diamètre ayant un noyau rond avec une chromatine très dense (Figure 23). Les lymphocytes activés, par des stimulations immunitaires, sont de plus grande taille (10 à 15 μm), leur noyau est plus excentré, leur cytoplasme plus abondant et ont une coloration plus basophile (Hewson & Viel, 2002). Le pourcentage de lymphocytes chez le cheval cliniquement sain est en moyenne de 30% dans le LBA (Viel, 2003). Les lymphocytes sont impliqués dans l'inflammation chronique et jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire. Le rôle des lymphocytes T est important et la balance des lymphocytes Th1/Th2 est considérée comme essentielle dans l'asthme. Mais la découverte du rôle des sous-populations lymphocytaires Th17, T régulateur (Treg) et NK montre que la seule considération de la balance Th1/Th2 ne permet pas d'expliquer la complexité de la réponse inflammatoire dans l'asthme.

Chez l'individu sain, l'exposition à un allergène induit une tolérance du système immunitaire nécessaire au maintien de l'homéostasie tissulaire, qui nécessite la différenciation des lymphocytes CD4^+ en lymphocytes Tregulator (Treg) (Robinson, 2009). Par cytométrie en flux, les différentes populations de lymphocytes peuvent être différenciées grâce à leurs différents marqueurs membranaires, les « clusters de différenciation » (CD).

La structure globale des lymphocytes T est identique, ils se distinguent par leurs récepteurs cellulaires (TCR) toujours accompagnés du cluster de différenciation CD3, mais aussi du CD4 ou du CD8 suivant le lymphocyte considéré. Les TCR sont des récepteurs membranaires caractéristiques des lymphocytes T. Grâce aux TCR, les lymphocytes T ont la propriété de

reconnaitre de manière spécifique des fragments peptidiques antigéniques associés aux molécules du CMH.

Ces récepteurs membranaires se distinguent par leur précocité d'expression et sont de deux types. Les TCR-1 associés au CD3 mais pas au CD4 et CD8, ces lymphocytes interviennent à la fois dans l'immunité innée et l'immunité spécifique et les TCR-2 sont associés au CD4 ou CD8⁺ suivant le type de lymphocyte (LT-CD4 ou LT-CD8) (Figure 24) (Rivière et *al.*, 2000).

Les lymphocytes B, eux, sont responsables de la production d'anticorps qui leur font aussi office de récepteurs membranaires spécifiques à un seul épitope. Ils sont activés et différenciés en cellules B mémoires ou en plasmocytes en fonction des cytokines sécrétées, en particulier par les cellules épithéliales, les mastocytes et les fibroblastes (Lavoie-Lamoureux, 2011). Les cellules B jouent un rôle plus important dans les maladies allergiques, comme l'asthme allergique notamment dans la synthèse des IgE spécifiques aux allergènes. Chez le cheval, le rôle des IgE n'est pas clairement défini. Des études suggèrent un taux plus élevé en IgE chez les chevaux atteints d'asthme sévère stimulés avec de *l'Aspergillus fumigatus* (Halliwell et *al.*, 1993 ; Schmallenbach et *al.*, 1998). Tandis que (Wagner, 2009) n'a pas identifié un rôle des IgE dans la pathogénie de l'AES.

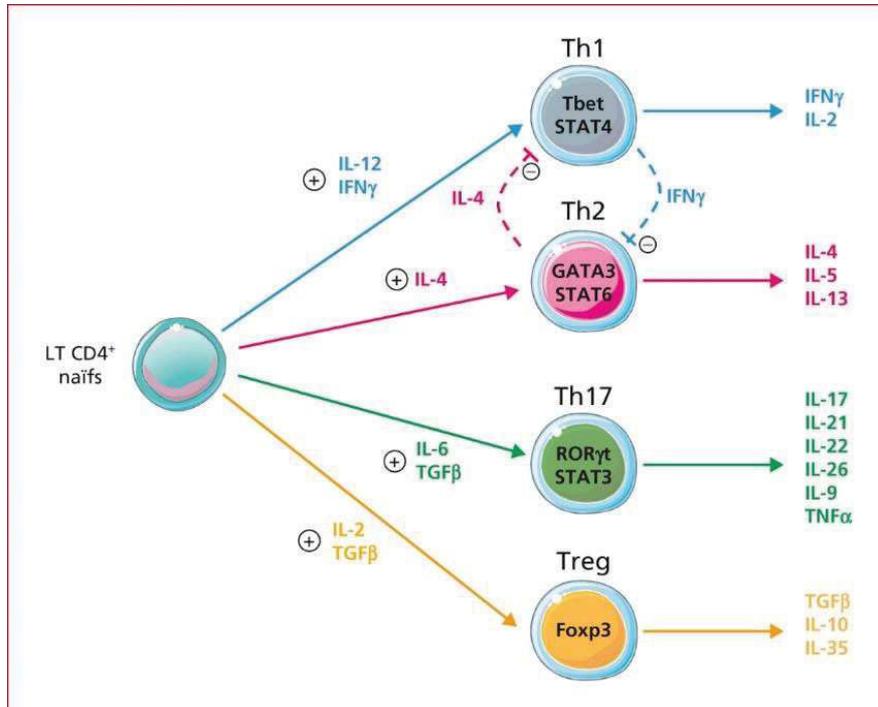


Figure 24 : Représentation schématique des différentes voies de régulations des LT (d'après Boschetti et *al.*, 2012).

3.1.5. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont présentes dans divers tissus et jouent un rôle clé dans l'initiation de la réponse inflammatoire. Elles font partie de la famille des cellules présentatrices d'antigène (CPA) et forment un réseau très dense de cellules capables de capturer les antigènes inhalés et de les présenter aux lymphocytes T, *via* le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) au niveau de la muqueuse bronchique (Tizard, 2013). De plus, elles induisent la prolifération des lymphocytes T ainsi que leur différenciation en Th1 et Th2.

3.1.6. Les macrophages

Les macrophages sont présents dans de nombreux tissus où ils jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie, dans la défense de l'hôte et dans la reconstitution tissulaire. Ils sont présents à la surface de l'épithélium alvéolaire et sont capables de se multiplier. Les macrophages sont les cellules immunitaires les plus abondantes au niveau du poumon. Ils sont retrouvés de façon majoritaire dans le LBA (60%) chez un cheval cliniquement sain (Hewson & Viel, 2002). De plus, les macrophages représentent une population très hétérogène combinant des fonctions pro- et anti-inflammatoires (Li et *al*, 2009) (Figure 25).



Figure 25 : Photographie prise au microscope optique de macrophage alvéolaire (G x50).

Les macrophages ont une activité importante de phagocytose et de macropinocytose. La phagocytose permet l'internalisation de virus, de bactéries, ou encore de moisissures. La macropinocytose permet l'internalisation de large volume d'antigènes solubles en impliquant les filaments d'actine. Il s'agit d'un mécanisme non spécifique qui permet l'internalisation d'un grand volume extracellulaire (50-1 000 nm) (Figure 26).

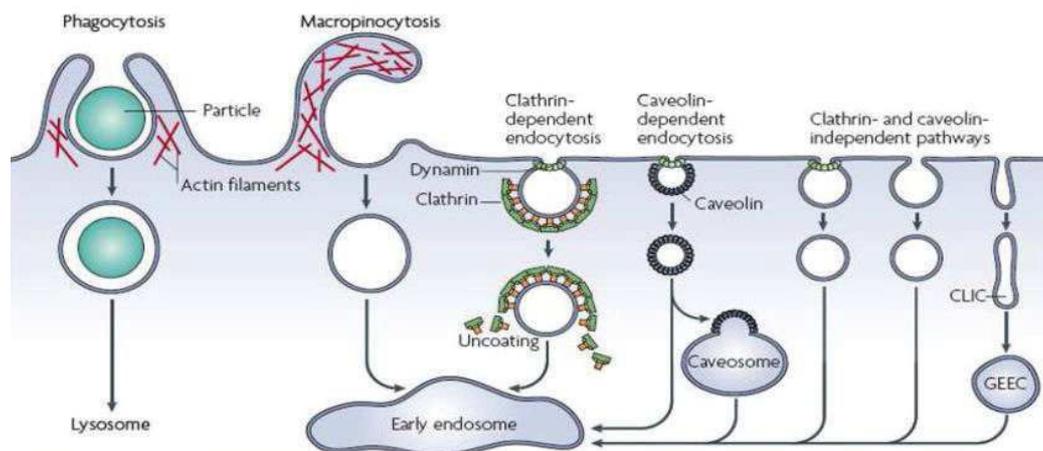


Figure 26: Schéma simplifié des mécanismes de phagocytose et de macropinocytose (d'après Lopez & Arias, 2010).

3.1.6.1. ORIGINE DES MACROPHAGES

Les macrophages ont été décrits pour la première fois en 1893 par Elie Metchnikoff. Dans son étude, il a observé que les phagocytes « attaquaient et engloutissaient les microbes d'une étoile de mer blessée par une épine » (pour revue Gordon, 2008). Ainsi il qualifia ces phagocytes de macrophages (pour « gros » phagocytes) et de microphages (pour les petits « phagocytes » tels que les neutrophiles). Bien plus tard, Van Furth & Cohn (1968) ont formulé le système phagocytaire mononucléaire selon lequel les macrophages dérivent de la différenciation terminale des monocytes circulants. Le système phagocytaire mononucléaire est un réseau de cellules qui comprend des monocytes sanguins circulants, des macrophages tissulaires, et des cellules dendritiques trouvés dans différents organes (Hume, 2006). Ces cellules sont caractérisées par leur capacité à phagocyter les particules non spécifiquement telles que les poussières, les bactéries ou les virus, et capter spécifiquement les particules enrobées d'immunoglobulines à travers leurs récepteurs Fc de surface (Hume et al., 2002). Les précurseurs de la moelle osseuse prolifèrent et entrent dans la circulation comme monocytes avant de migrer dans les tissus, où ils se développent en macrophages et cellules dendritiques. Contrairement aux monocytes sanguins, les macrophages ont une durée de vie de 2 à 4 mois contre 24h pour les monocytes. Une étude a aussi montré la double origine des macrophages : les macrophages issus des monocytes circulants et les macrophages dérivés des macrophages primitifs observés dans le sac embryonnaire ou le foie (Yona et al., 2013). L'implantation de ces macrophages primitifs au niveau des tissus s'est produite au cours du développement

embryonnaire, où ils ont proliféré pour former la population de macrophages tissulaires résidents (Figure 27).

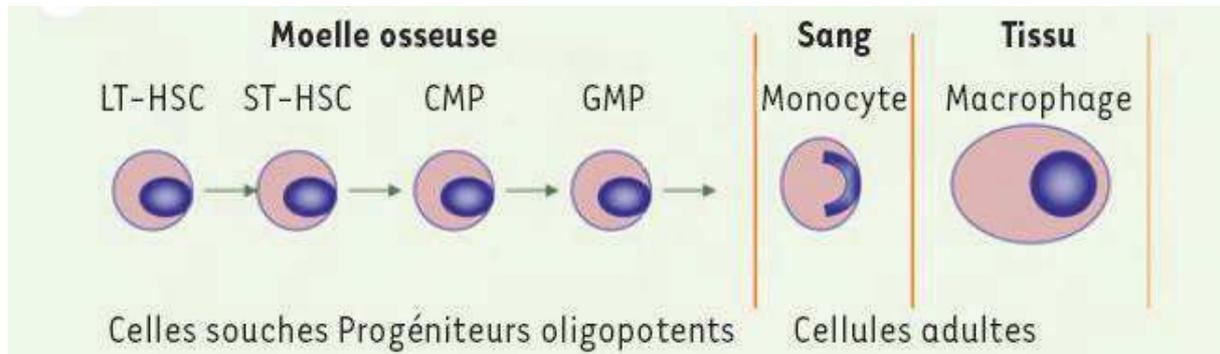


Figure 27 : Origine et différenciation des macrophages (d'après Vignery, 2005)

3.1.6.2. LES MACROPHAGES PULMONAIRES

Au niveau du poumon, les macrophages sont classés en deux catégories : les macrophages alvéolaires (MA) et les macrophages interstitiels (MI). Les macrophages alvéolaires résident sur la surface épithéliale des poumons et contrairement aux autres macrophages résidents, ils sont directement au contact de l'environnement (allergènes, bactéries...). Les macrophages alvéolaires proviennent des monocytes embryonnaires qui ont colonisé le poumon peu de temps après la naissance et se sont différenciés en macrophages alvéolaires (Guilliams *et al.*, 2013). Les macrophages alvéolaires sont indépendants des monocytes sanguins, cependant en cas de dommage ou d'altération des macrophages résidents, ce sont les monocytes du sang qui seront recrutés pour devenir la source dominante de nouveaux macrophages afin de repeupler les macrophages alvéolaires (Hashimoto *et al.*, 2013). Dans le cas de l'asthme chez l'Homme, suite à l'exposition à un allergène, il y a un recrutement rapide des monocytes et une augmentation des macrophages alvéolaires dérivés de monocytes (Mo-AMs) qui vont favoriser la réponse inflammatoire aiguë tandis que les macrophages alvéolaires résidents dans le tissu (TR-AMs) prolifèrent localement et ont tendance à supprimer l'inflammation (Draijer & Peters-Golden, 2017 ; Lee *et al.*, 2015 ; Zaslona *et al.*, 2014). Il est donc suggéré que ces Mo-AMs favorisent la réponse pro-inflammatoire et la restitution de l'homéostasie (Figure 28).

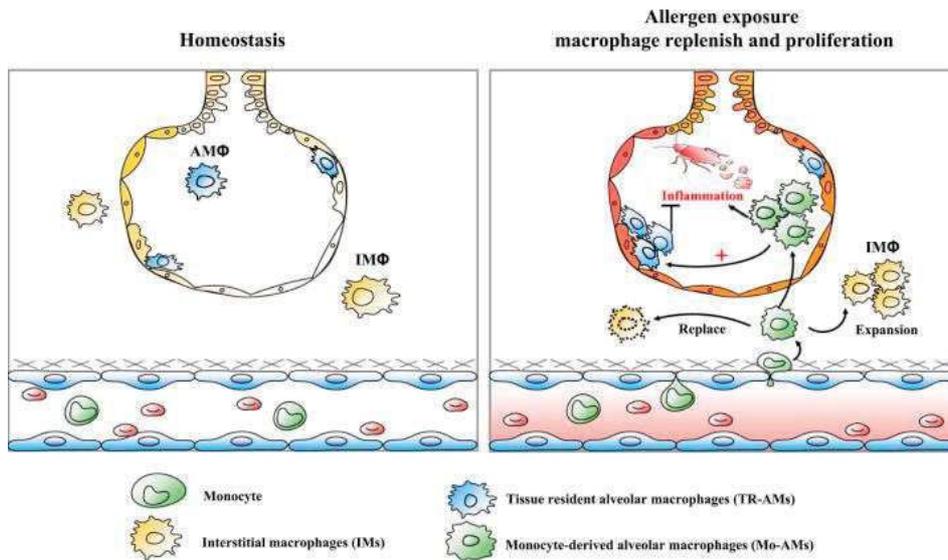


Figure 28 : Schéma d'action des différents sous types de macrophages à un allergène (d'après Saradna *et al.*, 2018)

3.1.6.3. L'ACTIVATION DES MACROPHAGES

La reconnaissance des pathogènes par les macrophages est dépendante de leur expression et des récepteurs intracellulaires incluant les « Toll like receptors » (TLRs). Les récepteurs vont permettre de distinguer le « non soi » inconnu aux cellules de l'hôte notamment nommées « Pathogen-Associated Molecular Patterns » (PAMPs). Le LPS est le PAMP le mieux caractérisé. Il est détecté par les TLR4, son co-récepteur CD14 et le co-récepteur membranaire (MD-2). L'activation du TLR4 induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires mais également celle d'interférons de type I. C'est le seul TLR qui est capable d'utiliser les 2 voies de signalisation, MyD88 et « TIR-Domain-Containing Adapter-Inducing Interferon- β » (TRIF) dépendantes (Figure 29).

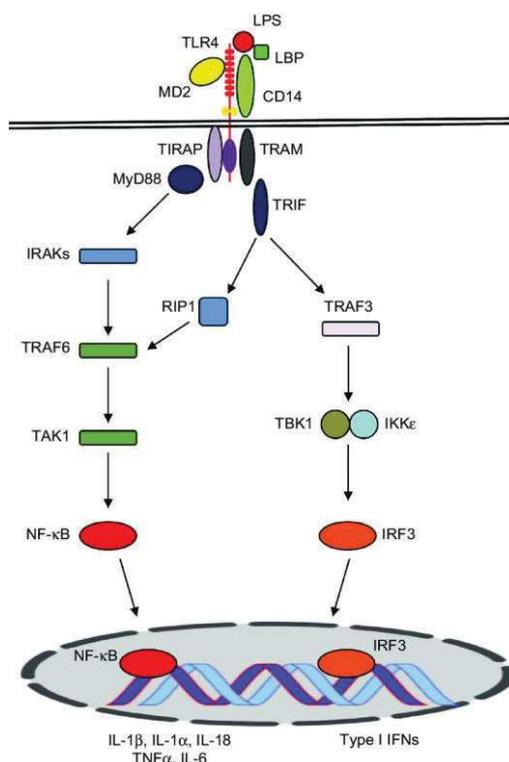


Figure 29 : Représentation schématique de la réponse à l'activation de la voie de signalisation TLR4 (d'après Diamond et *al.*, 2015).

En réponse, à la reconnaissance d'un PAMP, les macrophages avec d'autres cellules initient une cascade de signalisation complexe menant à la sécrétion de nombreux effecteurs moléculaires permettant le recrutement et l'activation d'autres cellules d'inflammatoires (Akira & Sato, 2003 ; Hume, 2008). Ce type d'activation des macrophages *via* les TLRs et les cytokines telles que l'interféron (IFN)- γ est la plus décrite dans la bibliographie.

3.1.6.4. LA POLARISATION DES MACROPHAGES

La polarisation des macrophages est définie comme un processus dynamique selon lequel les macrophages expriment différents phénotypes fonctionnels en réponse aux différents signaux présents dans leur environnement (Murray, 2017). Il semblerait que l'exposition aux allergènes active les cellules épithéliales et les cellules immunitaires du poumon pour produire des cytokines qui vont, d'une part recruter les monocytes circulant dans le sang vers le poumon, mais aussi polariser les macrophages primaires en différents sous types ayant des rôles différents dans l'asthme (Saradna et *al.*, 2017).

Les LPS, IFN- γ et le GM-CSF sont les stimulants potentiels pour la polarisation des macrophages vers le phénotype M1 induisant la sécrétion de grandes quantités de cytokines

telles que l'IL-1 β , le TNF- α , l'IL-12, l'IL-18 et l'IL-23. Cela favorise la réponse inflammatoire de type Th1 et Th17. Les macrophages M1 ont aussi un rôle d'activation de l'oxyde nitrique synthétase permettant la production d'oxyde nitrique chez les murins mais non produit par les macrophages humains et équins (Karagianni et *al.*, 2013 ; Young et *al.*, 2018). Les macrophages équins stimulés avec du LPS semblent métaboliser du tryptophane faisant intervenir une autre voie de signalisation que celle utilisée par les macrophages murins (Young et *al.*, 2018). Pourtant Hammond et *al.*, (1999) ont rapporté une augmentation de l'expression génique de l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS) dans les macrophages alvéolaires équins stimulés au LPS et ont suggéré que cette enzyme pourrait donc être une cible thérapeutique (Hammond et *al.*, 1999).

L'activation du phénotype M2 est induit par les moisissures, les complexes immuns, l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10 et le « Transforming Growth Factor- β » (TGF)- β . Une étude réalisée par Robbe et *al.*, 2015, a permis d'identifier la polarisation des macrophages chez deux modèles murins soumis à deux stimuli différents : d'une part des « poussières domestiques » reconnues pour induire une allergie et d'autre part des poussières provenant de fermes agricoles non allergisantes. Les résultats ont montré que le modèle « fermes agricoles » favorise la polarisation en M1 avec une augmentation de l'expression des cytokines de la voie Th1 et Th17 tandis que le modèle « poussières domestiques » favorise une polarisation M2 avec une réponse de type Th2 prédominante. Cela suggère la possibilité que les macrophages M1 soient les effecteurs majeurs de l'asthme non-allergique tandis que les M2 prédominent dans le cas de l'asthme allergique. Ainsi, la classification M1/M2 représente un guide utile pour l'étude des macrophages *in vitro* (Figure 30).

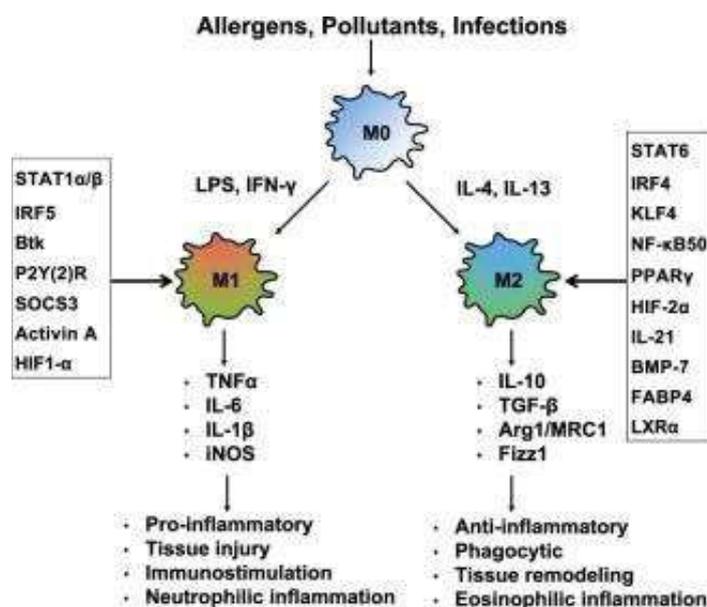


Figure 30 : Diagramme schématisé de l'activation des macrophages en fonction des molécules impliquées dans la polarisation M1/M2 des macrophages (d'après Saradna et *al.*, 2018)

Cependant les macrophages placés en culture sont différents de ceux rencontrés *in vivo* et ne traduisent pas l'existence d'un stade intermédiaire des macrophages. Récemment Jiang & Zhu (2016) ont choisi de nommer les macrophages en fonction des stimuli qui les ont activés (exemple, M(IL-4) et M(LPS)) ou selon les marqueurs exprimés à leurs surfaces (Tableau 3).

Tableau 3 : Marqueurs des macrophages (d'après Odemuyiwa 2012)

		M1	M2
Récepteurs	CD163 CD206	+ +	++++ ++++
Présentation antigénique	CD80 ; CD86 ; CMH II	++++	+
Chimiokines Cytokines	CCL17, TIE-2 IFN- γ ; TNF ; IL-12 ; IL-1 ; IL-4 ; TGF- β ; IL-10 ; IL-13	++++ +	++ + ++++
Enzymes métaboliques	Arginase Inducible nitric oxide synthetase (iNOS)	- ++++	++++ -

Avec CCL17 : Chemokine (C-C motif) Ligand 17 et TIE-2: Tyrosine Kinase with immunoglobulin.

De plus, les mécanismes épigénétiques ont aussi un rôle important sur l'activation et la polarisation des MA en réponse à un signal (Zhou et *al.*, 2017). Plusieurs études ont montré que certains miRNA (miR-155 ; miR-146 ; Let-7c ; miR-21 et miR511-3p) sont capables de

contrôler la polarisation des MA en régulant différents facteurs de transcription. Ils déstabilisent les ARNm et leur traduction modifiant ainsi l'expression des gènes et la fonction cellulaire (Lawrence & Natoli, 2011; Yoon et *al.*, 2011). L'action de la méthyl transférase modifie la transcription régulant ainsi l'expression génique de certaines cytokines comme l'IL-4 et l'IFN- γ . Chez l'homme, il a été montré une association entre l'effet de la méthylation de l'ADN sur quelques gènes avec le phénotype de l'asthme (Breton et *al.*, 2011). La DNA Methyltransférase-3 (DNMT-3) est la seule connue pour son rôle dans la différenciation en M2 (Kittan et *al.*, 2013). La DNMT3B méthyle aussi le promoteur du facteur de transcription Ppary qui est inhibé par une stimulation à l'IL-4 (Yang et *al.*, 2013). Mais le potentiel effet contradictoire du DNMT3B dans la polarisation M2 des macrophages (Yang et *al.*, 2013) justifie la mise en place d'investigations complémentaires.

3.1.6.5. LES MACROPHAGES ALVEOLAIRES DANS LA REGULATION DE L'ASTHME

Les macrophages sont les cellules immunitaires les plus représentées dans le poumon. Ils sont classés en deux catégories les macrophages alvéolaires (MA) et les macrophages interstitiels (MI), distincts phénotypiquement et localisés dans l'interstitium pulmonaire. Ainsi seuls les macrophages alvéolaires (MA) sont accessibles par un LBA (Denys, 2011). Les macrophages interstitiels semblent intéressants à étudier (Liegeois et *al.*, 2018) mais les obstacles techniques à leur récupération font qu'à ce jour seuls les MA ont été étudiés dans le cadre de l'AES. Lorsque le système immunitaire détecte un corps étranger au niveau d'un tissu, les macrophages se dirigent vers le tissu fragilisé. Les bactéries reconnues par les récepteurs des protéines du complément, sont internalisées dans une vésicule qui fusionnera avec le lysosome pour former un phagolysosome (Mandal, 2014). Le phagolysosome a un pH acide et contient des enzymes lytiques et des dérivés oxygénés. En effet, en induisant l'expression d'iNOS « Induced Nitric Oxyde Synthase », les antigènes favorisent la réponse oxydative des macrophages et conduisent à leur élimination par digestion enzymatique et l'élimination des éléments phagocytés.

De plus, une autre forme de digestion des particules solubles existe, il s'agit de la macropinocytose. Pour les macrophages, le mode d'internalisation d'un antigène soluble semble être décisif afin de déterminer la classe du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) par laquelle il sera présenté (Peppelenbosch et *al.*, 2000) : les antigènes des complexes immuns sont captés par endocytose grâce à des récepteurs et présentés par le CMH de classe II

tandis que les antigènes solubles libres sont captés par endocytose fluide et présentés par le CMH de classe I.

Les MA produisent de nombreuses cytokines correspondant aux différentes voies de signalisation et ayant une multitude de fonctions. Chez les sujets sains humains, les MA produisent plutôt un profil de cytokines Th1 parmi lesquelles se retrouvent l'IL-12, l'IL-23, l'IL-15 et l'IFN- γ (Kelley, 1990). Chez l'Homme et le cheval asthmatiques, les cytokines de types Th2 et pro-inflammatoires sont davantage produites par les macrophages alvéolaires (Kelley, 1990 ; Bowles *et al.*, 2002).

Chez l'Homme, la production de cytokines pro-inflammatoires peut contribuer à l'exacerbation de l'asthme chez la personne atteinte. En plus d'induire la sécrétion de mucus et la libération de cytokines de type Th2, l'IL-1 β induit une forte prolifération des cellules Th2 (Jarjour & Calhoun., 1994). Concernant l'IL-6, son rôle dans l'asthme n'a pas été bien défini mais il semblerait qu'elle soit associée à la production d'IgE dépendante de l'IL-4. Cependant, l'association entre l'IL-4 et l'AES n'est pas actée chez le cheval. Une seule étude a montré une augmentation d'IgE dans le sang des chevaux AES en présence de moisissures (Derksen *et al.*, 1985).

Le TNF- α , tout comme l'IL-1 β favorise l'adhésion des neutrophiles à l'épithélium favorisant ainsi les dommages tissulaires causés par ces derniers. De plus, il a été démontré que les espèces réactives d'oxygène « Reactive Oxygen Species » (ROS) sont produites en plus grands nombres par les macrophages d'individus asthmatiques que par ceux des individus sains (Jarjour & Calhoun., 1994). Les ROS sont de puissants modulateurs de la production de cytokines et de chimiokines. Ils jouent un rôle essentiel dans l'activation du facteur de transcription NF- κ B, un médiateur de la réponse inflammatoire grandement impliqué dans l'asthme.

Malgré leurs fonctions évidentes dans le maintien de l'homéostasie pulmonaire, dans le processus inflammatoire et dans la sécrétion de plusieurs médiateurs impliqués dans la pathogenèse de l'asthme, le rôle des MA dans l'asthme est controversé. Des études réalisées sur différentes espèces de rats suggèrent que les MA ont une action suppressive sur l'asthme allergique puisqu'ils inhibent l'hyperréactivité bronchique (Careau & Bissonnette, 2004). Chez le cheval, la plupart des investigations sur les MA ont été menées *in vivo*, ainsi les mécanismes *in vitro* sont mal connus. Les macrophages issus du LBA de chevaux atteints d'AES présentent un état d'activation plus élevé que ceux des chevaux contrôles. Ces macrophages sont généralement plus cytotoxiques et libèrent un nombre plus élevé de substances et de cytokines

pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β ; l'IL-8 ; la « Macrophage Inflammatory Protein 2 » (MIP-2), qui sont de puissants chimio-attracteurs pour les neutrophiles (Joubert et *al.*, 2011). L'exposition des MA équin à des suspensions de poussières de foin (HDS) et à des moisissures telle que l'*Aspergillus fumigatus* résulte en une production importante de TNF- α et d'IL-1 β (Laan et *al.*, 2006) suggérant que le phénotype M1 pourrait jouer un rôle prédominant. De plus, la sécrétion des médiateurs, lipidiques et protéiques ainsi que des cytokines par les MA précède l'infiltration du tissu par les neutrophiles suite à l'exposition des chevaux contrôles et atteint d'AES à du foin moisi (Franchini et *al.* 1998). Dans une étude similaire, les MA provenant de chevaux atteints d'AES sécrètent une grande quantité de TNF- α , IL-1 β et IL-8 comparée aux chevaux CTL chez qui la concentration en IL-6 est plus élevée justifiant encore la prédominance du phénotype M1 chez les chevaux AES (Laan et *al.*, 2006 ; Suarez et *al.*, 2008). Tang et *al.*, (2001) ont notamment montré qu'une déplétion en MA conduit à une réponse Th2 dans les voies respiratoires, inversée par le transfert d'AM activé par de l'IFN- γ . Ces études suggèrent que comme dans le cas de l'asthme chez l'homme, il y a un dysfonctionnement des mécanismes de tolérance des allergènes environnementaux. Cependant contrairement à l'asthme chez l'homme et les murins, les macrophages alvéolaires de chevaux AES semblent exprimer les enzymes capables d'attaquer les constituants essentiels des parois fongiques telle que la chitinase en faible quantité. Il semblerait que la régulation de la tolérance aux allergènes diffère entre l'Homme et le cheval (Reid et *al.*, 2009).

3.1.6.6. INTERROGATIONS ET POTENTIELLES APPLICATIONS THERAPEUTIQUES

Les travaux de Careau & Bissonnette (2004) ont été les premiers à suggérer le rôle important des MA dans l'asthme. Des chercheurs ont investigué les actions suppressives des MA par l'élaboration de molécules solubles ou par des mécanismes nécessitant un contact cellule-cellule ou une interaction. La déplétion des MA chez deux types de rats a montré que chez le rat Sprague Dawley (semblable à un sujet sain) l'hyperréactivité bronchique augmente après une exposition à l'allergène tandis qu'il n'y a aucun effet pour le rat Brown Norway. Ainsi Careau & Bissonnette (2004), ont montré qu'en transférant les cellules du rat Brown Norway vers le rat Sprague Dawley, il n'y avait pas d'effet sur l'hyperréactivité bronchique. Par contre, si le transfert se fait du rat Sprague Dawley vers le rat Brown Norway, une diminution significative de l'hyperréactivité bronchique est observée. Cela suggère que les macrophages résistants confèrent un rôle de protection en ayant un rôle de suppression de l'inflammation. De plus, Zaslona et *al.*, (2014) et Lee et *al.*, (2015) ont montré qu'immédiatement après

l'exposition à l'allergène, les macrophages peuvent provenir du recrutement des monocytes sanguins, ce qui provoque une réaction pro-inflammatoire chez la souris. Ainsi les résultats suggèrent que les macrophages alvéolaires résidents servent à maintenir l'homéostasie dans le poumon en supprimant l'inflammation tandis que les monocytes migrants vers les voies respiratoires favorisent l'inflammation (Holt et *al.*, 1993 ; Lee et *al.*, 2015 ; Westphalen et *al.*, 2014 ; Zaslona et *al.*, 2014). Dans le cas où ces macrophages dérivés des monocytes sanguins seraient effectivement pathogéniques, le fait de stopper leur recrutement permettrait d'améliorer la réponse inflammatoire. Cela nécessite cependant des investigations plus poussées. La communication entre les macrophages résidents et les monocytes sanguins reste à investiguer. De plus, les macrophages sécrètent des molécules solubles ayant un rôle anti-inflammatoire. Cependant les connaissances sont limitées concernant leur mode d'action. Les travaux effectués sur les rats montrent des différences de sensibilité suivant les races, en est-il de même pour les macrophages équins ou humains ? Plusieurs pistes thérapeutiques liées à l'utilisation des macrophages sont possibles mais leur mise en place dépend aussi fortement des réponses aux nombreuses questions restantes. Une étude récente a étudié l'effet *in vitro* des dérivés de cellules mésenchymateuses amniotiques, sur la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires, par les macrophages alvéolaires équins après stimulation au LPS (Zucca et *al.*, 2016). Il a été montré que les cellules mésenchymateuses seules et leur combinaison avec les microvésicules avaient un effet inhibiteur sur la libération de TNF- α en présence de LPS. De plus, les cellules mésenchymateuses et les microvésicules agissent en interférant avec la réponse cellulaire au TGF- β en prévention de son effet pro-inflammatoire (Zucca et *al.*, 2016). Ainsi cette première étude supporte le rôle potentiel des dérivés de cellules souches dans la régénération pulmonaire, notamment dans les allergies respiratoires. D'autres investigations doivent être menées afin d'évaluer leur application dans le cas de l'AES.

4. La réponse systémique

Si l'asthme est une maladie affectant les voies respiratoires, l'activation des leucocytes du sang (Lavoie-Lamoureux et *al.*, 2010) et une augmentation de la concentration des médiateurs inflammatoires circulants (Kirschvink et *al.* 2002 ; Lavoie-Lamoureux et *al.*, 2010) ont été observés chez les chevaux atteints d'AES lors de l'exacerbation de la maladie. Cela suggère que le processus inflammatoire ne se concentre pas seulement au niveau pulmonaire.

La réponse systémique est évaluée par l'étude des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC). Les PBMC constituent un mélange de plusieurs types cellulaires circulant dans le

sang (neutrophiles, monocytes, lymphocytes...). Elles regroupent des cellules intervenant à la fois dans la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire acquise. Les PBMC reflètent le statut immunitaire de l'animal (Crowther et al., 1969) et sont souvent utilisées dans l'étude de la réponse immunitaire systémique (Lanz et al., 2013 ; Pacholewska et al., 2015).

La réponse des PBMC suite à l'exposition à du LPS a été souvent étudiée et relativement bien caractérisée chez les mammifères. Chez le cheval, quelques études seulement ont étudié l'effet du LPS sur la réponse inflammatoire systémique de chevaux atteints d'AES et de chevaux contrôles. Cela a permis de caractériser les médiateurs intervenant dans la réponse immunitaire tels que l'IL-5, l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10 et l'IFN- γ (Böttcher et al., 2003 ; Devos et al., 2006 ; Dolecek et al., 1995 ; Lagging et al., 1998 ; Moverare et al., 1998). En 2013, Lanz et al., ont stimulé des PBMC de chevaux AES et CTL avec des extraits de poussière de foin, du LPS et des extraits d'*Aspergillus fumigatus*. Ils ont montré que les expressions géniques de l'IL-4 et de son récepteur IL-4R étaient augmentées significativement chez les chevaux AES comparativement aux chevaux CTL, après stimulation avec les extraits de poussières de foin. De plus, ils ont montré que l'expression des ARNm de l'IL-10 était augmentée chez les chevaux AES comparativement aux chevaux CTL (Lanz et al., 2013). En revanche, Lavoie-Lamoureux, 2012 n'ont pas détecté de différence significative des concentrations des cytokines IL-10 et IFN- γ dans le sang entre les chevaux AES et CTL soumis à un challenge naturel d'exposition à du foin et de la paille. Les cytokines IL-2, IL-4, et IFN- α n'ont pas été détectés dans le sang par technique ELISA (Lavoie-Lamoureux, 2012). Enfin, Hansen et al., (2014) ont comparé les réponses pro-inflammatoires systémique et locale chez les chevaux AES et CTL, après stimulation au LPS et au peptidoglycane. Une différence d'expression génique a été observée entre les deux compartiments. Les expressions géniques de l'IL-1 β et du TNF- α étaient significativement augmentées dans le LBA comparées aux PBMC quelle que soit la stimulation. En revanche les expressions géniques de l'IL-6 et du TLR-4 étaient significativement plus élevées dans les PBMC comparée au LBA. L'expression de l'ARNm de l'IL-8 n'était pas modifiée quel que soit le compartiment (Hansen et al., 2014). La réponse immunitaire en réponse à un stimulus semble être différente entre l'espace pulmonaire et l'espace sanguin. La réponse systémique pourrait aussi être la conséquence du remodelage pulmonaire observé dans l'asthme comme l'avait suggéré Leclere et al., (2011a).

V. Traitements de l'asthme équin sévère

1. Thérapie médicamenteuse

Afin de traiter et de soulager les chevaux AES, la solution la plus courante est l'utilisation des anti-inflammatoires et des bronchodilatateurs.

1.1. Anti-inflammatoires

Les corticostéroïdes sont les anti-inflammatoires les plus performants pour le traitement symptomatique de l'asthme quelles que soient leurs voies d'administration. Ils agissent en diminuant la contraction du muscle lisse des voies respiratoires par inhibition de l'action des cellules inflammatoires et de leurs médiateurs, en potentialisant l'action broncho-dilatatrice des catécholamines, et en réduisant la production de mucus (Muñoz-Diaz, 2010).

Plusieurs modes d'administration se sont révélés efficaces dans le traitement de l'AES, notamment la voie systémique et la voie locale par nébulisation (Cesarini et *al.*, 2006). Parmi les corticostéroïdes les plus fréquemment utilisés, la dexaméthasone est injectée par voie intraveineuse ou par voie intramusculaire à des concentrations allant de 0.004 à 0.1 mg/kg tous les jours pendant deux semaines (Cornelisse et *al.*, 2004 ; Deluca et *al.*, 2008).

En cours de rémission, les doses sont progressivement diminuées. Les corticostéroïdes ayant des effets indésirables, l'administration prolongée est à éviter. Néanmoins, en l'absence de modifications efficaces de l'environnement, les signes respiratoires réapparaissent rapidement dès l'arrêt du traitement anti-inflammatoire. Un autre corticostéroïde, la prednisolone, est de plus en plus utilisée depuis les études menées par Peroni et *al.*, (2002). Elle est souvent prescrite comme traitement pour les chevaux asthmatiques, malgré le manque de données démontrant son efficacité (Leclere et *al.*, 2010 ; Leguillette, 2003). Chez les chevaux asthmatiques, une première étude a comparé l'administration orale de prednisolone à l'administration intramusculaire de dexaméthasone sur une période de 12 jours avec des changements d'environnement (Couroucé-Malblanc et *al.*, 2008). Les résultats ont montré que les deux traitements ont un effet bénéfique sur les scores cliniques. De plus, Leclere et *al.*, (2010) ont montré que la prednisolone et la dexaméthasone amélioraient la fonction pulmonaire des chevaux asthmatiques malgré une exposition continue aux antigènes. Pour une même efficacité,

la dose de prednisolone à administrer est 4 fois supérieure à la dose de dexaméthasone (2 mg/kg contre 0,05 mg/kg).

La triamcinolone (acétonide) est un corticoïde puissant qui améliore la fonction respiratoire des chevaux asthmatiques pendant 5 semaines après une injection intramusculaire à 20-40 mg/ 500 kg, même chez les cas sévèrement atteints (Picandet et *al.*, 2003). Cependant, l'usage de la triamcinolone n'est pas recommandé en routine pour le traitement de l'AES chez le cheval à cause de ses effets secondaires systémiques.

1.2. Les bronchodilatateurs

Le bronchospasme est un des éléments clé de l'AES d'où l'intérêt d'utiliser des bronchodilatateurs. Cependant, il faut souligner que le bronchospasme est secondaire à l'inflammation et donc que l'utilisation seule des bronchodilatateurs est à éviter. Enfin, une utilisation de longue durée sans changement environnemental est contre-indiquée (Ivester et *al.*, 2014). En effet, cela augmenterait la quantité d'allergènes atteignant les voies respiratoires profondes. L'association de ces derniers à un changement environnemental et/ou à un traitement à base de corticostéroïdes est indispensable. Leur action rapide s'avère donc utile lors de crise aiguë de pousse. En revanche, cette action est de courte durée, ce qui engendre une fréquence d'administration élevée (4 à 12 fois par jour) et représente un inconvénient majeur sur le terrain (Leguillette, 2003 ; Picandet et *al.*, 2003). Les deux classes de molécules utilisables sont énumérées dans le Tableau 4.

Les bronchodilatateurs les plus utilisés sont les agonistes β -2 adrénergiques. Ces derniers activent les adrénorécepteurs fixés sur le muscle lisse des voies respiratoires (Figure 31) entraînant une augmentation de la production d'« Adénosine Monophosphate Cyclique » (AMPC), responsable de la bronchorelaxation. La deuxième classe de bronchodilatateurs est celle des anticholinergiques. Ces molécules empêchent la fixation de l'acétylcholine sur les récepteurs muscariniques. Ils inhibent donc la bronchoconstriction induite par le système parasympathique (Leguillette, 2003). Enfin, même si le système autonome est le principal régulateur de la contraction du muscle lisse des voies respiratoires, l'absence de réponse aux bronchodilatateurs de certains chevaux atteints d'asthme pourrait s'expliquer par une altération du système non-adrénergique non-cholinergique (Leguillette, 2003).

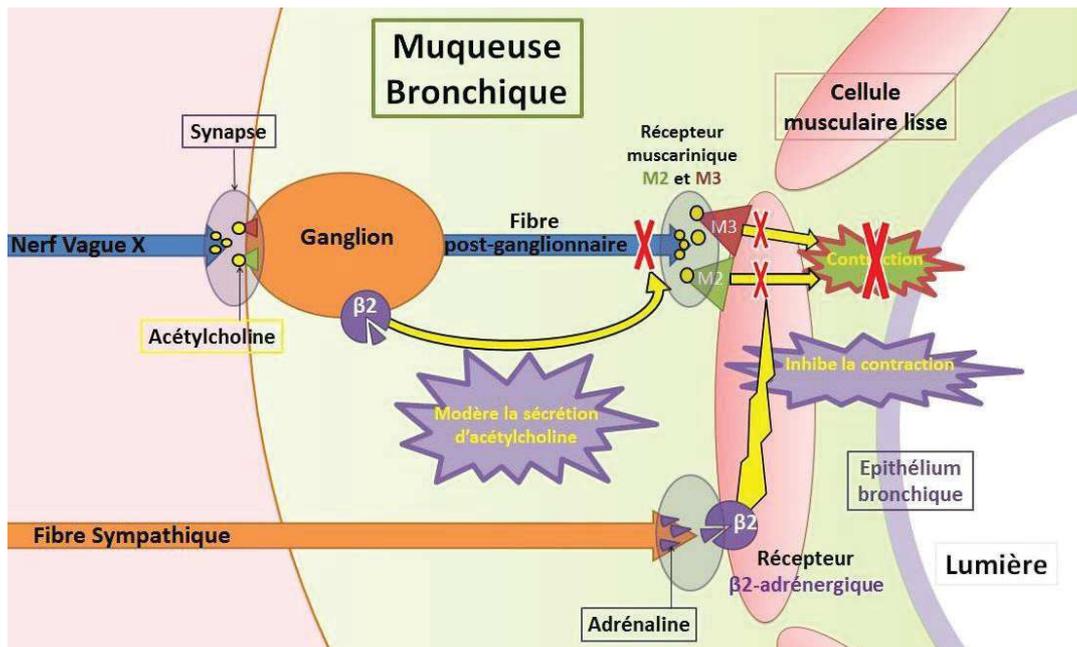


Figure 31 : Représentation schématique du mode d'action des bronchodilatateurs (d'après www.tout-sur-l-asthme.blogspot.com)

Tableau 4 : Liste et utilisation des bronchodilatateurs pour le traitement de l'AES (adapté de Laan *et al.*, 2006; Lavoie, 2007)

Molécule	Dosage	Effets thérapeutiques	Inconvénients
<i>Agonistes β-2 adrénergiques</i>			
Clenbuterol	PO: 0,8-3,2 µg/kg/12h IV: 0,8 µg/kg/12h	Bronchodilatation Favorise le transport muco-ciliaire	A fortes doses: Tachycardie, sudation, ileus gastro-intestinal, coliques...
Sulfate de Terbutaline	Inhalation: 0,02 mg/kg dans 4 ml de serum physiologique	Bronchodilatation (<4h)	
Fenoterol Albuterol Pirbuterol Salmeterol Clenbuterol	Inhalation	Bronchodilatation	Courte durée d'action (<1h) sauf pirbuterol et salmétérol
<i>Anticholinergiques</i>			
Atropine	IV: 0,01-0,02 mg/kg	Bronchodilatation rapide	Effet systémiques: tachycardie, iléus gastro-intestinal, coliques, augmentation de la viscosité des sécrétions respiratoires,... Courte durée d'action (<2h)

1.3. Les médecines alternatives

Un intérêt grandissant est actuellement porté aux médecines alternatives pour le traitement des maladies équines malgré le peu d'information disponible quant à leur efficacité et leur toxicité potentielle.

Une étude a notamment testée des traitements à base d'extraits de thym (*Thymus vulgaris*) et de primevère (*Primula veris*) administrés par voie orale chez des chevaux atteints d'AES. Les résultats ont montré une amélioration des paramètres mécaniques (compliance dynamique et résistance pulmonaire) après un mois de traitement mais aucun effet n'a été observé sur les signes cliniques, la pression partielle de l'oxygène (PaO₂) et la neutrophilie pulmonaire (Van den Hoven et *al.*, 2003).

Une autre étude menée par Khol-Parisini et *al.*, (2007) a montré que l'administration d'huile de tournesol et d'huile de grasse de phoque pourrait jouer un rôle sur l'inflammation pulmonaire des chevaux asthmatiques en modifiant les ratios d'acides gras dans le plasma et les phospholipides membranaires des leucocytes. Enfin, une étude a montré qu'apporter un supplément en omega 3 à la ration, combiné à un environnement pauvre en poussières permet d'améliorer les signes cliniques et de diminuer l'inflammation neutrophilique chez les chevaux asthmatiques (Nogradi, 2015). Des études additionnelles sont là encore nécessaires pour évaluer leurs effets sur les médiateurs de l'inflammation et leurs potentielles conséquences cliniques sur les animaux symptomatiques.

2. Gestion de l'environnement du cheval

2.1. Diminuer la concentration en poussière issue du foin

La réduction de l'exposition aux poussières est la clé du traitement des chevaux atteints d'AES. Une bonne corrélation est observée entre la sévérité et la rémission de la maladie selon les conditions d'environnement dans lesquelles les chevaux sont gardés (Davis & Rush, 2002). Il a été montré que placer les chevaux souffrant d'AES au pâturage afin de réduire le contact au foin et à la litière permet une rémission clinique après quelques semaines (McPherson et *al.*, 1978; Vandenput et *al.*, 1998).

Au quotidien, la mise au pâturage n'est pas toujours possible. Ainsi des solutions existent notamment pour diminuer la teneur en poussières contenues dans le foin. Tout d'abord, le trempage du foin permet de réduire significativement la quantité de poussières respirables (Moore-Colyer et *al.*, 2016). Cependant il a aussi été montré que tremper le foin augmente la

quantité de bactéries de 2 à 5 fois et diminue la teneur en minéraux du foin et sa valeur nutritive (Moore-Colyer *et al.*, 2016 ; Ainsworth *et al.*, 2007).

Une autre alternative est l'utilisation d'un purificateur de foin « à la vapeur ». Des études ont permis de mettre en évidence l'efficacité du processus dans l'élimination des particules inhalables et respirables (Moore-Colyer *et al.*, 2016 ; Stockdale & Moore-Colyer, 2010). De plus, soumettre du foin pendant 50 minutes à la vapeur permet de diminuer de 86% le pourcentage de levures, et d'éléments fongiques. La valeur nutritive du foin reste inchangée, seule la teneur en sucres solubles diminue légèrement (Moore-Colyer *et al.*, 2014). Des études microbiologiques effectuées sur 5 bottes de foin ont montré que le foin « à la vapeur » permet de réduire la teneur en bactéries de 99.08 % (38 000 UFC/g dans le foin sec et 4000 UFC/g dans le foin « à la vapeur ») et la teneur en moisissures de 100% (Moore-Colyer, 1996). La teneur en particules respirables est aussi diminuée de 94 % passant de 25 699 à 1 586 particules/kg de foin/litre d'air (Stockdale & Moore-Colyer, 2010).

Enfin, donner de l'enrubanné, de l'ensilage ou des pellets de foin permet de diminuer l'exposition aux particules respirables (Clements & Pirie, 2007 ; McGorum *et al.*, 1998; Vandenput *et al.*, 1997; Woods *et al.*, 1993). Des seuils d'expositions aux particules respirables existent chez l'Homme mais les unités utilisées étant différentes, il est difficile de les extrapoler au cheval.

2.2. Diminuer la poussière au sein de l'écurie

Le simple fait d'exposer des chevaux atteints d'AES 90 min à des poussières de l'environnement engendre une augmentation significative de la résistance pulmonaire chez ces chevaux (McGorum *et al.*, 1993b). Ainsi, une autre étape essentielle est de soustraire les chevaux atteints d'AES à toute activité engendrant de la poussière dans l'écurie comme la distribution de fourrages, le nettoyage de l'écurie ou le curage des box. L'arrosage du sol avant le nettoyage permet également de diminuer les poussières dans l'écurie. La figure 32 présente les teneurs en particules suivant le type d'hébergement et les activités.

La qualité de l'air influence la santé respiratoire du cheval, la ventilation de l'écurie est donc importante. Webster *et al.*, (1987) ont étudié l'efficacité de la ventilation dans des box individuels et dans des écuries. Ils ont constaté que la ventilation était satisfaisante dans les box individuels mais pas dans les écuries. De plus, une autre étude a comparé une écurie avec un taux de ventilation élevé (27 renouvellements d'air par heure) et une autre avec un taux de

ventilation faible (5 renouvellements d'air par heure) combiné à de la litière de papier ou de paille. Il a été montré que la quantité de poussières en suspension dans l'air générée durant l'entretien des box est plus rapidement évacuée avec un taux de ventilation accru. De plus la teneur en ammoniac est plus élevée dans les écuries ayant un faible taux de renouvellement d'air (Curtis, 1996).

Une autre équipe a montré que l'installation d'une ventilation mécanique dans les écuries permet d'améliorer la qualité de l'air (Wålinder et al., 2011). Le système a été placé au centre d'une écurie de 24 chevaux. Cette étude a montré que ce système permet un meilleur taux de renouvellement de l'air avec une diminution du niveau de CO₂ de 950 ppm à 510 ppm. Les teneurs en ammoniac, en particules < 10 µm et en allergènes diminuent significativement avec la ventilation mécanique. Les paramètres cliniques des chevaux sont eux aussi améliorés grâce à ce système (Wålinder et al., 2011). Une récente étude s'est intéressée à l'effet de l'ionisation de la litière et du foin sur la qualité de l'air dans les écuries (Siegers et al., 2018). L'ionisation est connue pour diminuer la teneur en poussière et en bactéries dans les élevages de porc ou de poulet notamment (Alonso et al., 2016; Cambra-López et al., 2009). Cependant l'utilisation de l'ionisation n'a pas d'effet sur la réduction des poussières, des endotoxines et des moisissures au sein des écuries (Siegers et al., 2018).

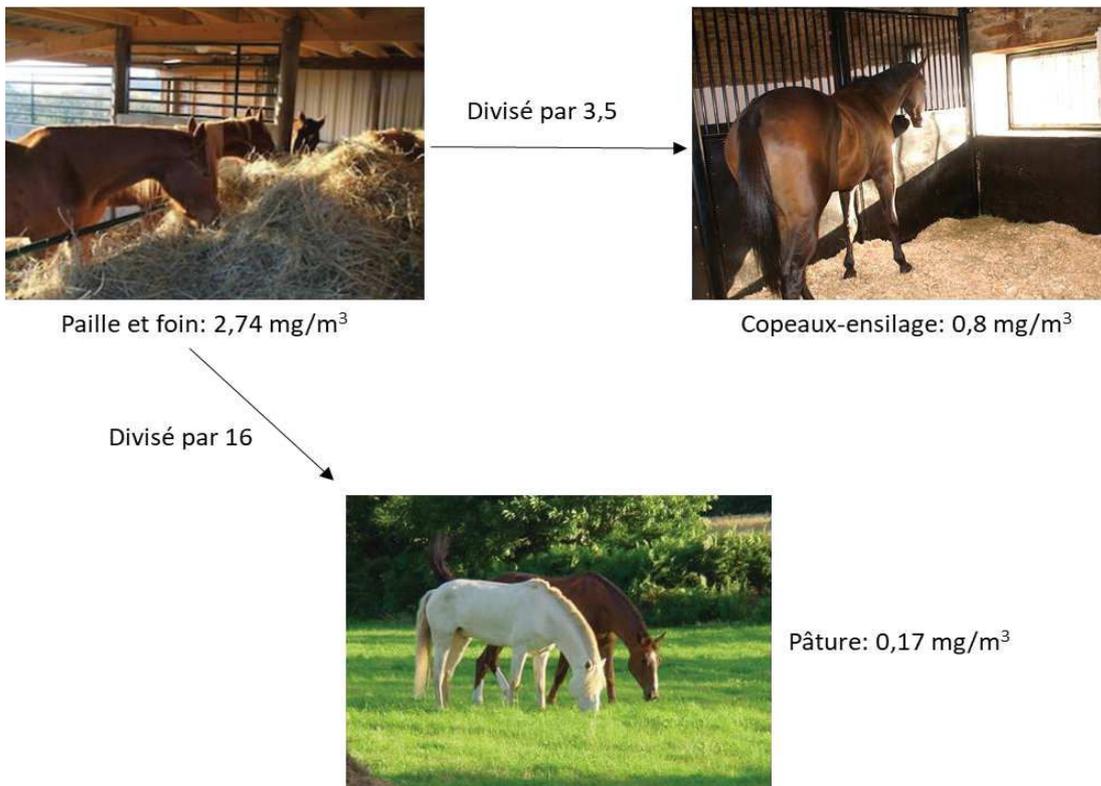
Dans les écuries mal ventilées, un séparateur de particules permet de filtrer l'air afin de purifier l'air ambiant au sein des écuries (Hedelin et al., 2017).

De plus, le taux de particules dans un box est influencé par l'environnement des box voisins (Clements & Pirie, 2007) ; retirer le foin et utiliser des litières faibles en poussières dans les box voisins peut améliorer la qualité de l'air et ainsi améliorer la fonction pulmonaire (Jackson et al., 2000). La disparition des signes cliniques résultant du changement d'environnement peut prendre 3 à 4 semaines (Davis & Rush, 2002 ; Thomson & Mcpherson, 1984). En effet, dans une étude réalisée sur 12 chevaux atteints d'AES maintenus dans une écurie pauvre en poussières (Deluca et al., 2008), l'amélioration clinique est apparue 4 semaines après le changement d'environnement. Cependant, chez 4 des 12 chevaux de l'étude, cette amélioration n'a pas permis le retour à des paramètres pulmonaires physiologiques (Deluca et al., 2008). Une autre étude a montré que lorsque des chevaux asymptomatiques atteints d'AES sont maintenus dans un environnement pauvre en poussières (copeaux et ensilage) durant 6 semaines, les paramètres mécaniques respiratoires (compliance pulmonaire, résistance pulmonaire et oxymétrie) ne diffèrent pas de ceux des chevaux sains ou des chevaux asthmatiques maintenus au pré (Vandenput et al., 1998).

Enfin, même après plusieurs années dans un environnement pauvre en poussières et en l'absence de tout autre signe, les chevaux asthmatiques présentent toujours une altération de l'expiration forcée.

Les différentes études menées montrent que la gestion de l'environnement du cheval n'est pas toujours suffisante, le recours à un traitement thérapeutique complémentaire est souvent nécessaire.

Particules dans l'air dans différentes conditions d'hébergement



Particules dans l'air avec paille et foin



Figure 32 : Concentrations en particules dans l'air suivant les conditions d'hébergement et le lieu de prélèvement (d'après Art & Lekeux, 2004)

VI. Le cheval comme modèle de recherche pour l'Homme

La plupart des découvertes et grandes avancées scientifiques sur l'Homme ont pu être réalisées grâce à l'étude préalable de modèles animaux. Le modèle murin est notamment très étudié et a permis des avancées considérables en médecine humaine. Cependant, les stratégies thérapeutiques issues de ces modèles animaux ne se vérifient pas forcément sur l'Homme notamment dans le cas de l'asthme (Clienti et *al.*, 2011 ; Giembycz & Newton, 2011 ; Nair, 2012).

Ainsi le développement de nouveaux modèles animaux plus proches des maladies de l'Homme en termes de présentation clinique, de diversité génétique, ou de mécanismes immunopathologiques est crucial pour la découverte de nouvelles approches thérapeutiques.

Les animaux domestiques développent spontanément des maladies ayant des similitudes avec celles développées par les Hommes en lien avec leur mode de vie. Les différentes recherches effectuées sur l'obstruction récurrente des voies respiratoires a conduit à identifier des similitudes entre cette dernière et l'asthme humain d'où l'utilisation du terme d'asthme équin mis en place lors du dernier consensus de l'ACVIM (Couëtil et *al.* 2016). Que ce soit chez l'Homme ou le cheval, l'asthme est une maladie hétérogène qui peut se présenter sous différentes formes dépendant du stade de la maladie, des facteurs déclenchants et de sa pathogénie (Bond et *al.*, 2018). Basé sur la définition la plus récente du guide Global Initiative for Asthma GINA (Global Strategy for Asthma Management and Prevention GSAMP, 2014), il semblerait que l'AES observée chez le cheval représente un modèle idéal pour l'étude de l'asthme non allergique et de l'asthme sévère de l'Homme. De plus, en plus de la sous-catégorisation de l'asthme équin sur la base de la gravité, il est évident que les équivalents équins de phénotypes d'asthme humain spécifiques existent, basées sur des caractéristiques cliniques et physiopathologiques communes (Bond et *al.*, 2018)

1. Avantage du modèle équin

Les mécanismes pathologiques de l'AES sont similaires à ceux observés chez l'Homme avec une alternance de périodes de crise et de période de rémission. (Bullone & Lavoie, 2015). De plus, comme les facteurs environnementaux déclencheurs de l'asthme sont connus, les stades de la maladie peuvent être modulés suivant les besoins de la recherche. Le cheval présente

l'intérêt majeur de pouvoir réaliser des études prospectives. Ces investigations permettent l'analyse des mécanismes de l'asthme et l'évolution du remodelage chez les sujets symptomatiques ou asymptomatiques à différents stades de la maladie ce qui est difficile à réaliser chez l'Homme (Gerber *et al.*, 2011; Hotchkiss *et al.*, 2007 ; Laumen *et al.*, 2010; Wasko *et al.*, 2011). Un autre avantage de l'utilisation du cheval comme modèle de l'asthme humain est lié à sa taille. En effet, il est possible d'effectuer un grand nombre de prélèvements de manière répétée et de récolter des quantités importantes de sang, de cellules circulantes et de liquide respiratoire sans altérer la réponse immunitaire de l'animal. Les poumons des chevaux permettent également d'effectuer des biopsies pulmonaires périphériques au moyen de la chirurgie thoracoscopique (Lugo *et al.*, 2002 ; Relave *et al.*, 2008 ; Relave *et al.*, 2010). Il s'agit du seul modèle animal permettant l'étude du remodelage des petites voies aériennes et l'étude de la fonction pulmonaire (Bullone *et al.*, 2014 ; Couëtil *et al.*, 2000 ; Van Erck *et al.*, 2006). L'effet du vieillissement sur les variables immunologiques est souvent négligé dans les études utilisant l'espèce murine, malgré la modification connue des fonctions immunologiques en fonction de l'âge (Busse *et al.*, 2010 ; Lee, 2012). Ainsi la durée de vie des chevaux (environ 30 ans) est un réel atout. En outre, les chevaux ont tendance à développer l'asthme à l'âge adulte, ce qui rappelle l'asthme tardif chez l'Homme, les deux conditions affichant généralement une inflammation pulmonaire neutrophilique et une composante allergique moins prononcée (Brazil *et al.*, 2005 ; Wenzel, 2012). De plus, d'un point de vue génique, de nombreux gènes de la fonction immunitaire sont plus proches entre le cheval et l'Homme qu'entre l'Homme et la souris. Milenkovic *et al.*, (2002) ont identifié 113 segments conservés entre le génome humain et équin. Enfin, la plupart des traitements de l'asthme a été testé chez la souris cependant leur efficacité variait une fois retranscrit chez l'Homme et le cheval (Tableau 5) (Bullone & Lavoie., 2015).

Tableau 5 : Efficacité des différents traitements de l'asthme chez l'Homme, le cheval et les souris (d'après Bullone & Lavoie, 2015).

	Chevaux	Rongeurs	Humains
Agents anti-inflammatoires			
Corticostéroïdes inhalés	+	+	+
Corticostéroïdes systémiques	+	+	+
Antileucotriènes	-	+	(+)*
Cromones	(+)	+	(+)*
Anti-inflammatoires non stéroïdiens	-		-
Bronchodilatateurs			
Agents β -adrénergiques	(+)*	(+)	(+)*
Agents anticholinergiques	(+)*	+	(+)*
Inhibiteurs de Phosphodiesterase (PDE)			
Inhibiteurs de méthylxanthine	(+)*	+	(+)*
Inhibiteurs sélectifs de PDE	-	+	-
Antioxydants	(+)	+	(+)*
Agent expectorant	-	(+)	-
Immuno-modulateurs	?	+	(+)
Antibiotiques			
Macrolides	?	+	(+)*
Thérapie cellulaire			
Cellules souches	-	+	?

*+ : traitement efficace chez cette espèce ; (+) : traitement efficace chez cette espèce mais peu d'études ; - : traitement dont l'efficacité n'a pas été démontrée ; ? : Traitement avec une efficacité non connue ; * ; Traitement pouvant être additionné à d'autre thérapie suivant les cas*

Ainsi le cheval apparaît être le modèle le plus pertinent pour tester l'efficacité de nouveaux traitements pour les patients asthmatiques.

2. Les inconvénients du modèle équin pour l'asthme humain

L'utilisation du cheval comme modèle pour l'asthme présente aussi quelques inconvénients. Si sa taille est un avantage, c'est aussi un inconvénient en terme de coût puisque les traitements, les équipements et les procédures ont un coût plus important que pour le modèle murin.

Afin de faciliter l'accès aux ressources biologiques équines et de favoriser la recherche une collaboration entre les centres de recherches internationaux a été mise en place et une banque de tissus respiratoires élaborée pour la recherche respiratoire (BTRE, 2015). La longue espérance de vie du cheval peut aussi être un inconvénient dans le cas des études longitudinales ayant pour but d'étudier l'effet de l'âge sur la pathologie (pour revue Leclere et al., 2011b). De plus encore peu d'outils moléculaires tels que les anticorps ont été validés sur le cheval (Schnabel et al., 2013) et les cellules du système immunitaire équin ne sont pas encore bien caractérisées. Enfin, les études sur les chevaux sont difficiles à mettre en place si une cohorte

de chevaux d'étude n'est pas disponible. Ainsi il est fréquent d'avoir dans une même étude des chevaux de races et d'âges différents ce qui augmente la variabilité inter-individus et donc complique l'analyse des données et leur interprétation. La nature inattendue de l'asthme chez le cheval et la diversité entre les individus atteints d'AES rend l'analyse des résultats difficile avec une puissance statistique généralement faible. Malgré cela, l'espèce équine reste un modèle intéressant dans l'étude de l'asthme humain.

Hypothèses et objectifs de l'étude

L'asthme sévère chez le cheval (AES) est une maladie obstructive récurrente. L'environnement du cheval et plus particulièrement le foin représente un facteur de risque prépondérant dans l'initiation ou le maintien de l'inflammation respiratoire chez le cheval.

Le projet HayDEA dans lequel s'inscrit la thèse vise à étudier l'influence du foin sur l'AES. Ce travail de thèse avait pour objectif général d'investiguer l'effet du foin chez les chevaux atteints d'AES et permettre une meilleure gestion préventive et/ou curative de cette maladie.

Ainsi le premier axe de ce travail reposait sur la mise en place d'un challenge d'exposition *in vivo* des chevaux AES et contrôles à du foin soumis « à la vapeur » ou non. Les objectifs étaient de :

- Déterminer l'effet du foin « à la vapeur » sur la réponse immunitaire systémique.
- Déterminer l'effet du foin « à la vapeur » sur la réponse respiratoire clinique, cytologique et immunitaire au niveau du lavage broncho-alvéolaire et des macrophages alvéolaires.

L'hypothèse associée à ce premier axe était que le foin « à la vapeur » permettrait de diminuer la réponse inflammatoire et immunitaire au niveau systémique et respiratoire chez des chevaux AES.

Dans un second temps, les investigations ont été ciblées sur les macrophages alvéolaires avec pour objectif de caractériser le comportement des macrophages alvéolaires équins issus du challenge, en réponse à une stimulation *in vitro* par des suspensions de poussières de foin (HDS). Les étapes stratégiques du travail ont été les suivantes :

- Caractériser les populations de MA, issus du challenge, par immunophénotypage.
- Etudier la capacité de phagocytose des MA issus de chevaux CTL et AES stimulés *in vitro* par différents antigènes.
- Etudier le comportement cellulaire et la réponse cytokinique à une stimulation *in vitro* par de l'HDS, des MA issus de chevaux AES et CTL, préalablement soumis à un challenge d'exposition *in vivo*.

Les hypothèses associées à ces objectifs étaient les suivantes :

- Le phénotype des macrophages alvéolaires varie selon le statut du cheval et le stade d'activation des macrophages ce qui peut influencer la capacité de phagocytose des MA.
- Le comportement cellulaire et la réponse immunitaire des MA varient selon le stimulus utilisé *in vitro*, et également selon le challenge *in vivo* préalable auquel les chevaux ont été soumis.
- Le challenge *in vivo* préalable au foin « à la vapeur » a une moindre influence que le foin sec sur la réponse ultérieure des MA de chevaux AES stimulés *in vitro*.

La démarche expérimentale peut être schématisée par la Figure 33 :

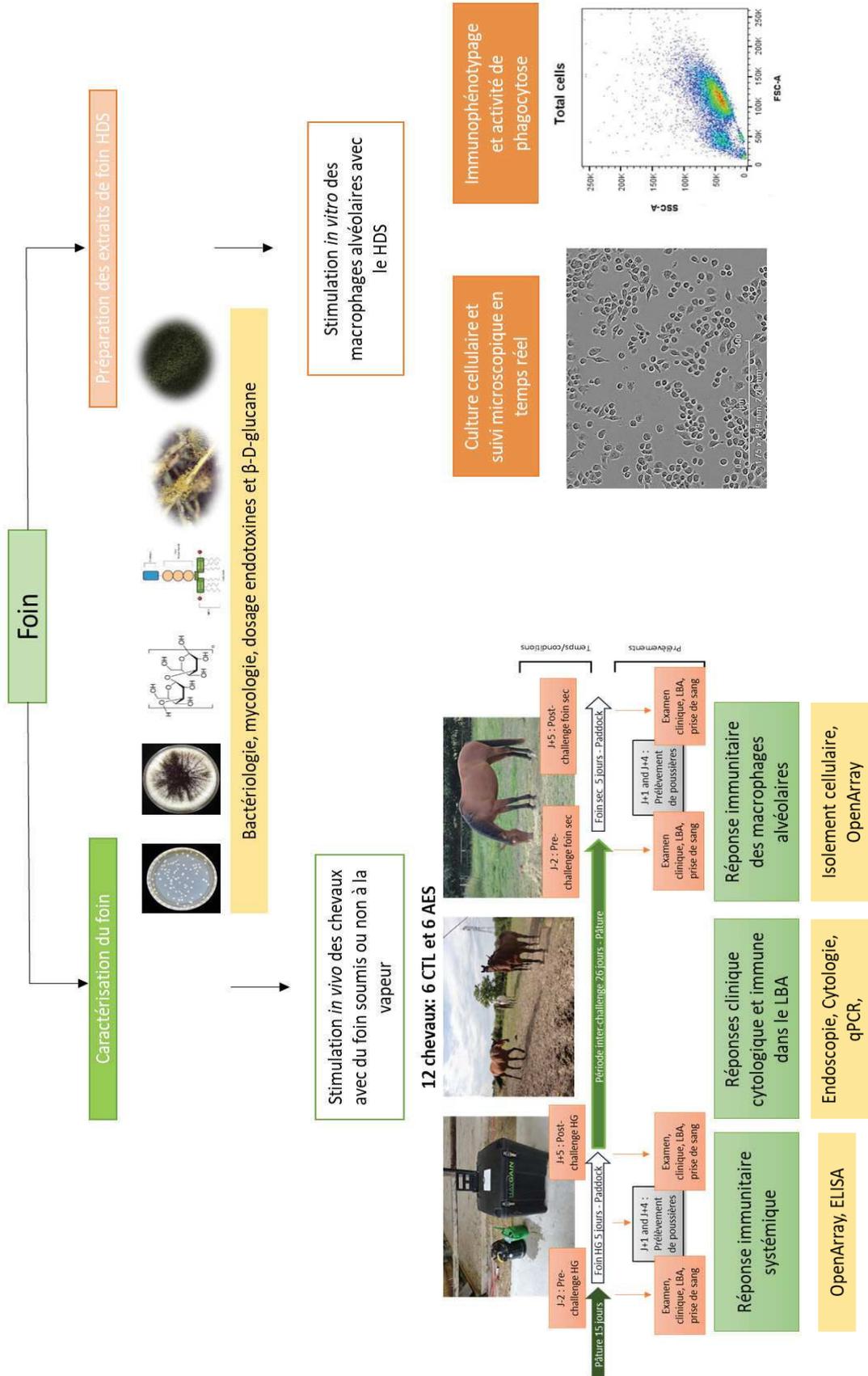


Figure 33 : Démarche expérimentale

Description des travaux de recherche

Partie I. Influence du foin « à la vapeur » sur la réponse systémique et respiratoire des chevaux AES

Article 1, accepté pour publication : The influence of hay steaming on clinical signs and airway immune response in severe asthmatic horses. *BMC Vet Res*, 2018. (Annexe 3).

Marie Orard, Erika Hue, Anne Couroucé, Céline Bizon-Mercier, Marie-Pierre Toquet, Meriel Moore-Colyer, Laurent Couëtil, Stéphane Pronost, Romain Paillot, Magali Demoor, Eric A. Richard.

Article 2, en préparation : Development of multiplex nanoscale PCR to evaluate peripheral blood cytokines mRNA expression in healthy and severe asthmatic horses (Annexe 4).

Marie Orard, Stéphanie Fougerolle*, Marie-Pierre Toquet, Romain Paillot, Stéphane Pronost, Eric A. Richard, Erika S. Hue*

Communication orale : La purification du foin a-t-elle une influence sur les signes cliniques et la réponse immune des chevaux atteints d'asthme sévère ? Communication orale au congrès de l'AVEF 2018, Bordeaux, France (Annexe 7).

Marie Orard, Erika Hue, Anne Couroucé, Céline Bizon-Mercier, Marie-Pierre Toquet, Meriel Moore-Colyer, Laurent Couëtil, Stéphane Pronost, Romain Paillot, Magali Demoor, Eric A. Richard

A. Mise en place du challenge *in vivo* et analyse du foin

A.1. Matériel et méthodes

A.1.1. Animaux

Douze chevaux ont été recrutés pour l'étude expérimentale : 6 chevaux (5 femelles et 1 hongre, âgés de 9 à 17 ans) atteints d'asthme équin sévère (AES) en période de rémission clinique ; et 6 chevaux contrôles (sains) (CTL ; 4 femelles et 2 hongres, âgés de 2 à 5 ans). Les chevaux ont été recrutés chez différents propriétaires volontaires ayant signé une lettre de consentement au préalable de l'étude.

Un cheval était défini comme contrôle, avant le début du challenge suivant les critères suivants: un pourcentage en neutrophiles < 10% dans la cytologie du LBA des deux poumons, l'absence de toux au repos et en début d'exercice, l'absence de mucus trachéal et/ou de jetage nasal. Les chevaux atteints d'AES ont précédemment été diagnostiqués par les vétérinaires équins d'ONIRIS (Nantes) sur base de leur historique, les chevaux AES étaient en période de rémission depuis plusieurs mois et sans traitement aux corticostéroïdes durant au moins le dernier mois précédent le début de l'étude.

L'étude a été approuvée par le comité d'éthique pour la recherche clinique (CERVO-2017-8-V- Nantes).

A.1.2. Design de l'étude

L'étude a été menée au printemps 2017. Avant le début de l'essai, les chevaux ont été maintenus au pré sans foin pendant 2 semaines. Au premier jour de l'essai (J-0), les chevaux CTL et AES ont été nourris avec du foin « à la vapeur » durant 5 jours consécutifs (challenge 1). Lors du 1^{er} challenge, le foin a été placé dans le purificateur HG-600 (HayGain) selon les recommandations du fournisseur jusqu'à ce que les pics, permettant la diffusion de la vapeur au sein du foin, soient bien implantés dans la botte. Le foin « à la vapeur » était ensuite immédiatement distribué aux chevaux à raison de 5 kg de foin par cheval distribué sur le sol deux fois par jour, matin et soir. Les chevaux avaient accès à volonté à l'eau et leur ration de foin était complétée avec un mélange de céréales et de fibres déshydratés (Twenty Horse ; Tromelin & Cie, Ploeren) deux fois par jour. Au cours des deux périodes de challenge, les chevaux étaient placés dans des paddocks d'environ 1 000 m², en groupe de 3 chevaux. Lors de la période inter-challenge de 26 jours, les chevaux étaient placés dans un pré de plusieurs hectares, sans accès au foin. Le

deuxième challenge a été réalisé en présence de foin sec dans les mêmes conditions que le challenge 1.

Deux jours avant (J-2) et 5 jours après (J+5) le début de chaque challenge, des prises de sang, un test clinique, une endoscopie trachéale et un LBA dans chaque poumon ont été effectués sur chaque cheval. Au cours de l'étude, une fiche de suivi était complétée pour chaque cheval (Annexe 1). A la fin du 2^{ème} challenge, les chevaux AES ont reçu de la dexaméthasone (0,1 mg/kg IV durant 2 jours puis une diminution progressive sur une semaine) et tous les chevaux sont retournés chez leur propriétaire.

A.1.3. Prélèvements effectués sur les chevaux

A J-2 et J+5 de chaque challenge, plusieurs investigations ont été effectuées sur les chevaux. Tout d'abord, un examen clinique a été réalisé. L'état général du cheval a été évalué avec une notation d'état corporel gradée sur 5. Ensuite un score clinique basé sur une échelle de 0 à 21 (adaptée de Tesarowski, 1996) a été assigné à chaque cheval (Annexe 2). Pour cela différentes constantes ont été relevées : température rectale, fréquence cardiaque et fréquence respiratoire. Les signes cliniques respiratoires ont ensuite été évalués, à savoir la présence de jetage nasal ou non, l'observation d'une ligne de pousse ou d'un éventuel effort respiratoire, la présence ou non de toux et l'écoute des bruits trachéaux (sifflement, crépitement).

Des prélèvements sanguins ont été effectués (2 tubes EDTA, 5 tubes sec, 2 tubes citrate, 2 tubes PaxGene, 10 tubes Héparine-Lithium). Une Numération Formule a été réalisée sur un tube sec. Les tubes secs et EDTA ont été centrifugés à 850 g pendant 10 minutes, conservés à 4°C puis stockés à -80°C jusqu'à analyse. Les tubes PaxGene ont été directement conservés à -80°C.

Des écouvillons naso-pharyngés ont été réalisés sur les chevaux afin de rechercher l'éventuelle présence des virus HVE-1, HVE-4, Virus de la Rhinite équine -A (ERAV) et Virus de la Rhinite équine- B (ERBV). Les écouvillons ont été immédiatement placés dans 4 ml de milieu de transport tel que décrit précédemment (Fortier *et al.*, 2013).

De la détomidine (0,01 mg/kg IV) et du butorphanol (0,01 mg/kg) ont ensuite été injectés aux chevaux avant de réaliser l'endoscopie. L'endoscopie des voies respiratoires et la collection du liquide de LBA ont été réalisées en utilisant un vidéoendoscope flexible de 3,2 m de long et de 12,8 mm de diamètre (Optomed). La quantité de mucus trachéal a été gradée selon l'échelle de Gerber *et al.*, (2004a) (Figure 10). Les LBA ont été effectués sur les 2 poumons. Pour cela, 500 ml de solution saline isotonique à 37°C ont été instillés en 2 bolus de 250 ml et ré-aspirés instantanément pour chaque poumon. 4 ml de chaque LBA a été prélevé pour effectuer l'analyse

cytologique. Des aliquots de 1 ml de LBA brut provenant du poumon droit brut avec ou sans inhibiteurs de protéases (Sigma) ont aussi été réalisés pour constituer une échantillothèque.

Pour le dosage des cytokines par RT-PCR, 50 ml de LBA ont été immédiatement centrifugés, pendant 15 minutes à 500 g. Les culots cellulaires ont été repris avec 2 ml de « RNA Protect Cell Reagent » (Qiagen) puis aliquotés dans 2 tubes avant d'être conservés à -80°C jusqu'à leur extraction.

Le reste du LBA issu du poumon droit a été centrifugé à 500 g pendant 10 minutes et les cellules ont été conservées dans du SVF avec 10% de DMSO et congelées dans l'azote liquide.

Les macrophages alvéolaires ont été isolés à partir du LBA du poumon gauche (Cf. C.2.1.1)

Les cellules ont été isolées dans la journée.

A.1.4. Caractérisation du foin et de la qualité de l'air

Le foin distribué aux chevaux était un foin de prairie provenant d'une parcelle située à Croissanville (14), récolté en 2016. Le foin était conditionné en bottes rectangulaires de 10-15 kg. Au préalable du challenge, des échantillons d'1 kg ont été collectés au hasard dans 10 bottes différentes, avant et après soumission « à la vapeur », puis stockés dans des sacs adaptés, fournis par HayGain avant analyse. Les échantillons ont été broyés et conservés dans des sacs hermétiques à l'abri de la lumière afin d'évaluer la teneur en bactéries, moisissures, et la qualité nutritionnelle. La teneur en poussières respirables et inhalables ainsi que la concentration en endotoxines et en β -D-glucane ont été évaluées sur filtres grâce aux prélèvements effectués dans la zone respiratoire des chevaux au cours du challenge.

A.1.4.1. Bactériologie et mycologie du foin

Broyage du foin :

Afin que le foin ne colmate pas dans le broyeur, 1 kg de foin a été placé à l'étuve à 40°C toute la nuit. Le foin a ensuite été broyé dans un broyeur (Retsch SM200). Le broyat a été collecté dans un sac plastique étanche pour être analysé le jour même.

Analyse bactériologique :

Un mélange de 20 g de broyat de foin avec 180 ml d'eau peptonnée tamponnée 0,1 % a été réalisé puis dilué de 10^{-1} à 10^{-6} . Un ml de chaque dilution a été coulé en masse dans une gélose Plate Count Agar (PCA) permettant le comptage total des bactéries. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37°C, avec un dénombrement à 2 et 5 jours d'incubation.

Analyse mycologique :

Le dénombrement des colonies de moisissures et levures a été réalisé à partir de 1 ml de chaque dilution coulée en masse dans une gélose d'Oxytetracycline-glucose-yeast Extract Agar (OGA) et incubée à 25°C. Les colonies de moisissures ont ensuite été isolées sur une gélose Sabouraud puis incubées à 25°C pendant 5 jours pour identification. L'identification a été réalisée par observation des moisissures et par isolement sur lame avec coloration au bleu trypan 0.4% (Lonza) pour être observées au microscope au grossissement x40 (Axio Vert A1- Zeiss).

La croissance des bactéries et moisissures a été exprimée en unité formant des colonies (UFC) après 5 jours d'incubation.

A.1.4.2. Valeurs nutritionnelles

Les méthodes d'analyse de la valeur nutritionnelle du foin sont issues du Règlement CE 152/2009 concernant l'alimentation des animaux.

Au préalable, les échantillons ont été broyés et tamisés à 0,5 mm.

La matière sèche a été évaluée par mesure de la perte de masse à la dessiccation. Pour cela 5 g de foin broyé ont été placés à l'étuve à 103°C pendant 4 heures. La teneur en matière sèche est donnée par le calcul suivant :

$$\text{Teneur en matière sèche} = \frac{(m - m_0)}{m} \times 100$$

Avec m = masse initiale (g) de la prise d'essai et m_0 = masse (g) de la prise d'essai sèche

La teneur en protéines brutes a été mesurée par la méthode de KJELDHAL. Tout d'abord 1 g d'échantillon a été minéralisé en présence de 15 g de sulfate de potassium, de 0,4 g d'oxyde de cuivre et de 25 ml d'acide sulfurique (1,84 g/ml) à une température de 410°C. Les sels d'ammonium formés ont été distillés en présence d'hydroxyde de sodium concentré, en excès,

et fixés dans de l'acide borique (10 g/L). Après dosage par de l'acide sulfurique 0,05 mol/L (0,1 N), la teneur en azote a été convertie en teneur en protéines (en %) par le calcul suivant:

$$\text{Teneur en protéines} = \frac{(V1 - V0) \times c \times 0,014 \times 6,25}{m} \times 100$$

Avec V0 = volume (ml) de H₂SO₄ utilisé dans l'essai à blanc, V1 = volume (ml) de H₂SO₄ utilisé pour le titrage de l'échantillon, c = concentration (N) de l'acide sulfurique, m = masse (g) d'échantillon, 6,25 = coefficient de conversion de l'azote en protéine

Le dosage des matières grasses brutes a été réalisé par un traitement à chaud de l'échantillon en présence d'acide chlorhydrique (3 mol/L). Pour cela, le mélange a été filtré à chaud puis lavé à l'eau chaude et séché. Le filtre avec le résidu est extrait, par reflux, par de l'éther de pétrole qui est récupéré dans une fiole préalablement séchée et tarée. Après élimination du solvant par distillation, la fiole contenant le résidu d'extraction a été séchée puis pesée. La teneur en matière grasse a été exprimée en % comme suit :

$$\text{Teneur en MG} = \frac{(m1 - m0)}{m} \times 100$$

Avec m₀ = masse (g) de la fiole avant extraction, m₁ = masse (g) de la fiole avec le résidu d'extraction, m = masse (g) de l'échantillon

La teneur en cellulose brute a été mesurée par la méthode de WEENDE. 1 g d'échantillon a été porté à ébullition en présence de 150 ml d'acide sulfurique (0,13 mol/L) pendant 30 minutes dans un creuset filtrant. L'acide sulfurique a ensuite été filtré et le résidu lavé trois fois avec 30 ml d'eau bouillante. Après l'ajout de 150 ml d'hydroxyde de potassium (0,23 mol/L) bouillant, la solution a été portée à ébullition pendant 30 minutes. L'hydroxyde de sodium a été filtré comme précédemment. Le creuset a ensuite été séché à l'étuve à 103°C puis incinéré à 525°C pendant 5 heures. La perte de poids résultant de cette incinération correspond à la cellulose brute de la prise d'essai.

$$\text{Teneur en cellulose brute} = \frac{(m0 - m1)}{m} \times 100$$

Avec m₀ = masse (g) du creuset et de l'échantillon après hydrolyses et séchage, m₁ = masse (g) du creuset et de l'échantillon après incinération, m = masse (g) de l'échantillon

La détermination des cendres brutes a été effectuée après une incinération de l'échantillon pendant 5h à 525°C puis le résidu obtenu a été pesé.

$$\text{Teneur en cendres brutes} = \frac{(m_1 - m_0)}{m} \times 100$$

Avec m_0 = masse (g) du creuset d'incinération vide, m_1 = masse (g) du creuset avec l'échantillon après incinération, m = masse (g) de l'échantillon

Pour la teneur en minéraux (Calcium, Phosphore, Sodium, Magnésium, Cuivre, Manganèse, Zinc), 2 g de foin ont été mélangés délicatement à 6 ml de l'acide nitrique (HNO₃) à 65% puis laissés en contact pendant 2 heures. Ensuite 3 ml de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ont été ajoutés puis laissés en contact pendant 2 heures. L'échantillon a ensuite été minéralisé sur bloc chauffant pendant 2 heures à 115°C. Le tube a ensuite été complété avec de l'eau ultra pure et le minéralisât filtré à l'aide du système de filtration filtermate (Agilent) de porosité 6 µm. Les échantillons ont ensuite été passés au spectrophotomètre d'émission atomique (Spectro Ciros Vision).

Enfin les valeurs d'unité fourragères cheval (UFC) et de matière azotée digestible par le cheval (MADC) ont été calculées suivant les recommandations de l'INRA (Martin-Rosset, 2012).

$$\text{UFC} = 0,825 - 0,0011 \text{ CB} + 0,0006 \text{ MAT}$$

$$\text{MADC} = -67,1 + 0,861 \text{ MAT} + 0,105 \text{ CB}$$

A.1.4.3. Particules respirables et inhalables

La mesure des particules inhalables et respirables a été effectuée au moment du repas de foin à J+1 pour les chevaux CTL et J+4 pour les chevaux AES lors de chacun des deux challenges. Le prélèvement des particules a été effectué selon le protocole précédemment décrit par Ivester *et al.* (2014). Tout d'abord, les filtres d'échantillonnage et les filtres contrôles ont été placés dans un dessiccateur pendant 24h avant d'être pesés 3 fois. Ensuite, un cheval CTL et un cheval AES ont été équipés chacun de deux pompes portatives reliées aux filtres placés au niveau des naseaux (Figure 34). La fraction respirable (< 5 µm) a été collectée à un débit de 2,5 L/min (AirCheck XR5000, Tecora) sur un filtre de 37 mm (type AE glass fibre) placé sur un cyclone en aluminium. La fraction inhalable (> 5 µm) a été collectée à un débit de 2 L/min (AirCheck 3000, Tecora) sur un filtre de 25 mm en Polychlorure de vinyle (PVC) placé dans une cassette IOM. Au cours de la procédure, des filtres contrôles ont été placés dans le même environnement à proximité des chevaux prélevés. Les filtres ont été à nouveau placés 24h dans un dessiccateur avant 3 nouvelles pesées.

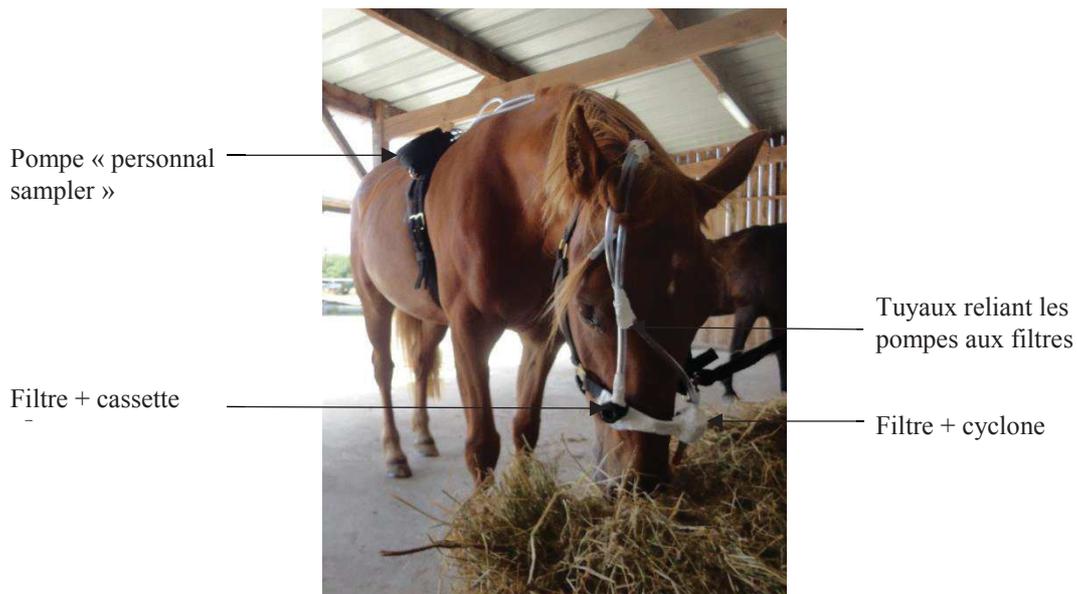


Figure 34 : Dispositif pour le prélèvement des poussières respirables et inhalables

La mesure des poussières respirables et inhalables a été réalisée par méthode gravimétrique (Ivester et *al.*, 2012) en soustrayant la moyenne des trois pesées réalisées avant les prélèvements de poussières à la moyenne des trois pesées effectuées après prélèvement des poussières. Le poids des particules a été divisé par le volume d'air prélevé afin d'obtenir la concentration. Les filtres ont ensuite été conservés à -20°C jusqu'à analyse des teneurs en endotoxines et β -D-glucane effectuée sur une moitié de filtre de 37 mm.

A.1.4.4. Endotoxines

La teneur en endotoxines a été mesurée à partir des filtres de 37 mm. Les filtres ont été élués dans 10 ml d'eau apyrogène (Endosafe®) avec 0,05% de Tween 20 (Sigma Aldrich) et agités pendant 1h (MS-NRK-30). La partie supérieure de l'éluat a été récupérée et centrifugée à 1 000 g pendant 15 minutes. Le surnageant a été conservé à -20°C jusqu'à analyse. Les éluats ont ensuite été dilués au 1/10^{ème} dans de l'eau apyrogène (Charles River) et la teneur en endotoxines a été mesurée par utilisation de l'Endosafe-PTS2005F suivant les recommandations du fournisseur (Charles river).

A.1.4.5. (1→3)-β-D-glucane

A la suite de l'éluat pour la recherche des endotoxines, une extraction à la chaleur a été effectuée sur l'éluat pour mesurer la teneur en (1-3)-β-D-glucane. Les échantillons ont ensuite été respectivement dilués au 1/10^{ème} pour les blancs et au 1/100^{ème} pour les échantillons prélevés. Les mesures ont été réalisées en duplicat avec le Glucatell® kit test (Cape Cod) (rang de quantification 5-40 pg/ml).

A.1.5. Analyses statistiques

Les données, ne suivant pas une loi normale selon le test de Shapiro-Wilk, ont été transformées en log₁₀. Concernant les paramètres liés au foin, des tests paires (Foin sec vs. Foin « à la vapeur ») ont été effectués pour les teneurs en bactéries et moisissures. Les valeurs étaient considérées comme significatives quand $p < 0,05$.

A.2. Résultats

A.2.1. Caractérisation du foin

Contrairement à la plupart des challenges préalablement effectués, le foin utilisé était non moisi et de bonne qualité nutritionnelle. De plus, soumettre le foin « à la vapeur » n'a pas eu d'effet sur la valeur nutritive du foin (Tableau 6).

Tableau 6 : Valeurs nutritionnelles dans le foin pré et post-« purification » (mélange de 10 foins échantillonnés)

	Foin Brut	Foin HG
MS totale (g/kg MS)	864,0	873,3
MM (g/kg MS)	114,9	89,7
Matière grasse totale (g/kg MS)	17,9	19,8
Protéines (g/kg MS)	106,0	92,2
Cellulose (g/kg MS)	314,2	292,0
UFC (UFC/Kg MS)	0,6	0,6
MADC (g MADC/kg MS)	52,6	42,7
P (g/kg MS)	3,3	3,6
Ca/P (g/kg MS)	1,4	1,2

MS, Matière sèche ; MM, matière minérale, UFC, Unité fourragère cheval ; MADC, Matière azotée digestibles chez le cheval ; P, Phosphore ; Ca/P, rapport Calcium/phosphore

L'étude a montré que « purifier » le foin diminuait significativement la teneur en bactéries (Figure 35 A) et en moisissures (Figure 35 B) ($P < 0,001$).

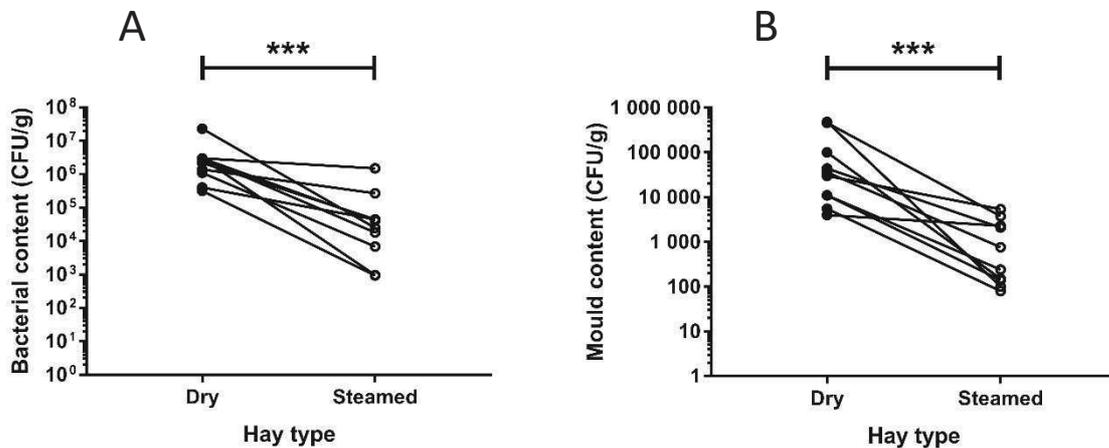


Figure 35 : Teneur en bactéries (A) et moisissures (B) (CFU/g) du foin sec (dry) et du foin « à la vapeur » (steamed). CFU (ou UFC), « Colony forming unit » ; *** différences significatives ($p < 0,001$). ($n=9$).

En moyenne, la teneur en bactéries passe de $4,04 \times 10^6 \pm 6,75 \times 10^6$ UFC/g à $1,95 \times 10^5 \pm 4,6 \cdot 10^5$ UFC/g et la teneur moyenne en moisissures passe de $1,18 \times 10^5 \pm 1,87 \times 10^5$ UFC/g à $1,5 \times 10^3 \pm 1,8 \times 10^3$ UFC/g.

Le genre *Aspergillus* a été identifié dans 9 des 10 foins secs et dans tous les foins après « purification » avec principalement les espèces *Aspergillus glaucus* et *Aspergillus nidulens*. L'*Aspergillus fumigatus* n'a été identifié que dans un foin sec uniquement. Le genre *Penicillium* a été identifié dans 3 sur 10 foins secs et dans 1 foin purifié.

A.2.2. Particules respirables et inhalables

La concentration en poussières respirables et inhalables collectées dans la zone respirable du cheval (1 CTL et 1 AES) était respectivement de 0,0015 et 0,0034 mg/m³, durant le premier challenge contre 0,0024 et 0,0057 mg/m³ durant le challenge au foin sec. De même, la fraction inhalable collectée était respectivement de 0,0045 and 0,0082 mg/m³, lors du challenge au foin soumis « à la vapeur » contre 0,31 et 0,26 mg/m³ lors du challenge au foin sec.

A.2.3. Endotoxines et β -D-glucane

La teneur en endotoxines de la fraction respirable était respectivement de 0,08 et 0,98 EU/ml, lors de l'exposition au foin soumis « à la vapeur » et de 2,19 et 3,88 EU/ml lors du challenge au foin sec.

La teneur en β -D-glucane était respectivement de 340 et 1067 pg/ml, lors du challenge 1 et de 895 et 2367 pg/ml lors du challenge 2.

B. Réponse systémique immunitaire des chevaux AES stimulés avec du foin « à la vapeur » ou non

Une fois les foins caractérisés, l'objectif était d'étudier la réponse systémique immunitaire des chevaux en réponse à l'exposition à du foin sec ou « à la vapeur », par la quantification de l'expression génique et la concentration protéique des cytokines du sang.

B.1. Matériel et méthodes

B.1.1. Isolement des PBMC

Les PBMC ont été isolés à partir du sang Héparine-Lithium, volume à volume avec le milieu de séparation des lymphocytes (Eurobio) (Figure 36), puis centrifugés à 400 g pendant 30 minutes sans frein. La partie supérieure, contenant le plasma, a été récupérée puis centrifugée à 850 g pendant 10 minutes aliquotée, puis conservée à -80°C afin de constituer la sérothèque.

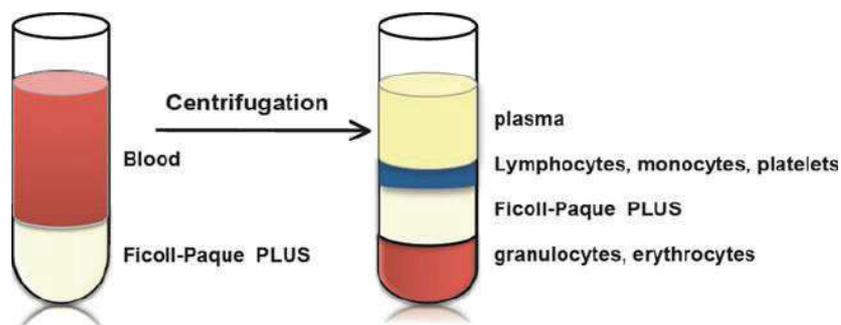


Figure 36 : Isolement des PBMC (Eurobio)

Les anneaux de cellules mononuclées (lymphocytes, monocytes, plaquettes) ont été récupérés puis lavés avec 40 ml de PBS et homogénéisés doucement avant d'être centrifugés à 500 g pendant 10 minutes. Le culot a été resuspendu dans 10 ml de PBS puis aliquoté en un tube de

5 ml et 5 tubes de 1 ml. Les tubes ont de nouveau été centrifugés à 500 g pendant 10 minutes. Le culot cellulaire de 5 ml a été repris dans 5 ml de SVF (90%) - DMSO (10%), aliquoté dans 5 ampoules de congélation, conservées à -80°C puis transférées dans l'azote liquide pour un immunophénotypage ultérieur. Les 5 tubes de 1 ml ont permis de conserver 3 culots secs à -80°C et 2 culots ont été repris dans 1 ml de « RNA Protect Cell Reagent » (Qiagen) et congelés à -80°C.

B.1.2. Extraction des ARN et synthèse de l'ADN complémentaire

L'extraction des ARN totaux a été réalisée à partir des tubes PaxGene. Les ARN du sang prélevé dans les tubes PaxGene ont été extraits avec le kit d'extraction PAXgene Blood RNA kit (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Tous les ARN ont été conservés à -80°C avant utilisation. La concentration et la pureté des ARN totaux ont été dosées au NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermoscientific France). Le « RNA integrity number » (RIN) était de $9,7 \pm 0,3$ pour les ARN du sang.

La synthèse d'ADNc a été réalisée à partir de 200 ng d'ARN avec le SuperScript® VILO™ cDNA synthesis kit (Life Technologies). Cette synthèse a été réalisée, selon les recommandations du fournisseur, en présence du pool d'amorces « custom Open Array Preamp » (Life technologies). Ce pool d'amorces est spécifique des 18 cibles recherchées en OpenArray dans l'étude (Tableau 7). Un témoin NoRT a été réalisé en parallèle sans l'enzyme ainsi qu'un contrôle de RT-PCR utilisant de l'ARN synthétique fourni dans le kit. En parallèle, les ADNc ont également été synthétisés dans les mêmes conditions en l'absence du pool d'amorces. Le programme suivant a ensuite été appliqué sur les échantillons, 10 min à 25°C, 1h à 42°C et 5 minutes à 85°C. Les ADNc obtenus ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation. Le tableau 7 récapitule les sondes et amorces des systèmes qPCR et OpenArray.

Tableau 7: Séquences nucléiques des amorces et sondes spécifiques équines utilisées pour les PCR en temps réel et en OpenArray.

Cible	Amorces et sonde (5'-3')	Taille (bp)	GenBank Accession	References	qPCR	OpenArray
ACTB	Amorce sens: AGCGAAATCGTGCGTGACA Amorce anti-sens: GCCATCTCCTGCTCGAAGT Sonde: CAAGGAGAAGCTCTGCTATGTCGCCCT	70	NM_001081838	Coombs et al., 2006	X	Ec04176172_gH (Life technologies)
β-GUS	Amorce sens: GAAAGGTCTGCTGGAACAGTATCA Amorce anti-sens: TCCAGATGAGCTCTCCAACCA Sonde: CAAAAACGCAAAGAAT	77	EF485029.1	Orard et al., 2019	X	X
GAPDH	Amorce sens: AAGTGGATATTGTCGCCATCAAT Amorce anti-sens: AACTGCCATGGGTGGAATC	88	AF097178	Colahan et al., 2002	X	X

Partie 1 : Influence du foin « à la vapeur » sur la réponse systémique et respiratoire des chevaux AES

Sonde: ACTACATGGTCTACATGTTTCAGTA (#)						
IFN-α	Amorce sens: CCTTACTGATGGCCCTGGTG(#) Amorce anti-sens: ATTCTCCTCATTTGTCCCAGGA (#) Sonde: CCTGCCTCACCCCATAG Yes	124	NM_001099441	Adapté de Horohov et al., (2008)	X	X
IFN-β	Amorce sens: ACACCTGGCGTATTTTCAGAAGA Amorce anti-sens: CACAAGGAGTTCTTAACGATGGT Sonde: CTAGCACTGGCTGGAATGA (#)	74	NM_001099440	Horohov et al., 2008	X	X
IFN-γ	Amorce sens: GGAGGACCTGTTTCGTTAAGTTCTTT (#) Amorce anti-sens: TTTGCGCTGGACCTTCAGA Sonde: ATTCAGATTCCGGTAAATGA	103	NM_001081949	Horohov et al., 2008	X	X
IL-1β	Amorce sens: CCGACACCAGTGACATGATGA Amorce anti-sens: TCCTCTCAAAGAACAGGTCATTC Sonde: CTTACTGCAGCGCAAT (#)	64	NM_001082526	Saulez et al., 2010	X	X
IL-2	Amorce sens: CAAGAATCCAAACTCTCCAAGAT Amorce anti-sens: TCGAGAGAAAGTTTTTTAGCATTCC Sonde: CCAAGAAGGCCACAGA (#)	134	NM_001085433	Colahan et al., 2002	X	
IL-4	Amorce sens: TCGTGCATGGAGCTGACTGTA Amorce anti-sens: CAGCCCTGCAGATTTCTTTTC (#) Sonde: GCCCGAAGAACACAGA (#)	76	NM_001082519	Ainsworth et al., 2003	X	X
IL-5	Amorce sens: TGCTTCTGCATTTGAGTGTGCTA Amorce anti-sens: TGTTTCATGGGACTTTCTACAGCAA Sonde: CTCTTGAGCTGCCTAC (#)	75	NM_001082499	Davis et al., 2005	X	X
IL-6	Amorce sens: GATGCTTCCAATCTGGTTCA (#) Amorce anti-sens: GCATAGTCTTGATGTTTTCTTTTC (#) Sonde: ATCAGGCAGGTCTCCTG	132	NM_001082496	Saulez et al., 2010	X	X
IL-6R	Amorce sens: GAAGGCGGCTGGTTCTGA Amorce anti-sens: CCTGGTAGCACGAATAGTTTCCA Sonde: TTCCGTGCAGCTCAG (#)	63	XM_005610076	Orard et al., 2019	X	X
IL-8	Amorce sens: GGCCACACTGCGAAAAC (#) Amorce anti-sens: GCACAATAATCTGCACCCACTTT Sonde: GAAATCATTGTAAAGCTCG (#)	97	NM_001083951	Allen et al., 2007	X	X
IL-10	Amorce sens: GACATCAAGGAGCACGTGAACTC Amorce anti-sens: TGCTCCACTGCCTTGCTCTT Sonde: GAAATCATTGTAAAGCTCG (#)	113	NM_001082490	Colahan et al., 2002	X	X
IL-12	Amorce sens: ACCAGGCCAGGAATGTTC Amorce anti-sens: TGACGGTCTCAGCAGGTTT Sonde: TGCCTCAACCACTCC	59	NM_001082511	Orard et al., 2019	X	X
IL-13	Amorce sens: CCCTGGAGTCCCTGAGCAA Amorce anti-sens: CATCTTCCGCTGTTTTGG Sonde: CCACCTGCAGTGCCAT (#)	59	NM_001143791	Orard et al., 2019	X	X
IL-17	Amorce sens: ATCGTGAAGCGGGAATAGTAA Amorce anti-sens: TCGTTTTCCGTTAAGGACG Sonde: ACAAGAACTTCCCTCAGAAT (#)	112	AY014959	Ainsworth et al., 2007	X	X
IL-18	Amorce sens: GAAATCAACCTGTGTTGAGGATATG Amorce anti-sens: TCACAGAGATGGTTACCGTAGAC Sonde: ATTGTACAGACAACGCACCC	126	NM_001082512	Orard et al., 2019	X	X
IL-23	Amorce sens: CCCATATCCAGTGCGAGGAT Amorce anti-sens: CTTTGCAAGCAGGGCTGACT sonde: TGTGATCCTGAAGGACT	70	NM_001082522	Orard et al., 2019	X	
TGF-β	Amorce sens: TCCTGGCGCTACCTCAGTAAC Amorce anti-sens: TGACATCAAAGGACAGCCATTC Sonde: CTGCTGACCCCCAGCGACTCG	70	NM_001081849	Dahlgren et al., 2005	X	
TNF-α	Amorce sens: CTTCTGCCTGCTGCACTTTG (#) Amorce anti-sens: GGGCTACAGGCTTGCACTTG (#) Sonde: CCAGACACTCAGATCAT	134	NM_001081819	Horohov et al., 2008	X	X

(#) représente les modifications faites par rapport aux publications précédentes ; ACTB, Actin beta; GUS, glucuronidase; GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; IFN, Interferon; IL, interleukine; TGF, Transforming Growth Factor; TNF, tumor necrosis factor.

B.1.3. Expression des ARNm des cytokines du sang

Le développement pour la quantification de l'expression des ARNm des cytokines du sang sur lame OpenArray a nécessité le développement et la validation des 21 systèmes PCR présentés dans le tableau 7. La méthodologie est explicitée dans l'article 2 (Cf. Annexe 4).

B.1.3.1. Présentation de la lame OpenArray

Une lame OpenArray comporte 48 subarrays composés chacun de 64 puits avec 10 puits dédiés aux contrôles qualité de la lame OpenArray validés par le logiciel d'analyse, et les 18 systèmes PCR déposés en triplicat (Figure 37). Chaque puits permet de réaliser une nanoscale PCR (nsPCR) de 33 nl. Cette technologie permet ainsi de réaliser 64 nanoscale PCR différentes à partir de 5 µl d'ADNc uniquement en un seul run. Cela permet donc de réaliser 3 072 amplifications en parallèle par lame et jusqu'à 12 228 PCR si 4 lames sont réalisées en parallèle.

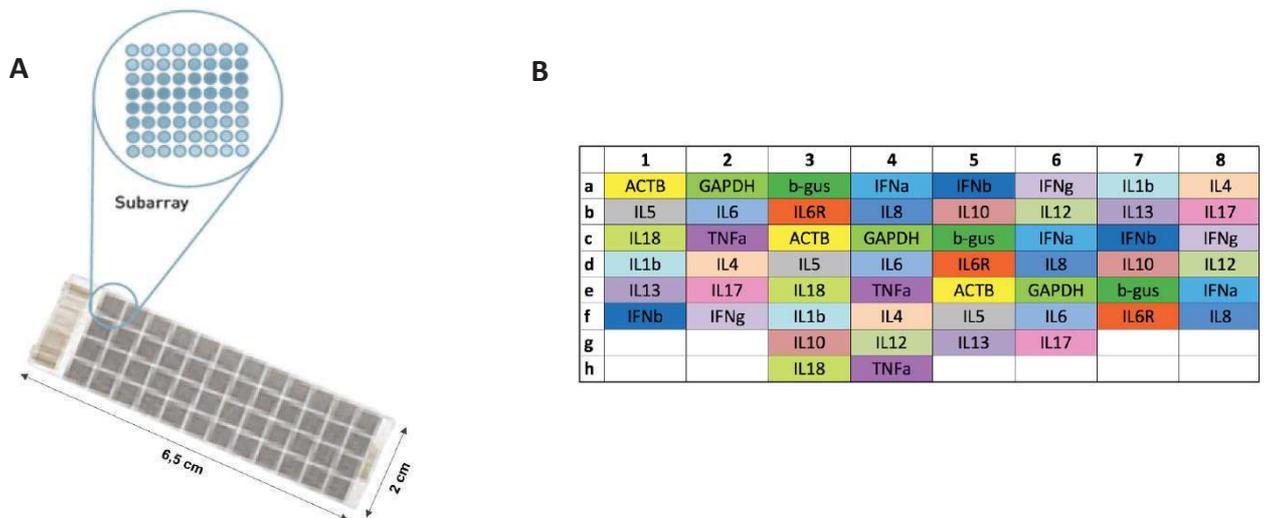


Figure 37 : Plaques OpenArray

A : Schéma d'une lame d'OpenArray (D'après le manuel du QuantStudio™ 12K Flex, (Life Technologies) ; B : Plan d'un Subarray avec la représentation des 18 cibles d'ADNc amplifiées. Les dix cases blanches correspondent aux contrôles qualités de la lame.

B.1.3.2. Pré-amplification des ADNc

Afin d'augmenter la quantité des cibles d'ADNc pour étudier l'expression des gènes en nanoscale PCR, une pré-amplification a été effectuée sur les échantillons. Pour cela, 5 µl d'ADNc ont été ajoutés à 5 µl de pool d'amorces « custom Open Array Preamp » et 10 µl de

TaqMan Pré amp Master Mix (Life Technologies). Le programme associé était le suivant : 10 minutes à 95°C, suivi de 14 cycles de 15 secondes à 95°C et 4 minutes à 60°C puis 10 minutes à 99°C. Suite à cette pré-amplification, les échantillons ont été dilués au 1/20^{ème} selon les recommandations du fournisseur.

B.1.3.3. Distribution des échantillons sur lame OpenArray®

Le mélange réactionnel a été déposé en plaque 384 puits spécifique (Life Technologies) : 2,5 µl d'échantillon et 2,5 µl de « master Mix Taqman Open Array » (Life Technologies).

Une fois scellée, la plaque a été centrifugée 1 minute à 200 g puis placée dans l'AccuFil (Life Technologies). Cet automate a distribué les échantillons sur la lame d'OpenArray à raison de 33 nl dans chacun des 64 puits de chaque subarray. Chaque lame a été validée par le dépôt du témoin négatif PCR, témoin NoRT, du témoin contrôle ARN et du témoin positif constitué d'un mélange de cinq plasmides correspondant à toutes les cibles recherchées. La lame a ensuite été fermée, huilée puis scellée selon les recommandations du fournisseur.

B.1.3.4. Nanoscale PCR sur lame OpenArray

La lame OpenArray a été placée dans le QuantStudio™ 12K Flex (Life Technologies) configuré sur le mode « OpenArray ». Les 18 cibles d'ADNc recherchées étaient : l'actine β (ACTB), la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), la β-glucuronidase (β-Gus), le récepteur IL-6R et les cytokines IFN-α, IFN-β, IFN-γ, IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 et TNF-α.

Pour pouvoir être validés et analysés, les échantillons devaient avoir un score d'amplification supérieur à 0,99, un Cq < 30 avec une courbe d'amplification caractéristique et avoir de bons répliquats.

Sur base des critères de sélection retenus, certaines cibles n'ont pas pu être analysées en OpenArray pour certains échantillons. Ainsi la recherche de l'expression des ARNm des cytokines IFN-γ, IL-10 et IL-17 du sang ont ultérieurement été analysées en qPCR en temps réel. L'IL-2, l'IL-23 et le TGF-β n'étant pas sur la puce, ces cytokines ont également été analysées par qPCR en temps réel. L'IFN-α, aussi développée sur lame OpenArray, n'a pas été analysée dans notre étude.

B.1.3.5. Réalisation des qPCR

L'expression relative a été évaluée par PCR temps réel dans cette étude pour l'interferon (IFN)- γ , l'IL-2, l'IL-10, l'IL-17, l'IL-23, et le « transforming growth factor » (TGF)- β and « tumour necrosis factor » (TNF)- α et d'un récepteur, IL-6R. Trois gènes de référence ont été systématiquement testés : la β -actine (ACTB), la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et la β -glucuronidase (β -GUS).

Chaque PCR a été réalisée avec 2,5 μ l d'ADNc dilué au 1/10^{ème} et 22,5 μ l de mix contenant les amorces, la sonde, l'eau « RNase Free » et le « TaqMan® Universal PCR MasterMix » (Life Technologies, France). Un contrôle positif PCR (échantillon exprimant la cible), et un contrôle négatif PCR (eau) ont été réalisés pour chaque plaque afin de valider chaque série de PCR. Une courbe standard de raison 10 avec une quantité connue de plasmide a également été réalisée. Le thermo-profil utilisé était le suivant : 10 minutes à 95°C suivi de 50 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C. Les PCR en temps réel ont été réalisées sur le thermocycleur « Quant Studio™ 12K Flex Real time PCR System » (Life technologies, France).

B.1.4. Analyse des données

Dans un premier temps, le logiciel NormFinder, a identifié la GAPDH et la β -GUS comme étant les meilleurs gènes de référence pour normaliser les données pour l'analyse de l'expression génique des cellules sanguines.

L'analyse des données a ensuite été effectuée sur le Cloud de Thermo Fisher Scientific. Toutes les données ont été importées sur le Cloud en séparant les données de l'OpenArray et résultant des qPCR en temps réel. Les courbes standards, avec des quantités connues de chaque cible, ont également été importées afin de déterminer la quantité absolue de chaque cible.

La quantité absolue moyenne de chaque cible a été récupérée pour chaque échantillon. Les résultats ont été exprimés en ratio cible/gènes de référence.

$$\text{Fold difference} = \frac{\text{Normalized cytokine (échantillon)}}{\text{Normalized cytokine (calibrateur)}}$$

Avec :

$$\text{Normalized cytokine (échantillon)} = \frac{\text{Quant cytokine}}{\text{moyenne Quant (GAPDH + } \beta\text{GUS)}}$$

Et :

$$\text{Normalized cytokine (calibrateur)} = \frac{\text{Quant cytokine}}{\text{moyenne Quant (GAPDH + } \beta\text{GUS)}}$$

**calibrateur : constitué par la moyenne de toutes les quantités absolues obtenues.*

B.1.5. Dosage des cytokines sériques

Le sérum a été collecté dans des tubes secs, et incubé à température ambiante 30 minutes avant d’être centrifugé 10 min à 850 g. Le sérum a ensuite été aliquoté et conservé à -80°C.

B.1.5.1. Dosage des cytokines avec le Milliplex® Map kit

Le dosage des cytokines sériques a été réalisé avec le kit EQCYTMAG-93K Milliplex® Map (Millipore) suivant les recommandations du fournisseur (Millipore). Les cytokines recherchées étaient : IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 et TNF- α . Brièvement, les échantillons et les standards du kit ont été incubés toute une nuit à 4°C sous agitation, avec les anticorps couplés à des billes magnétiques en plaque 96 puits. La plaque a ensuite été lavée trois fois avec la solution de lavage. Les anticorps de détection ont été déposés dans chaque puits, puis la plaque a été incubée 1h à température ambiante, à l’obscurité, sous agitation. La plaque a de nouveau été lavée trois fois comme précédemment puis la Streptavidin-Phycoerythrin a été ajoutée dans les puits. La plaque a ensuite été incubée pendant 30 minutes à température ambiante à l’obscurité sous agitation. Trois lavages ont à nouveau été effectués et 150 μ l de « Drive fluid » ont été ajoutés avant lecture au MagPix® (Luminex). Pour chaque cible, 50 billes ont été comptées à minima. Les résultats ont ensuite été analysés à l’aide du logiciel Milliplex Analyst®.

B.1.5.2. Dosage des cytokines sériques par technique ELISA

Les concentrations en cytokines IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, et TNF- α ont été dosées par technique ELISA « Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay » avec la méthode sandwich selon les recommandations du fournisseur (Bio-Techne). Les puits ont été sensibilisés en présence de 100 μ l de solution d'anticorps de capture Tableau 8 et incubé sur la nuit à 2-8°C. La plaque a ensuite été lavée 4 fois avec une solution de lavage (PBS-0,05 % Tween 20) puis incubée 2 heures à température ambiante avec 300 μ l de solution de blocage (PBS-2 % BSA) par puits.

Tableau 8: Préparation des anticorps de capture

Cytokines	Concentrations (μ g/ml)	Concentrations attendues	Dilution
TNF- α	72	0.4 μ g/ml	1/180
IFN- γ	72	0.4 μ g/ml	1/180
IL-1 β	144	2 μ g/ml	1/180
IL-2	360	0.8 μ g/ml	1/180
IL-4	144	0.8 μ g/ml	1/180
IL-10	144	0.8 μ g/ml	1/180
IL-6	144	0.8 μ g/ml	1/180

Tableau 9: Préparation des anticorps de détection

Cytokines	Concentrations (μ g/ml)	Concentrations attendues	Dilution
TNF- α	36	0.3 μ g/ml	1/120
IFN- γ	72	0.1 μ g/ml	1/720
IL-1 β	27	0.15 μ g/ml	1/180
IL-2	36	0.2 μ g/ml	1/180
IL-4	144	0.8 μ g/ml	1/180
IL-10	18	0.1 μ g/ml	1/180
IL-6	18	0.1 μ g/ml	1/180

Tableau 10: Reconstitution des standards

Cytokines	Diluant échantillon en μ l	Concentrations attendues
TNF- α	500	85 ng/ml
IFN- γ	500	210 ng/ml
IL-1 β	500	90 ng/ml
IL-2	500	450 ng/ml
IL-4	500	90 ng/ml
IL-10	500	90 ng/ml
IL-6	500	370 ng/ml

En parallèle, le standard fournisseur et la gamme d'étalonnage ont été préparés selon les recommandations du fournisseur (Bio-Techne) (Tableau 10). La plaque a ensuite été lavée 4 fois, puis 100 µl de standards et échantillons ont été déposés en duplicat et mis à incuber 2 heures à température ambiante. La plaque a ensuite été à nouveau lavée 4 fois puis incubée 2h à température ambiante avec 100 µl de solution d'anticorps de détection (Tableau 9) suivant les recommandations du fournisseur. La plaque a été lavée 4 fois puis incubée 30 minutes à température ambiante avec 100 µl de conjugué par puits dilué au 1/200^{ème}. La plaque a ensuite été lavée à 4 reprises puis incubée 20 minutes à température ambiante avec 100 µl de substrat. Enfin, 50 µl d'une solution d'arrêt (PBS-2 % BSA) a été distribuée dans chacun des puits. Les densités optiques ont été lues au spectrophotomètre « Revelation Quicklink » (ThermoLabSystem) à 450 nm. Les données ont ensuite été exprimées en pg/ml à partir de la gamme d'étalonnage.

B.1.6. Analyses statistiques

L'effet du challenge (foin sec *vs.* foin « à la vapeur »), du temps (J-2 *vs.* J+5) et du statut du cheval (CTL *vs.* AES) sur la réponse immunitaire systémique, a été analysé par une ANOVA (General Linear Model), avec l'âge en covariance ; un test post-hoc de Tuckey-Kramer a été effectué lorsque nécessaire. Les corrélations ont été déterminées par le coefficient de corrélation de Pearson. Les différentes analyses ont été menées en utilisant Prism 7c (GraphPad) et NCSS12 (NCSS – LLC).

B.2. Résultats

Après validation de la technologie (Cf. Article 2 en préparation, annexe 4), la quantification de l'expression des ARNm des cytokines du sang a été effectuée par la méthode Open Array® et par qPCR pour l'IL-2, l'IL-23 et le TGF-β ainsi que les cytokines n'ayant pas passé les critères de qualité de chaque matrice.

Tout d'abord aucun effet « challenge » (foin « à la vapeur » *vs.* foin sec) n'a été observé sur l'expression des ARNm des cytokines des cellules présentes dans le sang. Les expressions des ARNm de l'IL-5 ; l'IL-6 ; l'IL-10 ; l'IL-12 ; l'IL-23 et du TGF-β sont significativement supérieures chez les chevaux CTL *vs.* AES (Figure 38). De plus, il y a une corrélation négative de l'expression des ARNm de l'IL-6 et de l'IL-23 avec le score clinique, le score de mucus et

la proportion de grands lymphocytes pour l'IL-6. Les expressions géniques de l'IL-12 et de l'IL-23 sont corrélées positivement avec la proportion de petits lymphocytes dans la numération formule.

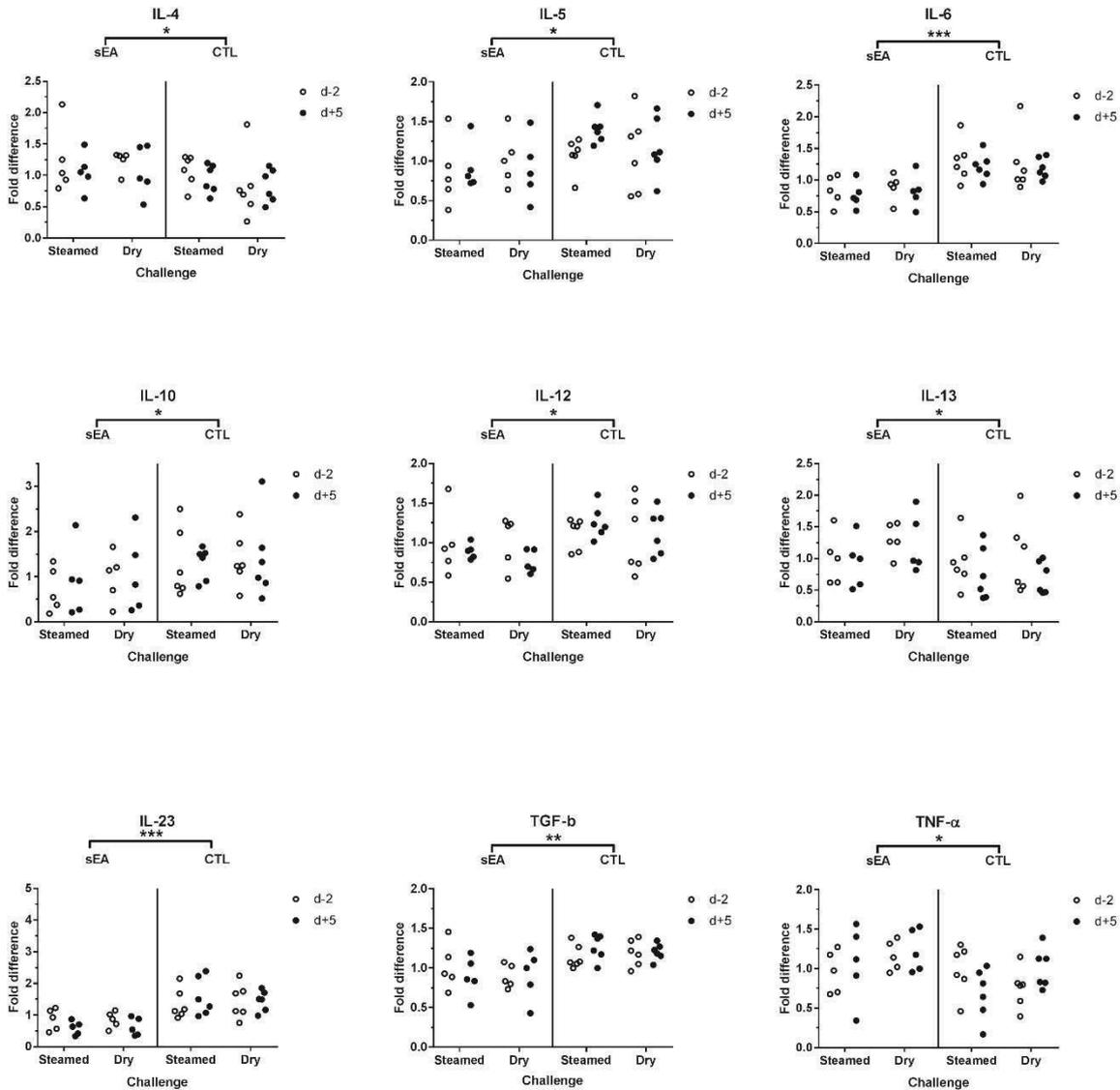


Figure 38 : Expression des ARNm dans le sang de chevaux CTL et AES pré et post-challenge *sEA* (ou *AES*) : *asthme équin sévère* ; *CTL*, *contrôle* ; *d-2* (*J-2*), 2 jours avant le challenge ; *d+5* (ou *J+5*), 5 jours après le challenge ; *dry* (ou *sec*), foin sec ; *steamed* (*HG*), foin « à la vapeur ». *, **, *** différences significatives selon le statut (respectivement $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$). Chevaux *CTL* ($n=6$) et chevaux *AES* ($n=5$).

Les expressions des ARNm de l'IL-4, l'IL-13 et du TNF- α sont significativement augmentées chez les chevaux AES quel que soit le challenge (Figure 38). De plus l'expression de l'IL-2 est à la fois significativement augmentée chez les chevaux AES avant le début de chaque challenge tandis que l'IL-18 est significativement augmentée après le challenge ; une interaction

timing/statut est également observée avec une augmentation de l'expression chez les chevaux AES uniquement (Figure 39). Aucun effet significatif n'a été observé sur les expressions des ARNm des cytokines IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1 β , IL-8, IL-17 et IL-6R.

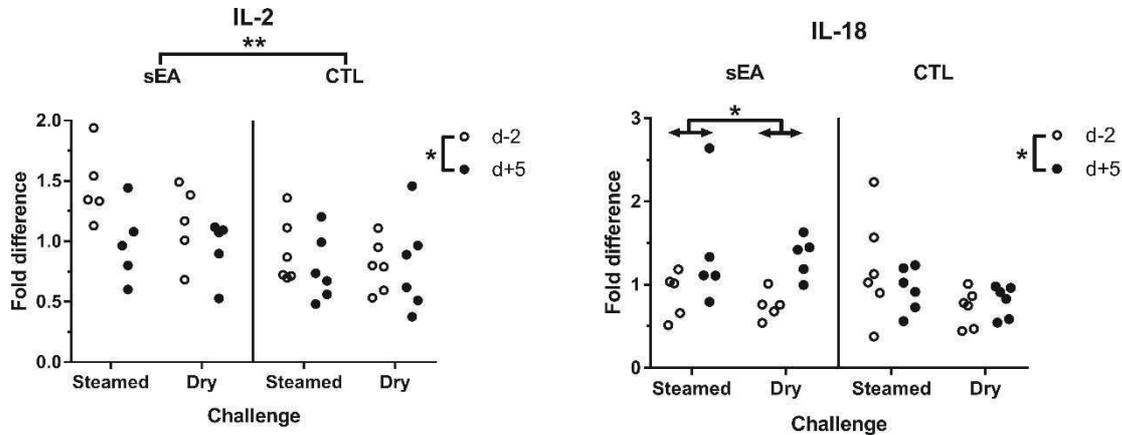


Figure 39 : Expression des ARNm des cytokines dans le sang des chevaux CTL et AES pré et post-challenge. *sEA* (ou *AES*), *asthme équin sévère* ; *CTL*, *contrôle* ; *d-2* (ou *J-2*), *2 jours avant le challenge* ; *d+5* (ou *J+5*), *5 jours après le challenge* ; *dry* (ou *sec*), *foin sec* ; *steamed* (*HG*), *foin « à la vapeur »*. *, ** *différences significatives (respectivement $p < 0,05$; $p < 0,01$)*. Chevaux *CTL* ($n=6$) et chevaux *AES* ($n=5$).

Les cytokines IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α ont aussi été dosées par le kit Milliplex® et par la technique ELISA. Aucun résultat n'ayant été obtenu avec le kit EQCYTMAG-93K Milliplex®, dû à un manque de sensibilité de la méthodologie, seuls les résultats issus des ELISA ont été analysés. Les chevaux AES présentaient des concentrations sériques en IL-2 (692 ± 1250 ; $p = 0,0162$) et IL-4 (91 ± 147 ; $p = 0,0298$) significativement plus élevées que les chevaux CTL (38 ± 46 et 18 ± 13 , respectivement). Aucune différence significative n'a été observée pour les autres cytokines.

C. Réponse respiratoire au challenge d'exposition *in vivo* à du foin « à la vapeur » ou non

L'AES étant une inflammation des voies respiratoires, les réponses cliniques, cytologiques et immunitaires respiratoires ont été étudiées chez les chevaux AES et CTL en réponse à une stimulation *in vivo* au foin soumis ou non « à la vapeur ».

C.1. Réponses clinique, cytologique et immunitaire au niveau du LBA

C.1.1. Matériel et méthodes

C.1.1.1. Recherche de virus dans les écouvillons naso-pharyngés

Les principaux virus respiratoires ont été recherchés dans les voies respiratoires, afin d'exclure toute potentielle implication dans l'étude. Toutes les qPCR, basées sur la norme AFNOR NF-U-47-600-2 ont précédemment été validées sur des échantillons respiratoires d'intérêt : Ecouvillon Naso-Pharyngés (ENP) et lavage trachéal (Hue et *al.*, 2014). La détection des virus suivants a été recherchée : Herpesvirus équin (HVE) -1, -4, Virus de la Rhinite équine -A (ERAV) et Virus de la Rhinite équine- B (ERBV).

Le milieu de transport des ENP a été centrifugé (2 000 g ; 15 min ; 4°C), et leurs culots ont été remis en suspension avec 500 µl de leur surnageant. Le protocole mis en place au laboratoire (Doubli-Bounoua et *al.*, 2016) a été suivi. L'extraction de l'ADN/ARN a été obtenue à partir de 140 µl de chaque échantillon, en utilisant le kit QIAamp® ARN viral Mini (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fournisseur. Chaque extraction comprenait un contrôle négatif (matrice négative, dépourvue des virus recherchés). Les extraits ADN/ARN ont ensuite été stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les qPCR spécifiques des virus ont été effectuées dans un volume total de 25 µl, et comprenaient un contrôle négatif (eau distillée) et des dilutions en série d'un ADN/ARN synthétique (respectivement les plasmides et les transcriptions des plasmides pour chaque région ciblée). L'amplification de la séquence de synthèse "myIC" (Deer et *al.*, 2010) a également été effectuée, afin de contrôler l'absence d'inhibiteurs de la PCR dans les extraits d'acide nucléique.

C.1.1.2. Analyse cytologique

Afin de connaître les proportions des différents types cellulaires présents dans le liquide du LBA, un comptage cellulaire total et un comptage cellulaire différentiel ont été réalisés, pour chaque poumon. Le comptage a été effectué sur 300 leucocytes.

Dans un premier temps deux lames d'étalements directs et une lame cytocentrifugée (72 g, 10 minutes ; Cytospin 4ND, Thermo Scientific) ont été préparées dans les 12 heures suivant le prélèvement. Les lames ont ensuite été colorées au May-Grünwald-Giemsa et ont été conservées à température ambiante, jusqu'à leur lecture. De plus, un comptage du nombre total de cellules nucléées et des hématies a été réalisé par un automate (ADVIA 120, Siemens) à

partir de l'échantillon initial. Les investigations cytologiques des liquides de lavages bronchoalvéolaires ont été menées en aveugle.

C.1.1.3. Extraction des ARN et synthèse de l'ADN complémentaire

Les ARN du LBA ont été extraits avec le kit d'extraction RNeasy Plus Mini kit (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

Tous les ARN ont été conservés à -80°C avant utilisation. La concentration et la pureté des ARN totaux ont été dosés au NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermoscientific France). L'intégrité des ARN a été évaluée avec le RNA 6000 Nano kit (Agilent) sur le 2100 Bioanalyzer (Agilent). Le RNA integrity number (RIN) était de 9.7 ± 0.2 pour les échantillons de LBA.

La synthèse de cDNA a été réalisée à partir de 200 ng d'ARN avec le SuperScript® VILO™ cDNA synthesis kit (Life Technologies). Cette synthèse a été réalisée selon les recommandations du fournisseur. Un témoin NoRT a été réalisé en parallèle sans l'enzyme ainsi qu'un contrôle de RT-PCR utilisant de l'ARN synthétique fourni dans le kit. Le programme suivant a ensuite été appliqué sur les échantillons, 10 min à 25°C, 1h à 42°C et 5 minutes à 85°C. Les ADNc obtenus ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation (Cf. Article 1 annexe 3).

C.1.1.4. Expression génique des cytokines dans le LBA

L'expression relative de 16 cytokines et d'un récepteur a été évaluée par PCR temps réel dans cette étude : interféron (IFN)- γ , interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-23, transforming growth factor (TGF)- β and tumour necrosis factor (TNF)- α . Trois gènes de référence ont été systématiquement testés : la β -actine (ACTB), la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et la β -glucuronidase (β -GUS). Les systèmes PCR (amorces et sondes) utilisées pour les cytokines et les gènes de référence sont donnés dans l'article 1 (Cf. Article 1 annexe 3).

Chaque PCR a été réalisée avec 2,5 μ l d'ADNc dilué au 1/10^{ème} et 22,5 μ l de mix contenant les amorces, la sonde, l'eau RNase Free et le TaqMan® Universal PCR MasterMix (Life Technologies, France). Un contrôle positif PCR (échantillon exprimant la cible), et un contrôle négatif PCR (eau) ont été réalisés pour chaque plaque afin de valider chaque série de PCR. Une courbe standard de raison 10 avec une quantité connue de plasmide a également été réalisée. Le thermo-profil utilisé était le suivant : 10 minutes à 95°C suivi de 50 cycles de 15 secondes

à 95°C et 1 minute à 60°C. Les PCR en temps réel ont été réalisées sur le thermocycleur Quant Studio™ 12K Flex Real time PCR System (Life technologies, France).

C.1.1.5. Analyse des données

Comme pour l'expression des ARNm du sang, les données ont été analysées avec le logiciel NormFinder. La GAPDH et la β -GUS ont été retenues pour l'analyse de l'expression des ARNm des cytokines des cellules du LBA.

Les données ont été analysées comme précédemment décrit dans la partie 1 : B.1.4. et les statistiques effectuées ont été décrites dans la partie 1 : B.1.6.

C.1.2. Examen clinique respiratoire

Les chevaux de l'étude étaient négatifs aux principaux virus respiratoires (EHV-1-4 ; ERAV et ERBV) testés par qPCR sur les écouvillons naso-pharyngés.

Concernant le score clinique noté sur 21 suivant l'annexe 2, aucun effet statut (AES vs. CTL), temps (J-2 vs. J+5) ou challenge (Foin sec vs. foin « à la vapeur ») n'a été observé. Cependant une interaction significative ($P = 0,049$) a été observée pour le score clinique entre le type de challenge et le temps (Figure 40 A). De plus, le score moyen de mucus trachéal était significativement supérieur chez les chevaux AES comparé aux chevaux CTL ($p = 0,005$) et était significativement supérieur à J+5 ($p = 0,024$) comparé à J-2, quel que soit le challenge. Enfin, une interaction entre le challenge et le temps a été observée sur le score de mucus ($p = 0,022$) (Figure 40 B).

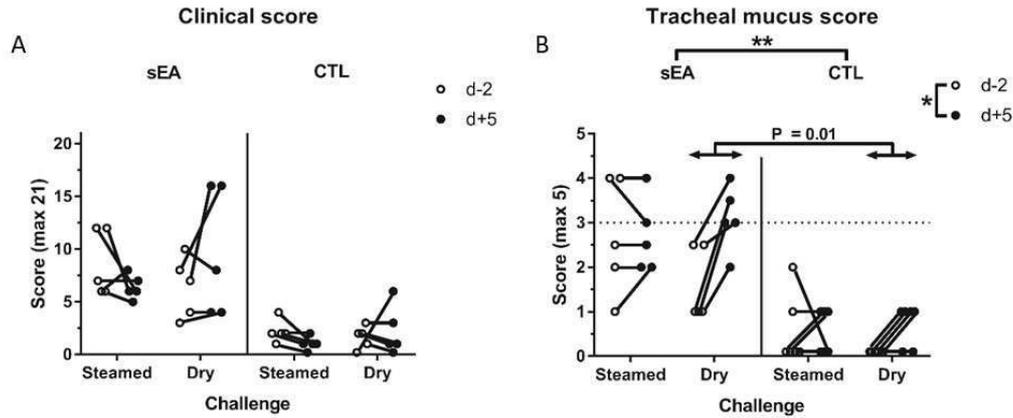


Figure 40: Score clinique (A) et score de mucus trachéal (B) pré et post-challenge *sEA* (ou *AES*): « *Severe Equine Asthma* »; *CTL*, *Contrôle*; *d-2* (ou *J-2*), 2 jours avant le challenge; *d+5* (ou *J+5*), 5 jours après le challenge ; *dry* (ou *sec*), foin sec ; *steamed* (*HG*), foin « à la vapeur ». *, ** différences significatives (respectivement $p < 0,05$; $p < 0,01$). Interactions significatives ($P < 0,05$) entre le challenge (« *steamed* », « *dry* ») et le temps (*d-2*, *d+5*); La *p*-value correspond au test post-hoc. Chevaux *CTL* ($n=6$) et chevaux *AES* ($n=5$).

C.1.3. Profils cytologique et cytokinique des LBA

Concernant la cytologie du LBA, aucun effet du challenge, du temps ou du statut n'a été observé sur le volume de liquide collecté (Tableau 11). Le nombre total de cellules et le pourcentage de cellules métachromatiques étaient significativement plus élevés chez les chevaux *AES* comparés aux chevaux *CTL* (respectivement $P = 0,037$; $P = 0,001$). Le pourcentage de lymphocytes dans le LBA était significativement diminué à *J+5* comparé à *J-2* ($P = 0,001$). Une interaction significative entre le statut de l'animal et le temps ($P = 0,009$) a été observée pour le pourcentage de macrophages dans le LBA. (Tableau 11). Aucun effet n'a été observé sur le pourcentage d'éosinophiles et de macrophages.

Tableau 11 : Cytologie du LBA pré et post-challenge chez les chevaux CTL et AES

	Chevaux AES				Chevaux CTL			
	Foin HG		Foin sec		Foin HG		Foin sec	
	J-2	J+5	J-2	J+5	J-2	J+5	J-2	J+5
Volume récupéré (%)	42 (29 – 44)	44 (37 – 48)	42 (33 – 50)	38 (29 – 44)	58 (47 – 65)	59 (51 – 70)	58 (43 – 68)	595 (46 – 64)
Nombre total de cellules * (/mm ³)	415 (285 – 655)	250 (220 – 565)	400 (370 – 460)	310 (230 – 690)	320 (213 – 475)	330 (263 – 428)	320 (210 – 488)	450 (373 – 515)
Cellules Metachromatiques * (%)	2.0 (1.8 – 3.0)	1.0 (0.8 – 1.3)	1.0 (1.0 – 2.0)	1.0 (1.0 – 2.0)	2.0 (1.0 – 3.8)	2,5 (1.3 – 3.8)	3.0 (2.0 – 3.8)	2.0 (2.0 – 2.8)
Eosinophiles (%)	0.0 (0.0 – 0.0)	0.0 (0.0 – 4.3)	1.0 (0.0 – 3.8)	2.5 (1.0 – 6.3)				
Macrophages (%)	51 (50 – 54)	40 (34 – 45)	40 (35 – 50)	45 (32 – 48)	55 (51 – 64)	56 (51 – 68)	49 (41 – 64)	56 (51 – 60)
Lymphocytes # (%)	36 (29 – 38)	32 (56 – 45)	46 (29 – 49)	32 (25 – 34)	39 (33 – 43)	30 (26 – 39)	41 (29 – 48)	34 (27 – 36)

*AES, Asthme équin sévère ; CTL contrôle ; J-2, deux jours avant le début du challenge; J+5, cinq jours après le challenge ; * différences significatives entre les groupes (AES vs. CTL) ; # différence significative selon le temps (J+5 vs. J-2). Moyenne, (valeurs min et valeurs max). Chevaux CTL (n=6) et chevaux AES (n=5).*

Le pourcentage de neutrophiles dans le LBA était significativement plus élevé chez les chevaux AES comparé aux chevaux CTL ($p = 0,011$), et était aussi significativement augmenté à J+5 comparé à J-2 (Figure 41), cependant aucune interaction n'a été observée entre le challenge et le temps. Aucune différence significative n'a été observé entre le pourcentage de neutrophiles et le poumon prélevé quel que soit le challenge et le temps de prélèvement. De plus, aucun effet challenge n'a été observé selon le statut du cheval sur la cytologie du LBA. Enfin, une corrélation positive a été observée pour le pourcentage de neutrophiles avec le score clinique et le score de mucus trachéal. Le pourcentage de macrophages dans le LBA était corrélé négativement aux scores cliniques et de mucus.

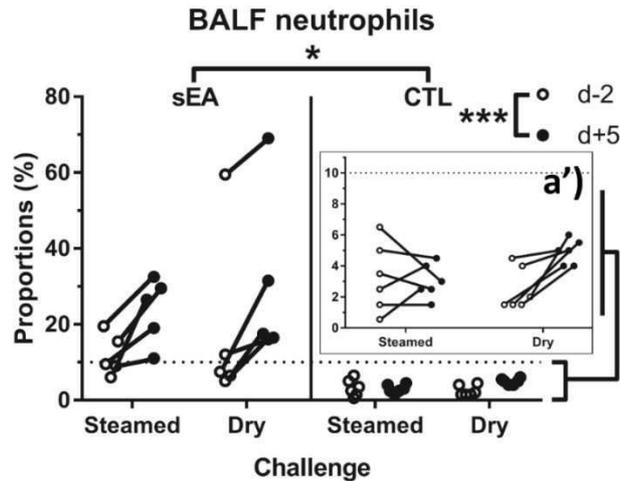


Figure 41 : Pourcentage moyen en neutrophiles dans le LBA des chevaux AES et CTL pré et post-challenge. *sEA* (ou AES), « Severe Equine Asthma » ; CTL, Contrôle ; d-2 (ou J-2), 2 jours avant le challenge ; d+5 (ou J+5), 5 jours après le challenge; dry (ou sec), foin sec ; steamed (HG), foin « à la vapeur ». *, valeurs significativement différentes selon le statut (*sEA* vs. CTL) ($p < 0,05$) ; ***, valeurs significativement différentes selon le temps (d-2 vs. d+5) ($p < 0,001$). a' : focus sur les proportions de neutrophiles des chevaux CTL. Chevaux CTL ($n=6$) et chevaux AES ($n=5$).

En plus de la cytologie du LBA, l'effet du foin « à la vapeur » a été investigué sur l'expression génique de cytokines du LBA. Un effet statut a été observé sur l'expression des ARNm de l'IL-4, l'IL-17 et du TNF- α . L'expression des ARNm de l'IL-4 était significativement plus faible ($P = 0,022$) et celle de l'IL-17 ($P < 0,001$) et du TNF- α ($P = 0,006$) significativement plus élevée dans le LBA des chevaux AES comparés aux chevaux CTL. Aucun effet statut n'a été observé sur l'expression génique des autres cytokines. De plus, l'expression des ARNm de l'IL-10 était significativement supérieure à J+5 comparé à J-2 ($P < 0,001$) quel que soit le statut du cheval. Chez les chevaux AES, une interaction significative entre le statut et le temps a été observée pour l'expression des ARNm de l'IL-1 β , IL-6R, IL-18 et IL-23 (Figure 42).

Aucune variation d'expression des ARNm des cytokines IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IFN- γ et TGF- β n'a été observée dans le LBA quel que soit le challenge, le temps de prélèvement ou le statut du cheval.

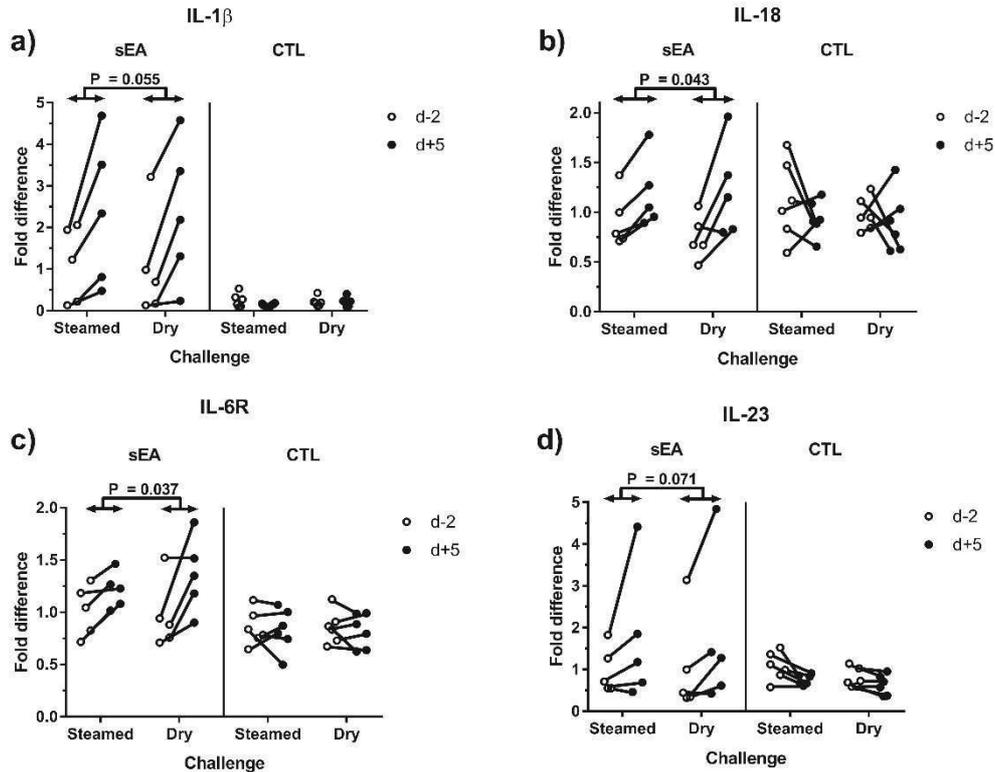


Figure 42 : Expression des ARNm des cytokines dans le LBA des chevaux CTL et AES pré et post-challenge. a) interleukine (IL)-1 β ; b) IL-18; c) IL-6R; d) IL-23. sEA (ou AES), asthme équin sévère ; CTL, contrôle ; d-2 (ou J-2), 2 jours avant le challenge ; d+5 (ou J+5), 5 jours après le challenge ; dry (ou sec), foin sec ; steamed (HG), foin « à la vapeur ». Interactions significatives ($p < 0,05$) entre le statut du cheval (sEA, CTL) et le temps (d-2, d+5). Les p-values correspondent aux analyses du test post-hoc de Tukey-Kramer's. Chevaux CTL (n=6) et chevaux AES (n=5).

L'expression des ARNm des cytokines IL-1 β , IL-6, IL-6R, IL-8 et IL-23 était significativement corrélée avec le pourcentage de neutrophiles dans le LBA (Figure 43).

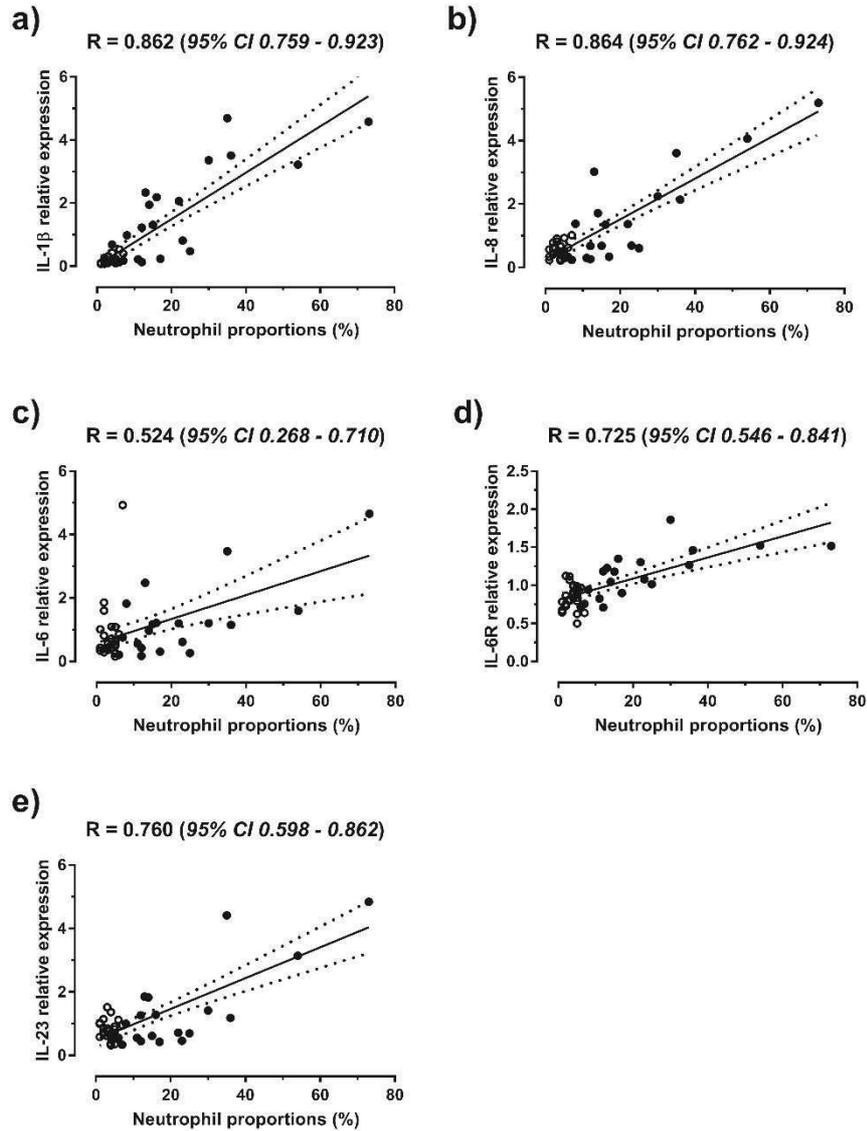


Figure 43 : Corrélation entre l'expression relative des cytokines et la proportion en neutrophiles dans le LBA pré et post-challenge (intervalle de confiance : 95%).
 a) interleukine (IL)-1 β ; b) IL-8; c) IL-6; d) IL-6R; e) IL-23. Ronds blanc: chevaux CTL (n=6); ronds noirs : chevaux AES (n=5).

C.2. Réponse immunitaire des macrophages alvéolaires

Les macrophages alvéolaires sont les premières cellules de la réponse immunitaire au niveau pulmonaire. Ainsi leur profil cytokinique a été étudié afin d'observer l'effet du foin « à la vapeur » sur la réponse des macrophages alvéolaires issus du LBA des chevaux ayant participé au challenge.

C.2.1. Matériel et méthodes

C.2.1.1. Isolement des macrophages alvéolaires équins

Les macrophages alvéolaires ont été isolés à partir des LBA des poumons gauches des chevaux. Les prélèvements ont été effectués à J-2 et J+5 de chaque challenge chez les chevaux CTL et AES. Les LBA collectés ont été aliquotés en tubes de 50 ml et centrifugés 10 minutes à 500 g à 4°C. Les culots ont été repris dans du PBS (Eurobio) et poolés par cheval. Les culots cellulaires ont été de nouveau centrifugés à 500 g pendant 10 minutes. Le filtrat a été repris dans du PBS et filtré sur « Sterile Cell stainer » 100 µm (FisherBrand®). Le liquide récupéré a été centrifugé 10 minutes à 500 g et le culot a été repris dans du milieu RPMI 1640 (Eurobio) à 37°C complété avec 5% de Serum de Veau Fœtal (SVF) (Eurobio) et 1% de Penicillin Steptomycin Amphotericin (Eurobio) puis ensemencé en flasque 75 cm². Les cellules ont ensuite été incubées sur la nuit à 37°C avec 5% de CO₂. Le surnageant a été éliminé et les cellules rincées au PBS chaud 3 fois puis trypsinées avec 3 ml de trypsine versène EDTA (Eurobio). Les cellules ont été centrifugées 10 minutes à 500 g. Les culots ont été repris dans 5 ml de PBS puis 2 aliquots de 1 ml et 1 aliquot de 3 ml ont été centrifugés 10 minutes à 500 g. Les 2 culots de 1 ml ont été repris dans 1 ml de « RNA Protect Cell Reagent » puis congelés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

C.2.1.2. Expression génique des cytokines des MA

L'extraction des ARN totaux a été réalisée à partir des MA isolés du poumon gauche conservé dans le « RNA Protect Cell reagent ». L'extraction a été réalisée comme précédemment décrit dans la partie 1 : C.1.1.3.

L'expression des ARNm des cytokines des MA a été investiguée par OpenArray suivant le protocole décrit dans la partie 1 : B.1.3.3. Sur la base des critères de sélection retenus, certaines cibles n'ont pas pu être analysées en OpenArray pour certains échantillons. Ainsi, la recherche de l'expression génique des cytokines IFN- γ , IL-4, IL-10 et IL-17 a été effectuée par PCR quantitative. L'IL-2, l'IL-23 et le TGF- β n'étant pas sur la puce, ces cytokines ont été analysées par qPCR en temps réel comme décrit dans la partie 1 : B.1.3.5.

C.2.1.3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées suivant la procédure décrite en Partie 1 : B.1.6.

C.2.2. Résultats

Les expressions des ARNm des cytokines IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-12 et TNF- α sont significativement plus élevées chez les chevaux AES, comparés aux chevaux CTL. Une interaction temps/statut et une interaction challenge/statut ont été observées pour l'IL-6, et une interaction temps/challenge a été observée pour l'IL-6R. Le TGF- β est significativement moins exprimé chez les chevaux AES comparé aux chevaux CTL (Figure 44). Aucune différence significative n'a été observée pour l'IL-4, l'IL-10, l'IL-17, l'IL-23, l'IFN- γ et l'IFN- β .

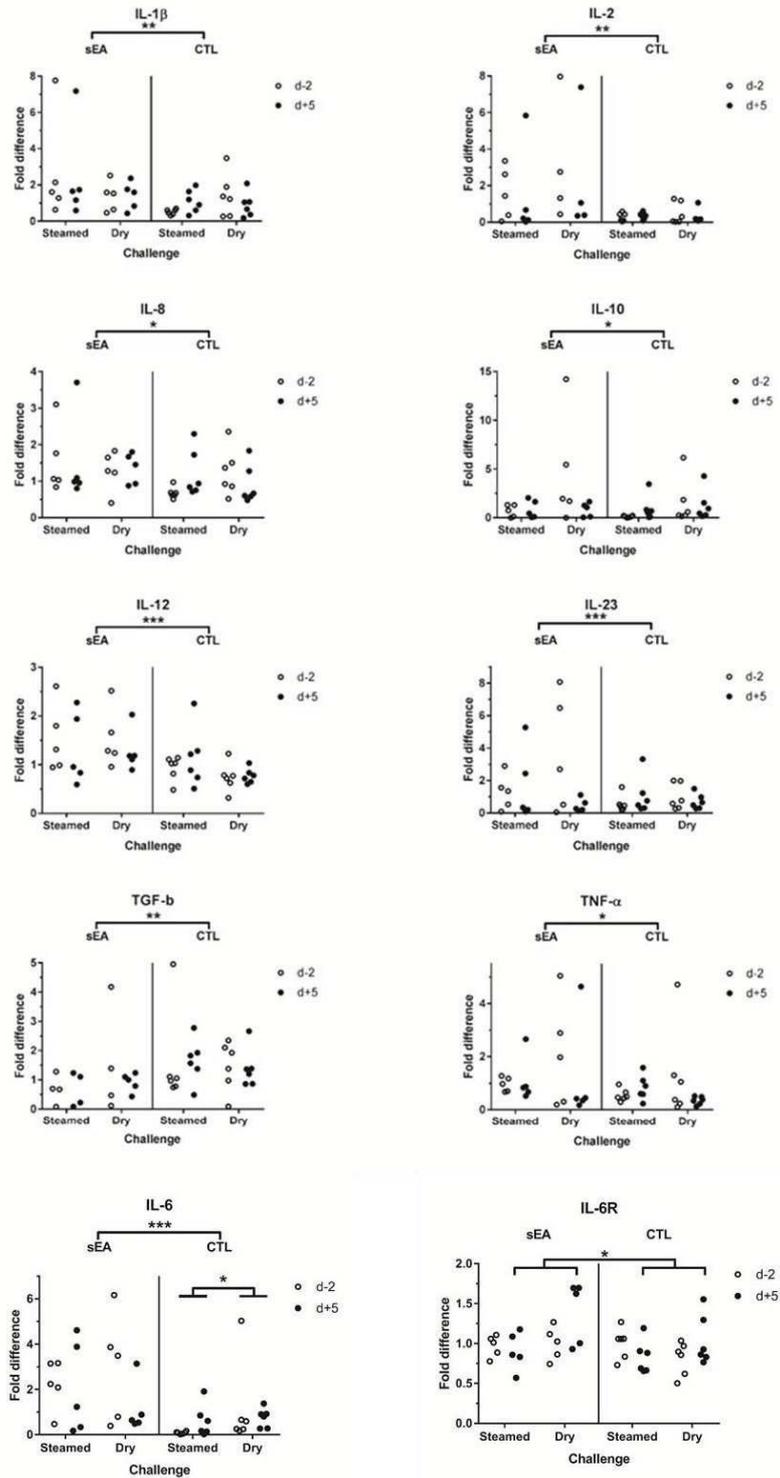


Figure 44 : Expression des ARNm des cytokines des macrophages alvéolaires des chevaux CTL et AES pré et post-challenge. *sEA* (ou *AES*), *asthme équin sévère* ; *CTL*, *contrôle* ; *d-2* (ou *J-2*), 2 jours avant le challenge ; *d+5* (ou *J+5*), 5 jours après le challenge ; *dry* (ou *sec*), foin sec ; *steamed* (*HG*), foin « à la vapeur ». *, **, *** différences significatives (respectivement $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$). Chevaux *CTL* ($n=6$) et chevaux *AES* ($n=5$).

L'IL-18 était par ailleurs significativement augmentée ($p = 0,0003$) post-challenge au foin sec, et ce quel que soit le statut du cheval (Figure 45).

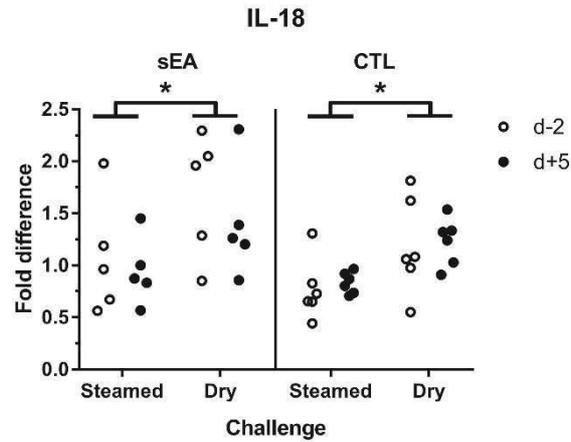


Figure 45 : Expression des ARNm de l'IL-18 par les macrophages alvéolaires des chevaux CTL et AES pré et post-challenge. *sEA* (ou *AES*), *asthme équin sévère* ; *CTL*, *contrôle* ; *d-2*, 2 jours avant le challenge ; *d+5*, 5 jours après le challenge ; *dry* (ou *sec*), *foin sec* ; *steamed* (*HG*), *foin « à la vapeur »*. * différences significatives selon le challenge ($p < 0,05$). Chevaux CTL ($n=6$) et chevaux AES ($n=5$).

Une corrélation significative entre l'IL-1 β ; l'IL-6 ; l'IL-8 ; l'IL-12 ; et le TNF- α a été observée. Aucune corrélation n'a été observée entre l'expression génique des différentes cytokines issues du LBA et des MA correspondants.

D. Discussion partielle

D.1. Chevaux

Ne pouvant disposer de chevaux expérimentaux dans le cadre de notre étude, les chevaux ayant participé au challenge étaient des chevaux de loisir appartenant à des particuliers. Douze chevaux ont été recrutés : 6 chevaux atteints d'asthme sévère (en rémission clinique) et 6 CTL, soumis à un examen clinique préalable, ce qui représente le nombre minimal (et le plus fréquemment utilisé) de chevaux pour valider l'interprétation des résultats. Le recrutement des chevaux contrôles a été difficile. En effet, les critères d'inclusion incluaient notamment un pourcentage de neutrophiles $< 10\%$ dans le LBA. Préalablement au challenge, un lavage bronchoalvéolaire dans les deux poumons a ainsi été réalisé sur les potentiels chevaux contrôles. Sur 14 chevaux testés, seuls 6 ont répondu aux critères d'inclusion permettant de les considérer comme chevaux CTL.

Les chevaux AES ont préalablement été diagnostiqués par les vétérinaires d'Oniris (Nantes). Une des difficultés rencontrées pour les chevaux AES est que, bien qu'ils aient tous été diagnostiqués AES, le stade de la maladie pouvait vraisemblablement varier parmi les 6 chevaux recrutés. Enfin, l'âge moyen entre les groupes de chevaux était significativement différent, avec des chevaux CTL significativement plus jeunes que les chevaux AES. Ce facteur a donc été contrôlé pour toutes les analyses statistiques afin de limiter son effet.

D.2. Design de l'étude

Nous n'avons pas effectué une étude en cross over qui aurait permis d'avoir 3 chevaux AES et 3 chevaux CTL nourris d'abord avec du foin sec puis avec du foin « à la vapeur » tandis que les 6 autres chevaux auraient été nourris d'abord avec le foin « à la vapeur » puis avec le foin sec. En effet, le choix a été fait de nourrir tous les chevaux avec le foin « à la vapeur » lors du 1^{er} challenge et de les nourrir avec du foin sec lors du 2^{ème} challenge. Comme les chevaux inclus dans l'étude étaient des chevaux de propriétaires, il n'était pas envisageable ni souhaitable de déclencher une crise d'asthme chez ces chevaux. Ainsi, l'intérêt de commencer par le foin « à la vapeur » était d'éviter de provoquer une crise d'asthme chez les chevaux AES lors de la première période qui aurait conduit à un traitement des animaux et donc à leur exclusion de l'étude. En ne les soumettant au foin sec que lors du 2^{ème} challenge, nous pouvions traiter tous les chevaux AES autant de temps que nécessaire suite à l'étude.

De plus, durant l'étude, les chevaux étaient placés dans des paddocks en extérieur afin d'éviter l'effet du confinement qu'on aurait pu avoir en les maintenant au box. En effet, Holcombe et *al.*, (2001) ont montré que le confinement des chevaux en box était associé à une inflammation des voies respiratoires chez les chevaux, ainsi il a été choisi de maintenir les chevaux aux paddocks durant tout le challenge. Cependant cela peut aussi être un inconvénient potentiel. En effet, les paramètres extérieurs ne peuvent être que difficilement maîtrisés, contrairement à une étude menée dans une station expérimentale confinée. Le challenge ayant été réalisé au printemps, on peut s'interroger sur l'effet potentiel de pollens présents dans l'environnement lors du challenge sur la fonction respiratoire des chevaux. Bullone et *al.*, (2016) et Costa et *al.*, (2006), avaient, en effet, montré une corrélation entre la teneur en pollen de l'air et les scores cliniques chez les chevaux AES. Les arbres majoritairement présents autour des paddocks étaient des saules et des chênes. Il s'agit d'arbres ayant un potentiel allergisant modéré avec une production de pollen modérée concentrée en mars-avril pour le chêne et en février-mars

pour le saule (RNSA, 2007) ce qui ne correspondait pas à nos périodes de challenge et limite ainsi leurs potentiels effets sur nos résultats.

D.3. Caractérisation du foin

Au préalable du challenge, le foin a été caractérisé en termes de bactériologie, mycologie, endotoxines, β -D-glucane et valeurs nutritionnelles. Le foin est un facteur majeur pouvant initier ou maintenir l'asthme chez les chevaux. L'effet synergique des différents composants du foin a été mis en avant dans plusieurs études. Lors du retrait de ces antigènes de l'environnement du cheval, il a été observé une rémission des chevaux atteints d'AES. La plupart des challenges effectués dans la littérature, ont soumis des chevaux à des foins poussiéreux, le plus souvent dans un box confiné. Dans notre étude le but était de déterminer les réponses clinique, cytologique et immunitaire des voies respiratoires lorsque les chevaux sont exposés à du foin purifié ou non « à la vapeur ». Contrairement à la plupart des challenges préalablement effectués, le foin utilisé était non moisi et de qualité standard afin de rester dans des conditions représentatives des différentes écuries en France qui nourrissent les chevaux avec du foin.

Comme montré précédemment, « purifier » le foin à la vapeur, diminue significativement la concentration en moisissures (Moore-Colyer et *al.*, 2014). En santé humaine, un seuil de 10^5 UFC/m³ a été défini comme seuil pouvant induire une inflammation respiratoire (Eduard, 2009). « Purifier » le foin à la vapeur a permis de diminuer la teneur en moisissures en dessous de ce seuil.

Cependant la teneur en moisissures a été évaluée uniquement sur gélose et l'identification des moisissures a été ciblée essentiellement sur les *Aspergillus*. Il aurait été intéressant de pouvoir effectuer un criblage complet en utilisant une méthodologie non ciblée telle que la spectrométrie en masse (Maldi-Tof) afin d'identifier tous les éléments présents dans le foin. Cela aurait permis d'être beaucoup plus précis sur la détection des différents allergènes du foin.

Concernant la teneur en poussières inhalables et respirables, dans la zone respirable des chevaux, nos résultats concordent avec les études précédentes. Les prélèvements ont été effectués dans la zone respirable du cheval et non dans le foin directement ce qui explique le peu d'échantillons prélevés. Seuls deux chevaux ont été équipés de pompes portatives et de filtres pour chacun des challenges ce qui limite l'interprétation de nos résultats. De plus, la quantité de poussières respirables inhalée est très dépendante du comportement du cheval lorsqu'il mange son foin comme l'avait précédemment observé Ivester et *al.* (2012). Enfin, la

concentration en endotoxines est 5,7 fois plus faible dans le foin purifié comparé au foin sec dans la zone respirable du cheval, ce qui est comparable aux résultats précédemment publiés (Wittacker et *al.*, 2009).

Les diverses analyses effectuées sur le foin ont montré une grande variabilité de la composition entre différentes bottes de foin d'un même lot. Cela pose la question de la standardisation des challenges à l'avenir. En effet, il serait sans doute préférable d'utiliser des HDS (Pirie et *al.*, 2002a) soumis par inhalation aux chevaux. Cette suspension de HDS pourrait ainsi être caractérisée et standardisée, afin d'avoir exactement le même type d'allergène tout au long du challenge et également d'un challenge à un autre.

D.4. Scores cliniques et inflammation

Les chevaux ont été placés au pâturage pendant 6 semaines avant le début du challenge, cependant des scores cliniques et des résultats de cytologies élevés ont été décelés chez 2 chevaux parmi les chevaux AES, ce qui peut s'expliquer par la nature persistante de ce syndrome. Ce score élevé de 12/21 pour ces chevaux diminue d'ailleurs de moitié après le challenge au foin purifié. Ainsi malgré une interaction significative entre le challenge et le temps (J-2 vs J+5), la variabilité individuelle pour les scores cliniques pourrait largement influencer les résultats. De plus, la durée du challenge d'exposition au foin était courte et peut s'avérer insuffisante pour observer un effet significatif du foin « à la vapeur » sur les signes cliniques et le score de mucus trachéal. Puis le challenge a été réalisé en extérieur ce qui peut diluer l'effet spécifique du foin sur les voies respiratoires. Enfin au-delà de l'effet bénéfique significatif du foin « à la vapeur » sur le score de mucus, d'un point de vue statistique, les observations faites sur le terrain au quotidien vont en faveur du foin « à la vapeur » pour les chevaux AES. Aucune détresse respiratoire n'a été observée chez les chevaux AES nourris au foin « à la vapeur » alors que 2 des 5 chevaux AES commençaient à avoir des signes cliniques de détresse respiratoire post-foin sec. Cependant, malgré des observations en faveur du foin « à la vapeur », les résultats obtenus dans cette étude, avec les limites identifiées, n'ont pas permis de montrer un effet bénéfique statistiquement significatif du foin « à la vapeur » sur les réponses cliniques et cytologiques des chevaux AES et CTL.

Le LBA a été effectué en instillant 500 ml d'eau physiologique stérile en deux bolus successifs de 250 ml dans chacun des poumons. Nous avons précédemment montré dans une étude qu'en instillant 500 ml, le pourcentage de neutrophiles dans le LBA était plus faible qu'en instillant 250 ml cependant le diagnostic ne changeait pas significativement quel que soit le volume

instillé (Orard *et al.*, 2015 ; Annexe 5). Pour ce challenge nous avons donc choisi d'instiller 500 ml dans chacun des poumons afin de récupérer le plus d'échantillon possible afin de pouvoir mener toutes les études souhaitées et notamment pour isoler le plus grand nombre de macrophages possible pour les investigations *in vitro*.

La cytologie du LBA a montré que le pourcentage de neutrophiles dans le LBA est augmenté à J+5 comparé à J-2 pour les deux challenges, tant chez les chevaux CTL que AES. L'induction d'une neutrophilie dans les voies respiratoires avait préalablement été montrée chez les chevaux CTL suite à des challenges d'exposition (Beeler-Marfisi *et al.*, 2010 ; Gerber *et al.*, 2004b). Au vu des résultats obtenus sur la réponse inflammatoire suite aux deux challenges, il est possible que d'autres stimuli non évalués puissent être présents dans le foin même après « purification » à la vapeur. Ainsi, soumettre le foin « à la vapeur » ne semble pas suffisant pour prévenir l'activité synergique des différents composés du foin dans l'inflammation comme l'ont montré préalablement Pirie *et al.*, (2003a).

D.5. Réponse immunitaire systémique

L'utilisation de la qPCR en temps réel pour l'évaluation de l'inflammation dans le cas de l'asthme est une technologie maîtrisée par notre équipe depuis plusieurs années déjà. Ainsi le développement d'une puce OpenArray a été effectué dans la continuité de l'acquisition de matériel/compétences par le laboratoire. L'intérêt d'utiliser cette technologie est de pouvoir cibler un grand panel de cytokines avec une petite quantité d'échantillon.

Dans cette étude, nous avons montré que les expressions géniques de l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10, le TGF- β , l'IL-12 et l'IL-23 étaient significativement augmentées dans le sang de chevaux CTL comparés aux chevaux AES. L'expression des ARNm de l'IL-12 est connue pour son rôle clé dans le développement de la réponse immunitaire de type Th1. Plusieurs études chez la souris ont montré que l'IL-12 avait un potentiel rôle inhibiteur de la réponse immunitaire dans le cadre de l'asthme, et pourrait être utilisée comme une voie thérapeutique (Leonard & Sur, 2003 ; Meyts *et al.*, 2006). Cette cytokine n'a pas été investiguée dans le cas de l'AES mais une étude, en médecine humaine, avait confirmé le rôle anti-inflammatoire de l'IL-12 dans l'asthme chez les enfants (Ai-Hua Cui *et al.*, 2017). L'utilisation de cette cytokine semble intéressante dans le cadre d'une application potentielle en tant qu'agent thérapeutique et prophylactique chez l'Homme et la souris. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer ces résultats chez le cheval.

L'IL-23 est connue pour son rôle essentiel dans la différenciation en lymphocytes Th17 impliqués dans l'inflammation chronique (Tousssirot, 2012). Ainsworth et *al.*, (2007) avaient montré une augmentation de l'IL-23 chez les cellules pulmonaires mononuclées des chevaux AES et CTL exposées *in vitro* à une solution de HDS pendant 6h et 24h. En revanche le rôle de l'IL-23 n'a pas été investiguée chez le cheval au niveau systémique. Une production excessive d'IL-23 a été confirmée dans le cas d'allergie respiratoire chez la souris, et il a été montré que l'inhibition de l'IL-23 diminuait l'inflammation asthmatique induite par l'ovalbumine (OVA) chez la souris (Peng et *al.*, 2010). L'IL-10 et le TGF- β sont sécrétées par les lymphocytes Treg, dont le rôle a été récemment mis en évidence dans le cas de l'asthme chez l'homme et le cheval (Henriquez et *al.*, 2014). Bien plus qu'un déséquilibre entre les voies de signalisation Th1 et Th2, une étude a montré que les Treg étaient responsables des mécanismes de tolérance au niveau du système immunitaire et qu'ils étaient déficitaires chez les sujets asthmatiques (Cottrez et *al.*, 2004 ; Ling et *al.*, 2004). Cela pourrait ainsi expliquer que les expressions géniques de l'IL-10 et du TGF- β étaient plus élevées chez les chevaux CTL, comparés aux chevaux AES. En revanche aucun effet challenge n'a été observé contrairement à d'autres études qui avaient montré une augmentation de l'expression des ARNm de l'IL-10 chez les chevaux AES post-challenge à des extraits de foin (Lanz et *al.*, 2013; Pacholewska et *al.*, 2015). De plus, l'expression protéique de l'IL-10 n'a pas été détectée dans le sang. Le temps nécessaire à la traduction de l'ARNm pourrait expliquer ce résultat.

De plus, il est intéressant d'observer que l'expression des ARNm de l'IL-18 est significativement plus élevée post-challenge quel que soit le statut du cheval. L'IL-18 est une cytokine pro-inflammatoire, pouvant agir comme co-facteur pour le développement des lymphocytes Th2. Il s'agit ici de la première étude dans laquelle cette cytokine est investiguée dans le cadre de l'AES. En médecine humaine, un polymorphisme du gène IL-18 a été rapporté et semblerait être associé à la sévérité de l'asthme et à une augmentation de son expression dans le sang (Lee et *al.*, 2008). Il serait intéressant de poursuivre les investigations sur l'intérêt et le rôle de l'IL-18 dans la physiopathologie de l'AES.

Comme dans les études précédentes, l'expression des ARNm de l'IL-4 était plus élevée chez les chevaux AES, par rapport aux chevaux CTL. En effet, l'IL-4 joue un rôle clé dans l'asthme équin (Cordeau et *al.*, 2004 ; Horohov, 2005 ; Lanz et *al.*, 2013 ; Lavoie et *al.*, 2001). De plus, les résultats de notre étude confirment l'hypothèse que l'asthme est caractérisé par une réponse immunitaire de type Th2 modifiée, telle que définie par la surexpression d'IL-4 et d'IL-13 mais non d'IL-5 (Horohov et *al.*, 2005). L'IL-13 utilisant la même voie de signalisation que l'IL-4, les résultats sont cohérents (Lanz et *al.*, 2013 ; Niedźwiedz et *al.*, 2016). L'IL-5 est connue pour

son implication dans le développement et l'activation des éosinophiles (Bancherau & Galizzi, 1990). Dans notre étude, le LBA des chevaux AES n'avaient pas un profil éosinophilique, ce qui pourrait expliquer cette observation (Dixon *et al.*, 1995 ; Seahorn & Beadle, 1993). L'expression génique du TNF- α était significativement plus élevée chez les chevaux AES, ce qui conforte les précédentes études. Le TNF- α apparaît être un médiateur majeur de l'inflammation et de la réaction immunitaire (Wallach *et al.* 1999; Werner *et al.*, 2008). Lavoie-Lamoureux *et al.*, (2012) ont par ailleurs montré une corrélation entre la sévérité clinique de l'AES et la concentration sérique en TNF- α .

L'IL-2 a rarement été étudiée dans le cadre de l'AES, notamment pour l'investigation d'une réponse immunitaire systémique. Les résultats de notre étude ont montré une expression génique de l'IL-2 plus élevée chez les chevaux AES, par rapport aux chevaux CTL. De manière surprenante, dans notre étude, l'expression des ARNm de l'IL-2 est augmentée pré-challenge quel que soit le challenge alors que Niedźwiedz *et al.*, (2016) n'avaient montré aucune différence. De plus, l'expression protéique de l'IL-2 est augmentée chez les chevaux CTL ce qui s'oppose aux résultats d'expression des ARNm. Les investigations sont donc à poursuivre sur le rôle de l'IL-2 dans le cas de l'AES.

L'expression des ARNm de l'IL-6 dans le sang était plus élevée chez les chevaux CTL par rapport aux chevaux AES, alors que l'expression des ARNm de l'IL-6R était inchangée quelles que soient les situations. Contrairement à nos résultats, en médecine humaine, l'IL-6 est associée à une réponse pro-inflammatoire et est augmentée chez les patients asthmatiques (Rincon & Irvin, 2012). Jusqu'à présent, l'expression des ARNm du récepteur de l'IL-6 n'a pas été investiguée chez le cheval dans le cadre de l'asthme. En médecine humaine, une étude a montré la présence d'une association entre un polymorphisme nucléotidique unique dans le gène IL-6R et le risque de développer de l'asthme chez l'homme (Ferreira *et al.*, 2011). D'autres investigations sont nécessaires afin de caractériser la voie de signalisation de l'IL-6 dans le cas de l'AES.

Aucune différence significative n'a été observée concernant les expressions géniques de l'IL-1 β , l'IL-8, l'IL-17 et de l'IFN- γ , contrairement à de précédentes études (Ainsworth *et al.*, 2007) qui ont montré l'importance de la réponse Th1 dans le cas de l'asthme, avec une augmentation significative de l'IFN- γ chez les chevaux AES comparé aux CTL. Cependant leurs investigations avaient été menées *in vitro* sur des PBMC de chevaux AES stimulés avec une suspension de foin. Nos résultats concernant les expressions géniques de l'IL-1 β et de l'IL-8 sont concordants avec les résultats publiés par Hansen *et al.*, (2014). Les différences de méthodologies et de réalisation des challenges *in vivo* entre les études peut aussi expliquer les

différences de résultats. La standardisation des challenges entre les équipes de recherche permettrait une meilleure comparaison des résultats.

D.6. Réponse immunitaire dans le poumon

D.6.1. Réponse immunitaire évaluée dans le LBA

Aucun effet du foin « à la vapeur » n'a été observé sur l'expression des ARNm des cytokines pour les cellules du LBA. Cependant, des interactions significatives entre le statut du cheval et le temps ont été observées pour l'expression des mRNA de l'IL-1 β et de l'IL-18. L'expression relative du TNF- α est également significativement supérieure dans le LBA des chevaux AES comparés aux CTL. De plus, plusieurs études suggèrent que la voie de signalisation Th17 pourrait avoir un rôle dans la réponse immunitaire des chevaux asthmatiques (Ainsworth et *al.*, 2007 ; Debrue et *al.*, 2005), ce qui semble se vérifier par nos résultats. L'expression de l'IL-17 était significativement plus élevée dans le LBA des chevaux AES comparés aux chevaux CTL. L'expression relative de l'IL-23 était également augmentée suite aux challenges et corrélée avec le score de mucus et le pourcentage de neutrophiles dans le LBA.

L'expression génique de l'IL-8 n'était pas significativement différente entre les groupes, ni influencée par le challenge ; pourtant une corrélation significative a été observée avec le pourcentage de neutrophiles dans le LBA et l'IL-8 a souvent été surexprimée chez les chevaux atteints d'AES (Ainsworth et *al.*, 2007 ; Debrue et *al.*, 2005) et contribue au chimiotactisme neutrophilique lors du stade précoce de l'asthme du cheval (Pirie, 2014). La durée limitée de l'exposition au foin, ainsi que la qualité de celui-ci pourraient expliquer que l'expression des ARNm de l'IL-8 n'ait pas été significativement surexprimée à l'issue du challenge.

La faible expression des ARNm de l'IL-4 dans le LBA des chevaux RAO vs. CTL est inattendue puisque la majorité des précédentes études ont démontré une polarisation Th2 pour ce syndrome (Cordeau et *al.*, 2004). Les chevaux AES avaient un pourcentage en cellules métachromatiques dans le LBA significativement moins élevé que les chevaux CTL. L'expression de l'IL-4 est corrélée à la fois aux proportions d'éosinophiles et de cellules métachromatiques dans le LBA ce qui peut expliquer que l'expression des ARNm de l'IL-4 soit augmentée chez les chevaux CTL comparés aux chevaux AES.

Bien que les Treg semblent avoir un rôle dans l'asthme équin, l'expression génique du TGF- β dans le LBA n'était pas significativement modifiée tout au long du challenge quel que soit le statut du cheval. D'autre part, l'expression des ARNm de l'IL-10 était significativement

augmentée suite aux challenges, mais aucune différence significative n'a été relevée entre les chevaux CTL et AES. Le dosage des cytokines dans le LBA n'a pas été effectué car les kits commerciaux disponibles manquent de sensibilité comme montré dans des précédentes études où les concentrations en cytokines étaient indétectables (Perkins et *al.*, 2008 ; Richard et *al.*, 2014).

D.6.2. Réponse immunitaire des macrophages alvéolaires

Contrairement aux résultats obtenus dans le LBA et le sang, les expressions géniques de l'IL-5 et de l'IL-13 n'ont pas pu être analysées dans les macrophages alvéolaires. En effet, l'expression des ARNm de ces cytokines n'a été détectée que dans certains échantillons (5 chevaux sur 11) ce qui rendait l'analyse délicate. Ces cytokines ne semblent donc peu ou pas être sécrétées par tous les macrophages alvéolaires équins, contrairement aux macrophages alvéolaires humains (Hancock et *al.*, 1998 ; Xu et *al.*, 2018).

La réponse immunitaire des macrophages alvéolaires a été relativement peu étudiée dans le cas de l'asthme équin. Joubert et *al.*, (2011), ont montré que l'expression génique des cytokines TNF- α , IL-1 β et IL-8 des macrophages alvéolaires ne variait pas en fonction du statut mais bien en fonction du challenge. À l'opposé dans notre étude, l'expression des ARNm de l'IL-1 β , l'IL-2, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12 et le TNF- α était significativement plus élevée chez les macrophages des chevaux AES comparés aux chevaux CTL, quel que soit le challenge. La majorité d'entre elles (IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α) sont des cytokines pro-inflammatoires reconnues pour jouer un rôle clé dans l'inflammation. Ces données sont ainsi à mettre en relation avec une possible polarisation des macrophages dans le cas de l'asthme équin. En effet, il semblerait que les chevaux AES présentent une polarisation de type M1, caractérisée par la libération de cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12 et le TNF- α (Saradna et *al.*, 2018).

L'IL-8 est un chimio-attracteur et un activateur des neutrophiles (Franchini et *al.*, 2000). Plusieurs études ont montré que l'expression génique de l'IL-8 était plus élevée chez les chevaux AES que les CTL, dans les cellules du LBA et les macrophages alvéolaires (Franchini et *al.*, 2000 Giguère et *al.*, 2002). Ainsworth et *al.*, (2003) avaient aussi montré que l'expression génique de l'IL-8 et de l'IFN- γ augmentait dans le LBA chez les chevaux AES en période de crise ce qui va dans le sens de nos résultats.

Dans notre étude, l'expression des ARNm de l'IL-6 était également augmentée pour les macrophages alvéolaires des chevaux AES. Cette observation va à l'encontre de précédents résultats (Laan et *al.*, 2006), qui ont montré que l'expression génique de l'IL-6 dans les

macrophages alvéolaires augmentait significativement post-challenge (LPS, HDS et *Aspergillus fumigatus*) chez les chevaux CTL uniquement et non chez les chevaux AES. De plus, des interactions temps/statut et challenge/statut ont été observées sur l'expression génique de l'IL-6 dans notre étude. Bang *et al.*, (2011), ont montré chez la souris que la sécrétion de l'IL-1 β , IL-6 et TNF- α contribuait à l'incapacité des macrophages alvéolaires à conserver leur rôle de protection des poumons. Cette observation avait aussi été faite par Careau & Bissonnette (2004) qui avait démontré que les macrophages alvéolaires (MA) de rats asthmatiques perdaient leur capacité à prévenir le développement de l'asthme. Ces observations ont été faites sur un modèle murin, des études supplémentaires sont donc nécessaires afin de vérifier ou non ces observations sur le modèle équin.

Dans notre étude, l'expression des ARNm du TGF- β était significativement supérieure chez les chevaux CTL comparé aux chevaux AES. Plusieurs études chez l'homme ont montré que le TGF- β avait un rôle inhibiteur de l'inflammation afin de protéger le poumon et ainsi serait déficient chez les personnes asthmatiques (Makinde *et al.*, 2007), ce qui pourrait expliquer sa surexpression chez les chevaux CTL vs. AES. De plus l'expression du TGF- β est positivement corrélée à celle de l'IL-23 ce qui est cohérent puisque le TGF- β est nécessaire à l'induction de l'IL-23 et à la différenciation en Th17 (Morishima *et al.*, 2009). Le TGF- β est aussi une cytokine régulatrice des Treg comme l'IL-10. Cependant, l'expression des ARNm de l'IL-10 par les macrophages alvéolaires n'était pas significativement différente entre les groupes, confirmant les précédentes observations de Laan *et al.*, 2006. Chez l'homme, la réponse immunitaire pulmonaire est pilotée en partie par l'IL-10 qui est la cytokine anti-inflammatoire la plus importante. Suite à un challenge au LPS chez les chevaux AES, l'expression de l'IL-10 reste faible dans les macrophages alvéolaires (Fernandez *et al.*, 2004). De plus la stimulation des macrophages alvéolaires par du LPS a montré une inhibition du récepteur de l'IL-10 permettant de surmonter les effets de l'IL-10 (Lang *et al.*, 2002). De même, il a été montré que la diminution de l'expression de l'IL-10 permettait une réponse immunitaire pulmonaire plus efficace (Ogawa *et al.*, 2008). Contrairement aux données obtenues dans le LBA, un effet challenge a été observé sur l'expression génique de l'IL-18, qui est significativement diminuée après « purification » du foin à la vapeur alors qu'aucun effet du statut (AES, CTL) n'a été observé sur l'expression de cette cytokine. L'IL-18 est sécrétée par les macrophages alvéolaires, et aurait un effet pro-inflammatoire par activation de type autocrine (Jordan *et al.*, 2001). Chez l'homme, l'implication de l'IL-18 a été mise en évidence dans la réponse immunitaire contre les virus ou les bactéries (Rovina *et al.*, 2015), et plus récemment dans le cadre de maladies allergiques (Sanders *et al.*, 2016). Ainsi, l'IL-18 aurait un rôle dans la différenciation des Treg

et aurait un rôle protecteur contre l'asthme allergique (Koch et *al.*, 2015). Cependant chez le cheval aucune étude n'a été publiée à ce jour sur le rôle de cette cytokine dans l'asthme.

Aucun effet n'a été observé sur l'expression des ARNm de l'IFN- γ , l'IL-4, l'IL-17 et l'IL-23 dans les macrophages. Ainsworth et *al.*, (2007) avaient montré que l'expression de l'IL-23 dans le LBA augmentait 6h et 24h post-inhalation de HDS, alors que l'expression génique de l'IL-17 dans le LBA augmentait seulement 6h post-HDS. En effet il a été montré chez l'Homme que le TGF- β était nécessaire à l'induction de la voie Th17 en présence d'IL-6. L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire importante dans le cas de l'asthme allergique. Song et *al.*, (2008), ont montré qu'elle était sécrétée en majorité par les macrophages et qu'elle était surexprimée par les macrophages alvéolaires de souris, suite à un challenge d'exposition à l'ovalbumine. À ce jour, aucune étude n'a été publiée concernant l'expression des ARNm de l'IL-17 et de l'IL-23 par les macrophages alvéolaires équins.

L'expression génique de l'IL-4 ne varie pas quel que soit le challenge ou le statut de l'animal, contrairement à ce qu'avait montré Giguère et *al.*, (2002). La courte durée du challenge n'a peut-être pas permis l'expression des ARNm de cette cytokine.

E. Conclusion partielle

La première partie de ce travail était axée sur la mise en place d'un challenge d'exposition *in vivo* de chevaux AES et CTL, afin de déterminer l'effet du foin « à la vapeur » sur la réponse immunitaire systémique et la réponse pulmonaire. Ce challenge a permis d'étudier la réponse globale des chevaux soumis à un challenge d'exposition à du foin « à la vapeur ». Notre hypothèse était que le foin « à la vapeur » permettait de diminuer la réponse inflammatoire et immunitaire au niveau systémique et pulmonaire. Nos résultats n'ont pas permis d'observer une diminution significative de l'inflammation et de la réponse immunitaire chez les chevaux AES et CTL. Cependant aucun effet néfaste du foin « à la vapeur » n'a été observé sur les chevaux nourris pendant 5 jours avec ce foin. Au niveau respiratoire, les scores cliniques et de mucus respiratoire étaient visiblement améliorés même si les résultats n'étaient pas statistiquement significatifs comparés aux résultats obtenus en présence de foin sec. Aucun effet du challenge n'a été observé sur la réponse immunitaire systémique et locale. Comme discuté précédemment, la durée du challenge était limitée à 5 jours ce qui était peut-être insuffisant pour montrer un effet bénéfique significatif du foin « à la vapeur » sur la santé respiratoire des chevaux. Ainsi, le foin « à la vapeur » ne semble pas dégrader l'état de santé des chevaux, il peut donc être

distribué aux chevaux AES et CTL. Cependant en cas de crise, la meilleure solution reste de soustraire le foin de la ration des chevaux AES.

Partie II. Caractérisation et stimulation *in vitro* des macrophages alvéolaires équins

Articles en préparation :

Hay dust suspension for equine equine asthma: variability of mould and dust content from a single batch of hay bales.

Marie Orard, Erika Hue, Marilyne Guillamin, Meriel Moore-Colyer, Anne Couroucé, Laurent Couëtil, Magali Demoor, Eric A. Richard.

Characterisation of alveolar macrophages from severe asthmatic horses: morphological and immune responses to *in vitro* and/or *in vivo* stimulations.

Marie Orard, Erika Hue, Romain Paillot, Meriel Moore-Colyer, Anne Couroucé, Laurent Couëtil, Magali Demoor, Eric A. Richard.

Communication orale : Hay dust particles measured by flow cytometry in steamed *versus* dry hay. Communication orale au congrès du WEAS 2017, Copenhague, Danemark (Annexe 8).

Marie Orard, Erika Hue, Marilyne Guillamin, Meriel Moore-Colyer, Anne Couroucé-Malblanc, Laurent Couëtil, Magali Demoor, Eric A. Richard.

Avant-propos

De nombreuses études sur l'asthme équin ont été menées à l'échelle du cheval avec des challenges d'exposition à des extraits de foin ou à différents antigènes tels que le LPS afin d'étudier les réponses clinique, cytologique ou immunitaire au niveau du LBA. Cependant la compréhension de la pathogénie de l'asthme reste encore à préciser. Plusieurs études ont étudié les mécanismes cellulaires impliqués dans l'asthme. Les neutrophiles sont à ce jour les cellules les plus étudiées notamment par les travaux de Lavoie-Lamoureux (2012). Il a cependant été montré que la sécrétion de médiateurs par les macrophages alvéolaires précédait l'infiltration des neutrophiles au niveau du poumon des chevaux CTL et AES après exposition à du foin moisi (Franchini et *al.*, 1998). Les macrophages alvéolaires semblent donc être les principaux effecteurs de la réponse immunitaire au niveau de l'espace alvéolaire (Lohmann-Matthes et *al.*, 1994). Contrairement aux études *in vivo*, l'étude des macrophages alvéolaires *in vitro* nécessite de les isoler avant de les stimuler. Pour cela plusieurs protocoles ont été décrits pour l'isolement des MA équins, notamment la technique basée sur l'adhérence des cellules (Karagianni, 2014 ; Laan et *al.*, 2006; Waldschmidt et *al.*, 2013). Il s'agit de la méthode la moins stressante pour les cellules malgré une limite non négligeable liée à la présence potentielle d'autres types cellulaires.

Une fois les macrophages alvéolaires isolés, leurs fonctions immunitaires post-stimulation peuvent être étudiées. L'activité de phagocytose est un premier paramètre important puisqu'il rend compte de la capacité des macrophages à phagocyter les éléments étrangers. L'étude de la macropinocytose, pinocytose non spécifique permettant d'internaliser les grosses molécules solubles, peut également être investiguée. Ce processus a été découvert par Warren Lewis en 1931 dans les macrophages et a longtemps été considéré comme une activité endocyttaire accessoire. Pourtant, depuis quelques années, ce mécanisme fait l'objet d'un intérêt croissant, en particulier pour son rôle déterminant au début de la réponse immunitaire (Robinson et *al.*, 1996 ; Swanson & Watts, 1995). Cette voie permet l'intériorisation de grandes quantités de solutés.

L'observation en temps réel des macrophages alvéolaires stimulés ainsi que l'utilisation de l'impédancemétrie sont des techniques innovantes et intéressantes pour l'étude des MA. L'utilisation de l'impédancemétrie présente l'avantage d'évaluer les cellules en temps réel basée sur leur capacité d'adhésion. Cette technologie permet la détection des événements biologiques précoces et tardifs de la réponse cellulaire (Sun et *al.*, 2017). En plus de l'activité de phagocytose et du comportement cellulaire des macrophages alvéolaires, ces derniers

expriment de nombreuses cytokines qui vont servir de médiateurs pour le recrutement d'autres cellules. Chez le cheval, l'étude de la réponse immunitaire innée pulmonaire se traduit généralement par l'évaluation des fonctions cellulaires telles que la phagocytose ou la réponse oxydative (Raidal et *al.*, 1998) ainsi que la quantification de l'expression des ARNm des cytokines d'intérêt dans l'inflammation.

L'intérêt de notre étude est d'identifier de nouvelles pistes de caractérisation du comportement cellulaire *in vitro* par l'utilisation de la microscopie en temps réel, l'impédancemétrie et l'étude de la phagocytose des MA par cytométrie en flux dans le cas de l'AES.

L'étude des macrophages alvéolaires n'était précédemment pas effectuée au sein de LABÉO. Cette partie présente donc la mise en place d'outils innovants dans le suivi du comportement cellulaire pour des macrophages alvéolaires équins stimulés ainsi que les premiers résultats de stimulation.

A. Caractérisation du stimulant (HDS) et développement des techniques de culture cellulaire

A.1. Caractérisation des suspensions de foin (HDS)

Afin de stimuler les MA *in vitro* des solutions de HDS « hay dust suspension » ont été constituées à partir de de foin sec et de foin « à la vapeur ».

A.1.1. Matériel et méthodes

A.1.1.1. Hay Dust Suspension (HDS)

Les solutions de poussières de foin ou HDS « hay dust suspension » ont été réalisées à partir de foin sec et à partir de foin « à la vapeur » selon le protocole adapté de Pirie et *al.*, (2002a). Environ 1 kg de foin a été prélevé de manière aléatoire dans 14 bottes rectangulaires de foin, avant et 24 heures après avoir été soumis à la vapeur comme décrit dans la Partie 1 : A.1.2. Toutes les bottes provenaient de la même pâture. Parmi ces 14 bottes, 6 ont également été prélevées immédiatement, puis 6h et 48h après « purification » à la vapeur. Chaque échantillon a ensuite été secoué manuellement durant 30 minutes sur une surface plane amovible désinfectée. Les poussières ont été collectées et tamisées dans une colonne de tamis allant de 2 mm à 50 μm (Saulas). Pour les échantillons provenant du foin sec, la solution de HDS a été obtenue en ajoutant 10 ml de solution saline pour 1 g de poussières collectées. Le même volume d'eau saline stérile a été ajouté à chaque fraction de poussière collectée de la même botte après « purification » à la vapeur. Les HDS constituées ont été aliquotées et conservées à -80°C jusqu'à utilisation et caractérisation.

A.1.1.2. Quantification des poussières respirables et inhalables

A.1.1.2.1. QUANTIFICATION DES POUSSIÈRES PAR CYTOMETRIE EN FLUX

La quantification des poussières inhalables et respirables a été effectuée par cytométrie en flux (Gallios ; Beckman Coulter) par acquisition des données pendant 200 s. Les HDS ont été filtrées sur toile à « bluter » de 48 μm puis 100 μl d'échantillon ont été diluées au 1/100^{ème} dans du PBS. La quantification des particules a été déterminée par l'utilisation des billes Sphero™ Accucount Fluorescent (Spherotech) selon les recommandations du fournisseur. Les résultats

provenant de l'analyse ont donné un comptage absolu des particules dans chaque HDS. La quantité relative en nombre de particules/ μl a été calculée par la formule suivante :

$$\text{Nombre de particules}/\mu\text{l} = (A/B) \times (C/D) \times \text{dilution}$$

Avec A le nombre de particules dans l'échantillon, B le nombre de billes dans l'échantillon, C la concentration en billes dans 50 μl (donnée par le fournisseur en fonction du numéro de lot) et D le volume d'échantillon initial (100 μl). La taille de ces billes étant de 5 μm , deux fractions ont pu être établies : les poussières inférieures à 5 μm et les poussières comprises entre 5 et 48 μm .

A.1.1.2.1. QUANTIFICATION DES POUSSIÈRES PAR GRANULOMETRIE

La quantification des poussières inhalables et respirables a également été effectuée par granulométrie avec le Multisizer™ 4 (Beckman Coulter). Comme pour la cytométrie en flux, les HDS ont été dilués au 1/100^{ème} dans du PBS. L'orifice utilisé mesurait 50 μm de diamètre pour un comptage des particules de 1 à 30 μm . Un volume de 100 μl de solution de HDS a été instillé dans 20 ml d'une solution d'eau distillée. Un volume de 100 μl d'échantillon a été mélangé à 20 ml de solution d'« Isoton II diluent ». La mesure a été réalisée à partir de 100 μl d'échantillon dilué dans de l'eau physiologique stérile. Le nombre de particules par μl a été calculé à l'aide du logiciel Coulter Counter® (Beckman Coulter).

A.1.1.3. Concentration en bactéries et moisissures des HDS

Pour le dénombrement total des bactéries sur gélose PCA, 100 μl de HDS, provenant de foin sec, diluée de 10^{-1} à 10^{-6} , et de foin « à la vapeur », diluée de 10^{-1} à 10^{-3} , ont été étalés sur gélose PCA et incubés pendant 5 jours à 37°C, avec un dénombrement tous les 2 jours.

Pour le dénombrement et l'identification des moisissures, 100 μl de HDS, provenant de foin sec, diluée de 10^{-1} à 10^{-3} , et de foin « à la vapeur », diluée de 10^{-1} à 10^{-2} , ont été étalés sur gélose Sabouraud et incubés à 25°C pendant 1 semaine. Le dénombrement a été effectué deux jours post-ensemencement et l'identification a été faite après 1 semaine d'incubation.

A.1.1.4. Teneur en endotoxines et β -D-Glucane

Le dosage des endotoxines a été effectué sur l'« Endosafe PTS2005F » selon les recommandations du fournisseur (Charles river). Pour cela 1 ml de HDS a été dilué dans 10 ml d'eau apyrogène (« LAL reagent water endosafe® » ; Charles river). Les échantillons ont ensuite été mélangés par retournement pendant 1h puis autoclavés 1h à 120°C. Les échantillons ont été centrifugés 15 minutes à 1 000 g. Les surnageants ont été récupérés, aliquotés et conservés à -20°C jusqu'à utilisation. Les HDS provenant des bottes de foin sec ont été diluées de 10^{-5} à 10^{-7} selon les foins et les HDS provenant de foin « à la vapeur » ont été diluées de 10^{-3} à 10^{-5} .

Le dosage du β -D-glucane a été effectué suivant le protocole précédemment décrit dans la partie 1 : A.1.4.5. avec une dilution de 10^{-3} à 10^{-6} pour les HDS de foin sec et de 10^{-2} à 10^{-4} pour les HDS de foin « à la vapeur ».

A.1.1.5. Analyses statistiques

Pour la teneur en poussières respirables ($< 5 \mu\text{m}$) et inhalables ($>5 \mu\text{m}$), les données ont été comparées par le t test de Student et une ANOVA à un facteur. De plus, la corrélation des résultats entre la cyrtométrie en flux et la granulométrie a été comparée par un test de Spearman. Pour les teneurs en bactéries, moisissures, endotoxines et β -D-glucane, les données ont été \log_{10} transformées et les données analysées par un test de Student. Une p-value $< 0,05$ était considérée comme significative.

A.1.2. Résultats

A.1.2.1. Teneur en particules respirables et inhalables

« Purifier » le foin à la vapeur diminue significativement les poussières respirables ($29\,805 \pm 31\,198$ vs. $576\,449 \pm 316\,162$ particules/ μl ; $p < 0,001$) et inhalables (419 ± 365 vs. $4\,895 \pm 2\,200$; $p < 0,001$) à 24h post-« purification » à la vapeur (Figure 46).

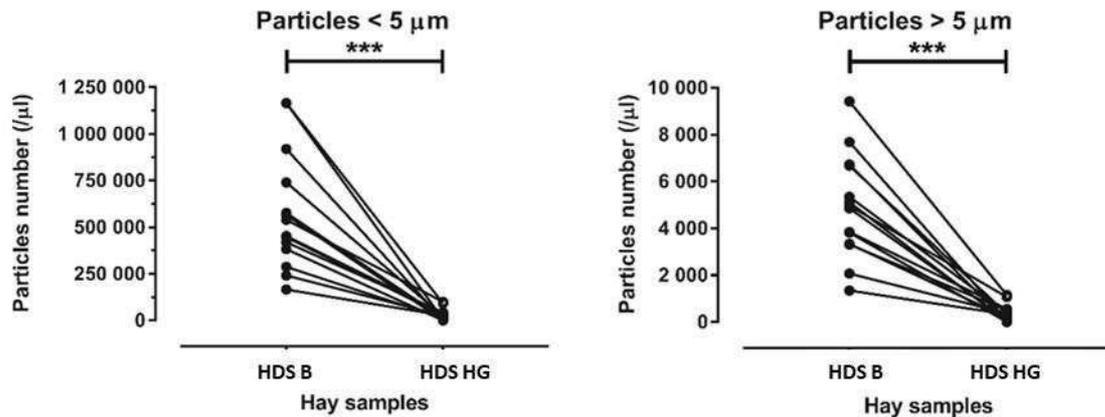


Figure 46 : Nombre (/μl) de particules respirables (< 5μm) et inhalables (> 5μm) dans les HDS provenant de foin sec (HDS B) et provenant de foin « à la vapeur » (HDS HG), tel que mesuré par cytométrie. *** différences significatives entre la solution de HDS B et de HDS HG ($p < 0,001$). ($n=14$).

Par ailleurs, une diminution significative ($p < 0,01$) du nombre de particules immédiatement, 6h et 48h après « purification » a aussi été observée, comparé au foin sec. De plus, les différents points de prélèvement post- « vapeur » n'étaient pas significativement différents entre eux. Ainsi la diminution des particules est effective au cours du temps au moins jusqu'à 48h post-« purification » (Figure 47).

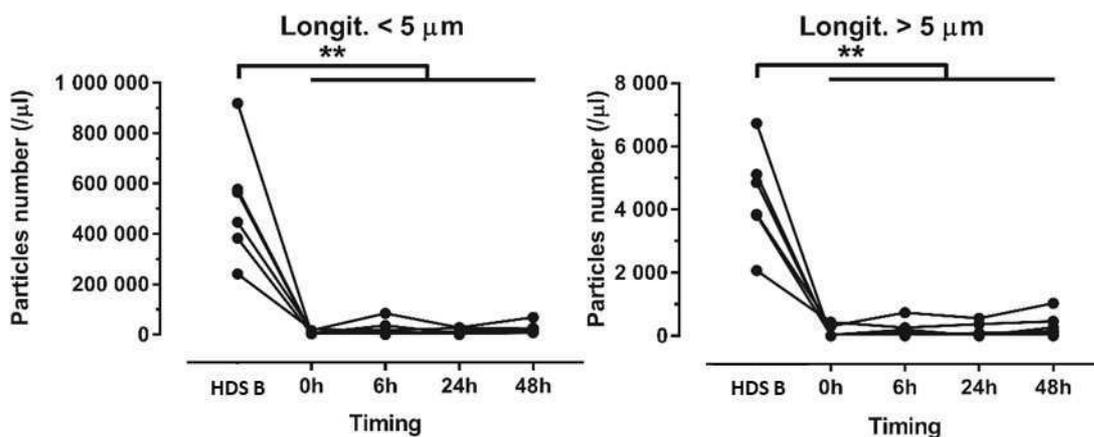


Figure 47 : Nombre (/μl) de particules respirables (< 5μm) et inhalables (> 5 μm) dans les HDS avant, 0h, 6h, 24h et 48h post- « à la vapeur », tel que mesuré par cytométrie. ** différences significatives entre les HDS provenant de foin sec (HDS B) et provenant de foin « à la vapeur » (HDS HG), ** différences significatives ($p < 0,01$). ($n=6$).

La teneur en particules respirables et inhalables a également été mesurée par granulométrie. Les résultats ont montré une diminution significative du nombre de particules inhalables dans la solution de HDS issue du foin « à la vapeur » ($7\,000 \pm 4\,200$ particules / ml) comparées au foin

sec ($800 \times 10^6 \pm 700 \times 10^6$ particules / ml). Malgré cela, une grande variabilité des foins est observée.

Quelle que soit la méthodologie, la teneur en particules respirables est plus importante que la teneur en particules inhalables (Tableau 12). Une grande variabilité de la teneur en particules a été observée selon la méthodologie utilisée

Tableau 12 : Nombre de particules respirables et inhalables (/µl) suivant la méthodologie

	Cytométrie en flux	Granulométrie
Nombre de particules/ml dans la solution de HDS foins sec		
Particules respirables < 5 µm	578 000 ± 375 000	6 760 ± 4 021
Particules inhalables 5 < x < 50 µm	9 860 ± 1517	300 ± 170
Nombre de particules/ml dans la solution de HDS foins « à la vapeur »		
Particules respirables < 5 µm	58 050 ± 55 580	770 ± 729
Particules inhalables 5 < x < 50 µm	990 ± 967	40 ± 33

Cependant une bonne corrélation a été observée entre les deux méthodologies pour les particules totales ($R = 0,604$; 95% CI 0,155 – 0,846), les particules respirables ($R = 0,510$; 95% CI 0,148 – 0,844) et les particules inhalables ($R = 0,531$; 95% CI 0,047 – 0,812) (Figure 48).

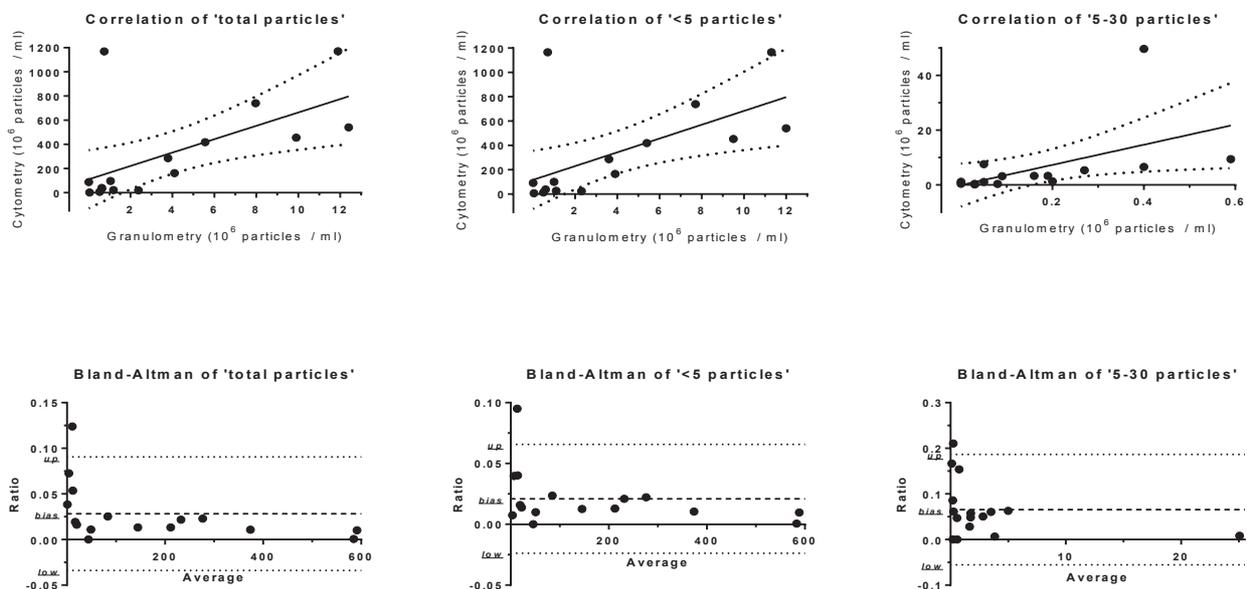


Figure 48 : Corrélations entre la teneur en poussières respirables et inhalables mesurées par cytométrie en flux et granulométrie (en haut) et diagramme de Bland-Altman représentant la concordance des résultats entre les deux méthodologies (en bas). *Corrélations avec ligne droite (régression linéaire) et lignes en pointillés (intervalle de confiance de 95%). Bland-Altman avec lignes avec tirets (biais) et lignes en pointillés (-1,96 déviation standard du biais) et + 1,96 déviation standard du biais).*

A.1.2.2. Teneurs en bactéries et moisissures

Les teneurs en bactéries et moisissures sont significativement moins élevées dans la solution de HDS provenant du foin « à la vapeur » comparativement au foin sec ($p < 0,01$) (Figure 49).

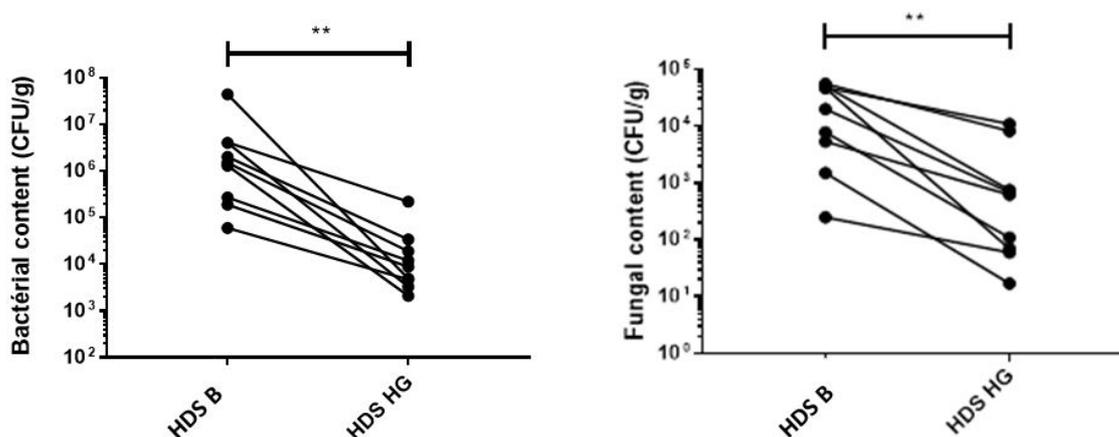


Figure 49 : Teneur (CFU/g) en bactéries et moisissures dans la solution de HDS provenant de foin sec (HDS B) et provenant de foin « à la vapeur » (HDS HG). ** différences significatives entre la solution de HDS B et la solution de HDS HG ($p < 0,01$). ($n=9$).

A.1.2.3. Teneur en β -D-glucane et en endotoxines

La teneur en β -D-glucane et la concentration en endotoxines sont significativement moins élevées dans la solution de HDS provenant du foin « à la vapeur », comparativement au foin sec (Figure 50).

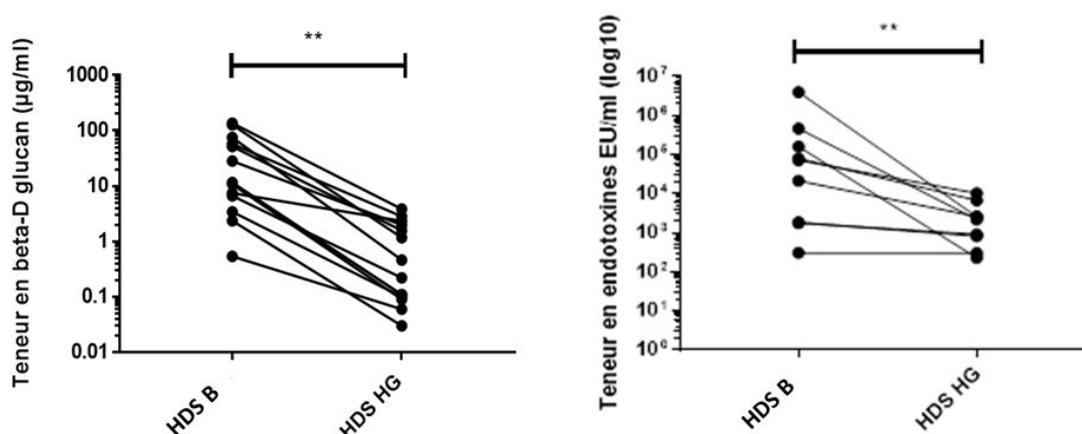


Figure 50 : Concentration en β -D-glucane (en pg/ml) et en endotoxines (en EU/ml) (\log_{10}) dans la solution de HDS provenant de foin sec (HDS B) et provenant de foin « à la vapeur » (HDS HG). ** différences significatives entre la solution de HDS B et de HDS HG ($p < 0,01$).

A.1.3. Discussion partielle

Les résultats montrent que le foin « à la vapeur » diminue significativement la teneur en particules respirables et inhalables et que cette diminution est durable dans le temps. Nos résultats confirment bien les investigations précédemment menées sur le foin (Moore-Colyer et *al.*, 2016). Les concentrations en bactéries, endotoxines, moisissures et β -D-glucane diminuent également significativement. Cependant, une importante variabilité est constatée entre les bottes foin pourtant issues d'un même lot, ce qui pourrait avoir une influence importante sur les résultats des études visant à étudier l'effet du foin sur les voies respiratoires du cheval. Ainsi, afin de standardiser les investigations, il serait recommandable d'utiliser une suspension de foin, bien caractérisée, afin d'éviter ce biais. Pirie et *al.*, (2002a) avaient réalisé des HDS à partir de foin moisi. Nos résultats montrent des valeurs en particules respirables et inhalables du même ordre que les valeurs obtenues par Pirie et *al.*, (2002a), cependant les valeurs sont deux fois plus faibles, dans notre étude, pour la teneur en endotoxines et 10 fois plus faible pour la teneur en β -D-glucane comparées aux résultats de Pirie et *al.*, (2002a), ce qui semble cohérent puisque le foin utilisé était un foin de prairie standard et non moisi.

Ainsi dans la suite du projet, la solution de HDS utilisée provient de la même botte de foin, afin d'éviter les biais liés à la variabilité inter-bottes en terme de teneur microbiologique.

A.2. Mise en place des techniques de culture pour les macrophages

Tout d'abord, les techniques de culture ont été mises en place sur les cellules murines RAW264-7 bien décrites dans la littérature.

A.2.1. Développement des techniques sur les macrophages murins

A.2.1.1. Culture des RAW264-7

Les macrophages murins de la lignée RAW264-7 (Sigma) ont été cultivés en milieu « Dulbecco's Modified Eagle Medium », DMEM (Eurobio) complété avec 1% de L-Glutamine 200 nM (Eurobio), 1% de Penicilline Streptomycine Amphotericine (Eurobio) et 10% de sérum de veau fœtal (SVF ; Eurobio) à 37°C avec 5% de CO₂. Les cellules ont ensuite étéensemencées à 50 000 cellules/puits en plaque 96 puits (Falcon) ou en plaque « E-plate

View PET » (ACEA, Biosciences) pour la culture en temps réel, avant d'être stimulées par différents antigènes.

A.2.1.2. Stimulation des RAW264-7

Les macrophages murins ont été stimulés avec des antigènes standards testés à différentes concentrations : le lipopolysaccharide (LPS) (0111-B4, Sigma) de 10 à 1 000 ng/ml qui est un antigène d'origine bactérienne; la Gliotoxine (Cliniscience) à 250 et 500 ng/ml et la Fumagilline (Cliniscience) de 3 et 4 µg/ml, qui représentent les mycotoxines sécrétées par *Aspergillus fumigatus*; les Bioparticules d'*E. coli* couplées à la « Green Fluorescent Protein » GFP (ThermoFisher) de 5 à 10 Bioparticules (BP)/cellule. Les cellules ont également été stimulées avec des HDS provenant de foin sec (142 723 particules / puits) et provenant de foin « à la vapeur » (3 690 particules/puits).

A.2.1.3. Suivi par impedancemétrie et microscopie en temps réel

Le système xCELLigence® (ACEA Biosciences Inc) permet de mesurer en temps réel l'impédance des cellules présentes dans les plaques « E-plate view PET » (ACEA, Biosciences Inc), qui se traduit par l'obtention de valeurs de « Cell Index » (CI). Cette méthode est non invasive et ne nécessite ni marquage ni coloration préalable. Ce système permet ainsi d'obtenir des informations quantitatives sur l'état biologique des cellules telles que la prolifération, la viabilité, l'invasion ou la mort cellulaire en temps réel (Limame et al., 2012). La valeur du CI varie en fonction du nombre de cellules, de leur morphologie, de leur force d'adhésion et de leur étalement. Il est donc nécessaire de réaliser un suivi microscopique en parallèle pour l'analyse des courbes de CI.

Les expériences menées sur le système xCELLigence® RTCA MP (ACEA Biosciences Inc) ont été réalisées suivant les instructions du fournisseur. Les mesures de bruit de fond ont été obtenues par deux mesures d'impédance successives après ajout de milieu de culture DMEM complété dans les puits de la « E-plate view PET® » 96 puits. Les cellules RAW264-7 ont étéensemencées à une densité de 50 000 cellules par puits dans des plaques 96 puits « E-plate view PET » puis incubées à température ambiante pendant 30 minutes afin qu'elles sédimentent au fond des puits. La plaque a ensuite été positionnée sur le système RTCA MP dans l'incubateur à 37°C sous 5 % de CO₂. Les mesures d'impédance ont été réalisées toutes les minutes pendant 3 heures (phase d'adhésion) puis toutes les 2 minutes pendant 21 heures (phase

de prolifération). Après 24 heures de culture, les cellules ont été stimulées avec différents antigènes décrits précédemment partie 2 : A.2.1.2. Les mesures d'impédance ont alors été réalisées toutes les 5 minutes pendant 72 heures (phase de traitement). Avant analyse, les CI ont été normalisés à la dernière valeur précédant le traitement des cellules selon les recommandations du fournisseur. En parallèle, deux plaques 96 puits (Falcon) ont été traitées de la même façon et suivies en temps réel avec le microscope Incucyte S3 (Essen Bioscience) au grossissement $\times 10$ et $\times 20$ avec prise de vue toutes les 5 minutes pendant 72 heures. Les prises de vue ont permis la réalisation de films pour l'observation du comportement cellulaire au cours du temps. Les microphotographies ont permis de mesurer la taille de 20 cellules par champ et par condition.

A.2.1.4. Activité de phagocytose des macrophages murins stimulés

L'activité enzymatique de l'oxyde nitrique (NO) synthétase inductible (iNOS) des macrophages a été mesurée par dosage des NO présents dans les surnageants prélevés à 6h post-stimulation. Le NO produit par l'iNOS étant un composé instable, il est rapidement converti en nitrite qui peut être dosé par le test de Griess (Promega). Pour cela 50 μl de surnageants de culture ou de standards avec une concentration connue en NO (100 μM ; 50 μM ; 25 μM ; 12,5 μM ; 6,25 μM ; 3,12 μM) ont été incubés à température ambiante avec 50 μl de réactif de Griess (1% sulfanilamide, 5% acide phosphorique) en duplicat. Après 10 minutes dans l'obscurité, 50 μl de 0.1% N-1-naphtylethylenediamine dihydrochloride (NED) ont été ajoutés et la densité optique a été mesurée après 15 minutes à 540 nm. Les concentrations de nitrites ont été calculées à partir de la courbe standard de nitrite selon les recommandations du fournisseur. Les premiers tests ont été effectués sur les RAW264-7 stimulées au LPS avec des dosages de NO effectués à 3h, 6h et 24h post-stimulation.

L'activité de phagocytose des macrophages a été évaluée par la détection de l'ingestion des bioparticules (BP) couplées à la GFP (BP ; Thermofisher scientifique). Lors des premiers tests, les RAW 264-7 ont étéensemencées en plaque 6 puits à 200 000 et 500 000 cellules/puits et stimulées avec deux concentrations de BP (5 BP / cellule et 10 BP / cellule). Les cellules ont été incubées 1h en présence des BP. Les cellules ont ensuite été fixées à l'acide paraformaldéhyde 4% puis observées au microscope à fluorescence Eclipse Ti (Nikon). Dans un second temps, les macrophages ont étéensemencés en plaque 96 puits à une concentration de 50 000 cellules/puits puis stimulées avec une concentration de 10 BP / cellule. L'activité de

phagocytose a été observée par microscopie en temps réel (Incucyte S3 ; Essen Bioscience). Les différentes prises de vue ont permis de mesurer la taille des cellules au cours du temps et de visualiser la phagocytose des BP.

A.2.1.5. Analyses statistiques

La taille des cellules, en fonction des stimuli et de leur concentration, a été comparée par une ANOVA à 1 facteur.

La concentration en NO sécrétée par les RAW264-7 en fonction du stimulus a été analysée avec une ANOVA à 2 facteurs (le temps de stimulation et la concentration).

Une p-value < 0,05 était considérée comme significative.

A.2.2. Résultats

A.2.2.1. Réponse des RAW264-7 aux antigènes standards

A.2.2.1.1. REPONSE AU LPS AU COURS DU TEMPS

Après stimulation au LPS, les cellules RAW264-7 ne semblent pas subir des modifications morphologiques importantes. Les cellules restent arrondies, et quelques-unes se déforment mais ne se décollent pas (Figures 51 A et B). La taille des cellules stimulées avec du LPS à 1 000 ng/ml est significativement supérieure à celle des cellules non stimulées (Figure 51 C). Cette variation de taille permet d'expliquer, au moins partiellement, l'augmentation de l'impédance cellulaire, visible par xCELLigence après stimulation au LPS (Figure 51 D).

Les courbes d'impédance montre que quelle que soit la concentration en LPS, le « Cell Index » normalisé (normalized CI) augmente pour les cellules stimulées avec des profils de courbes semblables. Cette augmentation est d'autant plus importante que la concentration en LPS est élevée. A 1 000 ng/ml, l'inclinaison de la courbe d'impédance diminue dès 6h post-stimulation tandis que pour les cellules stimulées avec des concentrations plus faibles de LPS (10 à 500 ng/ml) un plateau est observé entre 6h et 20 h post-stimulation avec un CI à 1,35 (Figure 51 D). Les cellules non stimulées ont un CI de 1,3 entre 3 et 10 h post-stimulation puis qui diminue légèrement. De plus, plus la concentration en LPS est importante et plus la durée d'exposition est longue, plus la concentration en NO augmente dans le surnageant (Figure 51 E).

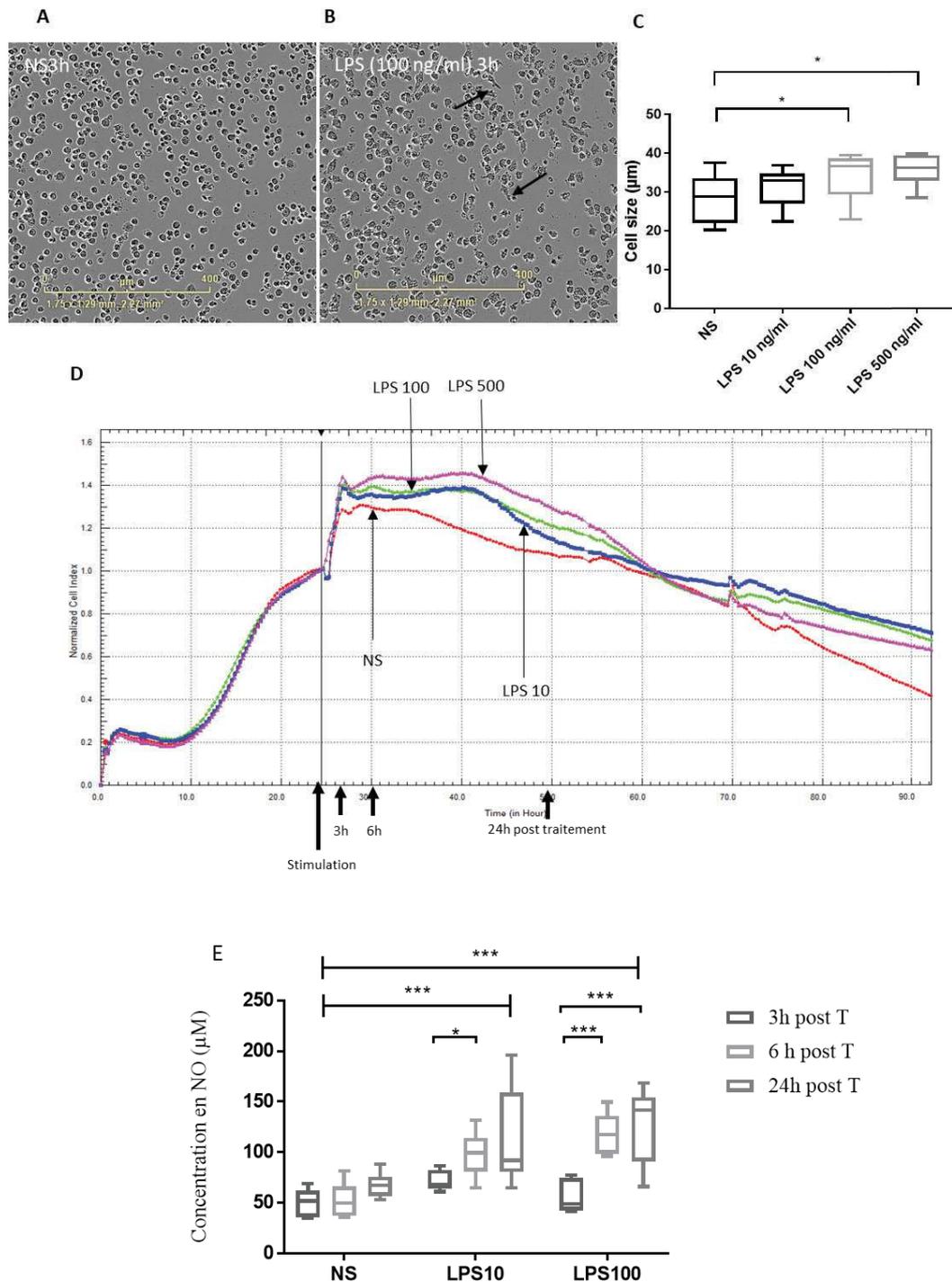


Figure 51 : Réponse des RAW264-7 à différentes concentrations en LPS. **A** : Observations microscopiques en temps réel ($G \times 10$) des cellules non stimulées (NS) ; **B** : cellules 3h après stimulation au LPS (500 ng/ml), les flèches montrent les déformations cellulaires ; **C** : Taille des cellules mesurée 3h post-stimulation, selon les concentrations en LPS (10, 100 et 500 ng/ml), ($n=4$) ; **D** : Impédance des cellules au cours du temps, stimulées ou non avec différentes concentration de LPS (la ligne verticale noire correspond au temps de normalisation du « Cell Index ») (courbes représentatives des $n=10$) ; **E** : Mesure de la concentration en NO (μM) sécrétée par les cellules 3h, 6h et 24h après stimulation au LPS ($n=4$ en duplicat). Box plots représentant la médiane et les IQR ; *, **, *** différences significatives (respectivement $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$).

Sur base des tests effectués sur les RAW264-7 stimulées au LPS, le dosage du NO dans le surnageant des cellules stimulées avec la fumagilline, la gliotoxine et les BP a été effectué à 6h post-stimulation.

A.2.2.1.2. REPONSE A LA GLIOTOXINE AU COURS DU TEMPS

L'observation microscopique des RAW264-7 stimulées à la gliotoxine (500 ng/ml) semble montrer le début d'une dégradation des cellules 3h post-stimulation, les membranes des cellules sont moins visibles et des débris cellulaires sont observés (Figure 52 A et B). Il n'y a pas de variation de taille des RAW264-7 quelle que soit la concentration en gliotoxine par rapport aux cellules non stimulées (NS) (Figure 52 C).

Les courbes d'impédance semblent confirmer ces observations puisque le « Cell Index » normalisé des cellules stimulées varie très peu par rapport aux cellules NS (Figure 52 D). Enfin la concentration en NO sécrétée par les cellules ne varie pas pour une concentration en gliotoxine de 500 ng/ml, 6h post-stimulation (Figure 52 E).

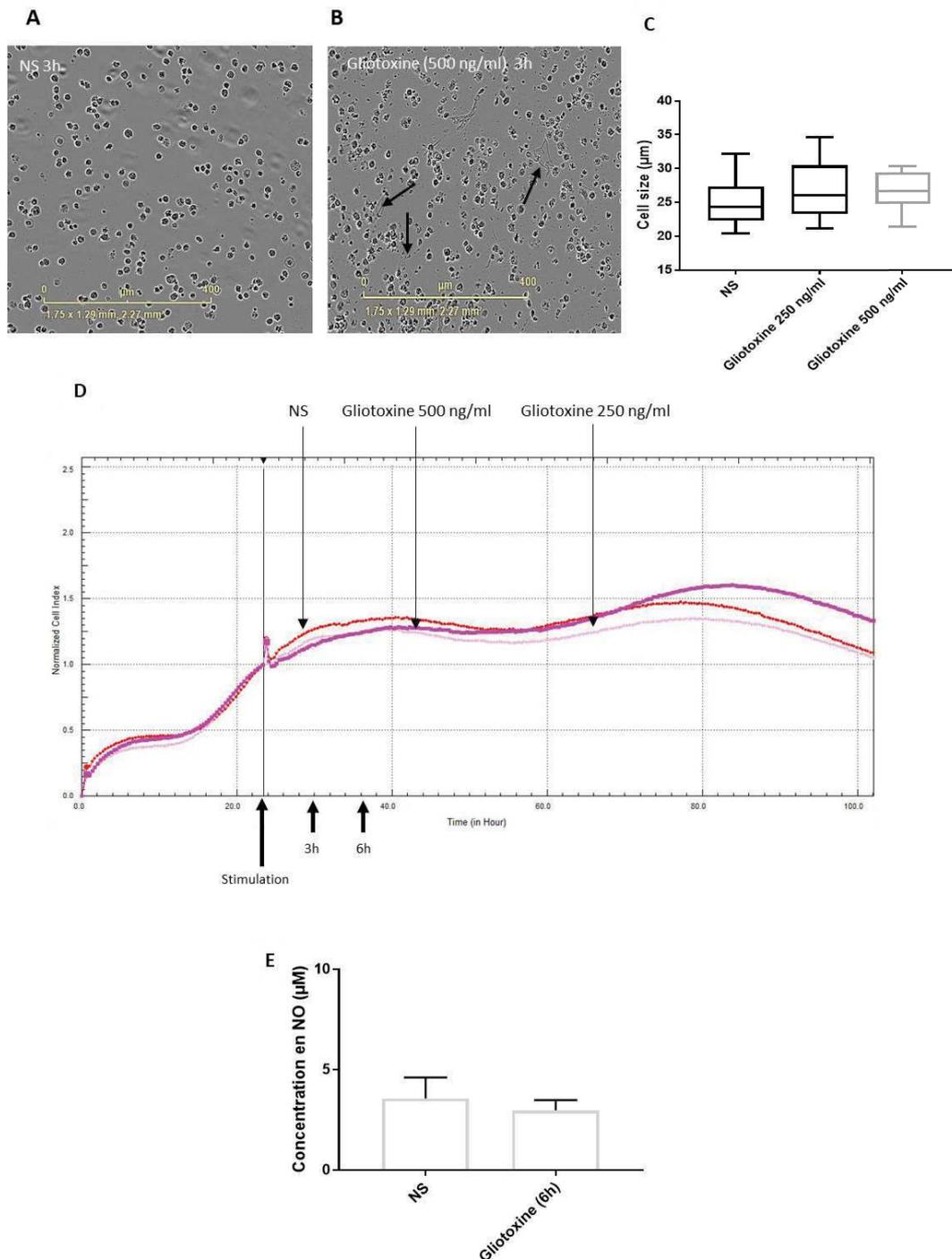


Figure 52 : Réponse des RAW264-7 à la gliotoxine.

A : Observations microscopiques en temps réel ($G \times 10$) des cellules non stimulées (NS) ; B : cellules 3h après stimulation à la gliotoxine (500 ng/ml), les flèches représentent les cellules dégradées ; C : Taille des cellules mesurée 3h post-stimulation, selon les concentrations en gliotoxine (250 et 500 ng/ml) ($n=4$), box plots représentant la médiane et les IQR.; D : Impédance des cellules au cours du temps, stimulées ou non avec différentes concentrations de gliotoxine (la ligne verticale noire correspond au temps de normalisation du « Cell Index » (CI), (courbes représentatives des $n=10$) ; E : Mesure de la concentration en NO (μM) sécrétée par les cellules 6h après stimulation à la gliotoxine (500 ng/ml) ($n=4$ en duplicat).

A.2.2.1.3. REPONSE A LA FUMAGILLINE AU COURS DU TEMPS

L'observation microscopique des cellules RAW264-7, 3h après stimulation à la fumagilline (4 µg/ml), montre une déformation des cellules et la présence de vacuoles témoignant d'une activité de phagocytose (Figure 53 A et B). La taille des cellules est significativement supérieure après stimulation, alors qu'aucune différence significative n'a été observée entre les deux concentrations en fumagilline (Figure 53 C).

Les courbes d'impédance montrent que le « Cell Index » normalisé des cellules NS reste globalement stable au cours du temps. À l'opposé, une augmentation importante du « Cell Index » normalisé (de 1 à 4,3), avec un pic à 3h post-stimulation pour les cellules stimulées avec la fumagilline est observé, comparées aux cellules NS. Puis une diminution importante de l'inclinaison de la pente est observée jusqu'à 10h post-stimulation avec un retour à un CI de 1,5 proche de la courbe des cellules non stimulées à 16h post-stimulation. (Figure 53 D). La concentration de NO sécrétée par les cellules n'est pas significativement différente entre les cellules stimulées et non stimulées (Figure 53 E).

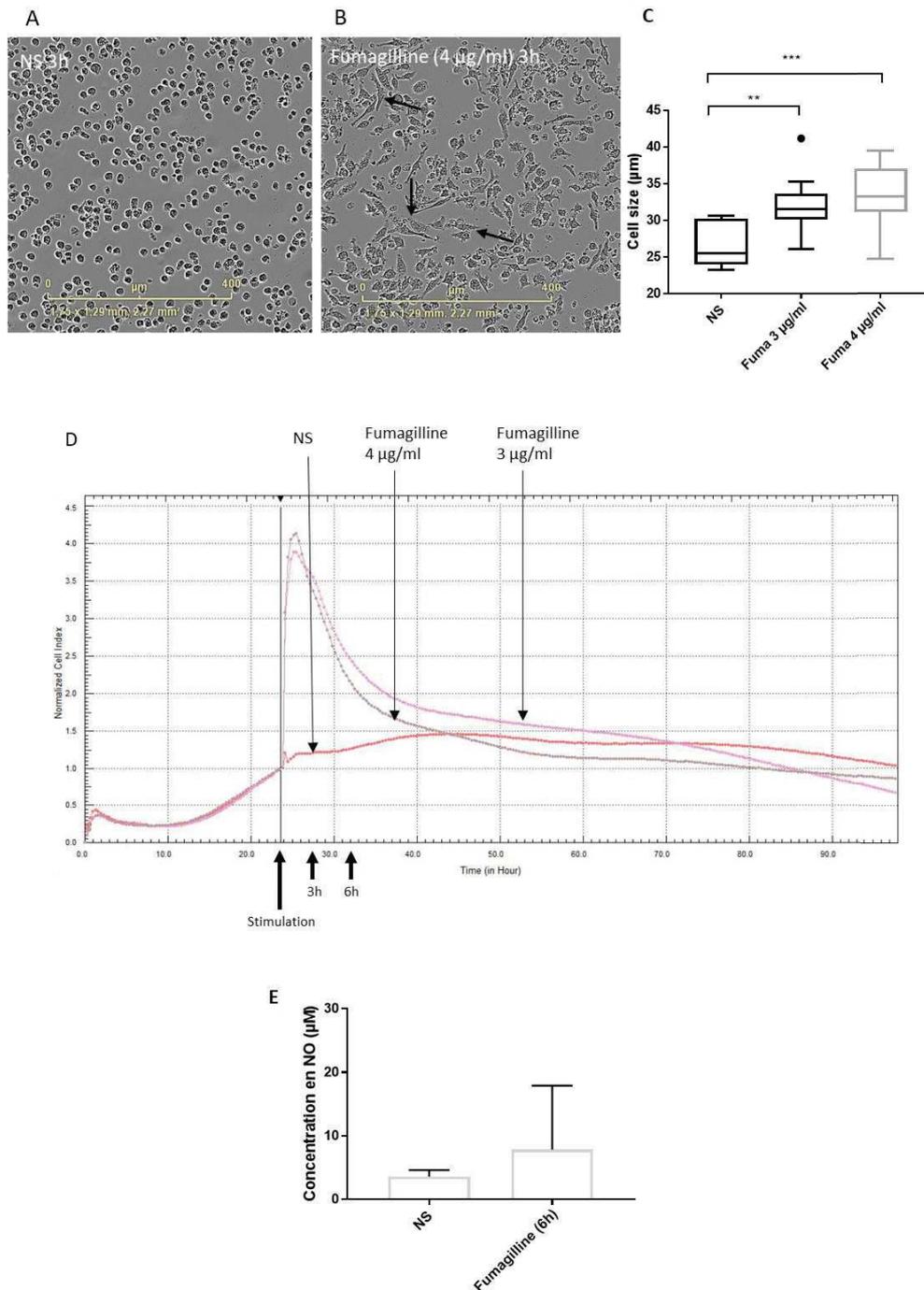


Figure 53: Réponse des RAW264-7 à la Fumagilline.

A : Observations microscopiques en temps réel ($G \times 10$) des cellules non stimulées (NS) ; B : cellules 3h après stimulation à la fumagilline ($4 \mu\text{g/ml}$), les flèches représentent les cellules déformées; C : Taille des cellules mesurée 3h post-stimulation, selon les concentrations en fumagilline (3 et $4 \mu\text{g/ml}$) ($n=4$), box plots représentant la médiane et les IQR.; D : Impédance des cellules au cours du temps, stimulées ou non avec différentes concentrations de fumagilline (la ligne verticale noire correspond au temps de normalisation du « Cell Index ») (CI), (courbes représentatives des $n=10$) ; E : Mesure de la concentration en NO (μM) sécrétée par les cellules 6h après stimulation à la fumagilline ($4 \mu\text{g/ml}$) ($n=4$). **, ***, différences significatives (respectivement $p < 0,01$; $p < 0,001$).

A.2.2.1.4. REPONSE AUX BIOPARTICULES D'E.COLI AU COURS DU TEMPS

L'observation des cellules au microscope à fluorescence Eclipse Ti (Nikon) a permis d'observer le nombre de BP phagocytées par les RAW264-7 en fonction de la concentration en BP (5 BP / cellule et 10 BP / cellule). Pour une concentration de 5 BP / cellule, 17% des macrophages ont phagocyté lorsque 500 000 cellules ont étéensemencées (Figure 54 B), alors que 35% des macrophages ont phagocyté lorsque 200 000 cellules ont étéensemencées (Figure 54 A). Pour une concentration de 10 BP / cellule, 90 % des macrophages avaient phagocyté des BP quel que soit le nombre de cellulesensemencées (Figure 54 C et D). C'est cette concentration de 10 BP / cellule qui a été retenue pour la suite de l'étude.

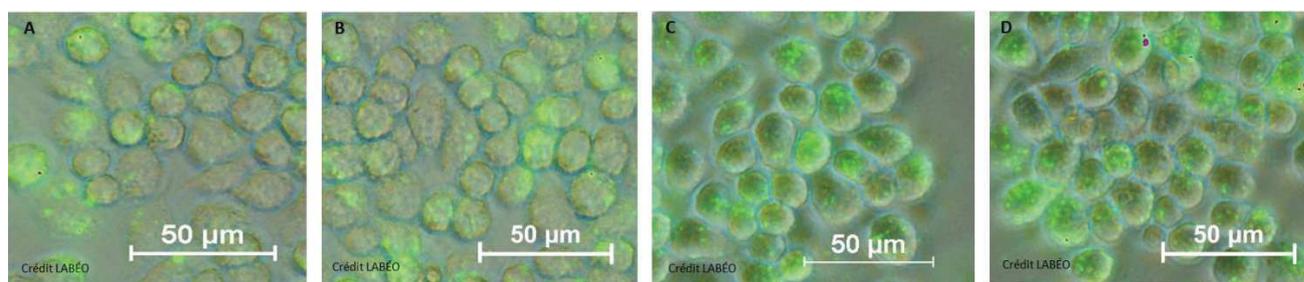


Figure 54 : Photographies des RAW264-7 en présence des BP prises au microscope à fluorescence (G x40). A : 200 000 cellules avec 5 BP / cellule ; B : 500 000 cellules avec 5 BP / cellule ; C : 200 000 cellules avec 10 BP / cellule ; D : 500 000 cellules/ml avec 10 BP / cellule. Les BP fluorescent en vert.

L'observation des cellules par l'IncuCyte a permis de suivre en temps réel l'activité de phagocytose néanmoins sans pouvoir compter le nombre de bioparticules ingérées par les macrophages (Figure 55 A et B). Les films effectués par l'IncuCyte permettent en plus, de visualiser le déplacement des cellules au cours du temps. Lors de la phagocytose, les cellules s'étalent et s'élargissent pour phagocyter les BP (Figure 55 B). De plus la taille des cellules augmente significativement en présence de BP (Figure 55 C).

Ces observations microscopiques sont confirmées par les courbes d'impédance. Le CI des cellules augmente immédiatement pour atteindre un CI de 1,5 après l'ajout des BP jusqu'à 6h post-stimulation puis la pente de la courbe diminue. Les cellules NS ont un « Cell Index » qui se maintient entre 1,0 et 1,2 au cours du temps (Figure 55 D). Enfin le test de Griess n'a montré aucune différence significative de la concentration en NO sécrétée par les cellules après 6h de stimulation aux BP (Figure 55 E).

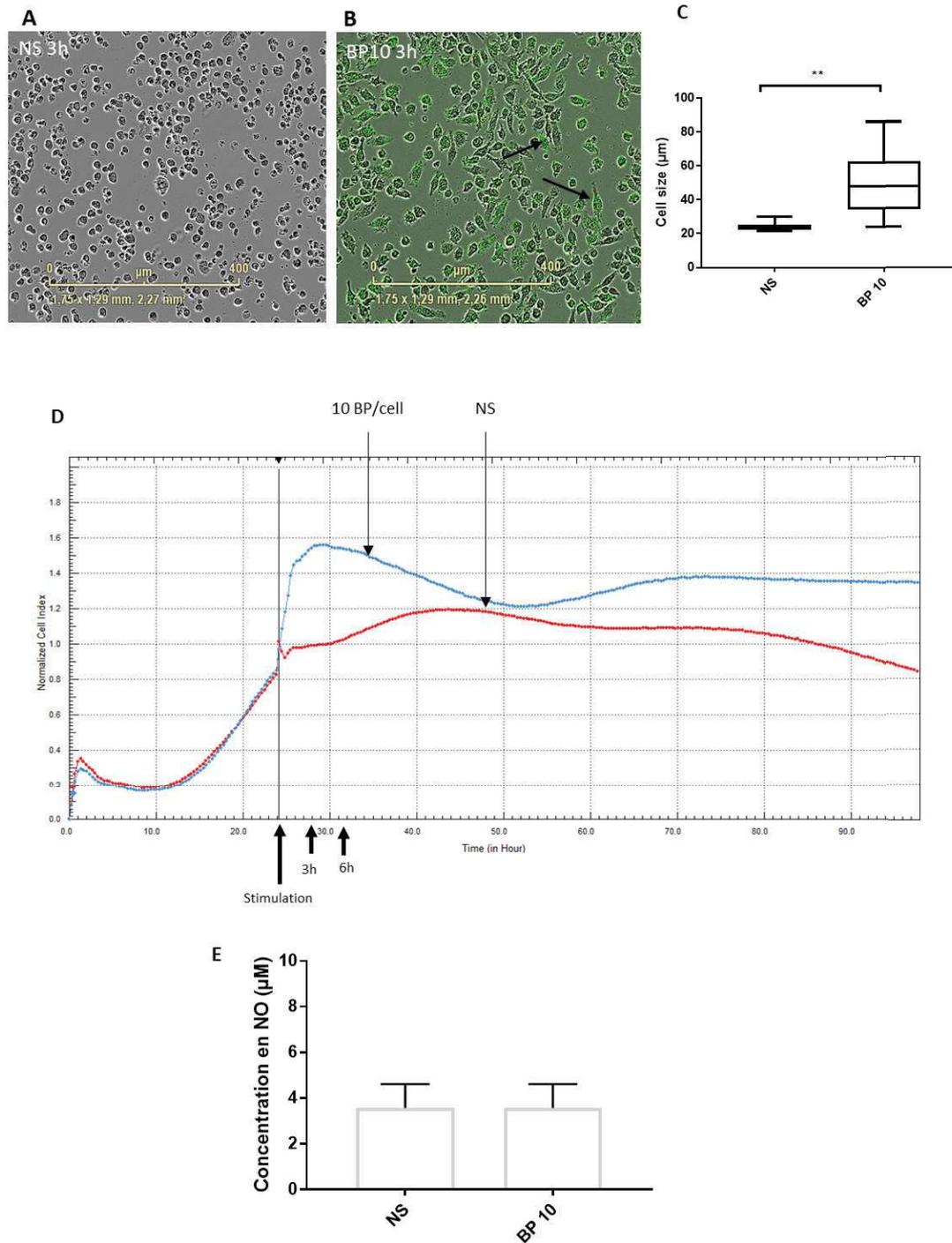


Figure 55: Réponse des RAW264-7 stimulées 10 bioparticules *E.coli* par cellule. A : Observations microscopiques en temps réel (G x10) des cellules non stimulées (NS) ; B : cellules 3h après stimulation avec des BP, les flèches montrent les cellules déformées ; C : Taille des cellules mesurée 3h post-stimulation aux BP (n=4), box plots représentant la médiane et les IQR. ; D : Impédance des cellules au cours du temps, stimulées ou non avec les BP (la ligne verticale noire correspond au temps de normalisation du « Cell Index » (CI), (courbes représentatives des n=10) ; E : Mesure de la concentration en NO (µM) sécrétée par les cellules 6h après stimulation aux BP (n=4, en duplicat). ** différences significatives (p < 0,01).

A.2.2.2. Réponse des RAW264-7 aux HDS au cours du temps

L'observation microscopique des cellules stimulées avec la solution de HDS provenant de foin sec (HDS B) montre une modification morphologique importante des cellules. Les macrophages s'étalent et se déplacent pour phagocyter la solution de HDS (Figure 56 B) comparés aux cellules non stimulées (Figure 56 A). De plus, des débris cellulaires sont observés (Figure 56 B et C). La taille des cellules est significativement augmentée lors de la phagocytose de la solution de HDS provenant de foin sec ou de la solution de HDS provenant de foin « à la vapeur » (Figure 56 D).

Les courbes d'impédance confirment ces observations. En présence de HDS sec l'impédance des cellules augmente rapidement et fortement pour atteindre un CI normalisé de 3,6 à 3h post-stimulation. L'inclinaison de la courbe diminue brusquement 4 h post-stimulation. Pour les cellules stimulées avec la solution de HDS provenant de foin « à la vapeur », une augmentation de l'impédance est aussi observée mais moindre que celle observée pour la stimulation avec la solution de HDS provenant de foin sec avec un CI normalisé de 2 à 3h post-stimulation. Cependant les profils des courbes sont les mêmes quelle que soit la solution de HDS (Figure 56 E).

Aucune différence significative n'a été observée pour la concentration en NO quelle que soit la stimulation (Figure 56 F).

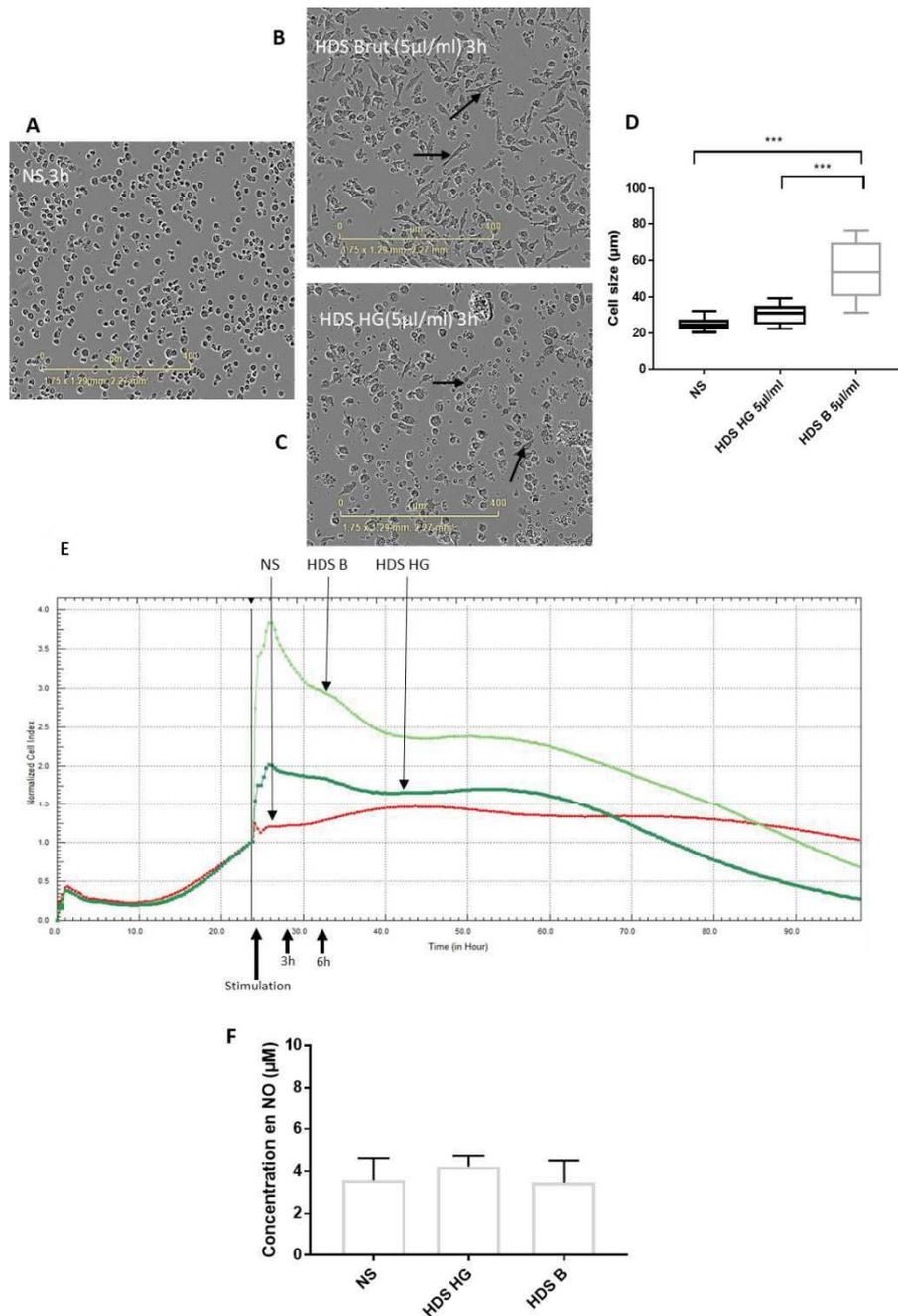


Figure 56 : Réponse des RAW264-7 stimulées avec les HDS provenant de foin sec et de foin « à la vapeur ». A : Observations microscopiques en temps réel ($G \times 10$) des cellules non stimulées (NS) ; B : cellules 3h après stimulation avec la solution de HDS provenant de foin sec (HDS B) ; C : cellules 3h après stimulation avec la solution de HDS provenant de foin « à la vapeur » (HDS HG), les flèches représentent les cellules déformées ; D : Taille des cellules mesurée 3h post-stimulation aux HDS ($n=4$), Box plots représentant la médiane et les IQR ; E : Impédance des cellules au cours du temps, stimulées ou non avec les HDS, (la ligne verticale noire correspond au temps de normalisation du « Cell Index » (CI), (courbes représentatives des $n=10$) ; F : Mesure de la concentration en NO (μM) sécrétée par les cellules 6h après stimulation aux HDS ($n=4$ en duplicat). *** différences significatives ($p < 0,001$).

A.2.3. Discussion

L'impédancemétrie et la microscopie en temps réel sont des technologies récentes nécessitant un certain nombre de mises au point préalablement à leur utilisation pour l'étude de la réponse des MA. Un développement a donc été effectué sur les RAW264-7, lignée de macrophages murins bien caractérisée dans la littérature.

L'impédancemétrie est la mesure de la force de résistance d'un tapis cellulaire au passage d'un courant électrique. Il est indispensable d'y associer de la microscopie en temps réel afin d'observer la morphologie des cellules pour comprendre les variations d'impédance observées. Les RAW264-7 étant une lignée cellulaire, la croissance cellulaire jusqu'à confluence permet d'observer une augmentation du CI et un profil de courbe représentatif de cette lignée. L'utilisation de l'xCeLLigence au sein du laboratoire étant récente, les études menées sur les RAW264-7 ont permis d'observer des profils de courbes spécifiques à chacun des stimuli.

Le LPS est un puissant activateur de différents types cellulaires tels que les macrophages alvéolaires (Zhang *et al.*, 2013). Une augmentation du CI normalisé a été observée pour les cellules stimulées au LPS. Les variations d'impédance au cours du temps et en fonction de la concentration en LPS confirment les résultats de Sun *et al.*, (2017) qui avaient étudié l'impédance des RAW264-7. La concentration de 500 ng/ml semble être appropriée pour l'étude de la capacité de phagocytose des macrophages, avec l'absence de dégradation à 6h post-stimulation. Des concentrations trop élevées en LPS peuvent être toxiques pour les cellules, menant à des dysfonctions cellulaires et un détachement des cellules. Dans notre étude, le tapis cellulaire se détériore à partir de 48h pour les macrophages murins stimulées au LPS (500 ng/ml), comme précédemment montré par Sun *et al.*, (2017). D'un point de vue microscopique, peu de variations morphologiques des cellules sont visibles entre 0 et 6h post-stimulation aux grossissements x10 et x20. Un grossissement plus fort aurait permis d'observer la présence de vacuoles dans les RAW264-7, témoin de leur activité de phagocytose. Cependant l'IncuCyte ne dispose actuellement pas d'un tel objectif à plus fort grossissement. Enfin, nos résultats obtenus par des techniques de culture en temps réel sont comparables à ceux de Karagianni, (2014) et à ceux de Sosroseno *et al.*, (2002), qui avaient montré une augmentation de la concentration en NO des macrophages murins dose dépendante au LPS.

La stimulation des cellules avec la gliotoxine n'a montré aucune différence d'impédance comparée aux cellules non stimulées et aucune variation morphologique n'a été relevée par microscopie mais des débris cellulaires ont été observés. La concentration en NO des cellules stimulées ou non ne varie pas quelle que soit la concentration en gliotoxine testée. Ainsi les

outils utilisés ne nous permettent pas de confirmer de manière certaine un effet toxique de la gliotoxine sur les cellules à une concentration de 500 ng/ml comme l'avait montré Schlam et *al.*, (2016) mais la présence de débris peut laisser supposer une action toxique de la gliotoxine à cette concentration.

La fumagilline, toxine produite par *Aspergillus fumigatus*, a été très peu étudiée jusqu'à présent. Les résultats du projet ont montré une augmentation importante et immédiate du CI normalisé pour les cellules stimulées avec 4 µg/ml de fumagilline, suivie d'une chute de l'impédance. Ces résultats sont concordants avec les observations faites par Sun et *al.*, (2017) en impédancemétrie lors de la stimulation des RAW264-7 avec une solution d'*Aspergillus fumigatus*. Cette même augmentation d'impédance avait été observée dans leur étude. Parallèlement, l'observation microscopique confirme ces résultats avec une augmentation de la taille des cellules stimulées à la fumagilline, ce qui témoigne d'une activité importante des macrophages avec une déformation de leur cytosquelette et une communication inter-cellulaire. Cependant aucune variation de la concentration en NO n'a été observée. La gliotoxine et la fumagilline sont connues pour être des toxines fongiques inhibant l'activité de phagocytose ce qui peut expliquer qu'aucune variation de NO n'ai été observée. D'autres études ont investigué l'effet de la fumagilline sur les neutrophiles (Fallon et *al.*, 2010 ; Tsunawaki et *al.*, 2004). Les résultats ont montré que la fumagilline inhibait l'activité de phagocytose et la dégranulation des neutrophiles. Il est difficile de comparer nos résultats car à ce jour l'effet de la fumagilline n'a pas été étudiées sur les macrophages. D'autres études et d'autres approches seront nécessaires pour conclure sur l'effet de la fumagilline sur les macrophages.

Les cellules ont aussi été stimulées avec des bioparticules d'*E.coli* couplées à la GFP, afin de visualiser l'internalisation des BP par les macrophages par microscopie en temps réel. Les résultats ont montré que les RAW264-7 étaient capables de phagocyter plusieurs BP, ce qui est en accord avec les résultats de Kapellos et *al.*, (2016) observés en microscopie en temps réel. En revanche l'utilisation des BP-GFP ne permet pas d'obtenir la même précision de quantification que celle permise avec l'utilisation des Bioparticules pHrodo. En effet, contrairement aux BP-GFP, les BP pHrodo ne fluorescent qu'une fois phagocytées par les macrophages, ce qui permet une quantification de la fluorescence représentative de l'activité de phagocytose par mesure de l'intensité de fluorescence. Etonnamment la sécrétion de NO ne varie pas significativement après stimulation des cellules avec des BP qui sont pourtant d'origine bactérienne comme le LPS.

La stimulation des RAW264-7 par la solution de HDS semble avoir un effet sur le CI normalisé des cellules ainsi que sur leur morphologie. Stimulées avec la solution de HDS provenant de

foin sec, le CI des cellules atteignait une valeur de 3,8 par rapport à une valeur de 1,2 pour les cellules CTL avant de diminuer rapidement 3h après stimulation. Le même profil de courbe a été observé chez les cellules stimulées avec la solution de HDS provenant de foin « à la vapeur », avec un pic atteignant une valeur de 2,0 à 3h post-stimulation. La microscopie a montré une augmentation importante de la taille des cellules en présence de HDS provenant de foin sec. Les HDS contenant des particules de grande taille (0 à 50 μm), notre hypothèse est que les macrophages s'élargissent afin de phagocyter les particules. Cependant après quelque temps le tapis cellulaire se détériore dû, semble-t-il, à une modification morphologique trop importante des macrophages alvéolaires. Les particules présentes dans la solution de HDS provenant de foin « à la vapeur » sont de plus petite taille et moins nombreuses dans le champ par rapport aux cellules stimulées avec de l'HDS provenant de foin sec, ce qui pourrait expliquer que la taille des RAW264-7 stimulées avec de l'HDS de foin « à la vapeur » ne soit pas significativement augmentée. La concentration en NO sécrétée par les RAW264-7 stimulées ne varie qu'en présence de LPS. Pourtant la solution de HDS contient aussi du LPS cependant il est possible que les LPS non purifiés présents dans la solution de HDS aient un effet différent sur les cellules par rapport à la solution de LPS purifié (011 : B4) utilisée pour stimuler les cellules *in vitro*. De plus, l'effet synergique des antigènes du foin, certains inhibant et d'autres favorisant l'activité de phagocytose, impacte la réponse phagocytaire des macrophages. Enfin, la sécrétion de NO, semble directement liée au mécanisme de phagocytose engendré par les macrophages en fonction du stimulus comme l'avait montré Saradna et *al.*, (2018) et Young et *al.*, (2018). Notre étude a montré une augmentation de la concentration en NO des RAW264-7, en réponse au LPS comme l'avait précédemment montré Karagianni et *al.*, (2013). En revanche pour les autres types de stimulation, aucune différence n'a été observée pour la sécrétion de NO par les cellules RAW264-7. Une autre hypothèse est liée à la polarisation des macrophages en fonction du stimulus. En effet, le LPS initie une polarisation des macrophages de type 1, reconnue pour sécréter du NO après stimulation au LPS (Arnold et *al.*, 2014 et Mac Micking et *al.*, 1997). Les autres antigènes ne semblent pas favoriser la polarisation des macrophages M1 puisque la concentration en NO ne varie pas. De plus, il est décrit que les macrophages M2 sont activés par des antigènes de type moisissure (Saradna et *al.*, 2018). Ainsi en présence de gliotoxine et de fumagilline, le type M2 est possiblement dominant ce qui expliquerait qu'en présence de ces antigènes, les cellules ne sécrètent pas de NO. Pour la stimulation avec la solution de HDS, comme il a été décrit dans la partie 2 : A.1.2., la suspension se compose d'un ensemble d'antigènes faisant intervenir des voies de signalisation différentes. L'effet synergique de ces antigènes n'a pas été étudié dans notre étude

mais cet aspect serait intéressant à développer. De plus, une cinétique pour le suivi de la concentration en NO n'a été faite que pour les cellules stimulées au LPS. Peut-être que l'étude de la concentration en NO au cours du temps serait souhaitable pour les cellules stimulées avec les autres antigènes afin d'identifier ou non la sécrétion de NO par les cellules stimulées sur un temps plus long.

Enfin, les différents outils utilisés sur les macrophages RAW264-7 semblent pertinents pour étudier la réponse des macrophages à différents stimuli et les résultats obtenus semblent cohérents avec les précédentes études. Ainsi, ces méthodologies seront appliquées aux macrophages alvéolaires équins afin d'étudier leur réponse aux différents antigènes choisis qui sont : la fumagilline, le LPS, les BP, et les HDS.

B. Caractérisation et stimulation *in vitro* des macrophages alvéolaires équins

B.1. Matériel et méthodes

B.1.1. Isolement des macrophages alvéolaires

Les MA ont été isolés à partir des LBA réalisés dans le poumon gauche des chevaux AES et CTL ayant participé au challenge selon le protocole décrit dans la partie 1 : C.2.1.1. Le culot cellulaire a été repris dans 3 ml de SVF 90% - DMSO 10% puis congelés dans 3 ampoules de congélation à -80°C avant conservation dans l'azote liquide. Les MA ont été dénombrés après coloration au bleu trypan 0,4 % (Lonza). Les MA ont été cultivés en milieu RPMI 1640 complétés avec 1 % de Penicilline Streptomycine Amphotericine (Eurobio) et 10 % de sérum de veau fœtal (SVF ; eurobio) incubées à 37°C sous 5 % de CO₂.

B.1.2. Immunophénotypage

La pureté des macrophages a été évaluée par immunophénotypage. Pour cela, 100 000 cellules ont été centrifugées à 600 g pendant 3 min, puis incubées avec les anticorps (Tableau 13) à 4°C pendant 30 min à l'obscurité avec la solution de marquage PBS/BSA 0,5 %.

Tableau 13 : Liste des anticorps et conditions d'utilisation

Condition	Cible	Cellules cibles	Fluorochrome	Clone	Réactivité	Référence	Fournisseur	Dilution	Canal de lecture
A	CD14	Macrophages, monocytes	APC/Cy7	HCD14	humains	BLE325620	Ozyme	1/20	APC-A750
B	CD14	Macrophages, monocytes	Pacific Blue	HCD14	humains	BLE325620	Ozyme	1/20	Pacific Blue
B	CD206	Macrophages M2	PC7	3.29B1.10	humains	B36120	Beckman Coulter	1/20	PC7
B	Pan B cells	Lymphocytes B	R-PE	CVS36	cheval	MCA1899PE	AbD serotec	1/20	PE
C	CD163	Macrophages,	FITC	AM3K	humain	MAB1733	Abnova	1/10	FITC

A : 100 000 cellules en présence de l'anticorps anti-CD14 ; B : 100 000 cellules en présence des anticorps anti-CD14, CD206 et Pan B cells ; C : 100 000 cellules en présence de l'anticorps anti-CD163.

Les cellules ont ensuite été lavées 3 fois avec la solution PBS/BSA 0.5 % et centrifugées à 600 g pendant 3 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été fixées à la Formaline (10 %) (Sigma) et conservées à 4°C à l'obscurité jusqu'à analyse par cytométrie en flux.

Dans un premier temps, une matrice de compensation a été réalisée avec les billes Versacomp (Beckman Coulter) selon les recommandations du fournisseur. Pour cela, une goutte de billes négatives et une goutte de billes positives ont été incubées 20 minutes à température ambiante en présence de chacun des anticorps (Tableau 13). Après une centrifugation de 6 minutes à 600 g, les billes ont été lavées au PBS, vortexées, centrifugées 6 minutes à 300 g puis reprises avec 600 µl de PBS et analysées au CytoFlex S 4 lasers (Beckman Coulter).

Après création et importation de la matrice de compensation, les cellules ont été analysées au cytomètre de flux Cytoflex S selon leur taille (FSC), leur granulométrie (SSC) et l'intensité de marquage de chacun des anticorps. Une région « R1 » a été définie pour les macrophages selon les critères de taille et de granulométrie et un total de 10 000 événements a été enregistré dans cette région.

B.1.3. Capacité de phagocytose et de macropinocytose de la population R1

Afin de compléter la caractérisation des MA, leurs capacités de phagocytose et de macropinocytose ont été investiguées. L'activité de macropinocytose a été évaluée par stimulation des cellules avec de la BSA comme décrit par Paillot et *al.*, (2001). L'activité de phagocytose a été étudiée en stimulant les cellules avec des bioparticules *d'E.coli* couplées à la GFP. Pour cela, 100 000 cellules ont étéensemencées dans des tubes Eppendorf. Les cellules ont été incubées avec 10 bioparticules *d'E.coli* couplées à la GFP (BP-GFP ; ThermoFisher Scientific) par cellule pendant 1h à 37°C, et avec 1 mg/ml de Bovine Serum Albumin -FITC (BSA-FITC ; Cliniscience) pendant 2h à 37°C. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 600 g pendant 3 min, lavées au PBS, centrifugées à 600 g pendant 3 min, puis marquées avec les panels d'anticorps (Tableau 13) comme décrit en B.1.2. Un total de 10 000 événements a été enregistré dans la région « R1 » et analysé en FITC. La phagocytose des BP a été évaluée dans la population CD14⁺ ou CD206⁺ de la région « R1 ». La macropinocytose a été évaluée sur les cellules CD206⁺ et CD14⁺ capables d'internaliser la BSA.

Parmi les cellules ayant phagocyté et/ou macropinocyté, les proportions de cellules CD14⁺ et/ou CD206⁺ ont été identifiées.

Les ratios de cellules CD14⁺ BP⁺/CD14⁺BP⁻, CD206⁺ BP⁺/ CD206⁺ BP⁻, CD14⁺BSA⁺/CD14⁺BSA⁻ et CD206⁺BSA⁺/ CD206⁺BSA⁻ ont aussi été calculés et comparés suivant le statut du cheval.

Dans un second temps, les données de cytométrie ont été comparées par un test de Mann Whitney chez les chevaux CTL et AES. Le seuil de significativité correspond à une p-value < 0,05.

B.1.4. Stimulation *in vitro* des macrophages alvéolaires

Les cellules isolées à J-2 et J+5 post-challenge au foin « à la vapeur », ainsi que J+5 post-challenge au foin sec, ont étéensemencées en plaque 96 puits « E-plate view PET » (ACEA) à 50 000 cellules / puits et stimulées après 3h d'adhésion avec les antigènes suivants : LPS (500 ng/ml), Fumagilline (4 µg/ml), HDS de foin sec (142 723 particules / puit), HDS de foin « à la vapeur » (3 690 particules / puits) et Bioparticules-GFP (10 BP / cellule). Dans le cas où le nombre de cellules disponibles était insuffisant, seules les stimulations au LPS et aux HDS ont été effectuées. Les mêmes protocoles d'acquisition que pour les macrophages murins ont été appliqués aux MA équins (Cf. Partie 2 : A.2.1.3.) En parallèle, 2 plaques 96 puits ont étéensemencées et traitées dans les mêmes conditions puis placées dans l'Incucyte® pour un suivi en temps réel des cultures cellulaires avec des captures d'images, toutes les 30 minutes, au grossissement x10 pour toutes les conditions, et x20 pour les cellules stimulées aux BP. Des observations microscopiques ainsi que des mesures de taille des cellules ont été réalisées avant stimulation et 3h post-stimulation par les différents antigènes. Pour cela, dans chacun des champs pris en photo par l'Incucyte®, 20 cellules ont été mesurées aléatoirement avec le logiciel ImageJ (fournisseur). Pour chaque condition, 50 µl de surnageant de culture ont été récupérés à 6h post-stimulation et congelés à -20°C, afin de doser les cytokines avec le kit EQCYTMAG-93K (Millipore). De plus 25 µl de surnageant de culture ont permis de doser la concentration de NO par le test de Griess (Cf. Partie 2 : A.2.1.4.).

Enfin, 750 000 cellules ont étéensemencées en plaque 12 puits. Après 3h d'adhésion, les cellules ont été stimulées avec du LPS (500 ng/ml), et des solutions de HDS (5 µl/ml) provenant respectivement de foin sec et « à la vapeur ». Les surnageants de culture ont été récupérés pour un dosage ultérieur des cytokines par la technique ELISA. Les cellules ont été récupérées et centrifugées 5 minutes à 600 g puis les culots ont été repris dans 1 ml de « RNA Protect cell Reagent » et conservées à -20°C afin d'étudier ultérieurement l'expression des ARNm. Enfin 750 000 cellules ont étéensemencées en plaque 12 puits. Après 3h d'adhésion, les cellules ont

été stimulées avec du LPS (500 ng/ml), et des HDS provenant de foin sec ou provenant de foin « à la vapeur » (5 µl/ml). Les surnageants de culture ont été récupérés pour un dosage ultérieur des cytokines par la technique ELISA. Les cellules ont été récupérées et centrifugées 5 minutes à 600 g puis les culots ont été récupérés dans 1 ml de « RNA Protect Cell Reagent » et conservées à -20°C afin d'étudier ultérieurement l'expression des ARNm.

Dans un premier temps les données issues de la stimulation des MA isolés à J-2 ont été comparées entre les chevaux AES et CTL.

Dans un deuxième temps, les données obtenues après stimulation (*in vitro*) par la solution de HDS provenant de foin sec des MA isolés pendant le challenge *in vivo* (respectivement J-2 et J+5 post-challenge au foin « à la vapeur », ainsi que J+5 post-challenge au foin sec) ont été étudiées. Les comparaisons ont été effectuées par une ANOVA à 2 facteurs, à savoir le statut du cheval (AES vs. CTL) et le challenge *in vivo* (foin sec ou foin « à la vapeur ») à l'aide du logiciel GraphPad. Le seuil de significativité était fixé à une p-value < 0,05.

B.1.5. Réponse protéique des macrophages alvéolaires stimulés

Les cytokines IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, l'éotaxine, le « Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor » (GM-CSF) et le « Monocyte Chemoattractant Protein-1 » (MCP-1) ont été mesurées avec le kit Milliplex® Map EQCYTMAG-93K (Millipore). Pour cela, 25 µl de surnageant de culture ont été analysés suivant les recommandations du fournisseur (Millipore) afin de quantifier la concentration en cytokines excrétée par les macrophages alvéolaires 6h après stimulation par respectivement, du LPS, de l'HDS de foin sec et de l'HDS de foin « à la vapeur ».

Les effets des différents stimuli sur la réponse immunitaire des MA ont été comparés en réalisant une ANOVA à 2 facteurs (le stimulus et le statut du cheval). Le seuil de significativité était donné pour une p-value < 0,05.

B.2. Résultats

B.2.1. Caractérisation de la population de macrophages alvéolaires

Les MA ont été isolés selon leur capacité d'adhésion cellulaire. L'analyse par cytométrie en flux a permis de distinguer trois populations cellulaires selon leur taille et leur granulométrie

(Figure 57 A). La population R1 était composée de cellules ayant une taille plus importante et une forte granulométrie que les 2 autres régions R2 et R3. Ainsi comme les macrophages sont des cellules de grande taille à forte granulométrie, il a été supposé que la population R1 regroupait les MA (Figure 57 A), soit 68 % des cellules isolées. L'expression des principaux marqueurs des monocytes et macrophages, à savoir CD14, CD163 et CD206 a été recherchée sur la population R1. De plus, afin d'identifier une éventuelle présence des lymphocytes B, le panel d'anticorps « Pan B Cells », reconnaissant les marqueurs de différenciation CD19, CD20, CD21, CD22 et CD79 a aussi été testé.

En se concentrant uniquement sur la population R1, nous avons obtenu un marquage avec l'anticorps anti-CD14 couplés APC-Cy7 ; alors que le même clone anti-CD14, mais couplé au Pacific Blue n'a pas donné de résultats concluant en terme de marquage cellulaire. La figure 56 B montre que les cellules de la population R1 exprimaient le CD206. L'anticorps anti-CD163 n'a pas fonctionné sur la population R1, malgré de nombreux tests faisant varier les concentrations et le temps d'incubation. Enfin l'anticorps anti-Pan B cells a montré une absence de marquage des cellules R1 (Figure 57 B). Donc la population R1 était CD14⁺, CD206⁺ et Pan B⁻ confirmant l'hypothèse que la population R1 regroupe bien les MA.

La population R2 est composée de cellules de petite taille et de faible granulométrie. Les cellules de la population R2 sont CD14⁻, CD206⁻ et Pan B⁺ correspondant aux lymphocytes (Figure 57 B). La population R3 est composée de cellules de moyenne taille avec une faible granulométrie. Les cellules sont CD14⁻, CD206⁻ et Pan B⁻ qui représentent des cellules hors monocytes, macrophages ou lymphocytes B (Figure 57 B).

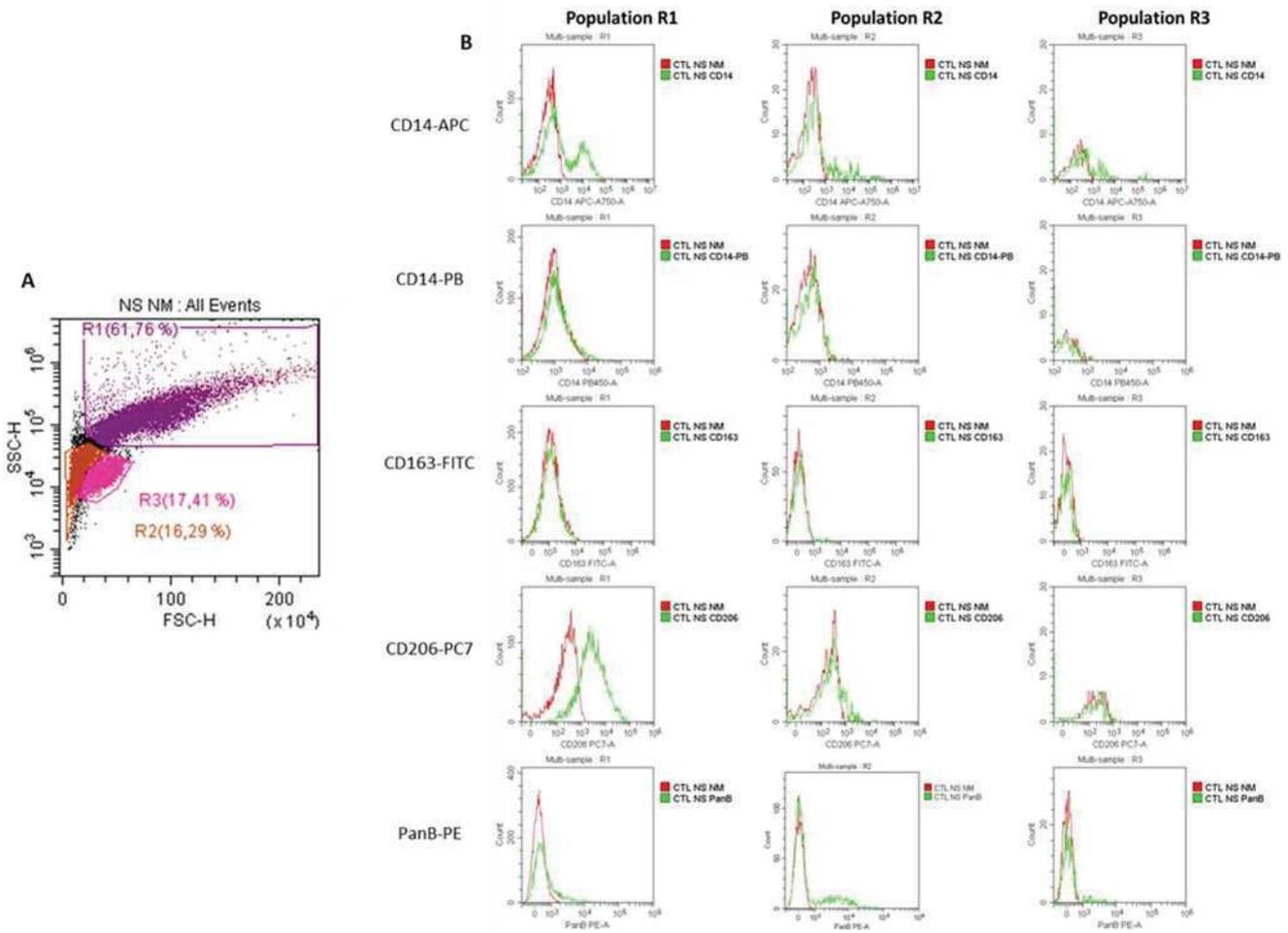


Figure 57 : Caractérisation des cellules isolées

A : Distribution des populations cellulaires en fonction de la taille (FSC) et de la granulométrie (SSC) ; B : Immunophénotypage des populations R1, R2 et R3 (B).

Les mécanismes de phagocytose et de macropinocytose ont été investigués dans la population de MA (R1). Les figures 58 A et E représentent les dot plot des cellules non marquées en CD14 (A) et non marquées en CD206 (E). Les figures 58 B et F représentent les cellules marquées sans BP ou BSA. Dans la population R1, 71% des cellules ont une activité de phagocytose des BP (Figure 58 C). Parmi les cellules CD14⁺, 23% ont phagocyté des BP (Figure 58 C). Il y a également 47 % de cellules CD14⁻ qui ont phagocyté les BP. Parmi les 55% de cellules CD206⁺ (Figure 58 G), 20% sont capables de phagocyter les BP (CD206⁺BP⁺) et 19% des cellules CD206⁻ sont aussi capables de phagocyter des BP (Figure 58 G). Dans la population R1, 15% des cellules sont capables de macropinocyter la BSA dont 7% sont CD14⁺ (Figure 58 D) et 12% de cellules CD206⁺ (Figure 58 H).

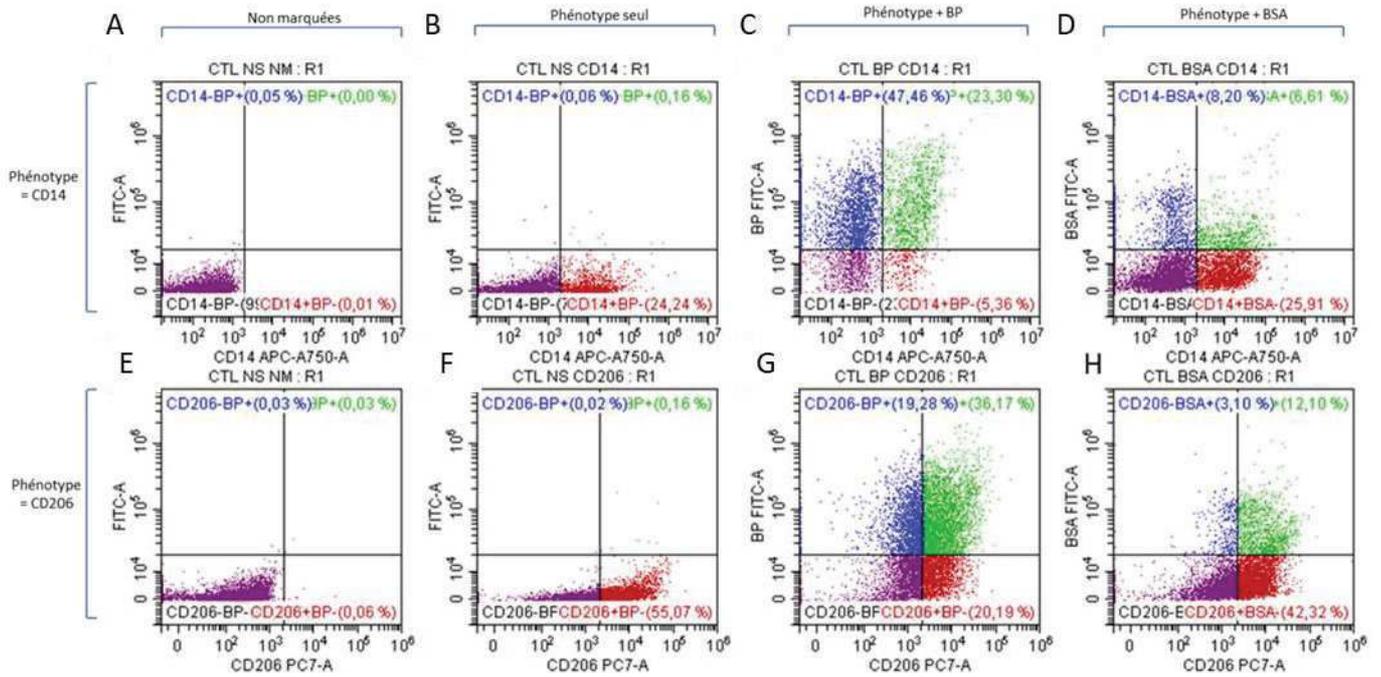


Figure 58 : Dot-plot représentant les proportions de cellules dans la population R1 par cytométrie en flux. A et E : Représentation des cellules de la population R1 non marquées ; B : Représentation des cellules marquées avec l'anticorps anti-CD14 ; C : Représentation des cellules marquées avec l'anticorps anti-CD14 en présence de BP-GFP ; (A, B, C : avec les cellules CD14⁻BP⁻ en bas à gauche, les cellules CD14⁻BP⁺ en haut à gauche, les cellules CD14⁺BP⁻ en bas à droite et les cellules CD14⁺BP⁺ en haut à droite) ; D : Marquées avec l'anticorps anti-CD14 en présence de BSA (cellules CD14⁻BSA⁻ en bas à gauche, cellules CD14⁻BSA⁺ en haut à gauche, cellules CD14⁺BSA⁻ en bas à droite et cellules CD14⁺BSA⁺ en haut à droite). F : Représentation des cellules marquées avec l'anticorps anti-CD206 ; G : Marquées avec l'anticorps anti-CD206 en présence de BP-GFP ; (E, F, G : avec les cellules CD206⁻BP⁻ en bas à gauche, les cellules CD206⁻BP⁺ en haut à gauche, les cellules CD206⁺BP⁻ en bas à droite et les cellules CD206⁺BP⁺ en haut à droite) ; H : Marquées avec l'anticorps anti-CD206 en présence de BSA (cellules CD206⁻BSA⁻ en bas à gauche, cellules CD206⁻BSA⁺ en haut à gauche, cellules CD206⁺BSA⁻ en bas à droite et cellules CD206⁺BSA⁺ en haut à droite). (n=6).

La population R1 exprime les marqueurs CD14 et CD206. Elle a également les capacités de phagocyter et de macropinocyter ce qui confirme l'hypothèse que ces cellules sont bien des MA. La région R1 sera donc appliquée à l'ensemble des analyses par cytométrie en flux des échantillons obtenus lors du challenge pour l'étude des MA.

L'observation microscopique en temps réel montre que les MA équins se regroupent et forment des groupements de cellules en présence de BP (Figures 59 B et C) comparé aux cellules non stimulées (Figures A et C). De plus la fluorescence des bioparticules permet de visualiser la

phagocytose. Cependant, la phagocytose des BP semble conduire à la dégradation de certains MA après 3h d'incubation (Figure 59 B).

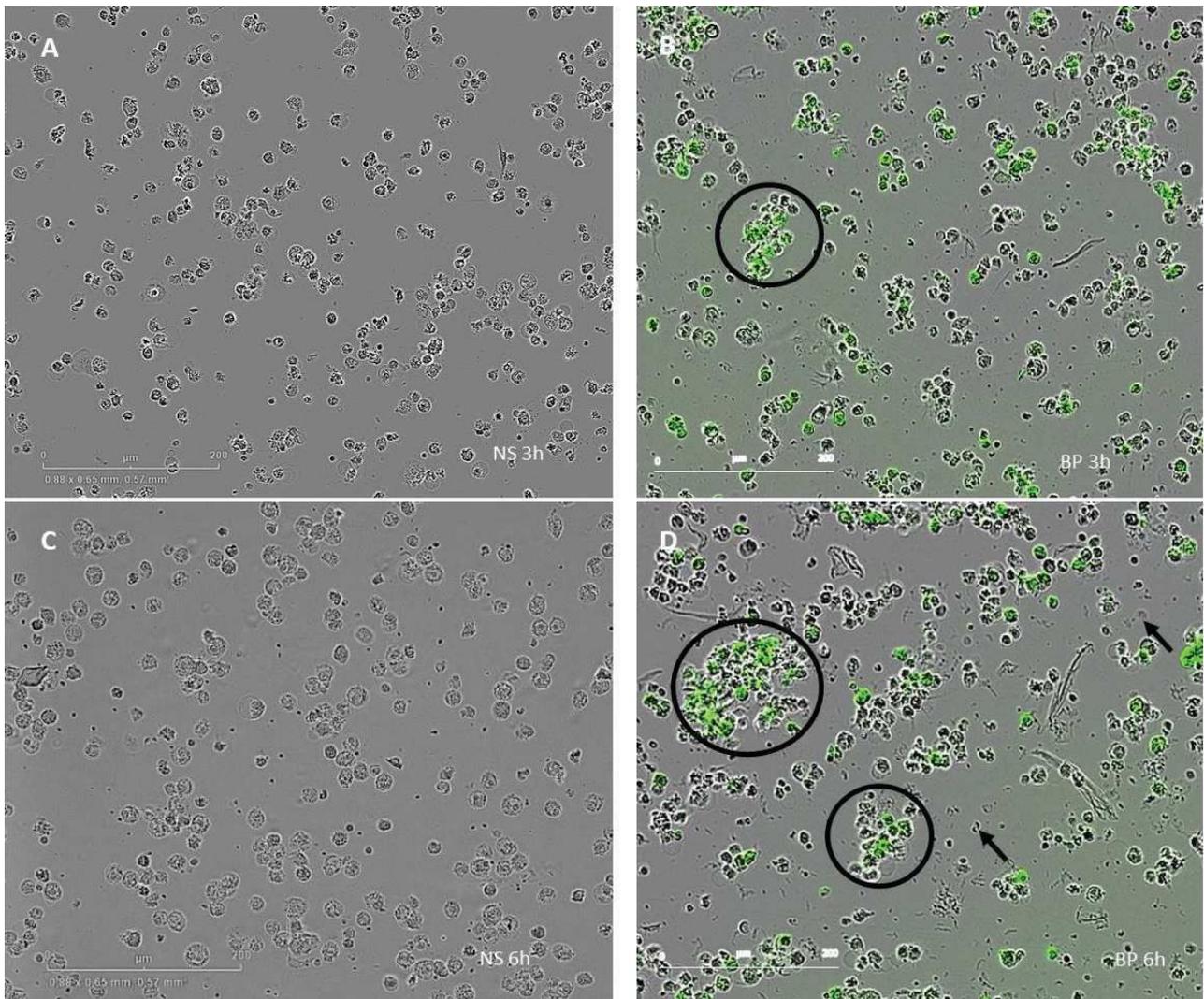


Figure 59 : Observations microscopiques en temps réel des macrophages alvéolaires en présence de bioparticules d'*E.coli* couplées à la GFP (10 BP / cellule) (G x20).

A : MA non stimulés ; B : 3h post-stimulation aux bioparticules ; C : MA non stimulés 6h post-traitement ; D : 6h post-stimulation aux bioparticules. Les cercles représentent les regroupements de cellules ; les flèches représentent les cellules dégradées. (n=6).

B.2.2. Comparaison de l'activité de phagocytose et de macropinocytose des MA isolés des chevaux AES et CTL

B.2.2.1. Activité de phagocytose

B.2.2.1.1. PAR CYTOMETRIE EN FLUX

Les macrophages alvéolaires isolés chez les chevaux AES et CTL à J-2 ont été caractérisés par immunophénotypage comme étant CD14⁺ et CD206⁺ dans la population R1 définie dans la figure 57. La pureté des MA était de 62 ± 9,6 % pour les chevaux CTL et de 57 ± 7,3 % pour les chevaux AES.

Les proportions de cellules CD14⁺ étaient significativement supérieures chez les chevaux AES comparés aux chevaux CTL ($p = 0.04$). Aucune différence significative n'a été observée pour les proportions de cellules CD206⁺ pour les chevaux CTL et AES (Figure 60).

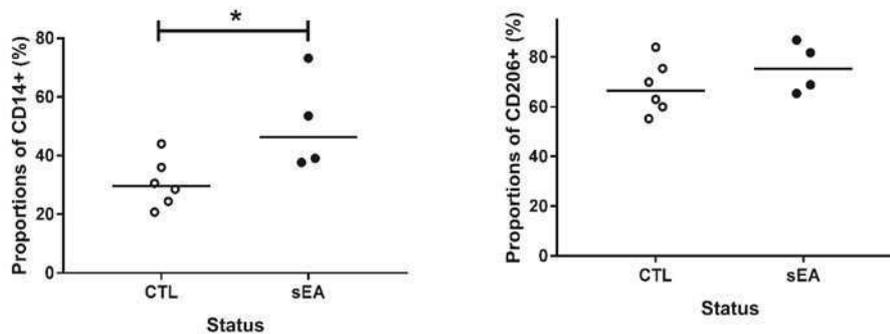


Figure 60 : Proportion de cellules CD14⁺ et CD206⁺ dans la population R1 suivant le statut du cheval. * valeurs significativement différentes selon le statut du cheval (CTL vs. sEA (ou AES)) ($p < 0,05$). Les barres horizontales représentent la médiane. Chevaux CTL ($n=6$) et chevaux AES ($n=4$).

La proportion des cellules ayant phagocyté des BP (CD14⁻ BP⁺ et CD14⁺ BP⁺) n'était pas significativement différente selon le statut du cheval (Figure 61 A).

La proportion de l'ensemble des cellules CD14⁺ (CD14⁺BP⁻ et CD14⁺BP⁺) était significativement supérieure chez les chevaux AES comparés aux chevaux CTL ($p = 0,02$) (Figure 61 B). Le pourcentage de cellules CD14⁺ ayant phagocyté les BP (CD14⁺BP⁺) était significativement supérieure chez les chevaux AES comparés aux chevaux CTL ($p = 0,04$) (Figure 61 C). La figure 61 représente les dot-plot des cellules des chevaux CTL (D) et AES (E).

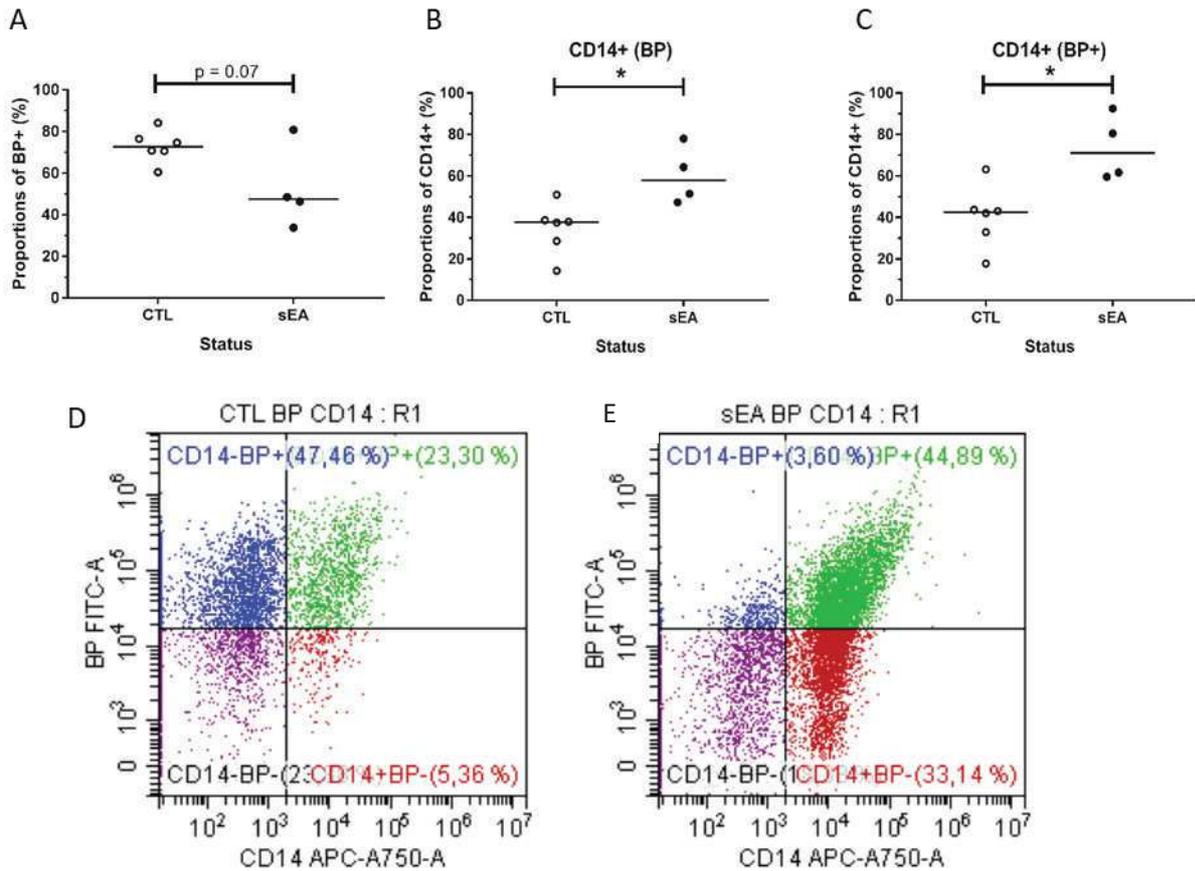


Figure 61 : Activité de phagocytose de la population R1 ($CD14^+$ et $CD14^-$) selon le statut du cheval.

A : Proportion de cellules BP^+ dans l'ensemble de la population $CD14^+$ et $CD14^-$ en fonction du statut du cheval ; B : Proportion de cellules $CD14^+$ parmi les cellules BP^+ et BP^- en fonction du statut du cheval ; C : Ratio de cellules $CD14^+BP^+/CD14^+BP^-$ en fonction du statut du cheval ; Les barres horizontales représentent la médiane. D et E : Dot-plot représentant les proportions de cellules $CD14^-/BP^-$ (en bas à gauche), $CD14^-/BP^+$ (en haut à gauche), $CD14^+/BP^-$ (en bas à droite), $CD14^+/BP^+$ en haut à droite pour les MA de chevaux CTL (D) et de chevaux AES (E). * différences significatives ($p < 0,05$). Chevaux CTL ($n=6$) et chevaux AES ($n=4$).

Dans la région R1, l'ensemble des cellules ayant phagocyté les BP ($CD206^+BP^+$ et $CD206^+BP^-$) n'était pas significativement différent suivant le statut du cheval (Figure 62 A).

De plus, aucune différence significative n'a été observée pour l'ensemble des cellules $CD206^+$ (populations $CD206^+BP^-$ et $CD206^+BP^+$) ni pour la proportion de cellules $CD206^+$ ayant phagocyté les BP suivant le statut du cheval (Figures 62 B et C). Les cellules sont représentées en dot plot sur les figures 62 D et E.

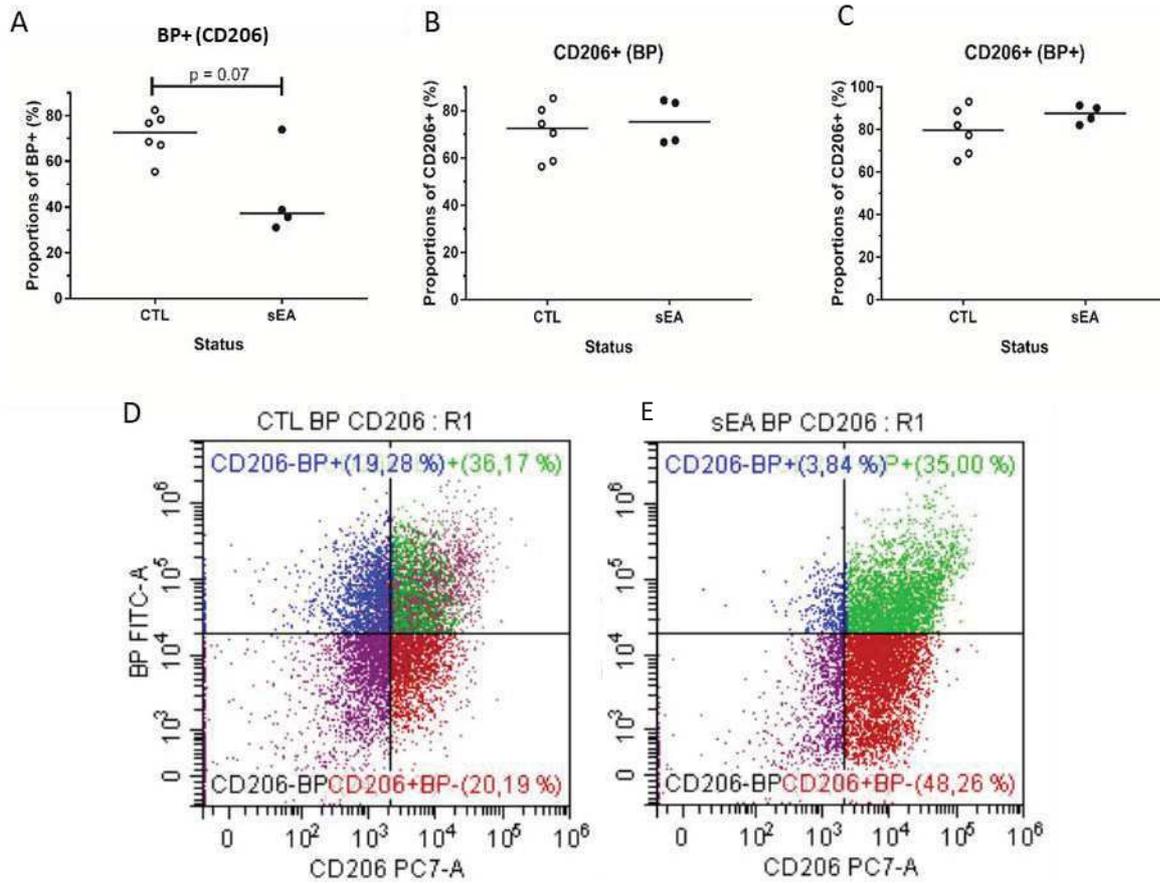


Figure 62 : Activité de phagocytose de la population R1 (CD206⁺ et CD206⁻) selon le statut du cheval

A : Proportion de cellules BP⁺ dans l'ensemble de la population CD206⁺ et CD206⁻ en fonction du statut du cheval ; B : Proportion de cellules CD206⁺ parmi les cellules BP⁺ et BP⁻ en fonction du statut du cheval ; C : Ratio de cellules CD206⁺BP⁺/CD206⁺BP⁻ en fonction du statut du cheval ; Les barres horizontales représentent la médiane. D et E : Dot-plot représentant les proportions de cellules CD206⁻/BP⁻ (en bas à gauche), CD206⁻/BP⁺ (en haut à gauche), CD206⁺/BP⁻ (en bas à droite), CD206⁺/BP⁺ (en haut à droite) pour les MA de chevaux CTL (D) et de chevaux AES (E). Chevaux CTL (n=6) et chevaux AES (n=4).

Par ailleurs, la stimulation des cellules par des BP n'a pas eu d'effet significatif sur la proportion de cellules CD14⁺ et CD206⁺, quel que soit le statut du cheval (Figure 63 A et B).

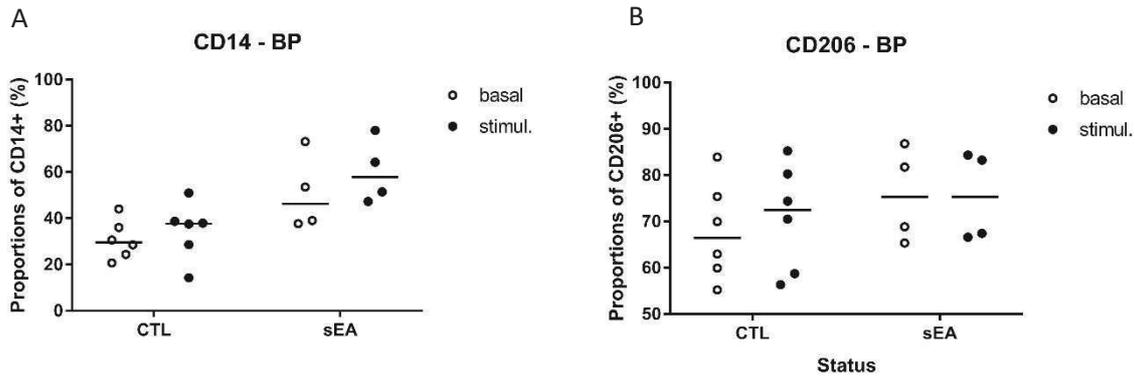


Figure 63 : Effet des bioparticules d'*E.coli* sur l'expression du CD14 (A) et du CD206 (B) à la surface des MA. Les barres horizontales représentent la médiane. Chevaux CTL (n=6) et chevaux AES (n=4).

B.2.2.2. Activité de macropinocytose

La proportion de cellules ayant macropinocyté la BSA (CD14⁻ BSA⁺ et CD14⁺ BSA⁺) n'est pas significativement différente selon le statut du cheval (Figure 64 A). La proportion des cellules CD14⁺ (populations CD14⁺ BSA⁻ et CD14⁺ BSA⁺) est significativement supérieure chez les chevaux AES *vs.* CTL (p = 0,02) (Figure 64 B). La proportion de cellules CD14⁺ BSA⁺ est significativement supérieure chez les chevaux AES (p = 0,04) (Figure 64 C). Les dot plot des cellules des chevaux CTL et AES sont représentés par les figures 64 D et E.

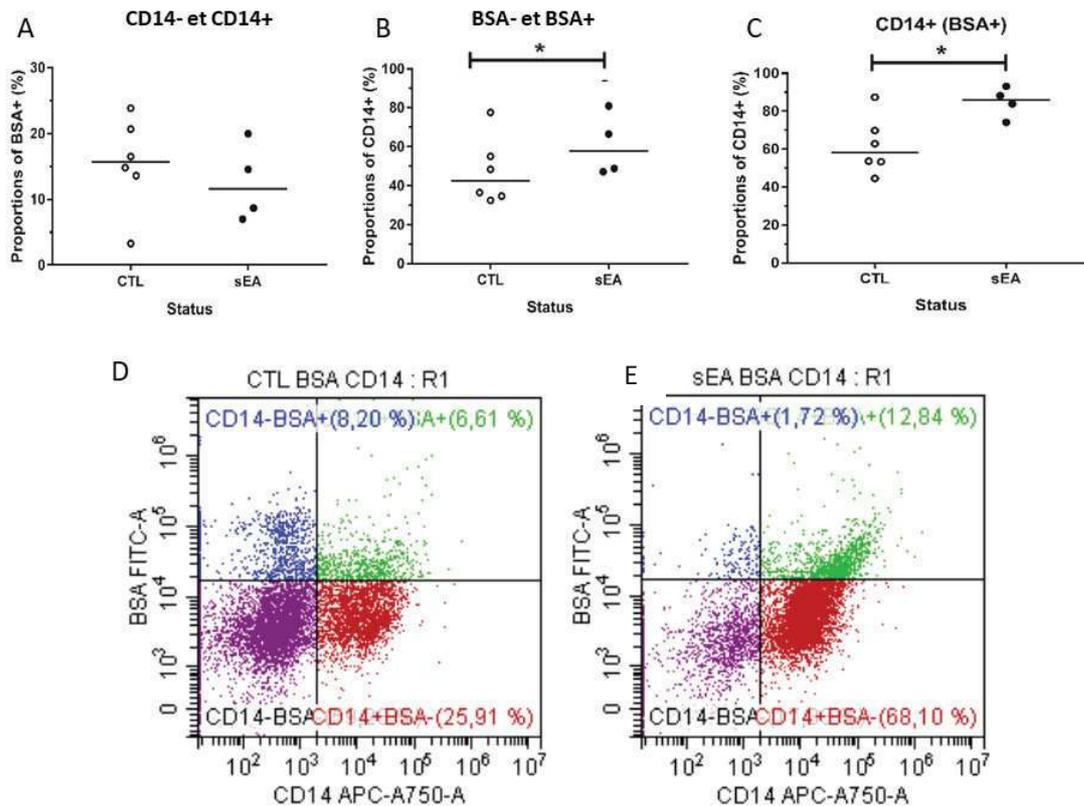


Figure 64 : Activité de macropinocytose de l'ensemble de la population R1 (CD14⁺ et CD14⁻) selon le statut du cheval

A : Proportion de cellules BSA⁺ dans l'ensemble de la population CD14⁺ et CD14⁻ en fonction du statut du cheval ; B : Proportion de cellules CD14⁺ parmi les cellules BSA⁺ et BSA⁻ en fonction du statut du cheval ; C : Ratio de cellules CD14⁺ BSA⁺ / CD14⁻ BSA⁺ en fonction du statut du cheval ; Les barres horizontales représentent la médiane. D et E : Dot-plot représentant les proportions de cellules CD14⁻ / BSA⁻ (en bas à gauche), CD14⁻ / BSA⁺ (en haut à gauche), CD14⁺ / BSA⁻ (en bas à droite), CD14⁺ / BSA⁺ (en haut à droite) pour les MA de chevaux CTL (D) et des chevaux AES (E). * différences significatives ($p < 0,05$). Chevaux CTL ($n=6$) et chevaux AES ($n=4$).

Il n'y a pas de différence significative dans les proportions de cellules ayant macropinocyté de la BSA (CD206⁻ BSA⁺ et CD206⁺ BSA⁺) suivant le statut du cheval (

Figure 65 65 A). De plus, aucune différence significative n'a été observée pour la proportion de cellules CD206⁺ (populations CD206⁺ BSA⁻ et CD206⁺ BSA⁺) (Figure 65 B) ni pour la proportion de cellules CD206⁺ ayant phagocyté de la BSA suivant le statut du cheval (Figure 65 C). Les dot plot des cellules des chevaux CTL et AES sont représentés par les figures 65 D et E.

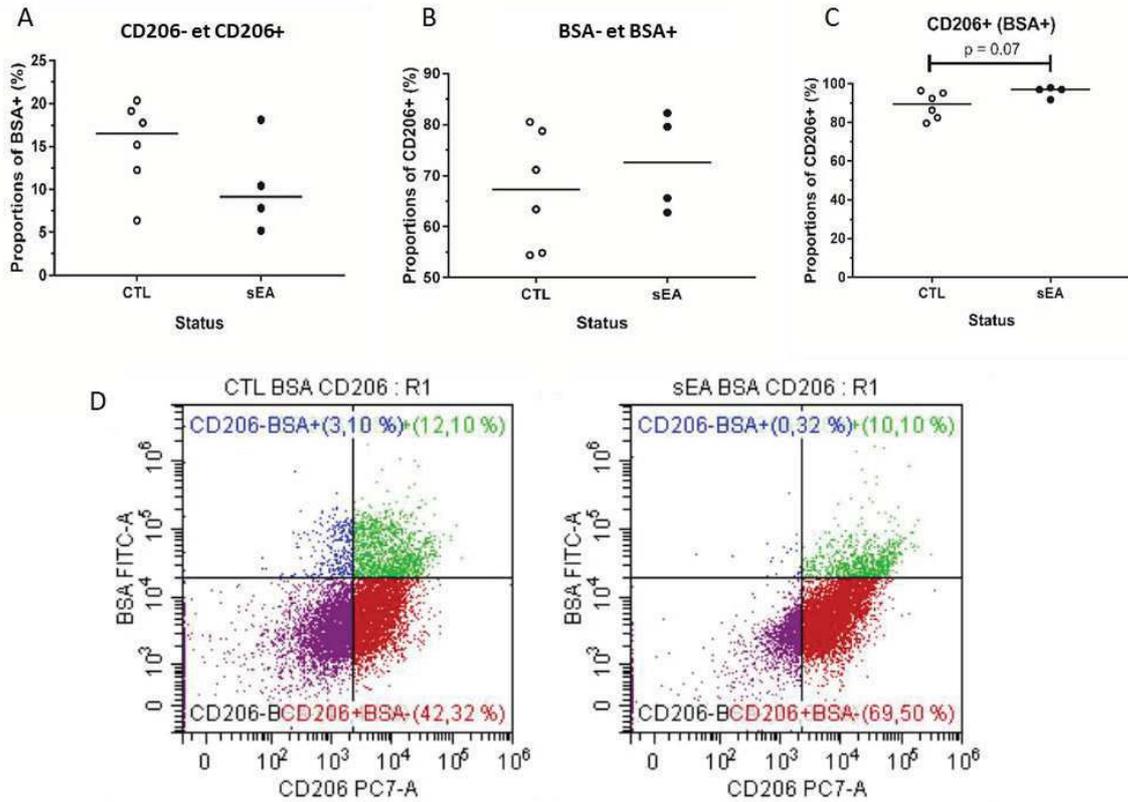


Figure 65 : Activité de macropinocytose de l'ensemble de la population R1 (CD206⁺ et CD206⁻) selon le statut du cheval

A : Proportion de cellules BSA⁺ dans l'ensemble de la population CD206⁺ et CD206⁻ en fonction du statut du cheval ; B : Proportion de cellules CD206⁺ parmi les cellules BSA⁺ et BSA⁻ en fonction du statut du cheval ; C : Ratio de cellules CD206⁺BSA⁺/CD206⁻BSA⁺ en fonction du statut du cheval. ; Les barres horizontales représentent la médiane. D et E : Dot-plot représentant les proportions de cellules CD206⁻/BSA⁻ (en bas à gauche), CD206⁻/BSA⁺ (en haut à gauche), CD206⁺/BSA⁻ (en bas à droite), CD206⁺/BSA⁺ en haut à droite pour les MA de chevaux CTL (D) et des chevaux AES (E). Chevaux CTL (n=6) et chevaux AES (n=4).

Un effet significatif de la BSA a été observé sur la proportion de cellules CD14⁺ chez les chevaux AES (p = 0,04) mais pas chez les chevaux CTL (p = 0,06) (Figure 66 A). Aucun effet de la BSA n'a été observé sur la proportion de cellules CD206⁺, quel que soit le statut (Figure 66 B).

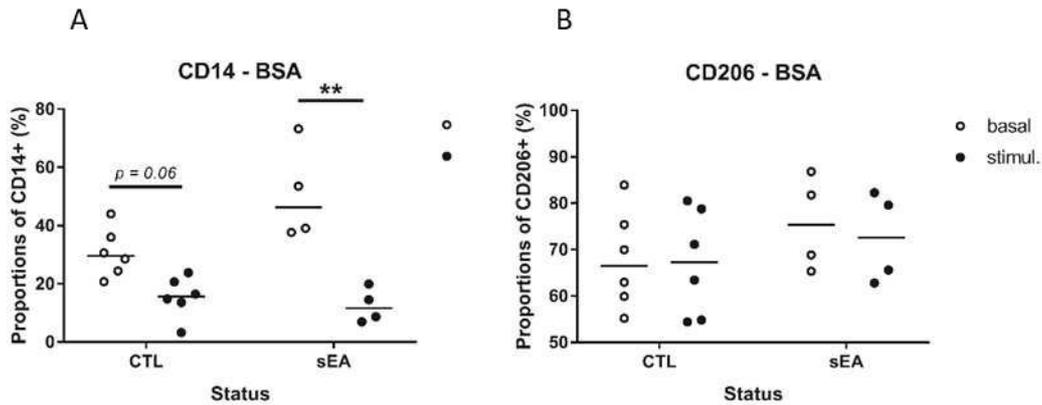


Figure 66 : Effet de la BSA sur l'expression de CD14 et de CD206 à la surface des MA
**** valeurs significativement différentes entre la proportion de cellules CD14⁺ BSA⁺ et CD14⁺ BSA⁻ chez les chevaux AES ($p < 0,01$). Les barres horizontales représentent la médiane. Chevaux CTL (n=6) et chevaux AES (n=4).**

B.2.3. Réponse à une stimulation *in vitro* des MA issus de chevaux préalablement challengés *in vivo*

B.2.3.1. Stimulation *in vitro* des MA « naïfs »

Cette étape est effectuée sur les MA issus des LBA prélevés avant la réalisation des challenges *in vivo* (à J-2). Les MA présentent des modifications morphologiques dès la mise en présence de différents stimuli. Les MA se regroupent en présence de LPS. Ce regroupement est plus visible chez les MA des chevaux CTL (Figure 67 A) que ceux provenant de chevaux AES (Figure 67 B). En présence de HDS de foin sec, des regroupements de cellules formant des amas cellulaires sont observés chez les MA des chevaux CTL comparé aux MA des chevaux AES ou seuls des rapprochements de cellules sont observés. De plus, une détérioration du tapis cellulaire est observée pour les MA des chevaux CTL en présence de HDS de foin sec 3h post-stimulation. Les MA des chevaux CTL sont déformés et forment des regroupements en présence de HDS provenant de foin sec. Les modifications cellulaires sont moins visibles chez les chevaux AES. Les regroupements de cellules sont moins nombreux en présence de HDS provenant de foin sec. De plus, le tapis cellulaire des MA provenant des chevaux AES semble moins détérioré que chez les chevaux CTL 3h post-stimulation.

La Figure 72 C montre que la taille des MA stimulés *in vitro* avec la solution de HDS de foin sec est significativement plus élevée chez les chevaux CTL et AES, comparée aux cellules stimulées avec LPS, fumagilline, HDS de foin « à la vapeur » et aux cellules non stimulées.

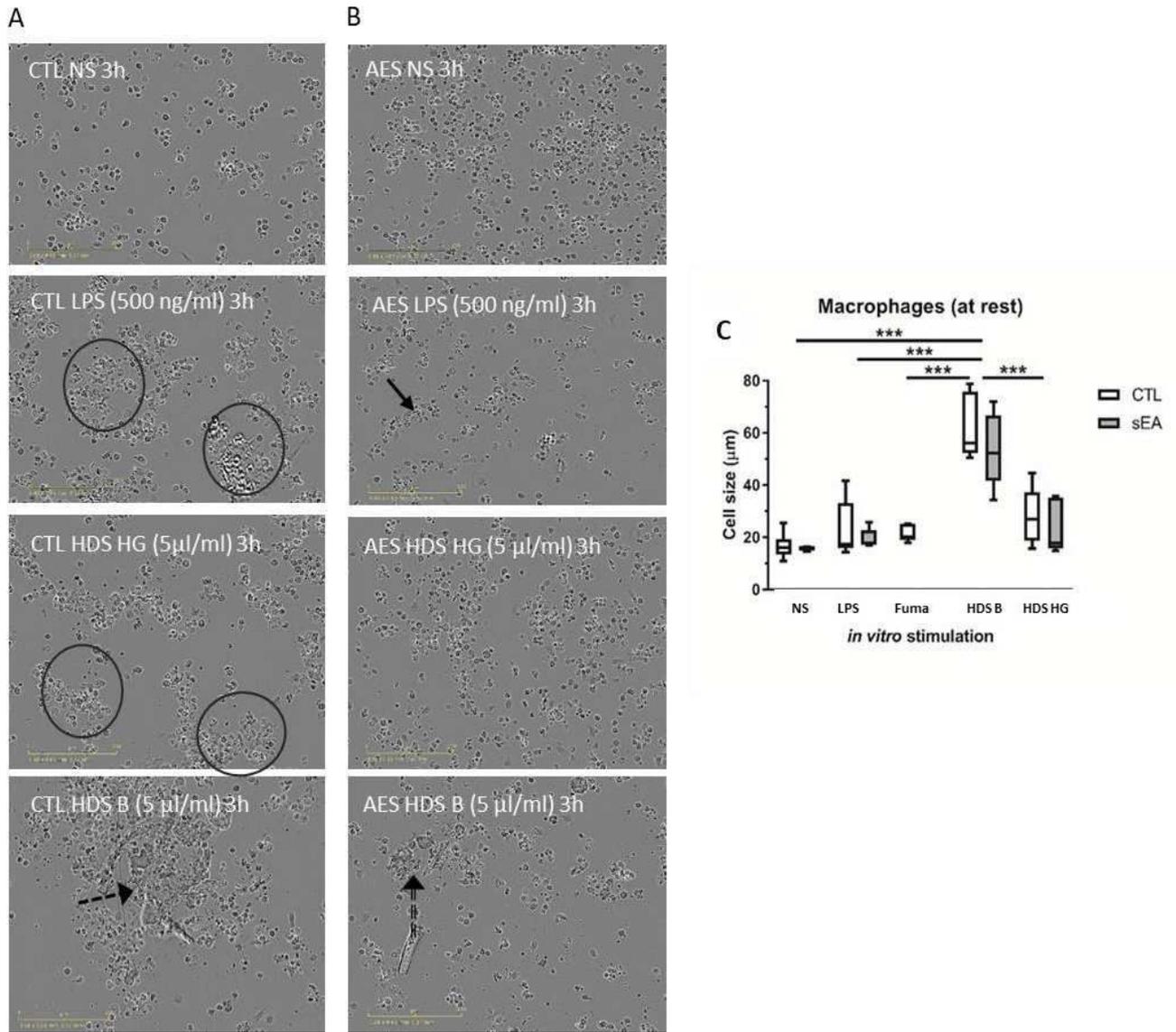


Figure 67 : Observations microscopiques en temps réel des macrophages alvéolaires stimulés isolés J-2 pré- challenge HG et stimulés *in vitro* avec du LPS, des solutions de HDS provenant de foin sec (HDS B) et de foin « à la vapeur » (HDS HG) pendant 3h (G x20).

A (de haut en bas) : Cellules non stimulées, Cellules stimulées au LPS, cellules stimulées avec la solution de HDS HG, cellules stimulées avec la solution de HDS sec chez les chevaux CTL 3h post-stimulation ; B : (de haut en bas) : Cellules non stimulées, Cellules stimulées au LPS, cellules stimulées avec la solution de HDS HG, cellules stimulées avec la solution de HDS sec chez les chevaux AES 3h post-stimulation. Les cercles représentent les groupements de cellules, la flèche noire représente un rapprochement de cellules, les flèches en pointillés montrent la détérioration des cellules ; C : Taille des MA isolés de chevaux AES et CTL à J-2 non stimulés (NS), stimulés au LPS (500 ng/ml), à la fumagilline (4 µg/ml), avec la solution de HDS provenant de foin sec (HDS B) et de foin « à la vapeur » (HDS HG) (5µl/ml), Box plots représentent la médiane et les IQR. Chevaux CTL (n=6) et chevaux AES (n=5). La fumagilline n'a pas été testée sur les MA des chevaux AES par manque de cellules.

Contrairement au modèle de macrophages murins, l'impédancemétrie n'a pas permis de mettre en évidence des profils de courbes analysables (Figure 68). En effet, le CI est très faible et ne permet pas la normalisation des datas. Des mises au point supplémentaires seront nécessaires afin d'étudier les variations de CI pour investiguer la réponse des MA par impédancemétrie.

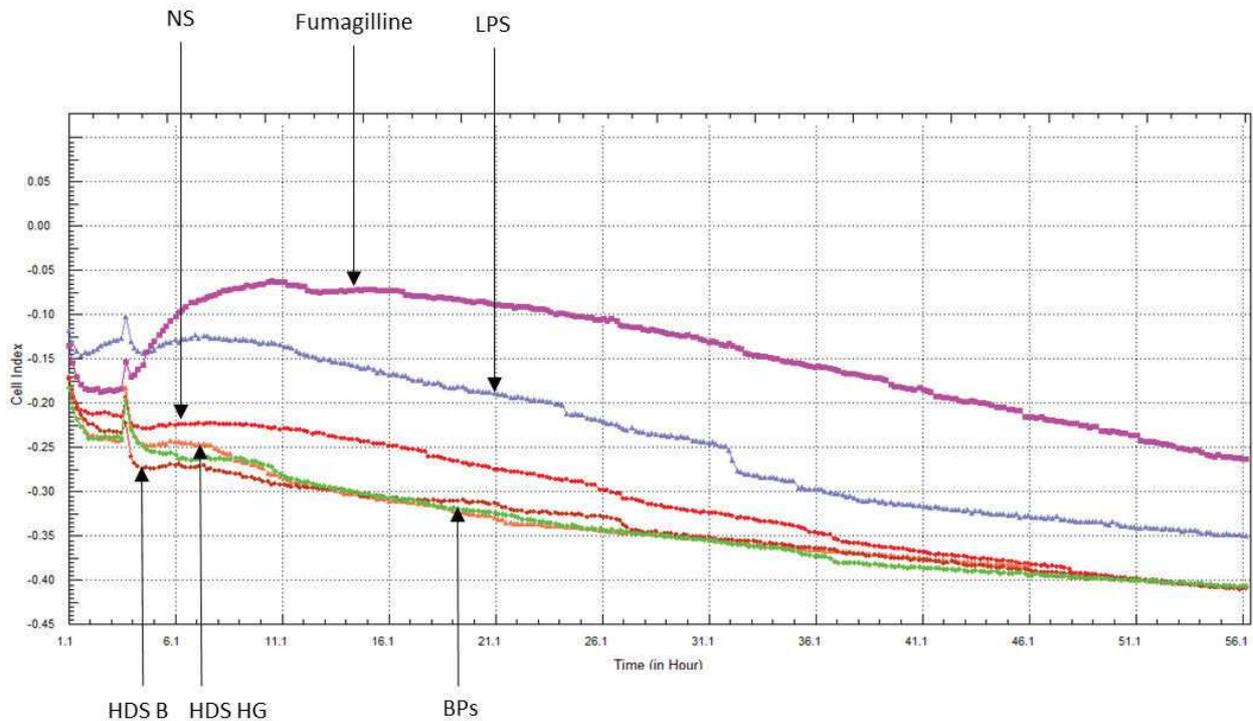


Figure 68 : Courbes d'impédance des macrophages alvéolaires de chevaux CTL stimulés avec du LPS (500 ng/ml), de la fumagilline (4 µg/ml), de l'HDS provenant de foin sec (HDS B) et de foin « à la vapeur » (HDS HG) (5µl/ml) et des BP (10 BP / cellule). « Cell Index » (CI), (courbes représentatives des 6 chevaux CTL et des 5 chevaux AES).

La concentration moyenne en NO sécrétée par les MA équins se maintient en dessous de 10 µM quelle que soit la stimulation des MA en présence de LPS (Figure 69). Le dosage de NO n'est pas adapté pour évaluer la réponse des MA équins après stimulation car aucune différence significative n'est observée entre les cellules non stimulées et stimulées.

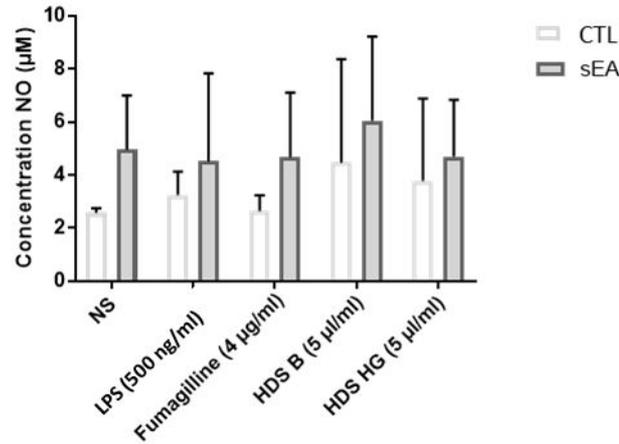


Figure 69 : Concentration en NO (µM) sécrétée par les macrophages alvéolaires équins de chevaux CTL et AES, 6h après stimulation *in vitro* avec du LPS, de la fumagilline, de l’HDS provenant de foin sec (HDS B) et provenant de foin « à la vapeur » (HDS HG).
Données exprimées en moyenne ± SD. Chevaux CTL (n=6) et chevaux AES (n=5).

Aucun effet de la stimulation au LPS et aux HDS n’a été observé sur la réponse cytokinique des MA équins pour l’IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, le GM-CSF, MCP-1 et l’éotaxine. Un effet statut a été observé pour l’IL-10 qui est sécrété de manière plus importante chez les MA de chevaux CTL (p = 0,03) tandis que l’IL-1β est significativement plus élevée chez les MA de chevaux AES par rapport aux MA de chevaux CTL (p = 0,03) (Figure 70).

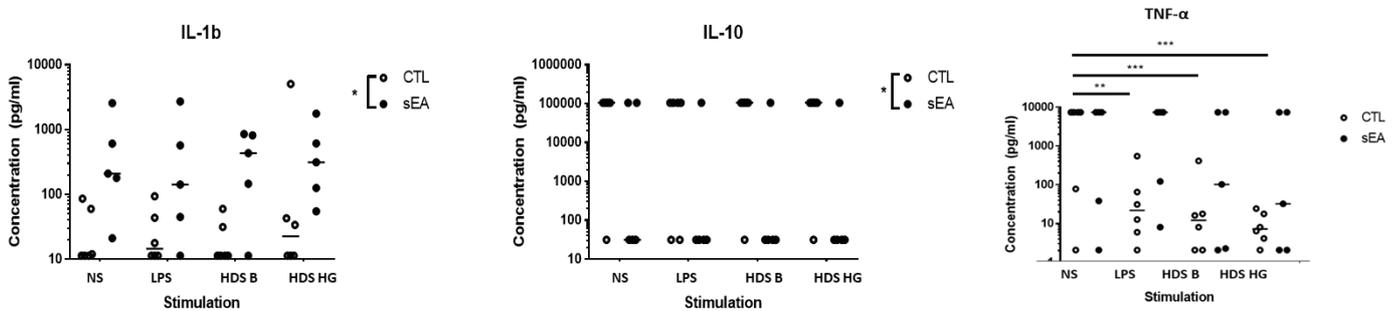


Figure 70 : Concentrations protéiques des cytokines dans les surnageants de culture des MA « naïfs », non stimulés (NS), 6h post stimulation avec du LPS (500 ng/ml) et des HDS provenant de foin sec (HDS B) et provenant de foin « à la vapeur » (HDS HG).
*, **, *** différences significatives (respectivement $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$). Chevaux CTL (n=6) et chevaux AES (n=5).

Un effet « stimulation » a été observé sur les MA des chevaux CTL et AES, pour le TNF-α avec une augmentation de la concentration protéique du TNF-α après stimulation (Figure 70) ; les stimulants n’étant par ailleurs pas significativement différents entre eux.

*B.2.3.2. Stimulation in vitro des MA préalablement « challengés »
in vivo*

Suite à la stimulation avec la solution de HDS provenant de foin sec, la capacité des MA à se déformer est plus importante s'ils n'ont pas été préalablement soumis à un challenge *in vivo* (Figure 71 A).

Pour les MA de chevaux CTL sans challenge *in vivo* préalable, une déformation importante des cellules et des regroupements conséquents sont en effet observés. Cette modification morphologique des MA est également visualisée de façon moins marquée pour les MA de chevaux préalablement soumis au challenge *in vivo* par du foin « à la vapeur ». Enfin, des regroupements sont visibles pour les MA de chevaux préalablement soumis au challenge *in vivo* par du foin sec (Figure 71 B). Cependant leur taille ne semble pas varier.

Pour les MA de chevaux AES, moins de cellules ont été observées dans les différents champs. Sans challenge *in vivo* préalable, une légère déformation des cellules et des débris cellulaires sont observés. Les variations morphologiques sont peu perceptibles en microscopie entre les MA stimulés *in vitro*, selon la réalisation préalable ou non des différents challenges *in vivo* (Figure 71 C). En revanche moins de cellules sont présentes sur les champs photographiques des chevaux AES comparé à celui des chevaux CTL (Figure 71).

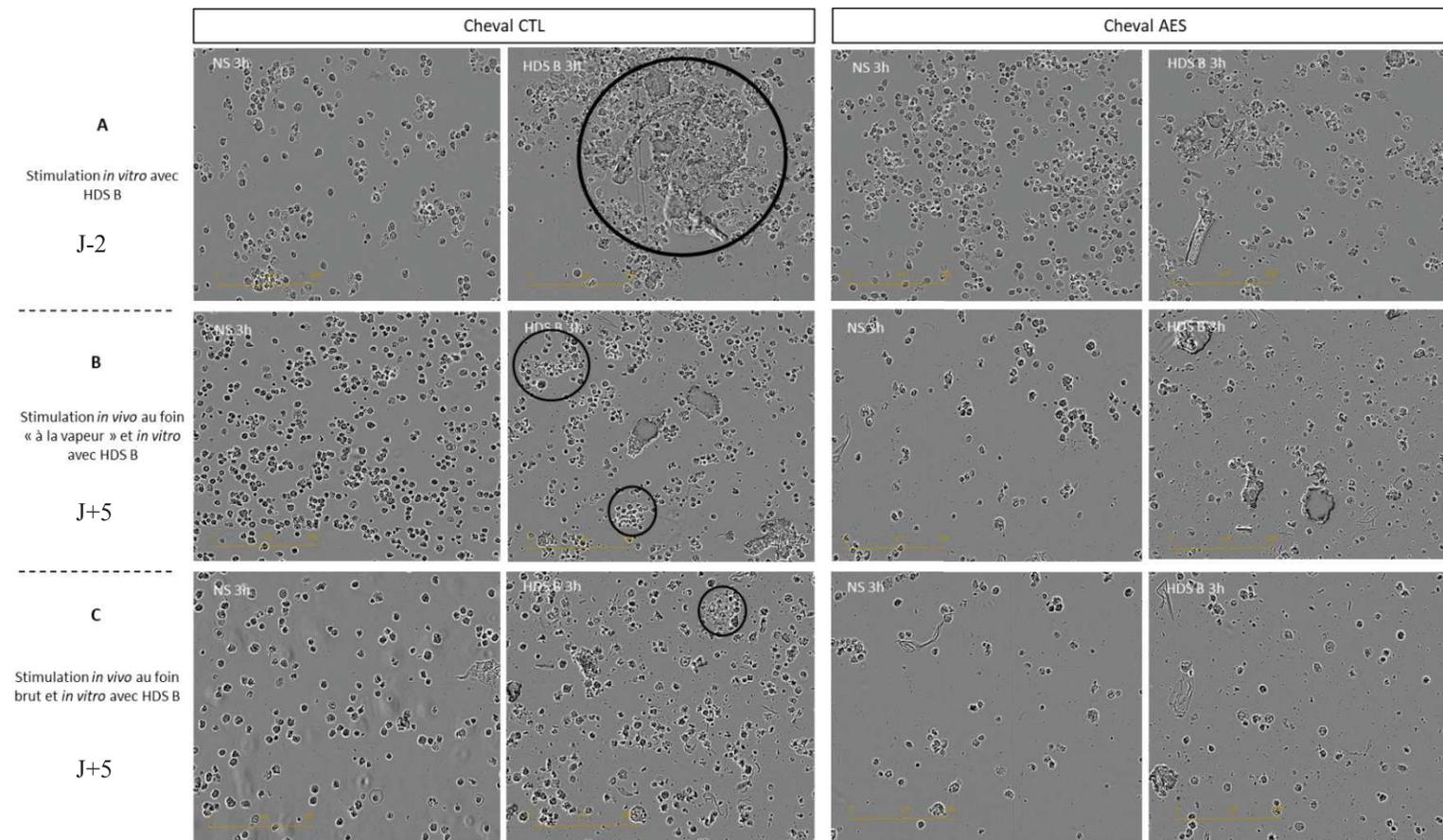


Figure 71 : Observations microscopiques en temps réel des MA isolés de chevaux CTL et AES à J-2 et J+5 post-challenge *in vivo* au foin « à la vapeur » et au foin sec, stimulés *in vitro* avec la solution de HDS provenant de foin sec (HDS B). Photos prises 3h post-stimulation *in vitro* (G x20).

A : MA isolés chez un cheval CTL et un cheval AES à J-2 pré challenge *in vivo* non stimulés (NS) *in vitro* et simulés avec la solution de HDS provenant de foin sec ; B : MA isolés chez un cheval CTL et un cheval AES à J+5 post-challenge *in vivo* au foin « à la vapeur » non stimulés *in vitro* et stimulés *in vitro* avec la solution de HDS ; C : MA isolés chez un cheval CTL J+5 post-challenge *in vivo* au foin sec, non stimulés *in vitro* et stimulés *in vitro* avec la solution de HDS. Les cercles représentent les regroupements de cellules. (Photographies représentatives des 6 chevaux CTL et des 5 chevaux AES).

Après stimulation *in vitro*, la taille des MA des chevaux CTL a tendance à diminuer mais n'est pas significativement différente selon la réalisation préalable ou non des différents challenges *in vivo* (Figure 72). Après stimulation *in vitro*, la taille des MA isolés des chevaux AES à l'issue du challenge *in vivo* au foin sec est significativement inférieure à celle des MA isolés des mêmes chevaux sans challenge *in vivo* préalable (Figure 72).

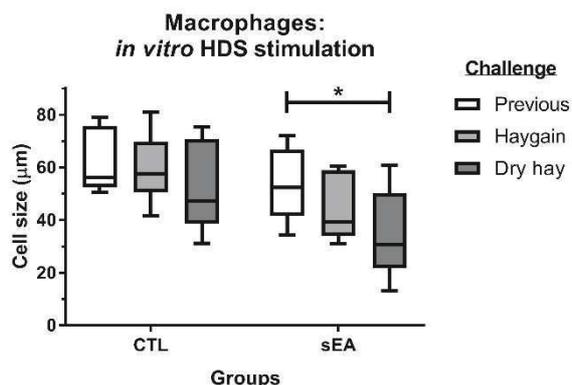


Figure 72 : Taille des macrophages alvéolaires stimulés *in vitro* avec la solution de HDS provenant de foin sec (HDS B).

Taille des MA isolés à J-2 et J+5 post-challenge au foin « à la vapeur » (Haygain) et post-challenge au foin sec (dry hay) et stimulés *in vitro* avec la solution de HDS sec. * valeurs significativement différentes entre la réponse des MA des chevaux AES au stimulus *in vitro* post-challenge *in vivo* au foin sec comparé à la réponse des cellules non challengées *in vivo* ($p < 0,05$). Box plots représentant la médiane et les IQR. Chevaux CTL ($n=6$) et chevaux AES ($n=5$).

Concernant la réponse immunitaire des MA pré stimulés par le challenge *in vivo* et stimulés *in vitro* avec la solution de HDS, aucun effet du challenge *in vivo* sur la réponse cytokinique des MA à la solution de HDS n'a été observé sur les cytokines l'IL-1 β , l'IL-10 et le TNF- α . Les autres cytokines : l'IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, le GM-CSF, MCP-1, et l'éotaxine n'ont pas été détectées.

C. Discussion partielle

C.1. Population des macrophages

Dans cette étude, la cytométrie en flux a été utilisée pour caractériser les populations de MA isolés au cours de l'étude *in vivo* présentée dans la partie 1. Ils ont été identifiés CD14⁺ et CD206⁺. Trois populations de cellules ont été distinguées chez les chevaux CTL et AES. Ces populations ont été catégorisées en fonction de leurs tailles et de leurs granulométries.

Odenuyiwa (2012) avait identifié seulement 2 populations de cellules chez les chevaux CTL. La 3^{ème} population identifiée dans notre étude regroupe des cellules CD14⁻ CD206⁻ et PanB⁻. L'identification des populations reste subjective en se basant uniquement sur la taille et la granulométrie, ce qui peut expliquer que nous ayons identifié 3 populations confirmées par les marquages effectués. Nos résultats ont été obtenus par l'utilisation du CD14 et du CD206 pour différencier la population de macrophages, mais un 3^{ème} marqueur avait aussi été testé (CD163). Le CD14 est connu pour son expression par les cellules de la lignée monocyttaire tandis que le CD206 est reconnu pour être exprimé par les macrophages polarisés en M2 majoritairement. De plus, un double marquage CD14 CD206 aurait été pertinent mais les deux anticorps étant couplés à des fluorochromes émettant dans le même spectre, ils ont dû être étudiés séparément. Concernant le CD163, nous n'avons pas obtenu de marquage des cellules avec l'anticorps utilisé, malgré sa description préalable par Karagianni (2014) chez le cheval.

De même, l'anticorps Pan B cells, ciblant le panel de marqueur CD19, CD20, CD22 et CD79, a été utilisé afin de discriminer l'éventuelle population de lymphocytes des MA (Lunn et *al.*, 1998). Cependant, les tests effectués ont montré qu'une partie des cellules de R1 avaient potentiellement un double marquage CD206⁺/Pan B⁺ ou CD14⁺/Pan B⁺ ce qui est difficilement interprétable du fait qu'aucun résultat semblable n'ait été observé précédemment. Ce marquage PanB⁺ de la population R1 se traduit par un décalage du pic avec l'anticorps Pan B cell par rapport aux cellules non marquées et ne correspond pas à une autre population comme visualisé dans la population R2. Une réaction croisée entre les anticorps, non investiguée, pourrait potentiellement expliquer ce résultat. Une autre hypothèse serait la possible phagocytose des lymphocytes dégradés, ou devenus inutiles suite à une réponse immunitaire efficace passée, par les macrophages alvéolaires qui présenteraient ainsi les marqueurs des lymphocytes à leur surface. Ce phénomène appelé efferocytose a en effet été récemment décrit par Grabiec & Hussel (2016).

Afin de caractériser au mieux la population des MA, leurs capacités de phagocytose et de macropinocytose ont été investiguées. Paillot et *al.*, (2001) avaient utilisé la BSA-FITC pour étudier la macropinocytose chez les cellules dendritiques porcines. Dans notre étude, 15% de la population R1 seulement est capable d'internaliser la BSA. L'activité de macropinocytose par internalisation de la BSA semble donc limitée chez les MA équins, comparée à l'activité de phagocytose. Une précédente étude menée par Litvack et *al.*, (2011) a montré que les macrophages murins internalisaient peu de BSA par rapport à l'internalisation d'IgG ou d'IgM. De plus, Hespanhol & Mantovani (2002) avaient montré une internalisation en surface de la BSA par les macrophages. L'observation microscopique des cellules en présence de BSA n'a

pas été effectuée dans le cadre de cette thèse, mais cela aurait permis de discuter davantage la capacité de macropinocytose des MA équins. Une autre étude de Yu et *al.*, (2015) a également investigué la macropinocytose de la BSA par les macrophages. Les résultats montraient que les macrophages M1 et les macrophages M2 étaient tout autant capables de macropinocytose et de dégrader la BSA. Les marquages effectués en cytométrie de flux n'ont pas permis de distinguer les macrophages M1 des M2 dans notre étude. Le dosage de la concentration protéique des cytokines n'a non plus permis de préciser le phénotype des MA stimulés *in vitro*. La quantification de l'expression génique du TNF- α de l'IL-1 β et du CD80 pour les M1 et l'IL-10, le TGF- β , le CD206 et de l'ARG2 pour les M2 serait intéressante à étudier dans le cas de l'asthme équin.

Concernant l'activité de phagocytose des macrophages, l'utilisation des bioparticules couplées au GFP est couramment décrite dans la littérature scientifique notamment pour les macrophages murins. En microscopie, comme nous l'avons montré, l'observation et la quantification de l'activité de phagocytose sont possibles, ce qui a également été observé par Kapellos et *al.*, (2016) en microscopie en temps réel sur les macrophages. La majorité des cellules CD14⁺ et CD206⁺ sont capables de phagocytose, ce qui est confirmé par nos résultats.

Ces investigations sur la population R1 nous ont permis de conclure qu'elle comprenait bien la population de macrophages alvéolaires. La pureté des MA isolés des chevaux CTL et AES était de 60 % \pm 9,5. Contrairement à Wilson (2014), qui avait utilisé un « Magnetically-activated cell sorting » (MACS), la méthode basée sur l'adhésion cellulaire utilisée dans notre étude pour isoler les MA, n'a pas permis d'atteindre le même pourcentage de pureté des MA. Cet outil est actuellement en cours d'acquisition au sein du laboratoire. Il sera donc utilisé pour les prochains isolements cellulaires.

C.2. Comparaison de l'activité de phagocytose et de macropinocytose des MA de chevaux AES et CTL après stimulation *in vitro*

Les études ont été menées sur les MA isolés de 6 chevaux CTL et de 4 chevaux AES. En effet, le nombre de MA isolés chez les chevaux AES étant relativement faible, toutes les approches expérimentales sur les MA n'ont pas pu être menées pour tous les chevaux AES. Ainsi les résultats obtenus sont à nuancer, au vu du nombre d'échantillons investigués.

Nos résultats ont montré que la proportion de cellules CD14⁺ au sein des MA, était supérieure chez les chevaux AES comparés aux chevaux CTL. Des résultats similaires ont été observés chez l'Homme. En effet, Alexis et *al.*, (2001) ont montré un niveau de CD14 soluble plus élevé

chez les patients asthmatiques comparé aux CTL. Marcos et *al.*, (2010) avaient montré une corrélation positive entre le CD14 soluble et le CD14 membranaire chez les MA, cependant l'étude de Karagianni et *al.*, (2013) n'a pas abordé cet aspect-là chez le cheval. De plus la proportion de cellules CD14⁺ BP⁺ est plus importante chez les chevaux AES par rapport aux chevaux CTL. Le CD14 étant un marqueur d'activation, il est possible que les MA des chevaux AES soient plus activés, en raison d'un environnement « pulmonaire » modifié. Concernant la population de cellules CD206⁺, aucune différence significative n'a été observée entre les chevaux CTL et les chevaux AES, ce qui est compatible avec les résultats observés en qPCR par Wilson (2014). Le CD163 testé dans notre étude n'a pas fonctionné, pourtant ce marqueur présente l'intérêt de cibler les macrophages de type M2. Odenuyiwa (2012) avait montré une diminution de la proportion des cellules CD163⁺ dans les LBA chez les chevaux AES en crise, comparé aux CTL ; suggérant une différence phénotypique des MA selon les conditions inflammatoires. Les investigations concernant les conditions d'utilisation du CD163 seront donc à approfondir au laboratoire.

La capacité de phagocytose des macrophages alvéolaires a tout d'abord été étudiée sur les MA issus de chevaux CTL et AES non préalablement soumis à un challenge *in vivo*, stimulés avec des bioparticules d'*E.coli* couplées à la GFP. Dans notre étude, la proportion de cellules CD14⁺ en présence de bioparticules ne varie pas significativement, contrairement aux résultats de Lin et *al.*, (2004) montrant que la proportion de cellules CD14⁺ diminuait chez les MA de lapin soumis à des *E. coli*. Le temps d'exposition d'1h seulement ainsi que le modèle équin pourraient expliquer nos résultats. En présence de BSA en revanche, la proportion de cellules CD206⁺ chez les chevaux AES est significativement plus faible, comparée aux mêmes cellules non stimulées, d'autres études seront donc nécessaires pour confirmer ce résultat.

Les MA stimulés avec des BP ont montré que la proportion de cellules CD14⁺ BP⁺ était significativement plus élevée chez les chevaux AES, comparés aux chevaux CTL. En revanche pour les cellules CD206⁺, et contrairement aux résultats de Wilson (2014), aucune différence significative n'a été observée selon le statut du cheval (AES vs. CTL). Wilson (2014) avait en effet montré une augmentation de l'expression des ARNm du CD206 par les MA de chevaux AES stimulés *in vivo* avec de l'HDS, suggérant une polarisation M2 des MA chez les chevaux AES. Afin de distinguer les macrophages M1 des macrophages M2 à l'avenir, il serait intéressant de développer les qPCR pour la recherche du CD80 témoignant d'une réponse de type M1 en parallèle du CD206 témoignant d'une réponse de type M2. Cela permettrait de compléter les approches et de confirmer les résultats. En revanche, même si la proportion de cellules CD206⁺ ne varie pas selon le statut du cheval dans notre étude, l'observation

microscopique des cellules a montré une augmentation de la taille des cellules, quel que soit le statut ainsi qu'une dégradation importante du tapis cellulaire après stimulation *in vitro* par la solution de HDS provenant de foin sec. Les différences observées entre notre étude et celle de Wilson (2014) peuvent aussi s'expliquer par des variations dans la composition de la solution de HDS utilisée. Le foin utilisé dans notre étude était un foin standard non moisi contrairement au foin utilisé par Wilson (2014). Ainsi la variabilité des études *in vivo* est aussi un frein à la comparaison des résultats.

Le suivi des cellules par microscopie en temps réel est un véritable atout pour observer leurs variations morphologiques. Cela permet d'observer les regroupements de cellules, la formation des vacuoles de phagocytose mais aussi la présence de débris cellulaires, et ainsi de caractériser l'activité cellulaire des MA. La taille des MA augmente en présence de HDS provenant de foin sec. La solution de HDS contient des particules de taille comprise entre 0 et 48 μm avec une majorité de particules ayant une taille inférieure à 5 μm (Partie 2 : A.1.2.). Yue et *al.*, (2010), ont investigué l'effet de la taille des particules sur l'activité des macrophages murins. Ils ont ainsi montré par mesure de l'absorption cellulaire que des particules nanométriques s'accumulaient plus rapidement et avec une surface plus grande que les particules micrométriques. De plus, ces auteurs ont montré que la phagocytose des particules intermédiaires (5 μm) nécessite le réarrangement du cytosquelette et le changement de morphologie, ce qui a également été observé dans notre étude sur des MA équins. Les regroupements observés sur les MA stimulés *in vitro* avec la solution de HDS montre une potentielle communication entre les MA stimulés. Fortes et *al.*, (2004) ont travaillé sur la communication des macrophages en étudiant le rôle des jonctions gap et des récepteurs P2. Ces mécanismes n'ont pas été investigués dans notre étude, mais les regroupements cellulaires, visibles en microscopie, soutiennent l'hypothèse d'une communication étroite entre les MA. L'utilisation du Bioflux (Fluxion), disponible au laboratoire, serait un outil innovant et intéressant, permettant d'évaluer les interactions des MA avec différents types cellulaires tels que les neutrophiles, après différentes stimulations *in vitro* dans des conditions proches de celles retrouvées au sein du poumon.

Le LPS et la fumagilline ne semblent pas significativement influencer la taille des MA stimulés. Dans le cas des BP, qui sont de petites particules, nos travaux ont montré que les macrophages étaient capables d'en phagocyter plusieurs en même temps, sans pour autant avoir un effet significatif sur la taille des macrophages. Concernant les macrophages murins, une augmentation de la taille des cellules stimulées à la fumagilline avait été observée, contrairement aux MA équins. La fumagilline étant une toxine libérée par *l'Aspergillus*

fumigatus reconnue pour son effet dans le déclenchement de l'asthme et son effet inhibiteur de la phagocytose, d'autres investigations seraient pertinentes pour approfondir les connaissances sur l'effet de la fumagilline sur les MA équins. De plus, comme observé précédemment dans notre étude la réponse morphologique et l'impédance des macrophages murins et des MA équins aux différents stimuli varient. L'utilisation des cellules RAW264-7 comme outils pour le développement méthodologique n'est peut-être pas le plus adapté pour l'étude des MA équins, cependant cette étape était nécessaire pour le développement méthodologique et la prise en main de l'xCELLigence et de l'IncuCyte pour le suivi des cellules immunitaires que sont les macrophages alvéolaires. Un effet « espèce » avait déjà été observé dans plusieurs études (Leclere et *al.*, 2011 ; Young et *al.*, 2018). L'observation microscopique en temps réel des MA a montré des variations morphologiques importantes suivant le stimulus et le statut du cheval. Cependant la présence de débris cellulaires a été observée, ce qui aurait mérité un suivi de la viabilité des cellules au cours du temps. L'étude des cellules avec un plus fort grossissement aurait aussi permis d'observer les vacuoles au sein des MA. Cependant le nombre limité de MA isolés n'a pas permis de multiplier les investigations. Ainsi, le choix d'utiliser la microscopie en temps réel avec l'IncuCyte permettait un meilleur suivi des cellules au cours du temps et permettait de visualiser les effets des différents stimuli.

Les MA isolés à J-2 pré-challenge *in vivo*, ont été stimulés *in vitro* avec différents antigènes afin d'étudier leur réponse. A l'état basal et stimulés avec du LPS et de l'HDS la concentration de l'IL-10 est significativement plus élevée tandis que l'expression de l'IL-1 β est significativement plus faible chez les MA de chevaux CTL comparés au MA de chevaux AES. Contrairement à nos résultats, Wilson (2014) avait montré une augmentation de l'expression des ARNm de l'IL-10 et de l'IL-8 par les MA des chevaux AES stimulés au LPS. Contrairement à Wilson (2014) qui avait quantifié une augmentation de l'expression des ARNm de l'IL-8 chez les chevaux CTL, la protéine de l'IL-8 n'a pas été détectée par la technique ELISA dans les MA de notre étude *in vitro*, alors que son expression génique par qPCR était significativement plus élevée dans les MA des chevaux AES comparés aux chevaux CTL lors du challenge *in vivo*. Des différences méthodologiques pour l'isolement des MA ou les conditions de culture cellulaire peuvent expliquer les divergences de résultats selon les études. Dans le cadre des stimulations *in vitro*, seule la sécrétion cytokinique par le kit EQCYTMAG-93K (Millipore) été effectuée, ainsi il est possible que l'intervalle de temps nécessaire entre la traduction de l'ARNm en protéine et sa libération extracellulaire peut expliquer ce résultat. De plus, le kit équin utilisé pour le dosage des cytokines en multiplexage est peu sensible et ne permet pas de distinguer les profils peu inflammatoires (Curto et *al.*, 2016). Les cellules ayant été suivies en

plaques 96 puits, le nombre de cellules était trop faible pour réaliser des qPCR immédiatement. Ainsi les investigations en qPCR seront effectuées ultérieurement et pourront peut-être confirmer les résultats de Wilson (2014). Comme dans notre étude, Laan *et al.*, (2006) n'avaient pas mis en évidence l'augmentation de l'IL-10 chez les MA de chevaux AES soumis à un challenge *in vitro* au LPS et à une solution de HDS. Dans notre étude l'augmentation de l'expression protéique de l'IL-10 par les MA des chevaux CTL soutien une possible polarisation des MA en M2 pour les chevaux CTL. Cependant avec l'augmentation de la concentration protéique de l'IL-1 β chez les chevaux AES, il semblerait que dans le cas de l'AES, une polarisation M1 soit observée. De plus, le TNF- α augmente chez les MA de chevaux CTL après stimulation au LPS et aux HDS, semblant orienter la réponse vers une réponse de type pro-inflammatoire. Les résultats sont néanmoins à nuancer car seuls les MA de 6 chevaux CTL et 5 chevaux AES ont été analysés.

C.3. Effet d'un challenge *in vivo* préalable sur la réponse à une stimulation *in vitro* des MA

Au-delà de la réponse basale des MA à une stimulation *in vitro* par LPS et HDS, nous avons étudié, dans le cadre de cette étude, l'effet d'un challenge *in vivo* préalable avec du foin sec et « à la vapeur » sur la réponse des MA (J+5) ultérieurement stimulés *in vitro* par une solution de HDS provenant de foin sec.

L'observation des cellules au microscope (IncuCyte) a montré que les MA des chevaux CTL non préalablement soumis au challenge *in vivo* avaient une capacité à se déformer plus importante en réponse à la stimulation *in vitro*, comparés aux MA de chevaux préalablement challengés *in vivo*. En effet les MA de chevaux CTL n'ont montré aucune variation de taille après stimulation *in vitro*. Il est possible que les MA ayant préalablement été soumis au challenge *in vivo*, ne soient plus en mesure de « répondre » à la stimulation *in vitro* ultérieure. Après stimulation *in vitro*, la taille des MA de chevaux AES préalablement challengés *in vivo* au foin sec est significativement moins importante que celle des MA des mêmes chevaux AES non précédemment challengés *in vivo*. En revanche aucune différence significative n'a été observée pour les MA de chevaux préalablement challengés *in vivo* par du foin « à la vapeur », comparativement aux MA de chevaux non préalablement challengés *in vivo*. Chez les chevaux AES, il semblerait donc que le challenge *in vivo* préalable au foin « à la vapeur » ait eu un effet moindre sur le « comportement » cellulaire des MA, comparé à un challenge *in vivo* préalable au foin sec. Ainsi d'un point de vue cellulaire, distribuer du foin « à la vapeur » aux chevaux

AES semble moins impacter la réponse des MA à des stimulations ultérieures. De plus, la modification morphologique des cellules des chevaux CTL et AES post-challenge *in vivo* pourrait se traduire par une dégradation des propriétés de déformation et de phagocytose plus importante.

Concernant la réponse cytokinique, Wilson (2014) a précédemment montré une augmentation de l'expression génique de l'IL-8 et de l'IL-10 des MA chez les chevaux AES préalablement stimulés avec un challenge *in vivo* à la poussière de foin et de paille, puis stimulés *in vitro* avec du LPS. Aucune différence n'avait été observée, concernant l'expression génique des cytokines, entre les chevaux AES et CTL, ce qui est corroboré par les résultats de notre étude.

D. Conclusion partielle

La deuxième partie du projet était ciblée sur l'étude du comportement cellulaire et de la réponse immunitaire des MA équins stimulés *in vitro*.

La première hypothèse émise concernant la variation du phénotype des MA selon le statut du cheval et du stimulus *in vitro* a été confirmée. L'immunophénotypage des MA a montré que les proportions de la population CD14⁺ était plus élevée chez les chevaux AES par rapport aux chevaux CTL, et que la proportion de cellules CD14⁺ BP⁺ était plus élevée chez les chevaux AES par rapport aux chevaux CTL. De plus, les observations microscopiques ont montré une activité plus importante des MA isolés de chevaux CTL stimulés *in vitro* avec la solution de HDS provenant de foin sec et de foin « à la vapeur ». La réponse cytokinique à la stimulation *in vitro* semble de type mixte (M1/M2) chez les chevaux AES et de type pro-inflammatoire chez les chevaux CTL, quel que soit le stimulus.

La deuxième hypothèse était que les MA stimulés *in vitro* par la solution de HDS provenant de foin sec présentaient une réponse cellulaire limitée s'ils étaient issus de chevaux AES préalablement soumis à un challenge *in vivo* par du foin sec. Cette hypothèse a été vérifiée par nos travaux. En effet, bien qu'aucun effet significatif n'ait été observé en terme de réponse cytokinique, l'observation microscopique des cellules a mis en évidence des différences morphologiques avec des regroupements de cellules plus importants pour les MA des chevaux CTL et une diminution de la taille des MA de chevaux AES stimulés *in vitro*, selon le challenge *in vivo* préalable au foin sec ou « à la vapeur » ce qui confirme l'observation d'une réponse différentes suivant le statut du cheval et le type de stimulation. Afin de conclure sur le rôle des macrophages alvéolaires dans le cas de l'AES, d'autres approches et d'autres investigations seront nécessaires.

Discussion générale

Les objectifs de ce travail de thèse étaient d'investiguer (1) la réponse respiratoire et systémique de chevaux AES soumis à un challenge d'exposition à du foin « à la vapeur » ; et (2) la réponse des macrophages alvéolaires à une stimulation *in vitro* à une solution de HDS provenant de foin sec ou « à la vapeur », avec ou sans challenge *in vivo* préalable. L'intérêt était de confronter les réponses immunitaires à l'échelle du « cheval » (sang), du « poumon » (LBA), et des MA, premières cellules de la réponse immunitaire pulmonaire. Afin d'étudier les MA équins, ces derniers ont été isolés des LBA des chevaux soumis ou non à un challenge *in vivo*, puis stimulés *in vitro* avec des antigènes standards tels que le LPS (agent activateur de la réponse immunitaire) et la fumagilline (toxine sécrétée par *Aspergillus fumigatus*, moisissure reconnue pour son effet inflammatoire dans les voies respiratoires chez le cheval). En plus des antigènes standards, les MA ont également été stimulés avec de l'HDS, représentative du foin distribué aux chevaux lors du challenge *in vivo*. Careau et Bissonnette (2004), ont démontré que les MA de rats sensibilisés perdaient leur capacité à prévenir le développement de l'asthme. La réponse cytokinique était modifiée après exposition à de l'ovalbumine (OVA), pouvant expliquer leur susceptibilité à développer de l'asthme (Careau & Bissonnette, 2004). Chez le cheval, les résultats de notre projet ont montré que la réponse immunitaire des MA de chevaux AES lors du challenge d'exposition à du foin *in vivo* semblait associée à une polarisation M1 des macrophages, avec une augmentation de l'expression des ARNm de l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12 et du TNF- α . L'augmentation de l'expression génique de l'IL-8 chez les chevaux AES témoigne aussi de la capacité des MA à recruter les neutrophiles, et donc à déclencher la réponse inflammatoire au niveau pulmonaire. Pirie et al., (2001) avaient d'ailleurs montré que les chevaux AES étaient plus sensibles au LPS que les chevaux CTL, et développaient une neutrophilie pulmonaire plus importante pour des doses faibles en LPS.

La stimulation *in vitro* des MA de chevaux AES, non précédemment exposés au foin *in vivo*, est responsable d'une concentration en IL-1 β significativement supérieure à celle des MA de chevaux CTL. Cette augmentation de la concentration protéique d'IL-1 β , quantifiée dans le surnageant des MA isolés de chevaux AES stimulés *in vitro* comparée aux chevaux CTL, est cohérente avec les valeurs plus élevées de l'expression génique de l'IL-1 β observées chez les chevaux AES stimulés *in vivo*. Cependant à part l'effet statut observé (CTL vs. AES), aucun effet challenge (*in vivo*) ou stimulation (*in vitro*) n'a été observé pour l'IL-1 β dans notre étude,

contrairement à Laan et *al.*, (2006) qui avaient montré une augmentation de l'expression protéique de l'IL-1 β après 6h de stimulation au LPS, à la solution de HDS et à *l'Aspergillus fumigatus*. Ainsi, l'expression protéique des cytokines dans le surnageant des MA stimulés *in vitro*, non encore effectuée, semble pertinente dans le cadre de ce projet. Étonnamment, une augmentation de la production de TNF- α a été observée pour les macrophages des chevaux CTL et AES suite aux stimulations *in vitro* (LPS, HDS de foin brut et « vapeur »), ce qui est cohérent avec l'augmentation de l'expression génique du TNF- α observée dans les MA de chevaux AES lors du challenge *in vivo*. Laan et *al.*, (2006), avaient aussi noté une augmentation de l'expression génique du TNF- α pour les MA de chevaux AES stimulés avec la solution de HDS, du LPS et de *l'Aspergillus fumigatus*. L'utilisation d'HDS différents selon les études pourrait expliquer la différence entre les résultats obtenus. De plus, les concentrations protéiques de l'IL-2, l'IL-6, l'IL-8 et de l'IL-12, après stimulation *in vitro* des MA, n'étaient pas suffisantes pour être détectées par la technique ELISA en multiplexage, alors que l'expression des ARNm de ces cytokines étaient significativement augmentées dans les MA des chevaux AES soumis au challenge *in vivo*. De même, l'éotaxine (impliquée dans le recrutement des éosinophiles) n'a pas été détectée par ELISA en multiplexage dans les MA stimulés *in vitro* ou non. La proportion d'éosinophiles dans le LBA n'ayant pas significativement évolué au cours du challenge, nos résultats sont cohérents. L'investigation de cette chimiokine au niveau des cellules épithéliales ou endothéliales, principales cellules sécrétrices de l'éotaxine chez les patients asthmatiques (Corrigan, 1999 ; Paplińska et *al.*, 2007), serait pertinente chez le cheval. Tout comme l'éotaxine, le GM-CSF n'a pas été détecté dans les surnageants de culture des MA après stimulation *in vitro*. Ce facteur de croissance permet aux MA d'assurer leurs fonctions de phagocytose, de présentation antigénique et de maintien de l'homéostasie pulmonaire (Trapnell & Whitsett, 2002). Il semblerait aussi que le GM-CSF ait un effet déterminant sur le phénotype des MA et leur différenciation (Guth et *al.*, 2009). Enfin, il est possible, comme l'avait montré Davis (2001), que lors d'une inflammation pulmonaire, l'épithélium des voies respiratoires soit la première source de GM-CSF ce qui expliquerait qu'il n'ait pas été détecté dans les surnageants de culture de MA.

Nos résultats sont cependant à nuancer du fait que les MA de 5 chevaux AES seulement ont été analysés *in vitro*. De plus, le kit équin d'ELISA en multiplexage pour la technologie Luminex a précédemment été développé pour la quantification des cytokines fortement exprimées dans les échantillons, ce qui est confirmé par l'étude de Curto et *al.*, (2016) qui avaient testé un large panel de cytokines équines dans le cas de l'uvéite récurrente associée à la leptospirose et n'avaient détecté que les profils fortement inflammatoires. Les seuils de détection pour l'IFN-

γ et l'IL-4 notamment ont respectivement un seuil de détection à 327,4 pg/ml et 126,3 pg/ml en multiplexage contre 31,2 et 15,6 pg/ml en ELISA ce qui peut expliquer l'absence de quantification. Cependant, la cytokine MCP-1 était très fortement exprimée dans le surnageant des MA des chevaux AES et CTL, stimulés *in vitro* ou non. La MCP-1 est une protéine sécrétée par les macrophages, avec un rôle chimio-attracteur des macrophages, monocytes et neutrophiles. Lee et *al.*, (2015) avaient montré une expression génique plus élevée de la MCP-1 dans le LBA chez les patients asthmatiques en crise comparés aux sujets sains. La limite du dosage des cytokines en multiplexage est qu'il est impossible de diluer certains échantillons pour une cible donnée, ainsi il est difficile d'utiliser ce kit lorsque certaines cytokines sont faiblement exprimées alors que d'autres le sont fortement. Le kit étant un kit commercial validé, nous n'avons pas effectué la démarche de valider le système pour son utilisation dans notre étude. D'un point de vue cytokinique, aucun effet de la stimulation *in vitro* sur la réponse des MA de chevaux CTL et AES n'a été observé après challenge *in vivo*. Cependant au sein du groupe AES, les observations microscopiques montrent une diminution de la taille des MA challengés *in vivo* avec du foin sec et avec la solution de HDS provenant de foin sec. Il est possible que le challenge *in vivo* ait activé de manière importante les MA, inhibant leur capacité potentielle de réponse à la stimulation ultérieure. Il avait été montré que pré-stimuler les macrophages avec du LPS induisait une réponse limitée lors d'une stimulation ultérieure avec du LPS (Chae, 2018). En effet, un phénomène de tolérance semblerait apparaître chez les macrophages murins déjà pré-exposés à l'antigène (Chae, 2018). Ce même processus pourrait être à l'origine des observations préliminaires effectuées sur la réponse des MA équins dans le cadre de notre étude. Le LBA est composé de différents types cellulaires ayant des interactions entre eux, pouvant induire une réponse différente de celle observée dans les MA isolés. A l'échelle du poumon, l'analyse du LBA a montré des résultats divergents avec la réponse des MA mais cohérents avec les réponses cytologiques et cliniques observées. En effet, l'expression des ARNm de l'IL-1 β et l'IL-8 était positivement corrélée avec le pourcentage de neutrophiles dans le LBA. Le rôle de l'IL-8 dans le recrutement des neutrophiles avait précédemment été investigué par Giguère et *al.*, (2002) et Joubert et *al.*, (2008). De plus, l'expression des ARNm de l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-8 était significativement corrélée avec le score clinique et le score de mucus trachéal. Au contraire dans le sang, l'IL-6 est corrélée négativement avec le score clinique et le score de mucus. L'asthme étant un syndrome respiratoire, il est intéressant de noter que la réponse clinique reflète davantage la réponse au niveau pulmonaire qu'au niveau systémique. De plus, nos résultats ont montré une augmentation de l'expression des ARNm et de la concentration protéique en IL-2 et IL-4 sériques chez les chevaux AES comparés aux

chevaux CTL, contrairement à l'étude de Lavoie-Lamoureux et *al.*, (2012) qui n'avaient pas détecté ces cytokines par la technique ELISA chez les chevaux AES et CTL après 30 jours de challenge. Dans notre étude, aucun effet du challenge ou du statut sur l'expression des ARNm de ces cytokines n'a cependant été observé dans le LBA. Au niveau systémique, nos résultats confirment le rôle potentiel des lymphocytes Treg dans la physiopathologie de l'asthme. En effet, l'expression génique de l'IL-10 et du TGF- β est moins élevée chez les chevaux AES par rapport aux CTL. Dans le LBA l'expression des ARNm de l'IL-10 était significativement plus élevée post-challenge. Des études ont d'ailleurs montré que les Treg étaient responsables des mécanismes de tolérance au niveau du système immunitaire, et qu'ils étaient déficitaires chez les sujets asthmatiques humains (Cottrez & Groux, 2004 ; Lloyd & Hawrylowicz, 2009). Ainsi, d'autres études sont nécessaires afin d'identifier le rôle des Treg dans l'AES. De plus, une réponse immunitaire de type Th2 modifiée en expression de l'IL-4 et d'IL-13 mais non d'IL-5, a été observée dans le sang chez les chevaux AES, ce qui tend à confirmer les résultats de Horohov et *al.*, (2005). Cependant une réponse de type Th2 n'est pas toujours observée dans les études ni dans tous les cas d'asthme équin, probablement à cause de facteurs individuels, du stade de la maladie, de facteurs génétiques ou du type de challenge d'exposition (Moran et Folch, 2011). Nos résultats confirment des phénotypes immunologiques hétérogènes dans le cas de l'asthme. Cependant afin de consolider et de standardiser les études, investiguer l'effet des différents antigènes présents dans l'environnement, qui peuvent influencer les résultats et notamment la polarisation des MA de chevaux AES ou CTL, est une perspective pertinente pour la suite.

Les résultats de notre étude n'ont montré aucune corrélation entre la réponse immunitaire locale (LBA) et systémique (sang), ce qui est en accord avec l'étude de Hansen et *al.*, (2014).

A ce jour, la principale difficulté dans la comparaison inter-études est le design des études, la durée des challenges, mais aussi les modèles animaux utilisés. En effet, la plupart des études ayant étudié l'AES ont soumis les chevaux à du foin moisi ou à un environnement poussiéreux, ce qui favorise le déclenchement d'une crise avec des profils inflammatoires et immunitaires bien distincts. De plus, travailler sur le modèle équin présente la limite d'avoir un nombre insuffisant d'individus nécessitant une interprétation nuancée des résultats. En effet, moins il y a d'individus dans l'étude plus les valeurs de chaque groupe devront être éloignées afin d'observer des différences significatives, ce qui n'a pas été le cas dans notre étude. De plus le nombre et la quantité d'échantillons accessibles sont limités, notamment dans le cas des macrophages, ce qui restreint les différentes investigations possibles.

Conclusions générales

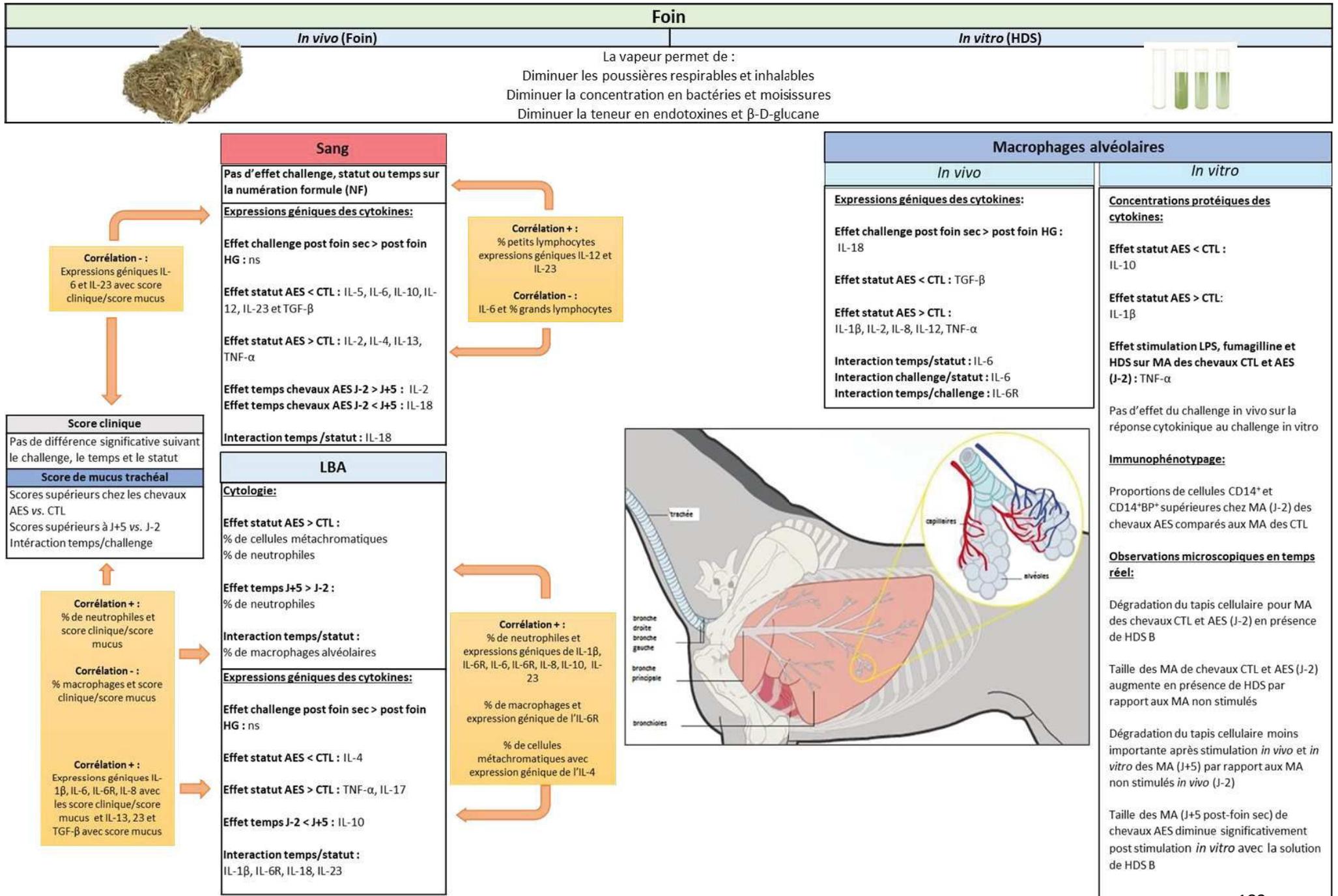
L'environnement du cheval, et plus précisément le foin sont les facteurs de risques majeurs dans l'initiation de l'asthme chez le cheval. La mise au pré des chevaux AES reste la solution la plus efficace pour éviter la crise d'asthme chez le cheval. Cependant cette solution ne peut pas toujours être appliquée. Les traitements curatifs sont efficaces mais coûteux et doivent être combinés à des mesures sanitaires. Ainsi des solutions alternatives ont été développées, parmi elles, le développement d'un purificateur de foin. Ce dispositif a été développé par l'entreprise HayGain en collaboration avec le Royal Agricultural College (Cirencester, UK) avec pour objectif de créer un produit capable d'éliminer les antigènes présents dans le foin. Ainsi depuis une dizaine d'années, le purificateur HayGain est utilisé dans les écuries en Angleterre et en Europe. L'efficacité du purificateur de foin à la vapeur sur la diminution de la teneur en bactéries, moisissures, et en poussières respirables et inhalables a été préalablement démontrée par Moore-Colyer et *al.*, (2014 ; 2016) et confirmée par nos travaux (Orard et *al.* 2018). En revanche l'efficacité de ce dispositif n'avait jamais été testée sur les chevaux atteints d'asthme. La première partie de ce travail, axée sur la mise en place d'un challenge d'exposition *in vivo* sur des chevaux AES et CTL, n'a pas permis de confirmer totalement notre hypothèse. Notre étude a montré un effet bénéfique du foin « à la vapeur » sur le score de mucus trachéal des chevaux CTL et AES. Cependant nos résultats n'ont pas permis d'observer une diminution significative de l'inflammation et de la réponse immunitaire chez les chevaux AES et CTL par les analyses en qPCR et ELISA.

La deuxième partie de ce travail a confirmé une variation du phénotype des MA selon le statut du cheval (AES vs. CTL). De plus, des réponses morphologiques des cellules ont été observées par microscopie en temps réel, avec une activité plus importante des MA isolés de chevaux CTL stimulés *in vitro* avec la solution de HDS par rapport aux MA de chevaux AES. L'expression des cytokines a montré une réponse de type « mixte », avec une polarisation de type M1/M2 chez les chevaux AES stimulés *in vitro* et de type « pro-inflammatoire » chez les chevaux CTL. De plus, un effet négatif du challenge *in vivo* préalable sur la réponse des MA après stimulation *in vitro* a été observé. Les observations microscopiques ont permis d'identifier des changements morphologiques des cellules, avec des modifications cellulaires plus importantes pour les MA de chevaux CTL non challengés préalablement.

Les deux approches utilisées dans ce travail ont permis d'étudier l'effet du foin « à la vapeur » sur la réponse systémique et respiratoire, tant à l'échelle du cheval qu'à l'échelle de la cellule (Figure 73).

Ainsi le foin « à la vapeur » semble avoir un effet bénéfique sur les paramètres cliniques des chevaux mais notre étude n'a pas permis de montrer un effet bénéfique significatif du foin « à la vapeur » sur la réponse systémique, locale et cellulaire. Notre étude a permis une appréhension globale de la réponse des chevaux AES avant et après exposition au challenge *in vivo*, après stimulation *in vitro* des macrophages alvéolaires et après stimulation *in vitro* post-challenge *in vivo*. Cet état des lieux sur l'effet du foin « à la vapeur » dans le cas de l'AES permet pour la première fois d'avoir une vision transversale, qui pourra servir de base aux études futures.

Figure 73 : Synthèse des principaux résultats obtenus



Perspectives

Tout d'abord, d'un point de vue méthodologique, l'une des principales difficultés aujourd'hui est de comparer les études *in vivo* entre elles, dans le cas de l'asthme équin. Afin d'obtenir une cohérence dans les résultats et de mieux définir les mécanismes immunitaires intervenant dans l'AES, il est nécessaire de standardiser les études. En effet, nous avons montré une grande variabilité entre les foins pourtant issus d'un même lot. Ainsi l'utilisation de HDS, dont la composition totale (microbiologique, teneurs en poussières...) est bien définissable pourrait permettre de standardiser la réalisation des challenges *in vivo* entre les études par inhalation de HDS et non par exposition à du foin.

Hormis le score de mucus significativement amélioré après exposition au foin « à la vapeur », notre étude n'a pas permis d'identifier un effet statistiquement bénéfique du foin « à la vapeur » sur la réponse inflammatoire et immunitaire des chevaux AES. Néanmoins sur le terrain, des observations positives ont été faites sur les chevaux AES. Cette étude s'est consacrée uniquement à l'effet du foin « à la vapeur » sur des chevaux atteints d'asthme sévère au repos. Il serait également intéressant d'étudier la réponse de chevaux atteints d'asthme équin modéré, dans un contexte de thérapie préventive de l'asthme chez le cheval.

L'utilisation du foin « à la vapeur » est aujourd'hui principalement dédiée aux chevaux présentant une inflammation respiratoire, cependant nous pouvons nous interroger sur l'intérêt de donner du foin « à la vapeur » à des chevaux CTL. En effet, on peut se demander si l'apparition d'une sensibilité respiratoire ou non serait observée sur ces chevaux ou si le foin « à la vapeur » aurait un effet préventif dans le développement potentiel de l'asthme chez le cheval.

Concernant la réponse immunitaire, différents profils ont été observés en fonction de l'échelle systémique ou locale. En effet, ce travail a permis d'étudier la réponse globale à l'échelle systémique, locale et au niveau cellulaire avec l'étude des macrophages alvéolaires. Les profils cytokiniques présentaient des différences suivant le compartiment étudié. Les résultats seront complétés par la quantification de l'expression des ARNm au niveau des MA stimulés *in vitro*. Aujourd'hui, la non-exposition aux allergènes reste la mesure prophylactique la plus efficace dans le cas de l'asthme, même lors de traitements à base de corticoïdes. Cependant le maintien des conditions d'hébergement du cheval sans allergènes est difficile à mettre en place sur le long terme. Ainsi l'immunothérapie est une approche prometteuse, notamment par l'utilisation

des cellules Treg. Nos résultats associés aux autres études (Henriquez et *al.*, 2014 ; Klier et *al.*, 2018) confirment la nécessité de poursuivre les recherches sur le rôle des Treg dans l'asthme équin. Klier et *al.*, (2015), ont également démontré que la Cytosine-phosphate-guanosine-oligodeoxynucleotide (CpG-ODN), molécule déjà testée chez l'Homme, avait des effets bénéfiques sur la réponse clinique des chevaux soumis à des allergènes. De plus la stimulation *in vitro* et *in vivo* de cellules provenant de LBA induit une augmentation de la concentration en l'IL-10, dans le lavage trachéal. Cette cytokine sécrétée notamment par les Treg aurait un effet régulateur sur les réponses excessives Th1 ou Th2 définies dans l'AES. Ainsi stimuler la réponse immunitaire de type Treg permettrait de restaurer la balance Th1/Th2 déséquilibrée dans le cas de l'AES.

Notre travail s'est concentré sur l'étude des macrophages alvéolaires, qui sont les premières cellules de l'immunité au niveau pulmonaire. Cependant une des limites à l'utilisation des macrophages alvéolaires est le faible nombre de cellules récupérées dans les LBA pour certains chevaux, limitant ainsi le nombre de conditions testées ainsi que la quantité d'investigations et les approches expérimentales pouvant être menées. C'est pourquoi, d'autres études sont nécessaires afin de confirmer le rôle des MA dans la physiopathologie de l'AES. Lors d'une stimulation, les MA ont un rôle de communication et d'attraction d'autres cellules du système immunitaire *via* des cytokines et chimiokines. Ainsi pour étudier plus largement les mécanismes de communications inter-cellulaires, l'utilisation d'un outil tel que le Bioflux (disponible au laboratoire) permettrait de représenter le fonctionnement dynamique des cellules impliquées dans la réponse immunitaire. Enfin, d'autres types cellulaires pourraient être étudiés, tels que les cellules dendritiques qui sont comme les macrophages alvéolaires, des cellules présentatrices d'antigènes et dont le rôle central a été démontré dans le cas de l'asthme en médecine humaine.

Références bibliographiques

Abbas A, Murphy K, Sher A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 383 : 787-793.

Ai-Hua-Cui MM, Jing-Zhao MM, Shu-Xiang-Liu MM, Ying-Shuang-Hao MB. (2017). Associations of IL-4, IL-6, and IL-12 levels in peripheral blood with lung function, cellular immune function, and quality of life in children with moderate-to-severe asthma. *Medicine (Baltimore)*. 96.

Ainsworth DM, Grünig G, Matychak M, Young JC, Wagner B, Erb HN, Antczak D. (2003). Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN-gamma and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 96 : 83-91.

Ainsworth DM, Wagner B, Erb HN, Young JC, Retallick DE. (2007). Effects of in vitro exposure to hay dust on expression of interleukin-17, -23, -8, and -1b and chemokine (C-X-C motif) ligand 2 by pulmonary mononuclear cells isolated from horses chronically affected with recurrent airway disease. *Am J*. 68 : 1361-1369.

Akira S, Sato S. (2003). Toll-like receptors and their signaling mechanisms. *Scand J Infect Dis*. 35 : 555-562.

Alexis NE, Soukup J, Nierkens S, Becker S. (2001). Association between airway hyperreactivity and bronchial macrophage dysfunction in individuals with mild asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 280 : 369-375.

Alonso C, Raynor PC, Davies PR, Morrison RB, Torremorell M. (2016). Evaluation of an electrostatic particle ionization technology for decreasing airborne pathogens in pigs. *Aerobiologia (Bologna)*. 32 : 405-419.

Arnold CE, Whyte CS, Gordon P, Barker RN, Rees AJ, Wilson HM. (2014). A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M1 macrophage activation and function in vitro and in vivo. *Immunology*. 141 : 96-110.

Art T, Lekeux P. (2004). Gestion de l'environnement du cheval souffrant de troubles respiratoires. *Pratique Vétérinaire Equine*. 36 : 115-122.

Auger E, Moore-Colyer M. (2017). The Effect of Management Regime on Airborne Respirable Dust Concentrations in Two Different Types of Horse Stable Design. *Equine Vet Sci*. 51 : 105-109.

Ayers M, Jeffery P. (1988). Proliferation and differentiation in mammalian airway epithelium. *Respir J*. 1 : 58-80.

Banchereau J, Galizzi JP. (1990). Receptors for interleukin 4, interleukin 5 and interleukin 6. *Ann Ist Super Sanita*. 26 : 453-467.

Bang B, Chun E, Shim E, Lee H, Lee S, Cho S, Min K, Kim Y, Park H. (2011). Alveolar macrophages modulate allergic inflammation in a murine model of asthma. *Exp Mol Med*. 43 : 275-280.

Barone R. (2010). Anatomie comparée des mammifères domestiques : Tome 3. 5ème édition. Paris: Vigot. 853.

- Beeler-Marfisi J, Clark ME, Wen X, Sears W, Huber L, Ackerley C, Viel L, Bienzle D. (2010). Experimental induction of recurrent airway obstruction with inhaled fungal spores, lipopolysaccharide, and silica microspheres in horses. *Am J Vet Res.* 71 : 682-689.
- Begueret H, Berger P, Vernejoux J, Dubuisson L, Marthan R, Tunon-de-Lara J. (2007). Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *Thorax.* 62 : 8-15.
- Benattia A, Cavailon P, Gachelin E, Devillier P, Vecellio L, Williams G, Dubus JC. (2015). Inhaled treatments: Choice of devices, systemic absorption of inhaled drugs and bitter taste receptors in the respiratory tract. *Rev Mal Respir.* 32 : 791-799.
- Berndt A, Derksen FJ, Robinson NE. (2010). Endotoxin concentrations within the breathing zone of horses are higher in stables than on pasture. *Vet J.* 183 : 54-57.
- Bernstein IL, Li J, Bernstein DI, Hamilton R, Spector SL, Tan R, Sicherer S, Golden DB, Khan DA, Nicklas RA, Portnoy JM, Blessing-Moore J, Cox L, Lang DM, Oppenheimer J, Randolph CC, Schuller DE, Tilles SA, Wallace DV, Levetin E, Weber R. (2008). Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 100 : S1-148.
- Bond S, Leguillette R, Richard E, Couetil L, Lavoie JP, Martin JG, Pirie RS. (2018). "Equine asthma"-integrative biologic relevance of a recently proposed nomenclature. *J Vet Intern Med.*
- Boschetti G, Nancey S, Kanjarawi R, Almeras T, Ruel K, Kaiserlian D, Flourie B. (2012). Immune responses in inflammatory bowel disease: Contribution of IL-23/Th17 axis. *Hepato Gastro.* 19 : 446-454.
- Bosshard S, Gerber V. (2014). Evaluation of coughing and nasal discharge as early indicators for an increased risk to develop equine recurrent airway obstruction (RAO). *J Vet Intern Med.* 28 : 618-623.
- Böttcher M, Bjurström J, Mai XN, Jenmalm M. (2003). Allergen-induced cytokine secretion in atopic and non-atopic asthmatic children. *Pediatr Allergy Immunol.* 14 : 345-350.
- Bowles KS, Beadle RE, Mouch S, Pourciau SS, Littlefield-Chabaud MA, Le Blanc C, Mistic L, Fermaglich D, Horohov DW. (2002). A novel model for equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol.* 87 : 385-389.
- Boyle A, Timoney J, Newton J, Hines M, Waller A, Buchanan B. (2018). Streptococcus equi Infections in Horses: Guidelines for Treatment, Control, and Prevention of Strangles-Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med.* 32 : 633-647.
- Bracher V, von Fellenberg JL, Winder CN. (1991). An investigation of the incidence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in random populations of Swiss horses. *Equine Vet J.* 23 : 136-141.
- Brazil TJ, Dagleish MP, McGorum BC, Dixon PM, Haslett C, Chilvers ER. (2005). Kinetics of pulmonary neutrophil recruitment and clearance in a natural and spontaneously resolving model of airway inflammation. *Clin Exp Allergy.* 35 : 854-865.
- Breton C, Byun H, Wang X, Salam M, Siegmund K, Gilliland F. (2011). DNA methylation in the arginase-nitric oxide synthase pathway is associated with exhaled nitric oxide in children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 184 : 191-197.
- Broadstone RV, Scott JS, Derksen FJ, Robinson NE. (1988). Effects of atropine in ponies with recurrent airways obstruction. *J Appl Physiol.* 65 : 2720-2725.

- Bullone M, Godbout M, Martin JG, Lavoie JP. (2014). Endobronchial ultrasonography of isolated bronchi reveals increased airway smooth muscle mass in large airways of asthmatic horses. *Am J Respir Crit Care Med.* 10 : 806-815.
- Bullone M, Lavoie JP. (2015). 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.
- Bullone M, Murcia R, Lavoie JP. (2016). Environmental heat and airborne pollen concentration are associated with increased asthma severity in horses. *Equine Vet J.* 48 : 479-484.
- Busse PJ, Mathur SK. (2010). Age-related changes in immune function: effect on airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 126 : 690-699.
- Busse W, Corren J, Lanier BQ, McAlary M, Fowler-Taylor A, Cioppa GD, van As A, Gupta N. (2001). Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 108 : 184-190.
- Cambra-Lopez M, Winkel A, van Harn J. (2009). Ionization for reducing particulate matter emissions from poultry houses. *Transactions of the ASAE.* 52 : 1757-1771.
- Careau E, Bissonnette EY. (2004). Adoptive transfer of alveolar macrophages abrogates bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 31 : 22-27.
- Cesarini C, Hamilton E, Picandet V, Lavoie JP. (2006). Theophylline does not potentiate the effects of a low dose of dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction. *Equine Vet J.* 38 : 570-573.
- Chae BS. (2018). Pretreatment of Low-Dose and Super-Low-Dose LPS on the production of In Vitro LPS-Induced Inflammatory Mediators. *Toxicol Res.* 34 : 65-73.
- Chavry J, Vaissaire J, Cheviron B. (2001). Encyclopedie du cheval. 1ère édition. Aniwa. Evialis. 32-35.
- Chetta A, Foresi A, Del-Donno M, Bertorelli G, Pesci A, Olivieri D. (1997). Airways remodeling is a distinctive feature of asthma and is related to severity of disease. *Chest.* 111 : 852-857.
- Christley RM. (2001). A case-control study of respiratory disease in Thoroughbred racehorses in Sydney, Australia. *Equine Vet J.* 33 : 256-264.
- Clarke A. (1992). Environmental monitoring in relation to equine respiratory disease. In : Robinson NE, *Current therapy in Equine Medicine 2.* Philadelphia. WB Saunders Company. 310-316.
- Clements JM, Pirie RS. (2007). Respirable dust concentrations in equine stables. Part 2: the benefits of soaking hay and optimising the environment in a neighbouring stable. *Res Vet Sci.* 83 : 263-268.
- Clienti S, Morjaria J, Basile E, Polesa R. (2011). Monoclonal Antibodies for the Treatment of Severe Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 11 : 253-260.
- Cordeau M, Joubert P, Dewachi O, Hamid Q, Lavoie JP. (2004). IL-4, IL-5 and IFN-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves (2004). *Vet Immunol Immunopathol.* 97 : 87-96.
- Cornelisse C, Robinson NE, Berney C, Kobe C, Boruta D, Derksen F. (2004). Efficacy of oral and intravenous dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction. *Equine Vet J.* 36 : 426-430.
- Corrigan CJ. (1999). Eotaxin and asthma: some answers, more questions. *Clin Exp Immunol.* 116 : 1-3.

- Costa LL, Johnson J, Baur M, Beadle R. (2006). Temporal clinical exacerbation of summer pasture-associated recurrent airway obstruction and relationship with climate and aeroallergens in horses. *Am J Vet Res.* 67 : 1635-1642.
- Costa LL, Seahorn T, Moore R. (2000). Correlation of clinical score, intrapleural pressure, cytologic findings of bronchoalveolar fluid and histopathologic lesions of pulmonary tissue in horses with summer pasture associated obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res.* 61 : 167-173.
- Cottrez F, Groux H. (2004). Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation.* 77 : S12-15.
- Couëtil LL, Rosenthal FS, Simpson CM. (2000). Forced expiration: a test for airflow obstruction in horses. *J Appl Physiol.* 88 : 1870-1879.
- Couëtil LL, Rosenthal FS, Denicola D. (2001). Clinical signs, evaluation of BAL fluid and assessment of pulmonary function in horses with inflammatory respiratory disease. *Am J Vet Res.* 4 : 538-546.
- Couetil LL, Ward M. (2003). Analysis of risk factors for recurrent airway obstruction in North American horses: 1444 cases (1990-1999). *J Am Vet Med Assoc.* 223 : 1645-1650.
- Couëtil LL. (2008). Caractérisation fonctionnelle et moléculaire de maladies inflammatoires du poumon chez le cheval de sport. *Ann Méd Vét.* 152 : 1-5.
- Couëtil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie P, Léguillette R, Richard EA. (2016). Inflammatory airway disease of horses - revised consensus statement. *J Vet Intern Med.* 30 : 503-515.
- Couroucé-Malblanc A, Fortier G, Pronost S, Siliart B, Brachet G. (2008). Comparison of prednisolone and dexamethasone effects in the presence of environmental control in heaves-affected horses. *Vet J.* 175 : 227-233.
- Cox G, Thompson N, Rubin A, Niven R, Corris P, Siersted R, Olivenstein R, Pavord ID, McCormack D, Chaudhuri R, Miller J, Laviolette M. (2007). Asthma control during the year after bronchial thermoplasty. *N Engl J Med.* 13 : 1327-1337.
- Crichlow E, Yoshida K, Wallace K. (1980). Dust levels in a riding stable. *Equine Vet J.* 12 : 185-188.
- Crowther D, Fairley GH, Sewell RL. (1969). Lymphoid cellular responses in the blood after immunization in man. *J Exp Med.* 129 : 849-869.
- Curtis L, Raymond S, Clark A. (1996). Poussière et ammoniac dans les boxes de chevaux avec différents taux de ventilation et de litière. *Aérobiologie.*
- Curto E, Messenger KM, Salmon JH, Gilger BC. (2016). Cytokine and chemokine profiles of aqueous humor and serum in horses with uveitis measured using multiplex bead immunoassay analysis. *Vet Immunol Immunopathol.* 182 : 43-51.
- Davies DE. (2001). The bronchial epithelium: translating gene and environment interactions in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 1 : 67-71.
- Davis E, Rush BR. (2002). Equine recurrent airway obstruction: pathogenesis, diagnosis, and patient management. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 18 : 453-467.

- Davison J, McGladdery C, Wylie C, Haggett E, Fettes C, Comyn I, Ramzan P. (2017). Respirable particulate size and concentrations in five newmarket (UK) training yard. Communication présentée au congrès World Equine Airway Symposium. 13-14 juillet. Copenhague, Danemark.
- Deaton C, Deaton L, José-Cunilleras E, Vincent T, Baird A, Dacre K, Marlin D. (2007). Early onset airway obstruction in response to organic dust in the horse. *J Appl Physiol.* 102 : 1071-1077.
- Debrue M, Hamilton E, Joubert P, Lajoie-Kadoch S, Lavoie JP. (2005). Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 105 : 25-31.
- Deer DM, Lampel KA, González-Escalona N. (2010). A versatile internal control for use as DNA in real-time PCR and as RNA in real-time reverse transcription PCR assays. *Lett Appl Microbiol.* 50 : 366-72
- Degueurce C. (2009). Les traitements de la pousse par nos anciens. *Bull Soc Hist Méd Sci Vét.* 9 : 69-87.
- Deluca L, Erb HN, Young JC, Perkins GA, Ainsworth DM. (2008). The effect of adding oral dexamethasone to feed alterations on the airway cell inflammatory gene expression in stabled horses affected with recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med.* 22 : 427-435.
- Denys M. (2011). Physiopathologie de l'obstruction récurrente des voies respiratoires chez le cheval: étude bibliographique et actualités. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire. Toulouse. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse-ENVT. 129p.
- Depecker M, Richard EA, Pitel PH, Fortier G, Leleu C, Couroucé-Malblanc A. (2014). Bronchoalveolar lavage fluid in Standardbred racehorses: Influence of unilateral/bilateral profiles and cut-off values on lower disease diagnosis. *Vet J.* 19 : 150-156.
- Derksen FJ, Robinson NE, Armstrong PJ. (1985). Airway reactivity in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *J Appl Physiol.* 58 : 598-604.
- Derksen FJ, Robinson NE, Scott JS, Stick JA. (1988). Aerosolised *Micropolyspora faeni* antigen as a cause of pulmonary dysfunction in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am J vet Res.* 49 : 933-938.
- Devos S, Cormont F, Vrtala S, Hooghe-Peters E, Pirson F, Snick J. (2006). Allergen-induced interleukin-9 production in vitro: correlation with atopy in human adults and comparison with interleukin-5 and interleukin-13. *Clin Exp Allergy.* 36 : 174-182.
- Diamond CE, Khameneh HJ, Brough D, Mortellaro A. (2015). Novel perspectives on non-canonical inflammasome activation. *Immunotargets Ther.* 4 : 131-141.
- Dixon PM, Railton DJ, McGorum BC. (1995). Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 3: Ancillary diagnostic findings. *Equine Vet J.* 27 : 428-435.
- Dolecek C, Steinberger P, Susani M, Kraft D, Valenta R, Boltz-Nitulescu G. (1995). Effects of IL-4 and IL-13 on total and allergen specific IgE production by cultured PBMC from allergic patients determined with recombinant pollen allergens. *Clin Exp Allergy.* 25 : 879-889.
- Doubli-Bounoua N, Richard EA, Léon A, Pitel PH, Pronost S, Fortier G. (2016). Multiple molecular detection of respiratory viruses and associated signs of airway inflammation in racehorses. *Virology J.* 13 : 197.

- Douwes J. (2005). (1-3)-Beta-D-glucans and respiratory health: a review of the scientific evidence. *Indoor Air*. 15 : 160-169.
- Draijer C, Peters-Golden M. (2017). Alveolar Macrophages in Allergic Asthma: the Forgotten Cell Awakes. *Curr Allergy Asthma Rep*. 17 : 12.
- Dutch Expert Committee on Occupational Standards-DECOS. (2010). Endotoxins: health based recommended exposure limit. A report of the Health Council of the Netherlands, publication no. 2010/04OSH. The Hague, the Netherlands: Health Council of the Netherlands.
- Eduard W. (2009). Fungal spores: a critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting. *Crit Rev Toxicol*. 39 : 799-864.
- Fairbairn S, Page C, Lees P. (1993). Early neutrophils but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure. *Clin Exp Allergy*. 23 : 821-828.
- Fallon JP, Reeves EP, Kavanagh K. (2010). Inhibition of neutrophil function following exposure to the *Aspergillus fumigatus* toxin fumagillin. *J Med Microbiol*. 59 : 625-633.
- Fernandez S, Jose P, Avdiushko MG, Kaplan AM, Cohen DA. (2004). Inhibition of IL10 receptor function in alveolar macrophages by Toll-like receptor agonists. *J Immunol*. 172 : 2613-2620.
- Ferreira M, Matheson M, Duffy D, Marks G, Hui J, Le Souëf P, Danoy P, Baltic S, Nyholt D, Jenkins M, Hayden C, Willemsen G, Ang W, Kuokkanen M, Beilby J, Cheah F, de Geus E, Ramasamy A, Vedantam S, Salomaa V, Madden P, Heath A, Hopper J, Visscher P, Musk B, Leeder S, Jarvelin M, Pennell C, Boomsma D, Hirschhorn J, Walters H, Martin N, James A, Jones G, Abramson M, Robertson C, Dharmage S, Brown M, Montgomery G, Thompson P. (2011). Australian Asthma Genetics Consortium. Identification of IL6R and chromosome 11q13.5 as risk loci for asthma. *Lancet*. 378 : 1006-1014.
- Fillion-Bertrand G, Dickson RP, Boivin R, Lavoie JP, Huffnagle GB, Leclere M. (2018). Lung microbiome is influenced by the environment and asthmatic status in an equine model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*.
- Fortes FS, Pecora IL, Persechini PM, Hurtado S, Costa V, Coutinho-Silva R, Braga MB, Silva-Filho FC, Bisaggio RC, De Farias FP, Scemes E, De Carvalho AC, Goldenberg RC. (2004). Modulation of intercellular communication in macrophages: possible interactions between GAP junctions and P2 receptors. *J Cell Sci*. 117 : 4717-4726.
- Fortier G, Richard E, Hue E, Fortier C, Pronost S, Pottier D, Lemaitre L, Lekeux P, Borchers K, Thiry E. (2013). Long-lasting airway inflammation associated with equid herpesvirus-2 in experimentally challenged horses. *Vet J*. 197 : 492-495.
- Franchini M, Gilli U, Akens M, Fellenberg R, Bracher V. (1998). The role of neutrophil chemotactic cytokines in the pathogenesis of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Vet Immunol Immunopathol*. 66 : 53-65.
- Franchini M, Gill U, von Fellenberg R, Bracher VD. (2000). Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay. *Am J Vet Res*. 61 : 1369-1374.
- Gerber H. (1989). The genetic basis of some equine diseases. *Equine Vet J*. 21 : 244-248.

- Gerber V, Straub R, Marti E, Hauptman J, Herholz C, King M, Imhof A, Tahon L, Robinson N. (2004a). Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Vet J.* 36 : 576-582.
- Gerber V, Lindeberg A, Bernet C, Robinson NE. (2004b). Airway mucus in recurrent airway obstruction -Short-term response to environmental challenge. *J Vet Intern Med.* 18 : 92-97.
- Gerber V, Schott II HC, Robinson NE. (2011). Owner assessment in judging the efficacy of airway disease treatment. *Equine Vet J.* 43 : 153-158.
- Giembycz MA, Newton R. (2011). Harnessing the clinical efficacy of phosphodiesterase 4 inhibitors in inflammatory lung diseases: dual-selective phosphodiesterase inhibitors and novel combination therapies. *Handb Exp Pharmacol.* 204 : 415-446.
- Giguère S, Viel L, Lee E, MacKay RJ, Hernandez J, Franchini M. (2002). Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Vet Immunol Immunopathol.* 85 : 147-158.
- Gordon S. (2008). Elie Metchnikoff: father of natural immunity. *Eur J Immunol.* 38 : 3257-64.
- Grabiec AM, Hussell T. (2016). The role of airway macrophages in apoptotic cell clearance following acute and chronic lung inflammation. *Semin Immunopathol.* 38 : 409-423.
- Guilliams M, De Kleer I, Henri S, Post S, Vanhoutte L, De Prijck S, Deswarte K, Malissen B, Hammad H, Lambrecht BN. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med.* 210 : 1977-1992.
- Guth AM, Janssen WJ, Bosio CM, Crouch EC, Henson PM, Dow SW. (2009). Lung environment determines unique phenotype of alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 296 : L936-946.
- Halliwell RE, McGorum BC, Irving P, Dixon PM. (1993). Local and systemic antibody production in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. *Vet Immunol Immunopathol.* 38 : 201-215.
- Hammond RA, Hannon R, Frean SP, Armstrong SJ, Flower RJ, Bryant CE. (1999). Endotoxin induction of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in equine alveolar macrophages. *Am J Vet Res.* 60 : 426-431.
- Hancock A, Armstrong L, Gama R, Millar A. (1998). Production of interleukin 13 by alveolar macrophages from normal and fibrotic lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 18 : 60-65.
- Hansen S, Baptiste KE, Fjeldborg J, Betancourt A, Horohov DW. (2014). A comparison of pro-inflammatory cytokine mRNA expression in equine bronchoalveolar lavage (BAL) and peripheral blood. *Vet Immunol Immunopathol.* 158 : 238-243.
- Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, Becker CD, See P, Price J, Lucas D, Greter M, Mortha A, Boyer SW, Forsberg E, Tanaka M, Van Rooijen N, García-Sastre A, Stanley ER, Ginhoux F, Frenette PS, Merad M. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity.* 38 : 792-804.
- Hedelin A, Sundblad B, Sahlander K, Wilkinson K, Seisenbaeva G, Kessler V, Larsson K, Palmberg L. (2017). Feasibility of particulate reduction in animal housing. Communication présentée au congrès du World Equine Airway symposium-WEAS, 13-14 juillet, Copenhague, Danemark.
- Henriquez C, Perez B, Morales N, Carrasco C, Sarmiento J, Morán G, Folch H. (2014). Participation of T regulatory cells in equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol.* 158 : 128-134.

- Herszberg B, Ramos-Barbón D, Tamaoka M, Martin JG, Lavoie JP. (2006). Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. *J Allergy Clin Immunol.* 118 : 382-388.
- Hespanhol MR, Mantovani B. (2002). Phagocytosis by macrophages mediated by receptors for denatured proteins - dependence on tyrosine protein kinases. *Braz J Med Biol Res.* 35 : 383-389.
- Hewson J, Viel L. (2002). Sampling, Microbiology and Cytology of the Respiratory Tract. In : Lekeux P, *Equine respiratory diseases*. St Louis. Saunders.
- Hoffman A, Robinson NE, Wade JF. (2002). Proceedings of a Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome. Presented at the Havemeyer Foundation Monograph Series No 9; Proceedings of a Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome, A Hoffman, NE Robinson and JF Wade, Boston, USA.
- Holcombe S, Jakson GV, Jefcoat A, Berey C, Eberhardt S, Robinson NE. (2001). Stabling is associated with airway inflammation in young Arabian horses. *Equine Vet J.* 33 : 244-249.
- Holt P, Olivier J, Bilyk N, McMenamin C, McMenamin P, Kraal G. (1993). Downregulation of the antigen-presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *J Exp Med.* 177 : 397-407.
- Horohov B., Beaddle R., Mouch S. (2005). Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol.* 108 : 237-245.
- Horohov DW, Breathnach CC, Sturgill TL, Rashid C, Stiltner JL, Strong D. (2008). In vitro and in vivo modulation of the equine immune response by parapoxvirus ovis. *Equine Vet J.* 40 : 468-472
- Hotchkiss J, Reid S, Chrisley R. (2007). A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: Risk factors for recurrent airway obstruction. *Equine Vet J.* 39 : 301-308.
- Houtsma A, Bedenice D, Pusterla N, Pugliese B, Mapes S, Hoffman A, Paxson J, Rozanski E, Mukherjee J, Wigley M, Mazan MR. (2015). Association between inflammatory airway disease of horses and exposure to respiratory viruses: a case control study. *Multidiscip Respir Med.* 10 : 33.
- Hue ES, Fortier GD, Fortier CI, Leon AM, Richard EA, Legrand LJ, Pronost SL. (2014). Detection and quantitation of equid gammaherpesviruses (EHV-2, EHV-5) in nasal swabs using an accredited standardised quantitative PCR method. *J Virol Methods.* 198 : 18-25.
- Hume DA, Ross IL, Himes SR, Sasmono RT, Wells CA, Ravasi T. (2002). The mononuclear phagocyte system revisited. *J Leukoc Biol.* 72 : 621-627.
- Hume DA. (2006). The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol.* 18 : 49-53.
- Ivester KM, Smith K, Moore GE, Zimmerman NJ, Couëtil LL. (2012). Variability in particulate concentrations in a horse training barn over time. *Equine Vet J.* 44 : 51-56.
- Ivester KM, Couëtil LL, Moore G, Zimmerman NJ, Raskin R. (2014). Environmental exposures and airway inflammation in young thoroughbred horses. *J Vet Intern Med.* 28 : 918-924.
- Jaakkola JJ, Ahmed P, Ieromnimon A, Goepfert P, Laiou E, Quansah R, Jaakkola MS. (2006). Preterm delivery and asthma: a systematic review and meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 118 : 823-830.
- Jackson C, Berney C, Jefcoat A, Robinson NE. (2000). Environment and prednisone intercatations in the treatment of recurrent airway obstruction (heaves). *Equine Vet J.* 32 : 432-438.

- James A, Bai T, Mauad T, Abramson M, Dolhnikoff M, McKay K, Maxwell P, Elliot J, Green F. (2009). Airway smooth muscle thickness in asthma is related to severity but not duration of asthma. *Respir J*. 34 : 1040-1045.
- James R, Moore-Colyer MJS. (2010). Determination of the microbial contamination in dry and steamed hay. European Workshop for Equine Nutrition, Cirencester, Sept 2010. The Impact of nutrition on the health and welfare of horses. EAAP publication No. 128. Ed Ellis, A., Longland, A.C., Coenen, M and Miraglia, N. 128–132.
- Jarjour NN, Calhoun WJ. (1994). Enhanced production of oxygen radicals in asthma. *J Lab Clin Med*. 123 : 131-136.
- Jefcoat AM, Hotchkiss JA, Gerber V, Harkema JR, Basbaum CB, Robinson NE. (2001). Persistent mucin glycoprotein alterations in equine recurrent airway obstruction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 281 : 704-712.
- Jiang Z, Zhu L. (2016). Update on the role of alternatively activated macrophages in asthma. *J Asthma Allergy*. 3 : 101-107.
- Jordan J, Guo R, Yun E, Sarma V, Warner R, Crouch L, Senaldi G, Ulich T, Ward P. (2001). Role of IL-18 in acute lung inflammation. *J Immunol*. 167 : 7060-7068.
- Jost U, Klukowska-Rötzler J, Dolf G. (2007). A region on equine chromosome 13 is linked to recurrent airway obstruction in horses. *Equine Vet J*. 39 : 236-241.
- Joubert P, Silversides D, Lavoie JP. (2001). Equine neutrophils express mRNA for tumour necrosis factor-alpha, interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, macrophage-inflammatory-protein-2 but not for IL-4, IL-5 and interferon-gamma. *Equine Vet J*. 33 : 730-733.
- Joubert P, Cordeau M, Boyer A, Silversides D, Lavoie JP. (2008). Cytokine expression by peripheral blood neutrophils from heaves-affected horses before and after allergen challenge. *Vet J*. 178 : 227-232.
- Joubert P, Cordeau ME, Lavoie JP. (2011). Cytokine mRNA expression of pulmonary macrophages with challenge but not with disease state in horses with heaves or in controls. *Vet Immunol Immunopathol*. 142 : 236-242.
- Kapellos TS, Taylor L, Lee H, Cowley SA, James WS, Iqbal AJ, Greaves DR. (2016). A novel real time imaging platform to quantify macrophage phagocytosis. *Biochem Pharmacol*. 116 : 107-119.
- Karagianni AE, Kapetanovic R, McGorum BC, Hume DA, Pirie RS. (2013). The equine alveolar macrophage: functional and phenotypic comparisons with peritoneal macrophages. *Vet Immunol Immunopathol*. 155 : 219-228.
- Kelley J. (1990). Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis*. 141 : 765-788.
- Khol-Parisini A, Van den Hoven R, Leinker S, Howard W Hulan, J. (2007). Effects of feeding sunflower oil or seal blubber oil to horses with recurrent airway obstruction. *Can J Vet Res*. 71 : 59-65.
- Kim HS, Hong JT, Kim Y, Han SB. (2011). Stimulatory Effect of β -glucans on Immune Cells. *Immune Netw*. 11 : 191–195.
- Kirschvink N, Di Silvestro F, Sbaï I, Vandenput S, Art T, Roberts C, Lekeux P. (2002). The use of cardboard bedding material as part of an environmental control regime for heave-affected horses: in vitro

- assessment of airborne dust and aeroallergen concentration and in vivo effect on lung function. *Vet J.* 163 : 319-325.
- Kittan NA, Allen RM, Dhaliwal A, Cavassani KA, Schaller M, Gallagher KA, Carson IV W, Mukherjee S, Grembecka J, Cierpicki T, Jarai G, Westwick J, Kunkel SL, Hogaboam C. (2013). Cytokine induced phenotypic and epigenetic signatures are key to establishing specific macrophage phenotypes. *PLoS One.* 8.
- Klier J, Lehmann B, Fuchs S, Reese S, Hirschmann A, Coester C, Winter G, Gehlen, H. (2015). Nanoparticulate CpG Immunotherapy in RAO-Affected Horses: Phase I and IIa Study. *J Vet Intern Med.* 29 : 286-293
- Klier J, Geis S, Steuer J, Geh K, Reese S, Fuchs S, Mueller RS, Winter G, Gehlen H. (2018). A comparison of nanoparticulate CpG immunotherapy with and without allergens in spontaneously equine asthma-affected horses, an animal model. *Immun Inflamm Dis.* 6 : 81-96.
- Koch K, Hartung M, Urban S, Kyburz A, Bahlmann A, Lind J, Backert S, Taube C, Müller A. (2015). Helicobacter urease-induced activation of the TLR2/NLRP3/IL-18 axis protects against asthma. *J Clin Invest.* 125 : 3297-3302.
- Kusel MM, Kebabdz T, Johnston SL, Holt PG, Sly PD. (2012). Febrile respiratory illnesses in infancy and atopy are risk factors for persistent asthma and wheeze. *Eur Respir J.* 39 : 876-882.
- Laan TT, Bull S, Pirie S, Fink Gremmels J. (2006). The role of alveolar macrophages in the pathogenesis of recurrent airway obstruction in horses. *J Vet Intern Med.* 20 : 167-174.
- Labiris NR, Dolovich MB. (2003). Pulmonary drug delivery. Part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br J Clin Pharmacol.* 56 : 588-599.
- Lagging E, Van Hage-Hamsten MG, Elfman L, Harfast B. (1998). Cytokine production in PBMC from allergics and non-allergics following in vitro allergen stimulation. *Immunol Lett.* 60 : 45-49.
- Lang R, Patel D, Morris J, Rutschman R, Murray PJ. (2002). Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J Immunol.* 169 : 2253-2263.
- Lanz S, Gerber V, Marti E, Rettmer H, Klukowska-Rötzler J, Gottstein B, Matthews JB, Pirie S, Hamza E. (2013). Effect of hay dust extract and cyathostomin antigen stimulation on cytokine expression by PBMC in horses with recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol.* 155 : 229-237.
- Laumen E, Doherr M, Gerber V. (2010). Relationship of horse owner assessed respiratory signs index to characteristics of recurrent airway obstruction in two Warmblood families. *Equine Vet J.* 42 : 142-148.
- Lavoie JP, Maghni K, Desnoyers M, Taha R, Martin J, Hamid Q. (2001). Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am J Respir Crit Care Med.* 164 : 1410-1413.
- Lavoie JP. (2007). Recurrent airway obstruction RAO (heaves) and summer-pasture-associated obstructive pulmonary disease SPAOPD. In : McGorum BC, Dixon PM, Robinson NE, Shumacher J. *Equine respiratory medicine and surgery.* Edinburgh ; New York. Saunders Elsevier. 565-589.
- Lavoie JP. (2015). Is the time primed for equine asthma? *Equine Vet Educ.* 27 : 225-226.

- Lavoie-Lamoureux A, Maghni K, Lavoie JP. (2010). Optimization of a procedure to accurately detect equine TNF α in serum samples. *Vet Immunol Immunopathol.* 138 : 118-123.
- Lavoie-Lamoureux A. (2011). Rôle des neutrophiles dans l'inflammation allergique associée au souffle chez le cheval, un modèle naturel d'asthme. Thèse. Sciences vétérinaires. Montréal. Université de Montréal. 377p.
- Lavoie-Lamoureux A, Leclere M, Lemos K, Wagner B, Lavoie JP. (2012). Markers of systemic inflammation in horses with heaves. *J Vet Intern Med.* 26 : 1419-1426.
- Lawrence T, Natoli G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol.* 11 : 750-61.
- Le Bâcle C, Bonnafé A. (2013). Risques biologiques en milieu de travail et maladies respiratoires d'origine allergique et/ou toxinique. [Brochure]. Paris. INRS. 4p.
- Leclere M, Lefebvre-Lavoie J, Beauchamp G, Lavoie JP. (2010). Efficacy of oral prednisolone and dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction in the presence of continuous antigen exposure. *Equine Vet J.* 42 : 316-321.
- Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Gélinas-Lymburner E, David F, Martin JG, Lavoie JP. (2011a). Effect of antigenic exposure on airway smooth muscle remodeling in an equine model of chronic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 45 : 181-187.
- Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP. (2011b). Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology.* 16 : 1027-1046.
- Lee C, Lin W, Wan L, Tsai Y, Tsai C, Huang C, Chen C, Tsai F. (2008). Association of interleukin-18 gene polymorphism with asthma in Chinese patients. *J Clin Lab Anal.* 22 : 39-44.
- Lee NS. (2012). T-cell biology in aging, with a focus on lung disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 67 : 254-263.
- Lee YG, Jeong JJ, Nyenhuis S, Berdyshev E, Chung S, Ranjan R, Karpurapu M, Deng J, Qian F, Kelly EA, Jarjour NN, Ackerman SJ, Natarajan V, Christman JW, Park GY. (2015). Recruited alveolar macrophages, in response to airway epithelial-derived monocyte chemoattractant protein 1/CCl₂, regulate airway inflammation and remodeling in allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 52 : 772-784.
- Leguillette R. (2003). Recurrent airway obstruction - heaves. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice.* 19 : 63-86.
- Lemanske R, Busse W. (2003). Asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 111 : 502-519.
- Leonard P, Sur S. (2003). Interleukin-12: potential role in asthma therapy. *BioDrugs.* 17 : 1-7.
- Li G, Mongillo M, Chin KT, Harding H, Ron D, Marks AR, Tabas I. (2009). Role of ERO1 α -mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Cell Biol.* 186 : 783-792.
- Liegeois M, Legrand C, Desmet C, Marichal T, Bureau F. (2018). The interstitial macrophage: A long-neglected piece in the puzzle of lung immunity. *Cell Immunol.* 330 : 91-96.

- Limame R, Wouters A, Pauwels B, Franssen E, Peeters M, Lardon F, De Wever O, Pauwels P. (2012). Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PLoS One*. 7.
- Lin SM, Frevert CW, Kajikawa O, Wurfel MM, Ballman K, Mongovin S, Wong VA, Selk A, Martin TR. (2004). Differential regulation of membrane CD14 expression and endotoxin-tolerance in alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 31 : 162-170.
- Ling E, Smith T, Nguyen X, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, Carr V, Robinson D. (2004). Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet*. 363 : 608-615.
- Litvack ML, Post M, Palaniyar N. (2011). IgM promotes the clearance of small particles and apoptotic microparticles by macrophages. *PLoS One*. 6.
- Lloyd CM, Hawrylowicz CM. (2009). Regulatory T Cells in Asthma. *Immunity*. 31 : 438-449. In : Lohmann-Matthes ML, Steinmuller C, Franke-Ullmann G. (1994). Pulmonary macrophages. *Eur Respir J*. 7 : 1678-1689.
- Lopez S, Arias C. (2010). How Viruses Hijack Endocytic Machinery. *Nature Educ*. 3 : 16
- Louving N. (2012). Conditionnement et santé respiratoire. In : N. Louving, Nouveau manuel vétérinaire pour propriétaires de chevaux. Paris. Vigot. 244-279.
- Lugo J, Stick JA, Peroni J, Harkema JR, Derksen FJ, Robinson NE. (2002). Safety and efficacy of a technique for thoracoscopically guided pulmonary wedge resection in horses. *Am J Vet Res*. 63 : 1232-1240.
- Lunn DP, Holmes MA, Antczak DF, Agerwal N, Baker J, Bendali-Ahcene S, Blanchard-Channell M, Byrne KM, Cannizzo K, Davis W, Hamilton MJ, Hannant D, Kondo T, Kydd JH, Monier MC, Moore PF, O'Neil T, Schram BR, Sheoran A, Stott JL, Sugiura T, Vagnoni KE. (1998). Report of the Second Equine Leucocyte Antigen Workshop, Squaw valley, California, July 1995. *Vet Immunol Immunopathol*. 62 : 101-143.
- Mac Micking J, Xie QW, Nathan C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*. 15 : 323-350.
- Mair T, Derksen F. (2000). Chronic obstructive pulmonary disease: a review. *Equine Vet Educ*. 12 : 35-44.
- Makinde T, Murphy RF, Agrawal DK. (2007). The regulatory role of TGF-beta in airway remodeling in asthma. *Immunol Cell Biol*. 85 : 348-356.
- Marcos V, Latzin P, Hector A, Sonanini S, Hoffmann F, Lacher M, Koller B, Bufler P, Nicolai T, Hartl D, Griese M. (2010). Expression, regulation and clinical significance of soluble and membrane CD14 receptors in pediatric inflammatory lung diseases. *Respir Res*. 11 : 32.
- Marlin D. (2002). Equine exercise physiology. *Blackwell science*. 296.
- Marlin DJ, Deaton CM. (2007). Pulmonary function testing. In: McGorum BC, Dixon PM, Robinson NE, Schumacher J. *Equine respiratory medicine and surgery*. Saunders. Elsevier. 211-233.
- Marti E, Gerber H, Essich G, Oulehla J, Lazary S. (1991). The genetic basis of equine allergic diseases. 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. *Equine Vet J*. 23 : 457-460.

- Martin-Rosset W. (2012). Nutrition et alimentation des chevaux. Editions Quae. 624p.
- McGorum BC, Dixon PM, Halliwell REW, Irving P. (1993a) Comparison of cellular and molecular components of bronchoalveolar lavage fluid harvested from different segments of the equine lung. *Res Vet Sci.* 55 : 57-59.
- McGorum BC, Dixon PM, Halliwell R. (1993b). Response of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens. *Equine Vet J.* 25 : 261-267.
- McGorum BC, Ellison J, Cullen RT. (1998). Total and respirable airborne dust endotoxin concentrations in three equine management systems. *Equine Vet J.* 30 : 430-434.
- McPherson EA, Lawson GH, Murphy JR, Nicholson JM, Fraser JA, Breeze RG, Pirie HM. (1978). Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of affected horses. *Equine Vet J.* 10 : 47-53.
- Metzger PBC. (1985). Alkadiene and botryococcene producing races of wild strains of *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry.* 24 : 2305-2312.
- Meyts I, Hellings P, Hens G, Vanaudenaerde B, Verbinnen B, Heremans H, Matthys P, Bullens D, Overbergh L, Mathieu C, De Boeck K, Ceuppens J. (2006). IL-12 contributes to allergen-induced airway inflammation in experimental asthma. *J Immunol.* 177 : 6460-6470.
- Michel A. (2011). Mise en place, utilisation et intérêts en pratique itinérante d'un endoscope embarqué chez le cheval. Thèse. Médecine vétérinaire. Créteil. École Nationale Vétérinaire d'Alfort. 78p.
- Mihalache A, Fitting JW. (2014). L'hyperréactivité bronchique et son importance pour le clinicien. *Rev Med Suisse.* 10 : 2190-2195.
- Milenkovic D, Oustry-Vaiman A, Lear TL, Billault A, Mariat D, Piumi F, Schibler L, Cribiu E, Guérin G. (2002). Cytogenetic localization of 136 genes in the horse: comparative mapping with the human genome. *Mamm Genome.* 13 : 524-534.
- Millerick-May M, Karmaus W, Derksen F, Berthold B, Holcombe S, Robinson NE. (2011). Particle mapping in stables at an American Thoroughbred racetrack. *Equine Vet J.* 43 : 599-607.
- Millerick-May M, Karmaus W, Derksen F, Berthold B, Robinson NE. (2015). Airborne particulates (PM10) and tracheal mucus: A case-control study at an American Thoroughbred racetrack. *Equine Vet J.* 47 : 410-414.
- Miskovic M, Couëtill L, Thompson C. (2007). Lung function and airway cytologic profiles in horses with recurrent airway obstruction maintained in low dust. *J Vet Intern Med.* 21 : 1060-1066.
- Montané L, Bourdelle E, Bressou G. (1972). Anatomie régionale des animaux domestiques, équidés, cheval, âne, mulet. Paris. Baillière et Fils. 977p.
- Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, D'Agostino R, Castro M, Curran-Everett D, Fitzpatrick AM, Gaston B, Jarjour NN, Sorkness R, Calhoun W, Chung KF, Comhair SA, Dweik RA, Israel E, Peters SP, Busse WW, Erzurum SC, Bleeker ER. (2010). Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med.* 181 : 315-323.
- Moore-Colyer M. (1996). Effects of soaking hay fodder for horses on dust and mineral content.
- Moran G, Folch H. (2011). Recurrent airway obstruction in horses – an allergic inflammation: a review. *Vet Med-Czech* 56 : 1-13.

- Moore-Colyer M, Lumbis K, Longland A, Harris P. (2014). The effect of five different wetting treatments on the nutrient content and microbial concentration in hay for horses. *PLoS One*. 26 : 9.
- Moore-Colyer M, Taylor J, James R. (2016). The Effect of Steaming and Soaking on the Respirable Particle, Bacteria, Mould, and Nutrient Content in Hay for Horses. *Equine Vet sci*. 39 : 62-68.
- Morishima N, Mizoguchi I, Takeda K, Mizuguchi J, Yoshimoto T. (2009). TGF-beta is necessary for induction of IL-23R and Th17 differentiation by IL-6 and IL-23. *Biochem Biophys Res Commun*. 386 : 105-110.
- Moverare R, Rak S, Elfman L. (1998). Allergen-specific increase in interleukin (IL)-4 and IL-5 secretion from peripheral blood mononuclear cells during birch-pollen immunotherapy. *Allergy*. 53 : 275-281.
- Muñoz-Diaz TT. (2010). Étude des effets secondaires associés à un traitement prolongé de fluticasone inhalée chez les chevaux atteints de souffle (asthme équin). Mémoire de master. Sciences vétérinaires. Montréal. Université de Montréal. 95p.
- Murray P. (2017). Macrophage Polarization. *Annual Review of Physiology*. 79 : 541-566.
- Nair PG. (2012). Safety and efficacy of a CXCR2 antagonist in patients with severe asthma and sputum neutrophils: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Clin Exp Allergy*. 42 : 1097-1103.
- Nakae S, Iikura M, Suto H, Akiba H, Umetsu D, Dekruyff RH, Saito H, Galli SJ. (2007). TIM-1 and TIM-3 enhancement of Th2 cytokine production by mast cells. *Blood*. 110 : 2565-2568.
- Nerren J, Payn S, Halbert N, Martens R, Cohen N. (2009). Cytokine expression by neutrophils of adult horses stimulated with virulent and avirulent *Rhodococcus equi* in vitro. *Vet Immunol Immunopathol*. 127 : 135-143.
- Niedźwiedź A, Borowicz H, Kubiak K, Nicpoń J, Skrzypczak P, Jaworski Z, Cegielski M, Nicpoń J. (2016). Evaluation of serum cytokine levels in recurrent airway obstruction. *Pol J Vet Sci*. 19 : 785-791.
- Nogradi N, Couetil LL, Messick J, Stochelski MA, Burgess JR. (2015). Omega-3 fatty acid supplementation provides an additional benefit to a low-dust diet in the management of horses with chronic lower airway inflammatory disease. *J Vet Intern Med*. 29 : 299-306.
- Odemuyiwa S. (2012). Immunophenotypic Characteristics of Equine Monocytes and Alveolar Macrophages. Thèse. Sciences vétérinaires en pathobiologie. Guelph. Université de Guelph. 106p.
- Ogawa Y, Duru EA, Ameredes BT. (2008). Role of IL-10 in the resolution of airway inflammation. *Curr Mol Med*. 8 : 437-445.
- Olszewski MA, Robinson NE, Zhu FX, Zhang XY, Tithof PK. (1999). Mediators of anaphylaxis but not activated neutrophils augment cholinergic responses of equine small airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 276 : 522-529.
- Orard M, Depecker M, Hue E, Pitel PH, Couroucé-Malblanc A, Richard EA. (2015). Influence of bronchoalveolar lavage volume on cytological profiles and subsequent diagnosis of inflammatory airway disease in horses. *Vet J*. 207 : 193-195.
- Pacholewska A, Jagannathan V, Drögemüller M, Klukowska-Rötzler J, Lanz S, Hamza E, Dermitzakis E, Marti E, Leeb T, Gerber V. (2015). Impaired Cell Cycle Regulation in a Natural Equine Model of Asthma. *PLoS One*. 10.

- Paillot R, Laval F, Audonnet JC, Andreoni C, Juillard V. (2001). Functional and phenotypic characterization of distinct porcine dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Immunology*. 102 : 396-404.
- Paplińska M, Grubek-Jaworska H, Chazan R. (2007). Role of eotaxin in the pathophysiology of asthma. *Pneumonol Alergol Pol*. 75 : 180-185.
- Peng J, Yang XO, Chang SH, Yang J, Dong C. (2010). IL-23 signaling enhances Th2 polarization and regulates allergic airway inflammation. *Cell Res*. 20 : 62-71.
- Peppelenbosch MP, DeSmedt M, Pynaert G, Van Deventer SJ, Grooten J. (2000). Macrophages present pinocytosis exogenous antigen via MHC class I whereas antigen ingested by receptor-mediated endocytosis is presented via MHC class II. *J Immunol*. 165 : 1984-1991.
- Perkins GA, Viel L, Wagner B, Hoffman A, Erb HN, Ainsworth DM. (2008). Histamine bronchoprovocation does not affect bronchoalveolar lavage fluid cytology, gene expression and protein concentrations of IL-4, IL-8 and IFN-gamma. *Vet Immunol Immunopathol*. 126 : 230-235.
- Peroni DG, Piacentini GL, Pietrobelli A, Loiacono A, De Gasperi W, Sabbion A, Micciolo R, Boner AL. (2002). The combination of single-dose montelukast and loratadine on exercise-induced bronchospasm in children. *Respir J*. 20 : 104-107.
- Picandet V, Léguillette R, Lavoie JP. (2003). Comparison of efficacy and tolerability of isoflupredone and dexamethasone in the treatment of horses affected with recurrent airway obstruction ('heaves'). *Equine Vet J*. 35 : 419-424.
- Pirie RS, Dixon PM, Collie DD, McGorum BC. (2001). Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses. *Equine Vet J*. 33 : 311-318.
- Pirie RS, McLachlan G, McGorum BC. (2002a). Evaluation of nebulised hay dust suspensions (HDS) for the diagnosis and investigation of heaves. 1: Preparation and composition of HDS. *Equine Vet J*. 34 : 332-336.
- Pirie RS, Collie DD, Dixon PM, McGorum B. (2002b). Evaluation of nebulised hay dust suspensions (HDS) for the diagnosis and investigation of heaves. 2: Effects of inhaled HDS on control and heaves horses. *Equine Vet J*. 34 : 337-342.
- Pirie RS, Dixon PM, McGorum BC. (2002c). Evaluation of nebulised hay dust suspensions (HDS) for the diagnosis and investigation of heaves. 3: effect of fractionned HDS. *Equine Vet J*. 34 : 343-347.
- Pirie RS, Collie DD, Dixon PM, McGorum BC. (2003a). Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma). *Clin Exp Allergy*. 33 : 676-683.
- Pirie RS, Dixon PM, McGorum BC. (2003b). Endotoxin contamination contributes to the pulmonary inflammatory and functional response to *Aspergillus fumigatus* extract inhalation in heaves horses. *Clin Exp Allergy*. 33 : 1183-1189.
- Pirie, RS. (2014). Recurrent airway obstruction: a review. *Equine Vet J*. 46 : 276-288.
- Prescott HK. (1995). Microbiologie. De Boeck & Larcier. France.
- Racklyeft DL, Love DN. (1990). Influence of head posture on the respiratory tract health of horses. *Aust Vet J*. 67 : 402-405.

- Raidal SL, Bailey GD, Love DN. (1998). The flow cytometric evaluation of phagocytosis by equine peripheral blood neutrophils and pulmonary alveolar macrophages. *Vet J.* 156 : 107-116.
- Rankin S. (2010). The bone marrow: a site of neutrophil clearance. *J Leukoc Biol.* 88 : 241-251.
- Reid CJ, Thompson L, Donnelly S, Deaton CM, Marlin DJ, Carrington SD, Irwin JA. (2009). The activity and expression of chitinase in the equine lung and its activity in normal horses and animals with recurrent airway obstruction. *Res Vet Sci.* 87 : 20-25.
- Relave F, David F, Leclère M, Alexander K, Bussièrès G, Lavoie JP, Marcoux M. (2008). Evaluation of a thoroscopic technique using ligating loops to obtain large lung biopsies in standing healthy and heaves-affected horses. *Vet Surg.* 37 : 232-240.
- Relave F, David F, Leclere M, Alexander K, Hélie P, Meulyzer M, Lavoie JP, Marcoux M. (2010). Thoroscopic lung biopsies in heaves-affected horses using a bipolar tissue sealing system. *Vet Surg.* 39 : 839-846.
- Richard EA, Depecker M, Defontis M, Leleu C, Fortier G, Pitel PH. (2014). Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid from horses with neutrophilic inflammatory airway disease. *J Vet Intern Med.* 28 : 1838-1844.
- Riegel R. (2002). Illustrated atlas of clinical equine anatomy and common disorders of the horse (Vol. 2). Marysville. Equistar publications.
- Riihimäki M, Raine A, Elfma, E, Pringle J. (2008). Markers of respiratory inflammation in horses in relation to seasonal changes in air quality in a conventional racing stable. *Can J Vet Res.* 72 : 432-439.
- Rincon M, Irvin CG. (2012). Role of IL-6 in Asthma and Other Inflammatory Pulmonary Diseases. *Int J Biol Sci.* 8 : 1281-1290.
- Rivière Y, Buseyne F, Scott-Algara D. (2000). Les outils d'exploration de l'activité des lymphocytes T CD8+. *Virologie.* 4.
- Robbe P, Draijer C, Borg TR, Luinge M, Timens W, Wouters IM, Melgert BN, Hylkema MN. (2015). Distinct macrophage phenotypes in allergic and non-allergic lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 308 : 358-367.
- Robinson DS. (2009). Regulatory T cells and asthma. *Clin Exp Allergy.* 39 : 1314-1323.
- Robinson NE, Derksen FJ, Olszewski MA, Buechner-Maxwell VA. (1996). The pathogenesis of obstructive pulmonary disease of horses. *Br Vet J.* 152 : 283-306.
- Robinson NE. (2001). International Workshop on equine chronic airway disease. Michigan State University. *Equine Vet J.* 33 : 5-19.
- Robinson NE, Berney C, Eberhart S, deFeijter-Rupp H, Jefcoat A, Cornelisse C, Gerber V, Derksen F. (2003). Coughing, mucus accumulation, airway obstruction, and airway inflammation in control horses and horses affected with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res.* 64 : 550-557.
- Robinson NE. (2007). How horses breathe : the respiratory muscles and the airways. In : McGorum BC, Dixon PM, Robinson NE, Schumacher J. *Equine respiratory medicine and surgery.* Edinburgh ; New York. Saunders Elsevier. 19-29.

- Rosenthal L, Avila P, Heyman P, Martin R, Miller E, Papadopoulos N, Gern J. (2010). Viral respiratory tract infections and asthma : The course ahead. *J Allergy Clin Immunol.* 125 : 1212-1217.
- Rovina N, Dima E, Bakakos P, Tseliou E, Kontogianni K, Papiris S, Koutsoukou A, Koulouris N, Loukides S. (2015). Low interleukin (IL)-18 levels in sputum supernatants of patients with severe refractory asthma. *Respir Med.* 109 : 580-587.
- Russo C, Polosa R. (2005). TNF- α as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis. *Clinical Science.* 109 : 135-142.
- Rylander R. (2002). Endotoxin in the environment – exposure and effects. *J Endotoxin Res.* 8 : 241-252.
- Samadi S, Wouters IM, Houben R, Jamshidifard AR, Van Eerdenburg F, Heederik DJ. (2009). Exposure to inhalable dust, endotoxins, beta (1-3)- glucans, and airborne microorganisms in horse stables. *Ann Occup Hyg.* 53 : 595-603.
- Sampson A. (2000). The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin Exp Allergy.* 30 : 22-27.
- Sanders N, Mishra A. (2016). Role of interleukin-18 in the pathophysiology of allergic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 32 : 31-39.
- Saradna A, Do D, Kumar S, Fu Q, Gao P. (2018). Macrophage polarization and allergic asthma. *Transl Res.* 191 : 1-92.
- Schlam D, Canton J, Carreño M, Kopinski H, Freeman SA, Grinstein S, Fairn GD. (2016). Gliotoxin Suppresses Macrophage Immune Function by Subverting Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Homeostasis. *MBio.* 7.
- Schleich F, Chevremont A, Paulus V, Henket M, Manise M, Seidel L, Louis R. (2014). Importance of concomitant local and systemic eosinophilia in uncontrolled asthma. *Respir J.* 44 : 97-108.
- Schmallenbach KR, Sasse H, Dixon PH, Miller H. (1998). Studies on pulmonary and systemic *Aspergillus fumigatus*-specific IgE and IgG antibodies in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Vet Immunol Immunopathol.* 66 : 245-256.
- Schnabel CL, Wagner S, Wagner B, Durán MC, Babasyan S, Nolte I, Pfarrer C, Feige K, Murua Escobar H, Cavalleri JM. (2013). Evaluation of the reactivity of commercially available monoclonal antibodies with equine cytokines. *Vet Immunol Immunopathol.* 156 : 1-19.
- Schnider D, Rieder S, Leeb T, Gerber V, Neuditschko M. (2017). A genome-wide association study for equine recurrent airway obstruction in European Warmblood horses reveals a suggestive new quantitative trait locus on chromosome 13. *Animal Genetics.* 48 : 691-693.
- Seahorn T, Beadle R. (1993). Summer pasture-associated obstructive pulmonary disease in horses: 21 cases (1983-1991). *J Am Vet Med Assoc.* 202 : 779-782.
- Sevestre J, Rosier N. (1983). L'appareil respiratoire et la respiration. In : Le cheval. Paris. Larousse. 50-51.
- Siegers E, Anthonisse M, van Eerdenburg F, van den Broek J, Wouters I, Westermann C. (2018). Effect of ionization, bedding, and feeding on air quality in a horse stable. *J Vet Intern Med.* 32 : 1234-1240.

- Song C, Luo L, Lei Z, Li B, Liang Z, Liu G, Li D, Zhang G, Huang B, Feng Z. (2008). IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. *J Immunol.* 181 : 6117-6124.
- Sosroseno W, Barid I, Herminajeng E, Susilowati H. (2002). Nitric oxide production by a murine macrophage cell line (RAW264.7) stimulated with lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol.* 17 : 72-78.
- Spina D. (1998). Epithelium smooth muscle regulation and interactions. *Am J Respir Crit Care Med.* 158 : 141-145.
- Stockdale C, Moore-Colyer MJS. (2010). Steaming hay for horses: The effect of three different treatments on the respirable particle numbers in hay treated in the Haygain steamer. European Workshop for Equine Nutrition, Cirencester, Sept 2010. The Impact of nutrition on the health and welfare of horses. EAAP publication No. 128. Ed Ellis A, Longland AC, Coenen MandMiraglia N. 136–138.
- Suarez CJ, Parker NJ, Finn PW. (2008). Innate immune mechanism in allergic asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 8 : 451-459.
- Sun J, Ning D, Cai W, Zhou H, Zhang H, Guan D, Wu D. (2017). Evaluation of a real-time impedance analysis platform on fungal infection. *J Microbiol Methods.* 136 : 88-93.
- Swanson JA, Watts C. (1995). Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 5 : 424-428.
- Swinburne J, Bogle H, Klukowska-Rötzler J, Drögemüller M, Leeb T, Temperton E, Gerber V. (2009). A whole-genom scan for recurrent airway obstruction in Warmblood sport horses indicates two positional candidate regions. *Mammalian genom.* 20 : 504-515.
- Tang C, Inman MD, van Rooijen N, Yang P, Shen H, Matsumoto K, O'Byrne PM. (2001). Th type 1-stimulating activity of lung macrophages inhibits Th2-mediated allergic airway inflammation by an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol.* 166 : 1471-1481.
- Tesarowski DB, Viel L, McDonnell WN. (1996). Pulmonary function measurements during repeated environmental challenge of horses with recurrent airway obstruction (heaves). *Am J Vet Res.* 57 : 1214-1219.
- Thompson J, McPherson E. (1984). Effects of environmental control on pulmonary function of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. *Equine Vet J.* 16 : 35-38.
- Tizard I. (2013). Immune Complexes and type III hypersensitivity. In: I. Tizard, *Veterinary Immunology*. St Louis, Elsevier, Saunders. 356-361.
- Toussirot E. (2012). The IL23/Th17 pathway as a therapeutic target in chronic inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 11 : 159-168.
- Trapnell BC, Whitsett JA. (2002). Gm-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense. *Annu Rev Physiol.* 64 : 775-802.
- Tsunawaki S, Yoshida LS, Nishida S, Kobayashi T, Shimoyama T. (2004). Fungal metabolite gliotoxin inhibits assembly of the human respiratory burst NADPH oxidase. *Infect Immun.* 72 : 3373-3382.
- Van den Hoven R, Zappe H, Zitterl-Eglseer K, Jugl M, Franz C. (2003). Study of the effect of Bronchipret on the lung function of five Austrian saddle horses suffering recurrent airway obstruction (heaves). *Vet Rec.* 152 : 555-557.

- Van Erck E, Votion D, Art T, Lekeux P. (2006). Qualitative and quantitative evaluation of equine respiratory mechanics by impulse oscillometry. *Equine Vet J.* 38 : 52-58.
- Van Furth R, Cohn ZA. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med.* 128 : 415-435.
- Vandenput S, Istasse L, Nicks B, Lekeux P. (1997). Airborne dust and aeroallergen concentrations in different sources of feed and bedding for horses. *Vet Q.* 19 : 154-158.
- Vandenput S, Duvivier DH, Votion D, Art T, Lekeux P. (1998). Environmental control to maintain stable COPD horses in clinical remission: effects on pulmonary function. *Equine Vet J.* 30 : 93-96.
- Verstraelen S, Bloemen K, Nelissen I, Witters H, Schoeters G, Van den Heuvel R. (2008). Cell types involved in allergic asthma and their use in in vitro models to assess respiratory sensitization. *Toxicol In Vitro.* 22 : 1419-1431.
- Viel L. (2003). Significance of bronchoalveolar cytology in inflammatory airway disease of horses. *Havemeyer Foundation Monograph.* 9 : 52-54.
- Vignery A. (2005). La fusion des macrophages : partenaires des cellules somatiques et cancéreuses ?. *Médecines sciences.* 21.
- Vincent JH. (2005). Health-related aerosol measurement : a review of existing sampling criteria and proposals for new ones. *J Environ Monit.* 7 : 1037-1053.
- Wagner B. (2009). IgE in horses: occurrence in health and disease. *Vet Immunol Immunopathol.* 132 : 21-30.
- Waldschmidt I, Pirottin D, Art T, Audigié F, Bureau F, Tosi I, El Abbas S, Farnir F, Richard E, Dupuis M. (2013). Experimental model of equine alveolar macrophage stimulation with TLR ligands. *Vet Immunol Immunopathol.* 155 : 30-37.
- Wälinder R, Riihimäki M, Bohlin S, Hogstedt C, Nordquist T, Raine A, Elfman L. (2011). Installation of mechanical ventilation in a horse stable: effects on air quality and human and equine airways. *Environ Health Prev Med.* 16 : 264-272.
- Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. (1999). Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol.* 17 : 331-367.
- Ward M, Couetil LL. (2005). Climatic and aeroallergen risk factors for chronic obstructive pulmonary disease in horses. *Am J Vet Res.* 66 : 818-824.
- Wasko AJ, Barkema HW, Nicol J, Fernandez N, Logie N, Léguillette R. (2011). Evaluation of a risk-screening questionnaire to detect equine lung inflammation. *Equine Vet J.* 43 : 145-152.
- Webster A, Clarke A, Madelin T, Wathes C. (1987). Air hygiene in stables 1: Effects of stable design, ventilation and management on the concentration of respirable dust. *Equine Vet J.* 19 : 448-453.
- Wenzel S. (2012). Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med.* 18 : 716-725.
- Werner SL, Kearns JD, Zadorozhnaya V, Lynch C, O'Dea E, Boldin MP, Ma A, Baltimore D, Hoffmann A. (2008). Encoding NF-kappaB temporal control in response to TNF: distinct roles for the negative regulators IkkappaBalpha and A20. *Genes Dev.* 22 : 2093-2101.

- Westphalen K, Gusarova G, Islam M, Subramanian M, Cohen T, Prince A. (2014). Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity. *Nature*. 506 : 503-506.
- Whittaker A, Hughes K, Parkin T, Love S. (2009). Concentrations of dust and endotoxin in equine stabling. *Vet Rec*. 165 : 293-295.
- Wilson M. (2014). Characterization of equine alveolar macrophages phenotypes in recurrent airway obstruction. Thèse. Médecine comparative et biologie intégrative comparative. Michigan. Université de Michigan. 133p.
- Winder NC, von Fellenberg R. (1987). Chronic small airway disease in horses slaughtered in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 129 : 585-593.
- Wolny-Koładka K. (2018). Microbiological quality of air in free-range and box-stall stable horse keeping systems. *Environ Monit Assess*. 190 : 269.
- Wood J, Newton J, Chanter N, Mumford J. (2005). Association between Respiratory Disease and Bacterial and Viral Infections in British Racehorses. *J Clin Microbiol*. 43 : 120-126.
- Woods D, Robinson N, Swanson M, Reed CE, Broadstone RV, Derksen FJ. (1993). Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different management systems. *Equine Vet J*. 25 : 208-213.
- Xu X, Xu JF, Zheng G, Lu HW, Duan JL, Rui W, Guan JH, Cheng LQ, Yang DD, Wang MC, Lv QZ, Li JX, Zhao X, Chen CX, Shi P, Jia XM, Lin X. (2018). CARD9S12N facilitates the production of IL-5 by alveolar macrophages for the induction of type 2 immune responses. *Nat Immunol*. 19 : 547-560.
- Yang J, Liao D, Chen C, Liu Chuang T, Xiang R, Markowitz D, Luo Y. (2013). Tumor-associated macrophages regulate murine breast cancer stem cells through a novel paracrine EGFR/Stat3/Sox-2 signaling pathway. *Stem Cells*. 31 : 248-258.
- Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, Strauss-Ayali D, Viukov S, Guilliams M, Misharin A, Hume DA, Perlman H, Malissen B, Zelzer E, Jung S. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*. 38 : 79-91.
- Yoon H, Ansong C, Adkins J, Heffron F. (2011). Discovery of Salmonella virulence factors translocated via outer membrane vesicles to murine macrophages. *Infect Immun*. 79 : 2182-2192.
- Young R, Bush S, Lefevre L, McCulloch M, Lisowski Z, Muriuki C, Kristin A, Sauter C. (2018). Species-Specific Transcriptional Regulation of Genes Involved in Nitric Oxide Production and Arginine Metabolism in Macrophages. *ImmunoHorizons*. 2 : 27-37.
- Yu M, Chen Z, Guo W, Wang J, Feng Y, Kong X, Hong Z. (2015). Specifically targeted delivery of protein to phagocytic macrophages. *Int J Nanomedicine*. 10 : 1743-1757.
- Yue H, Wei W, Yue Z, Lv P, Wang L, Ma G, Su Z. (2010). Particle size affects the cellular response in macrophages. *Eur J Pharm Sci*. 41 : 650-657.
- Zaslona Z, Przybranowski S, Wilke C, Van Rooijen N, Teitz-Tennenbouem S, Osterholzer JJ, Wilkinson JE, Moore BB, Peters-Golden M. (2014). Resident Alveolar Macrophages Suppress, whereas Recruited Monocytes Promote, Allergic Lung Inflammation in Murine Models of Asthma. *J Immunol*. 193 : 4245-4253.

Zhang J, Wang L, Xi L, Huang H, Hu Y, Li X, Huang X, Lu S, Sun J. (2013). Melanin in a Meristematic Mutant of *Fonsecaea monophora* inhibits the Production of Nitric Oxide and Th1 Cytokines of Murine Macrophages. *Mycopathol.* 175 : 515–522.

Zhou D, Yang K, Chen L, Zhang W, Xu Z, Zuo J, Jiang H, Luan J. (2017). Promising landscape for regulating macrophage polarization: epigenetic viewpoint. *Oncotarget.* 8 : 57693-57706.

Zock JP, Hollander A, Heederik D, Douwes J. (1998). Acute lung function changes and low endotoxin exposures in the potato processing industry. *Am J Ind Med.* 33 : 384-391.

Zucca E, Corsini E, Galbiati V, Lange-Consiglio A, Ferrucci F. (2016). Evaluation of amniotic mesenchymal cell derivatives on cytokine production in equine alveolar macrophages: an in vitro approach to lung inflammation. *Stem Cell Res Ther.* 7.

Ressources électroniques :

Audevard. (2016). Comment fonctionne l'appareil respiratoire de votre cheval ? [en ligne]. Disponible sur : <<http://www.audevard.com/fr/news/comment-fonctionne-lappareil-respiratoire-de-votre-cheval.html>>, consulté le 26 aout 2018.

Biobanque de Tissus Respiratoires Equins-BTRE. (2015). Bienvenue sur le site de la Biobanque de Tissus Respiratoires Équins. [en ligne]. Disponible sur : <<http://www.ertb.ca/>>, consulté le 26 mars 2018.

Fontan, J. (2018). Les particules polluantes de l'air : de quoi s'agit-il ? [en ligne]. Disponible sur : <<http://www.encyclopedie-environnement.org/air/particules-polluantes-air/>>, consulté le 2 octobre 2018.

Galopin. (1997). Les narines ou naseaux, les cavités nasales, les sinus. [en ligne]. Disponible sur : <<http://www.galopin-fr.net/respi/naseaux.htm>>, consulté le 26 aout 2018.

Global initiative for asthma-GINA. (2018). GINA Report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention. [en ligne]. Disponible sur : <<https://ginasthma.org/2018-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>>, consulté le 5 juin 2018.

IFE. Les granulocytes. In : Institut Français de l'éducation- Plateforme acces. <<http://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/immunité-et-vaccination/thematiques/cellules-immunes-et-organes-lymphoïdes/fiches-cellules-immunitaires/les-granulocytes>>, consulté le 10 octobre 2018.

L'asthme de A à E. (2013). Le contrôle du muscle lisse bronchique. [en ligne]. Disponible sur : <<http://tout-sur-l-asthme.blogspot.com/p/controle.html>>, consulté le 24 juillet 2018.

Mandal M. (2018). Fonctionnement de macrophage. [en ligne]. Disponible sur : <[https://www.news-medical.net/life-sciences/Macrophage-Function-\(French\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Macrophage-Function-(French).aspx)>, consulté le 3 septembre 2018.

Pavic M, Gérome P. (2013). Hématologie. [en ligne]. Disponible sur : <http://campus.cerimes.fr/semiologie/enseignement/esemio5/site/html/5_2.html>, consulté le 10 octobre 2018.

Phea. À propos de l'asthme. [en ligne]. Disponible sur : <<http://www.attentivasthme.ca/propos-de-lasthme>>, consulté le 2 octobre 2018.

Réseau Nationale de surveillance aérobiologique-RNSA. (2007). Les pollens. [en ligne]. Disponible sur : <<http://www.pollens.fr/le-reseau/les-pollens.php>>, consulté le 20 octobre 2018.

Saute C. (2018). Les poumons des chevaux sont fragiles [en ligne]. Disponible sur : <<https://blog.equisense.com/appareil-respiratoire-cheval/>>, consulté le 15 mars 2018.

Tempest. (2015). Si ton cheval fait une hémorragie pulmonaire: Causes et remèdes [en ligne]. Disponible sur : < <https://tempestitalia.com/fr/veterinaire/si-ton-cheval-fait-hemorragie-pulmonaire-causes-et-remedes/> >, consulté le 26 aout 2018.

WikimediaCommons. (2017). File : horse lung. [en ligne]. Disponible sur : <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Horse_lung.ogv#filehistory>, consulté le 3 septembre 2018.

World Health Organization-WHO. (2018). Chronic respiratory diseases [en ligne]. Disponible sur : <<http://www.who.int/respiratory/asthma/en/>>, consulté le 22 octobre 2018.

Annexe 1 : Grille d'évaluation de la santé respiratoire des chevaux**Fiche suivi du cheval durant le challenge**

Groupe : AES CTL
Challenge : Foin sec Foin purifié

Caractéristiques générales

Nom : Age :
Race : Sexe :
NEC : Vaccination :

Date dernière vermifugation :

Participe aux prélèvements de poussières respirables et inhalables : Oui Non

Prélèvement J - 2 :

Fréquence cardiaque : N° dossier :
Fréquence respiratoire :
Température :
NEC :

Observations durant le LBA

(toux, mucus, dyspnée ...)

Quantité de LBA récupérée

- Poumon droit :

- Poumon gauche :

Prélèvement J + 6 :

Fréquence cardiaque : N° dossier :
Fréquence respiratoire :
Température :
NEC :

Observations durant le LBA

(toux, mucus, dyspnée ...)

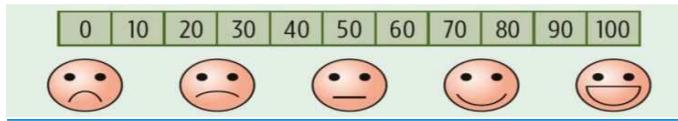
Quantité de LBA récupérée

- Poumon droit :

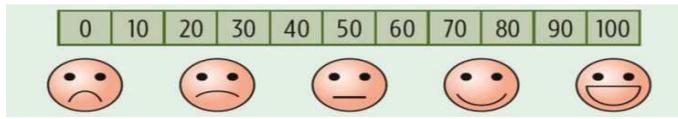
- Poumon gauche :

Observations durant le challenge:

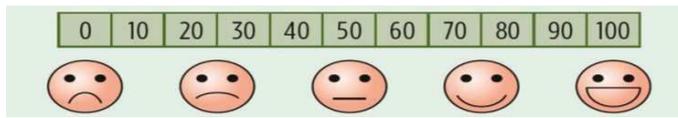
Jour 1 :



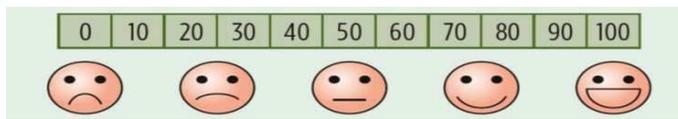
Jour 2 :



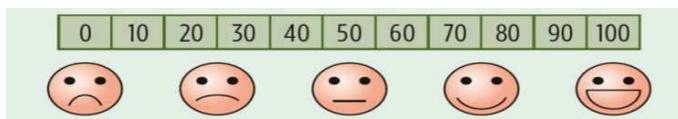
Jour 3 :



Jour 4 :



Jour 5 :



Annexe 2 : Fiche suivi des chevaux au cours du challenge

PATIENT'S STICKER or Owner's name / Horse's name Breed / Gender / Color DOB

DATE:

CLINICIAN:

BODY WEIGHT:

HEIGHT:

A) Clinical scoring system (adapted from Tesarowski, 1996)

Circle the score that applies to the horse

Variable	Descriptor	Score
Respiratory rate (breaths/min)	< 15	0
	16-20	1
	21-25	2
	26-29	3
	>30	4
Nasal discharge	None	0
	Serous	1
	Mucopurulent	3
Abdominal lift	None	0
	Mild (perceptible heave line)	1
	Pronounced (abdomen, thorax, and anal movement)	3
Nasal flaring	None	0
	Present	1
Tracheal sounds	Normal (tubular sound)	0
	Increase in intensity	1
	Mucus movement	3
Crackles	None	0
	Present	2
Wheezes	None	0
	Present	2
Cough	None	0
	Intermittent	1
	Paroxysmal	3
Total		/21

Annexe 3 : Article 1 (publié)

The influence of hay steaming on clinical signs and airway immune response in severe asthmatic horses.

Marie Orard, Erika Hue, Anne Couroucé, Céline Bizon-Mercier, Marie-Pierre Toquet, Meriel Moore-Colyer, Laurent Couëtil, Stéphane Pronost, Romain Paillot, Magali Demoor, Eric A. Richard.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



The influence of hay steaming on clinical signs and airway immune response in severe asthmatic horses

Marie Orard^{1,2}, Erika Hue^{1,2}, Anne Couroucé³, Céline Bizon-Mercier³, Marie-Pierre Toquet^{1,2}, Meriel Moore-Colyer⁴, Laurent Couëtil⁵, Stéphane Pronost^{1,2}, Romain Paillot^{1,2}, Magali Demoor² and Eric A. Richard^{1,2*} 

Abstract

Background: Avoidance of antigenic stimuli was found to significantly reverse airway obstruction of horses with severe equine asthma (sEA). To date, no published study investigated the influence of steaming hay on lower airway condition of sEA-affected horses. The objectives were to determine the clinical, cytological and cytokine respiratory responses of both sEA and control (CTL) horses experimentally exposed to steamed or dry hay.

Results: A cohort of 6 sEA horses and 6 CTL horses was involved in this field study. On day 0, both groups were fed with steamed hay for 5 consecutive days, followed by a wash-out period of 26 days prior to be fed with dry hay for 5 consecutive days. Investigations performed 2 days prior to and 5 days after each challenge included clinical score, tracheal mucus accumulation, and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology and cytokine mRNA expression. Feeding steamed hay significantly decreased its mould content ($P < 0.001$). Mucus score significantly increased when feeding dry hay ($P = 0.01$). No significant influence of challenge type was found on clinical score. Percentages of neutrophils ($P < 0.001$) as well as mRNA expression of IL-1 β ($P = 0.024$), IL-6R ($P = 0.021$), IL-18 ($P = 0.009$) and IL-23 ($P = 0.036$) in BALF of sEA affected horses were significantly increased after both (steamed and dry hay) challenges. Relative mRNA expression of IL-1 β , IL-6R and IL-23 in BALF were also significantly correlated to neutrophil percentages and both clinical and tracheal mucus score.

Conclusions: Steaming significantly decreased mould content but inconsistently influenced the respiratory response of sEA affected horses when fed hay. Based on BALF cytology and cytokine profiles, its relevance might be controversial as a non-medical therapy for sEA-affected horses.

Keywords: Equine asthma, Hay steaming, Inflammation, Cytology, Cytokines

Background

Severe equine asthma (sEA; previously known as recurrent airway obstruction) is a chronic disease of adult horses characterised by frequent coughing and increased respiratory effort at rest, as well as marked lower airway inflammation and reversible airway obstruction [1]. While neutrophils involvement in the pathophysiology of this disease is well defined, controversies still persist in terms of T-helper (Th)-1 and/or Th-2 polarisation, as determined by cytokines mRNA expression in BALF-derived

cells [2, 3]. Involvement of Th-17 pathway [4, 5] and regulatory T cells (Treg; [6]) have also been suggested. Exposure to airborne environmental antigens is central in both initiation and maintenance of the disease, especially through stabling and exposure to hay and straw [7]. Feeding mouldy hay indeed represents a long-established model for sEA exacerbation in susceptible horses [2], and also allows differentiation from mild/moderate equine asthma (mEA; previously known as inflammatory airway disease) [3]. Inhalation challenges with aqueous mould extracts were previously found to induce neutrophilic inflammation in sEA affected horses but not in controls [8]. Results from experimental exposure of sEA affected

* Correspondence: eric.richard@laboratoire-labeo.fr

¹LABÉO Frank Duncombe, Caen, France

²Normandie Université, UniCaen, BIOTARGEN, Caen, France

Full list of author information is available at the end of the article



horses to hay dust suspensions highlighted the synergistic effect of endotoxins and other dust components [9].

Environmental change, especially pasture turnout, with or without anti-inflammatory medication was found to significantly reverse airway obstruction of sEA affected horses [10]. On the other hand, corticosteroid therapy while maintaining the horse in a dusty environment leads to improved clinical signs and lung function but persistent airway inflammation [11, 12]. Feeding haylage and bedding wood shavings have been associated with significantly lower levels of both respirable dust (< 5 µm diameter) and endotoxins, within the horse's breathing zone, when compared to hay/straw environment [13, 14]. Alternatively, soaking and high-temperature steaming of hay for 16 h and 50 min respectively, significantly reduced respirable particles exposure; however endotoxin levels were not investigated [15, 16]. Steaming was also found to be effective at reducing mould content in hay, unlike soaking hay for 9 h [17]. Steaming hay indeed aims to reach and uniformly diffuse a temperature of 100 °C within the hay bale. To date, there is no published study that has investigated the potential influence of steaming hay on lower airway inflammation of sEA-affected horses.

The aim of the study was to determine clinical, cytological and cytokine respiratory responses of both sEA and control (CTL) horses experimentally exposed to steamed or dry hay. Our hypothesis was that feeding sEA affected horses with dry hay will result in higher respirable dust exposure, airway inflammation and clinical signs, as compared to feeding high-temperature steamed hay. Steaming hay indeed significantly decreased mould content but inconsistently influenced the respiratory response of sEA-affected horses. Both cytological and cytokine profiles actually revealed a significant airway inflammation when feeding hay (steamed or not).

Results

One sEA horse exhibited fever during the wash-out period and was subsequently excluded from the study. In the end, 5 sEA horses and 6 CTL horses completed both challenges (Additional file 1).

Hay and air sampling

Both bacterial and mould content were significantly lower ($P < 0.001$) in steamed hay ($195\ 280 \pm 465\ 270$ and $1\ 507 \pm 1\ 864$ CFU/g, respectively), when compared to dry hay ($4\ 042\ 000 \pm 6\ 748\ 619$ and $118\ 150 \pm 187\ 624$ CFU/g, respectively; Additional file 2). *Aspergillus* family (principally *A. glaucus* and *A. nidulens*) was identified in 9/10 samples of dry hay and 10/10 samples of steamed hay; *Aspergillus fumigatus* has been identified in one sample of dry hay only. Similarly, *Penicillium* spp. was identified in 3/10 samples of dry hay and 1/10 samples of steamed hay. Concentrations of respirable dust

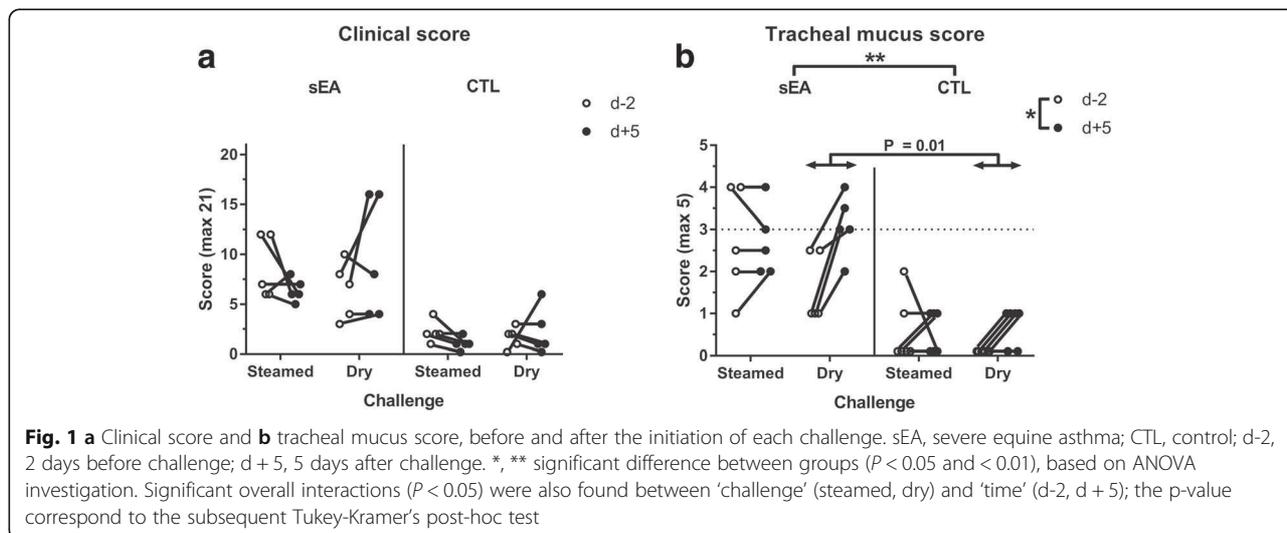
collected within the breathing zones (CTL and sEA horse) were 0.0015 and 0.0034 mg/m³, respectively, during challenge #1 (steamed hay) vs. 0.0024 and 0.0057 mg/m³ during challenge #2 (dry hay). Similarly, the inhalable fractions collected were 0.0045 and 0.0082 mg/m³, respectively, during challenge #1 vs. 0.31 and 0.26 mg/m³ during challenge #2. Endotoxin activities from respirable fraction were 0.08 and 0.98 EU/mL, respectively, during challenge #1, vs. 2.19 and 3.88 EU/mL during challenge #2. Levels of β-D-glucan were 340 and 1067 pg/mL, respectively, during challenge #1, vs. 895 and 2367 pg/mL during challenge #2.

Clinical score and tracheal mucus

Overall, the mean clinical scores were not significantly different between sEA and CTL horses ('disease status'; $P = 0.071$) and no significant influence on clinical scores was found for either 'challenge' or 'time' (Fig. 1), controlling for age. A significant interaction ($P = 0.049$) was found for clinical score between 'challenge' (steamed vs. dry hay) and 'time' (d + 5 vs. d - 2); the post-hoc tests were however not significant for any further comparison. Mean mucus score was significantly higher ($P = 0.005$) for sEA horses when compared to CTL horses and overall significantly higher ($P = 0.024$) at d + 5 when compared to d - 2 (Fig. 1). A significant interaction ($P = 0.022$) was also found for tracheal mucus between 'challenge' and 'time'; the score being significantly higher for dry hay at d + 5 when compared to d - 2 ($P = 0.01$), but not significantly different between d + 5 and d - 2 for steamed hay ($P = 0.98$).

BALF cytology

After controlling for age, no significant influence on the proportions of BALF volume recovered was found for either 'challenge', 'time' or 'disease status', nor any interaction between categories. Total cell counts were overall significantly higher ($P = 0.037$) for sEA compared to CTL horses (Additional file 3). The mean percentage of BALF neutrophils was significantly higher ($P = 0.011$) for sEA horses when compared to CTL horses and was overall significantly higher ($P < 0.001$) at d + 5 when compared to d - 2 (Fig. 2), while no significant interaction was found between 'challenge' and 'time' ($P = 0.197$). The mean percentage of BALF lymphocytes was significantly lower ($P = 0.001$) at d + 5 when compared to d - 2. A significant interaction ($P = 0.009$) was found between 'disease status' and 'time' for the percentage of BALF macrophages; the post-hoc tests being however not significant. The mean percentage of BALF metachromatic cells were significantly lower ($P = 0.001$) for sEA horses when compared to CTL horses (Additional file 3). No overall influence of the 'challenge' type (steamed vs. dry hay), or any interaction between 'challenge' and either



‘time’ or ‘disease status’ was found for any of the investigated cytological parameters.

BALF cytokines

After controlling for age, mean mRNA expression was significantly lower for IL-4 ($P = 0.022$) and significantly higher for IL-17 ($P < 0.001$) and TNF- α ($P = 0.006$) in BALF of sEA affected horses, when compared to CTL horses (Fig. 3). Overall mRNA expression of IL-10 was significantly higher ($P < 0.001$) at d + 5 when compared to d-2, irrespective of the horse disease status (Fig. 3). Significant interactions were found between ‘disease status’ and ‘time’ (higher at d + 5 than d-2 for sEA horses only) for relative mRNA expression of IL-1 β ($P = 0.024$),

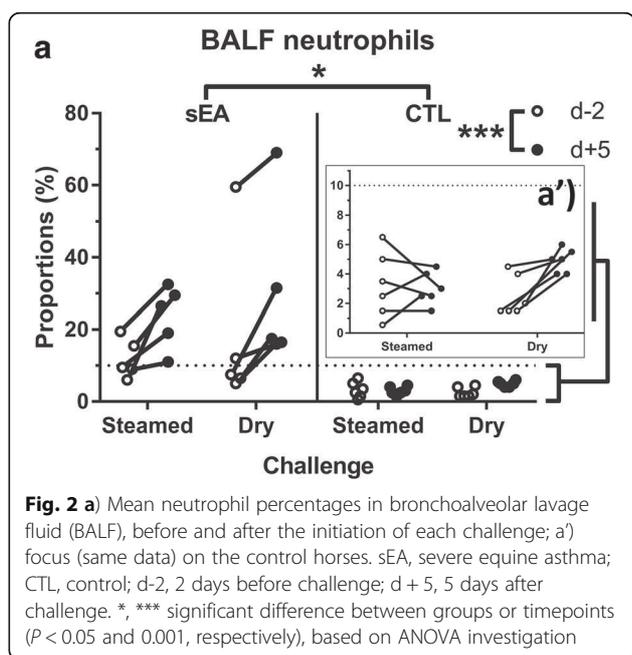
IL-6R ($P = 0.021$), IL-18 ($P = 0.009$) and IL-23 ($P = 0.036$) in BALF (Fig. 4). No significant variation was found throughout challenges for relative mRNA expression of IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IFN- γ and TGF- β (Additional file 4). No overall influence of the ‘challenge’ type (steamed vs. dry hay), or any interaction between ‘challenge’ and either ‘time’ or ‘disease status’ was found for any cytokine relative expression in BALF.

Correlations

Relative mRNA expression of IL-1 β , IL-6R, IL-8, IL-10 and IL-23 were significantly associated with BALF neutrophil percentages of sEA affected horses (Fig. 5), and mRNA expression of IL-1 β , IL-6R, IL-8, IL-13, IL-23 and TGF- β in BALF were also significantly correlated with tracheal mucus score (Additional file 5). Relative mRNA expression of IL-6R was negatively correlated with the percentage of macrophages in BALF of sEA affected horses, and IL-4 was significantly correlated with metachromatic cell percentages (Additional file 5).

Discussion

This is, to our knowledge, the first study in which the inflammatory and immune airway responses of both sEA and CTL horses have been investigated through a controlled exposition challenge with steamed and dry hay. Horses with sEA had been on pasture for at least 6 weeks prior to the challenge initiation. Unsurprisingly and due to the persistent nature of this syndrome, some level of clinical and/or cytological abnormalities at the time of enrolment was observed for 2 out of the 5 sEA-affected horses. Interestingly, the initial clinical scores were indeed 12/21 for both horses, and decreased to 6/21 at the end of the first exposure period (to steamed hay). Despite a significant interaction between ‘challenge’ (steamed vs. dry hay) and ‘time’ (d + 5 vs.



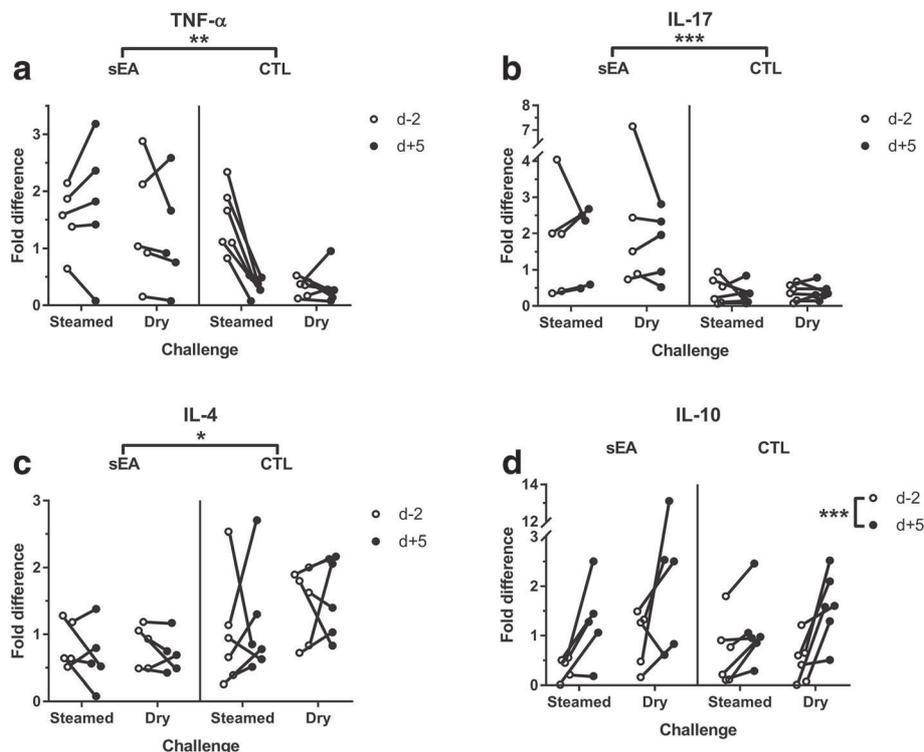


Fig. 3 Relative mRNA expression of cytokines in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), before and after the initiation of each challenge: **a** tumour necrosis factor (TNF)- α ; **b** interleukin (IL)-17; **c** IL-4; **d** IL-10. sEA, severe equine asthma; CTL, control; d-2, 2 days before challenge; d+5, 5 days after challenge. *, **, *** significant difference between groups or timepoints ($P < 0.05$, 0.01 and 0.001, respectively), based on ANOVA investigation

d-2), the individual variability of clinical scores may have confounded the results. However, 4 out of the 5 sEA horses showed significantly ($P = 0.01$) elevated tracheal mucus score (≥ 3) after being fed dry hay, while the score remained < 3 for a majority of them (3 out of 5) after being fed steamed hay.

Percentages of neutrophils in BALF were overall higher at d+5 when compared to d-2, irrespective of 'challenge' (steamed and dry hay) and 'disease status' (sEA and CTL). Induction of a significant neutrophilic airway inflammation has been previously reported in CTL horses through environmental challenges [18, 19]. In the present study, all BALF neutrophil percentages measured from CTL horses systematically remained $< 10\%$, while the same "good quality" (non-mouldy) hay was used in both challenges. Steaming hay significantly decreased mould content by a hundred fold, as previously described [17]. The mould content in hay was investigated in the present study by mycological culture only; the presence of spores, antigenic fragments or mycotoxins has not been evaluated. Targeted and non-targeted methodologies, such as qPCR and MALDI-ToF mass spectrometry, respectively, would considerably increase both the sensitivity and broadness of aeroallergen detection.

Based on the inflammatory responses measured after both challenges, it might be hypothesised that other non-evaluated stimuli might still be present within the hay even after steaming (e.g. mould and bacterial wall fragments). Horses were kept in paddocks during exposure periods, in order to avoid the influence of environmental confinement [20] and associated management of stables ventilation. Alternatively, steaming hay may not have been sufficient to prevent the synergistic inflammatory activity of various hay dust components, especially including endotoxins, which has previously been demonstrated experimentally [9]. When considering air sampling within the breathing zone during the present study, the inhalable fraction was 100 times lower when feeding steamed hay compared to dry hay. The influence of steaming hay on the respirable particles was however more limited in the current study, while this fraction was found to be significantly associated with lower airway inflammation of horses [21]. Respirable dust, endotoxin and β -D-glucan levels may also have been affected by individual horse's behaviour when eating hay, as previously demonstrated for particulate concentrations [22]. The mean values measured for endotoxin activities within the breathing zones were 5.7 times lower with steamed hay, when compared to dry hay,

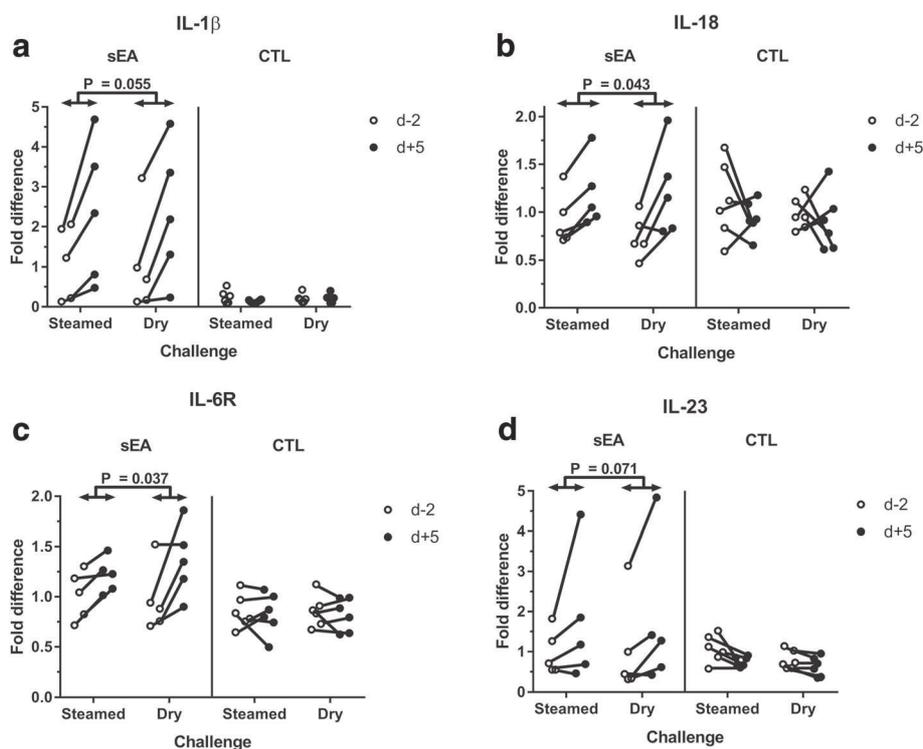


Fig. 4 Relative mRNA expression of cytokines in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), before and after the initiation of each challenge: **a** interleukin (IL)-1 β ; **b** IL-18; **c** IL-6R; **d** IL-23. sEA, severe equine asthma; CTL, control; d-2, 2 days before challenge; d + 5, 5 days after challenge. Significant overall interactions ($P < 0.05$) were found between 'disease status' (sEA, CTL) and 'time' (d-2, d + 5); the p-values correspond to the subsequent Tukey-Kramer's post-hoc tests

while a large variability was observed among horses. Interestingly, values for endotoxin activities within the breathing zone when feeding steamed hay were also comparable with previously published data for haylage/wood shavings combination [14].

No significant influence of the 'challenge' type (steamed vs. dry hay) was found for any cytokine mRNA expression in BALF. Significant interactions were found between 'disease status' (sEA vs. CTL) and 'time' (d + 5 vs. d-2) for mRNA expression of IL-1 β and IL-18; relative mRNA expression of TNF- α was also significantly higher in BALF from sEA affected horses, when compared with CTL horses. Such observations are coherent with the measurable inflammatory response of sEA affected horses to both (steamed and dry) hay challenges. Interestingly, mRNA expression of IL-6R in BALF was also increased post-challenges for sEA affected horses only. To date, the relative expression of this receptor has not been investigated in BALF of horses. Interestingly, a genome-wide association study identified a significant association between a single nucleotide polymorphism in the IL-6R gene and the risk of asthma in humans [23]. Further investigations are warranted to characterize the IL-6 signaling pathway involvement in equine asthma, especially in terms of

subsequent T-helper (Th) polarisation as recently demonstrated in humans [24].

The previously suggested involvement of Th17 pathway in the airways of horses with severe asthma [4, 5], is supported by the present study. Overall IL-17 mRNA expression was indeed significantly higher in BALF of sEA affected horses when compared with CTL horses. The IL-23 mRNA expression in BALF was also increased post-challenges for sEA affected horses only, and was furthermore significantly correlated with both tracheal mucus score and BALF neutrophil percentages. Surprisingly, IL-8 mRNA expression was neither significantly different among groups ($P = 0.11$; controlling for age of the horses) nor significantly influenced by the challenge types. However, a significant correlation ($R = 0.688$) was found with neutrophil percentages in BALF. While overexpression has been associated with sEA chronicity [4, 5], it is likely that IL-8 contributes to neutrophil chemotaxis in the earlier stages of equine asthma [2]. The short duration of each challenge period in the current study might partly explain the limited amplitude of IL-8 mRNA expression in BALF.

The lower mRNA expression of IL-4 in BALF of sEA versus CTL horses was unexpected, mainly based on the

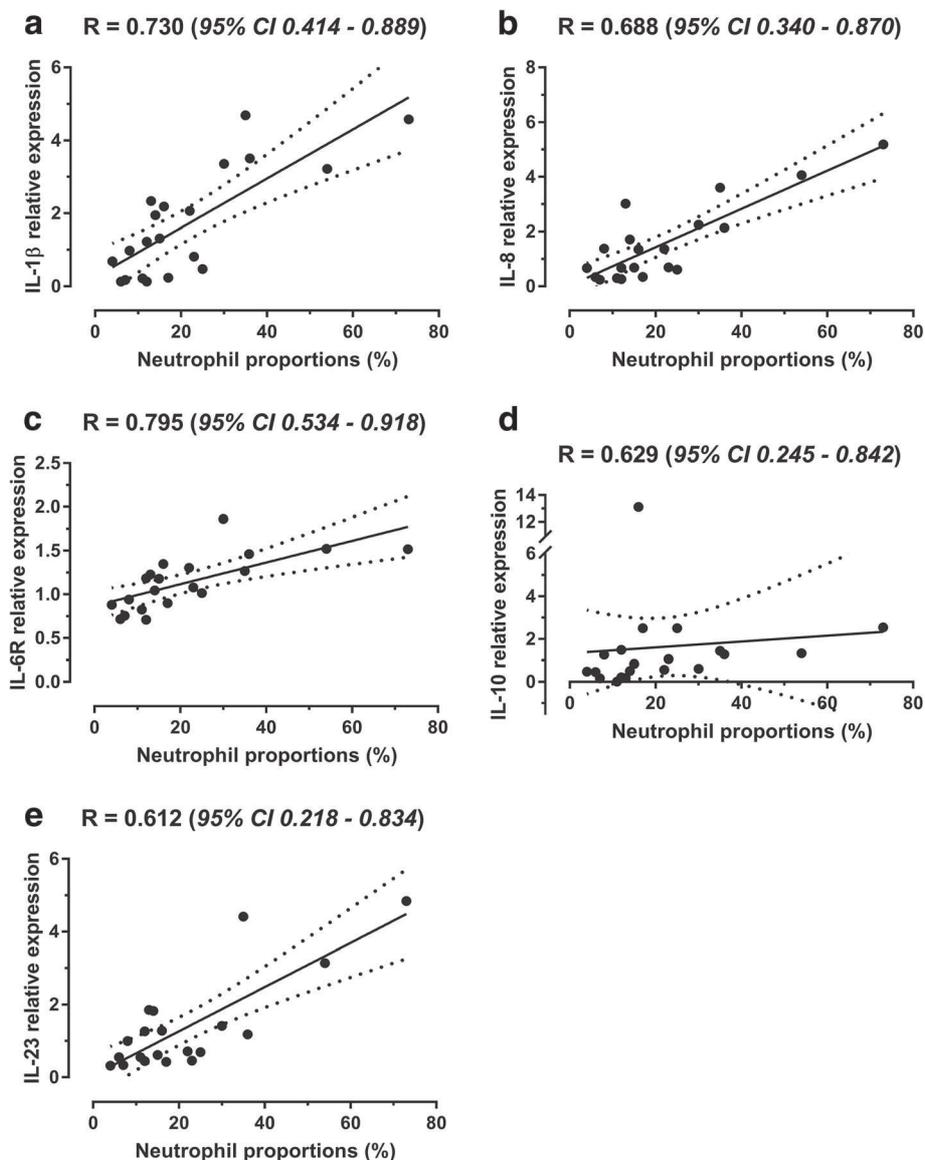


Fig. 5 Correlations (95% confidence interval) between relative mRNA expression of cytokines and neutrophil proportions in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of sEA affected horses, before and after the initiation of each challenge: **a** interleukin (IL)-1 β ; **b** IL-8; **c** IL-6R; **d** IL-10; **e** IL-23. Straight line, linear regression; dotted lines, 95% confidence

previously demonstrated Th2 polarisation for this syndrome [25]. Interestingly, mRNA expression of IL-4 in BALF of both sEA and CTL horses was also not significantly influenced by either challenge. The sEA group exhibited significantly lower percentages of metachromatic cells in BALF, when compared to CTL horses; and IL-4 mRNA expression was significantly correlated with both eosinophil and metachromatic cell percentages. When considering a possible Treg involvement in sEA, mRNA expression of TGF- β was interestingly not significantly modified throughout the study. On the other hand, IL-10 was the only cytokine which mRNA expression in BALF was significantly higher post-challenges and

correlated to BALF neutrophil proportions, with however no significant difference between sEA and CTL horses. Surprisingly, mRNA expression of IL-10 in BALF from sEA affected horses was previously found not to be significantly influenced by various environmental challenges [26]. Alternatively, percentages of different Treg subpopulations, as characterised by flow cytometry, were found to be significantly higher in BALF of sEA horses during crisis exacerbation when compared to remission [6].

Study limitations

All 12 horses involved in this field trial were client-owned, with differences in terms of geographic

origins prior to enrolment in the study. The limited number of horses enrolled in this study was consistent with similar works previously published [4, 8]. Based on the current results, the retrospective statistical power analyses highlights the variability of sample size required in relation to the multiple outcomes investigated. Values of power indeed ranged from 30% for clinical score to 82 and 98% for respectively mucus score and BALF neutrophil percentages. Unlike mucus and cytology (for which estimated sample size = 4–6), a minimum of 20 horses would have been required for clinical signs to reach a 80% power with a α -level of 0.05. The average age was significantly different between groups; the CTL horses being significantly younger than the sEA affected horses. This confounding factor was then taken into account in all further statistical analyses. In terms of design, both challenges (steamed and dry hay) were not performed as a cross-over study, since horses were initially fed with steamed hay (challenge #1) and subsequently fed dry hay (challenge #2). For ethical reasons, the design (i.e. steamed then dry hay) aimed at limiting the risk of horse exclusion (due to crisis exacerbation and subsequent treatment) at the end of the first exposure period, which would have precluded the horse to be involved in the second period. No significant difference was found for each group at d-2 (i.e. initiation of each exposure period) for all investigated parameters; suggesting that horses returned to “baseline level” prior to challenge #2. Also, clinical and tracheal mucus scoring were performed by clinicians not blinded to either challenge type (steamed vs. dry) or horse disease status (sEA vs. CTL), unlike all subsequent laboratory analyses, and lung function tests were not available for this study. Finally, the immune responses in BALF were investigated for the various cytokines through relative mRNA expressions only. Measuring BALF cytokine concentrations using commercially available ELISA kits however lacks sensitivity, since many BALF samples previously showed undetectable cytokine concentrations [27, 28].

Conclusions

Steaming hay significantly decreased mould content and induced less tracheal mucus in horses. However, both types of hay (steamed or not) induced BALF neutrophilia, and none induced respiratory clinical signs. The relevance of steaming hay however warrants further investigations both in the context of prevention/therapy for mEA horses at training and for long-term preclusion of lately developing sEA.

Methods

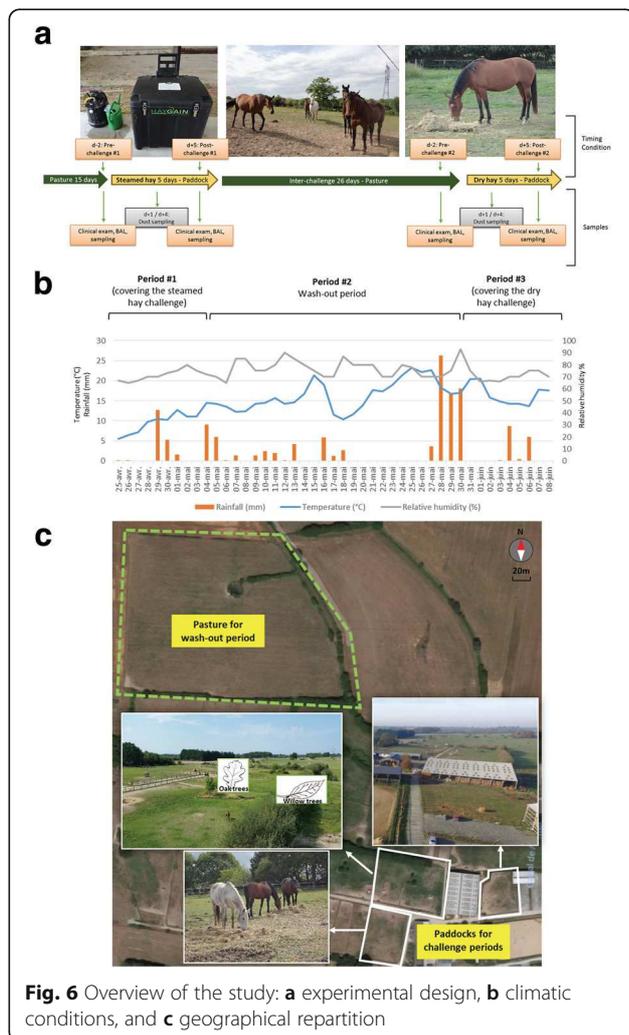
Horses

A cohort of 12 privately owned leisure horses were used in the study, and was subdivided into 2 separate groups.

The control (CTL) group included 6 young horses (4 mares and 2 geldings, aged 2–5 years). These horses had no history of coughing or nasal discharge, exhibited no tracheal mucus upon endoscopy, and had less than 10% neutrophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from each lung when investigated 10 days prior to the trial. The other group included 6 adult horses (5 mares and 1 gelding, aged 9–17 years) that had all previously been diagnosed by the same clinician as suffering from sEA, based on clinical investigations, BALF cytology and reversible airway obstruction after medical/environmental change. Only horses kept in pasture and without any medical treatment or access to hay for at least 1 month prior to the trial were enrolled in the study. Recruitment for the study was made on a volunteer basis from private training centres (CTL horses) and from the caseload previously referred to the hospital (sEA horses; Oniris, Nantes). All owners signed an informed consent, and all procedures were performed by veterinarians and complied with relevant guidelines (Directive 2010/63/EU). The study was also approved by the Institutional Ethic Committee for Clinical Research (CERVO-2017-8-V).

Study design

This study was conducted during spring 2017. At the initiation of the trial, all horses were gathered and kept in a 4 ha pasture without access to hay for a duration of 2 weeks (Fig. 6). Since stabling was previously found to be associated with increased airway inflammation [29], horses were kept in 1 000 m² paddocks by subgroups of three individuals during both exposure periods. On day 0 of the trial, both groups (sEA and CTL) were fed on the ground with about 5 kg per horse of steamed hay (challenge #1), twice daily for 5 consecutive days (i.e. exposure period #1); followed by a wash-out period of 26 days in the 4 ha pasture without access to hay, prior to a second challenge with similar distribution of dry hay (challenge #2) for 5 consecutive days, (exposure period #2). Horses had access to water ad libitum and were also fed flaked cereals and dry pellets (Twenty Horse¹) twice daily. Good quality (non-mouldy) grass hay was harvested as square bales (12–15 kg). For the challenge #1, the hay was steamed using a commercial device (HG-600²), according to manufacturer's recommendations, and immediately distributed to horses. Briefly, the hay bale was placed onto the steamer and pushed down firmly until the manifold spikes pierce the hay to their full length; the steam generator (containing water) was then activated and steam diffused in hay through the spikes. At the end of exposure period #2, asthmatic horses received dexamethasone (0.1 mg/kg IV for 2 days, then progressively decreasing doses over 1 week) and all horses (sEA and CTL) were returned to their owners. Two days before (d-2) and 5 days



after (d + 5) the initiation of each challenge, all horses underwent a full clinical evaluation, as well as a tracheal endoscopy and BALF sampling. The 2010 CONSORT guidelines for reporting clinical trial were used for this report (Additional files 1 and 6) [30, 31].

Hay characterisation

Hay samples (random sampling by hand for a total of 1 kg) were collected from 10 different square bales before and after the steaming procedure, and stored in dedicated bags¹. All square bales originated from the same batch of hay (one single pasture), and all analyses were performed immediately after sampling. For bacteriology, 20 g of crushed hay were mixed with 180 ml of 0.1% peptone water and diluted 1/10 up to 10⁻⁶. One ml of each dilution was plated onto a Plate Count Agar (PCA) and incubated at 37 °C. One ml of each dilution was also cultured in oxytetracycline-glucose-yeast Extract Agar (OGA) and incubated at 25 °C for fungal growth. Bacterial and fungal growths were expressed as

colony forming units (CFUs) after 5 days of incubation. The fungal colonies were then isolated on Sabouraud agar in order to be identified.

Air quality

Air sampling within the breathing zone was performed continuously for 2-3 h during hay feeding, on d + 1 (one CTL horse) and d + 4 (one sEA horse) of each exposure period. Respirable and inhalable particulates were collected according to previously published procedures [21].

Particulates

Horses were equipped with two samplers. The respirable fraction was collected with a flow rate of 2.5 L/min (Air-Check XR5000³) onto 37 mm type AE glass fibre filters using aluminium cyclone. The inhalable fraction was collected with a flow rate of 2.0 L/min (AirCheck 3000³) onto 25 mm PVC filters using Institute of Occupational Medicine (IOM) personal sampler. Sampling pumps were calibrated (Defender Bios calibrator³) before and after sampling. Measurements of respirable and inhalable dust were assessed by gravimetric method, in triplicate measurements. The weight of particulates was divided by volume of air sampled to obtain airborne concentrations. Filters were placed in a desiccator for 24 h prior to any weight measurement. Negative controls were similarly prepared and only transported to and from the site of trial.

Endotoxins

Endotoxins were measured from the 37 mm type AE glass fibre filters, which were kept frozen (-20 °C) after particulates measurements. Filters were eluted in 10 mL of 0.05% Tween 20⁴ within pyrogen-free water. Samples were then shaken during 1 h (MS-NRK-30⁵). After elution, the suspension was centrifuged (1000 g; 15 min). The supernatant was then kept frozen (-20 °C) until being analysed. The eluates provided from sample filters were diluted at 1/10 in pyrogen-free water. Endotoxin activities were assayed using Endosafe - PTS2005F⁶ according to manufacturer's recommendations.

β-D-glucan

Following endotoxin elution, heat extraction was performed in order to measure (1-3)-β-D-glucan content. Samples were then respectively diluted 10-fold for blank filters and 100-fold for sample filters in pyrogen-free water. Measures were carried out in duplicates, using a GlucateLL test,⁷ according to manufacturer's recommendations. The range of quantification was 5-40 pg/mL.

Clinical score, tracheal mucus and bronchoalveolar lavage fluid cytology

On d-2 and d + 5 for each exposure period, a clinical score, based on a 0–21 scale (Additional file 7) [32], was assigned to each horse. Detomidine hydrochloride (0.01 mg/kg IV) and butorphanol tartrate (0.01 mg/kg IV) was given prior to endoscopy. Airway endoscopy and BAL collection were performed using a flexible 3.2 m long, 12.8 mm tip diameter videoendoscope.⁸ The amount of tracheal mucus was scored (grade 0–5) according to the previously published scale [33]. Left and right lungs were then sampled according to previously published procedures [34], with minor modifications. Briefly, a total of 500 mL of warmed isotonic saline solution (2 boluses of 250 mL each) was instilled and aspirated for each lung. Samples were conditioned (+ 4 °C in EDTA tubes) and processed (cytocentrifugation, May-Grünwald-Giemsa staining) as described previously [35]. Differential cell counts were performed on 300 leukocytes. Unlike clinical and mucus scores, cytological investigations of BALF from both lungs were conducted by investigators blinded to challenge type and horse status.

RNA isolation and reverse transcription

Each BALF sample obtained from the right lung was conditioned in order to determine cytokine relative expressions. Expression of 15 cytokines (representative of the different pathways previously associated with sEA) and one receptor (described in human allergic asthma) have been targeted in this study: interferon (IFN)- γ , interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-23, transforming growth factor (TGF)- β and tumour necrosis factor (TNF)- α .

Twenty milliliters of BALF was centrifuged and the cell pellets resuspended in RNA protect Cell Reagent.⁹ Total RNA was extracted from cell pellets using the RNeasy Plus Mini Kit⁹. Concentration and purity of total extracted RNA was assessed using a NanoDrop 2000c Spectrophotometer¹⁰; and RNA integrity was evaluated using a 2100 Bioanalyzer¹¹ and the RNA 6000 Nano kit¹¹. Mean value (\pm standard deviation) of RNA integrity number (RIN) for all samples was 9.7 ± 0.2 . After extraction, 200 ng was retrotranscribed and cDNA generated using a Superscript Vilo cDNA synthesis kit,¹² according to the manufacturer's recommendations. All cDNA samples were stored at - 20 °C until further use. Apart from the cytokines of interest, three reference genes, namely β -actin (ACTB), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β -glucuronidase (β -GUS), were also assessed. For each reaction, cDNA was amplified in a 25 μ l standard reaction (Taqman Universal PCR Master Mix¹⁰). Thermal cycling profile used was: 10 min at 95 °C, followed by 50 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. The relative

amount of mRNA was calculated using the relative standard curve method (Genex 6.1¹³), and results were expressed as mean fold difference (target / reference genes). Using Normfinder, GAPDH and β -GUS were both selected for normalization (Additional file 8). Molecular investigations were also conducted blinded, in terms of horse 'disease status' and 'challenge' type.

Statistical analyses

Continuous data distributions which were not normally distributed, as assessed by Shapiro-Wilk W test, were log-10 transformed. For hay-related parameters, paired *t* tests (steamed vs. dry) were performed for the bacterial/mould content. For all horse-related parameters, effects of challenge (steamed vs. dry), time (d + 5 vs. d-2) and disease status (sEA vs. CTL) were investigated by 3-way analysis of variance (ANOVA, General Linear Model) and Tukey-Kramer's post-hoc tests, with age as covariate. Correlations among sEA affected horses were determined by Spearman's correlation coefficient. Absolute values of $R < 0.5$ were arbitrarily not reported. The different analyses were conducted using Prism 7¹⁴ and NCSS12,¹⁵ and values of $P < 0.05$ were considered significant.

Endnotes

- ¹Tromelin & Cie, Ploeren, France
- ²Haygain, Lambourn, Berkshire, UK
- ³SCK Inc., Eighty Four, PA, USA
- ⁴Merck-Millipore, Molsheim, France
- ⁵Major Science, Saratoga, CA, USA
- ⁶Charles River Laboratories, Saint-Germain-Nuelles, France
- ⁷Associates of Cape Cod Inc., East Falmouth, MA, USA
- ⁸Optomed, Les Ulis, France
- ⁹Quiagen, Courtabœuf, France
- ¹⁰Thermoscientific, Villebon-sur-Yvette, France
- ¹¹Agilent Technologies, Les Ulis, France
- ¹²Life Technologies, Saint-Aubin, France
- ¹³bioMMC, Freising, Germany
- ¹⁴GraphPad, La Jolla, CA, USA
- ¹⁵NCSS – LLC, Kaysville, UT, USA

Additional files

Additional file 1: CONSORT flow diagram for the clinical trial involving 6 control (CTL) horses and 6 horses with severe equine asthma (sEA). (PDF 46 kb)

Additional file 2: Microbiological content in hay ($n = 10$), before and after steaming: a) bacterial content; b) mould content. *** significantly different ($P < 0.001$), based on paired *t* test. (TIF 917 kb)

Additional file 3: Cytology of bronchoalveolar lavage fluid (BALF), before and after the initiation of each challenge. sEA, severe equine asthma; CTL control; d-2, 2 days before challenge; d + 5, 5 days after

challenge. * overall significant difference between groups (sEA vs. CTL horses); # overall significant difference between time points (d + 5 vs. d-2), based on ANOVA investigations. (DOCX 20 kb)

Additional file 4: Relative mRNA expression of cytokines in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), before and after the initiation of each challenge: a) interleukin (IL)-2; b) IL-5; c) IL-13; d) TGF- β ; e) IL-6; f) IL-8; g) Interferon (IFN)- γ . sEA, severe equine asthma; CTL, control; d-2, 2 days before challenge; d + 5, 5 days after challenge. (TIF 2119 kb)

Additional file 5: Correlations (95% confidence interval) between relative mRNA expression of cytokines and clinical/cytological parameters, before and after the initiation of each challenge. IL, interleukin; (95% CI); ns, non-significant and/or absolute value of $R < 0.5$. (DOCX 21 kb)

Additional file 6: CONSORT check-list for the clinical trial involving 6 control (CTL) horses and 6 horses with severe equine asthma (sEA). (PDF 134 kb)

Additional file 7: Clinical scoring system for respiratory conditions, adapted from Tesarowski et al. [32]. (DOCX 18 kb)

Additional file 8: Nucleotide sequences of equine-specific primers used in real-time PCR assays. (DOCX 22 kb)

Abbreviations

ACTB: Actin; BALF: Bronchoalveolar lavage fluid; cDNA: Complementary deoxyribonucleic acid; CFUs: Colony forming units; CTL: Control; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IFN: Interferon; IL: Interleukin; mEA: Mild equine asthma; mRNA: Ribonucleic acid messenger; OGA: Oxytetracycline-glucose-yeast extract agar; PCA: Plate count agar; qPCR: Quantitative polymerase chain reaction; RIN: RNA Integrity number; sEA: Severe equine asthma; TGF: Transforming growth factor; Th: T-helper; TNF: Tumor necrosis factor; β -Gus: β -glucuronidase

Acknowledgements

The authors wish to thank the horse's owners, as well as institutional staff (LABÉO, Oniris) for their kind collaboration.

Funding

Funding for this study was provided by Haygain, LABÉO and Oniris. The funders had no role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript.

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

Authors' contributions

MO contributed to data collection and study execution, data analysis/interpretation, and preparation of the manuscript. EH contributed to data collection, analysis and interpretation. AC contributed to study design, data collection and study execution. CBM contributed to study design, data collection and study execution. MPT contributed to data collection and study execution. MMC contributed to study design and preparation of the manuscript. LC contributed to study design, data collection and preparation of the manuscript. SP contributed to data analysis and interpretation. RP contributed to data interpretation and preparation of the manuscript. MD contributed to study execution and preparation of the manuscript. EAR contributed to study design, data interpretation, and preparation of the manuscript. All authors provided final approval of the manuscript.

Ethics approval and consent to participate

All owners signed an informed consent, and the study was approved by the Institutional Ethic Committee for Clinical Research (Comité d'éthique en recherche clinique et épidémiologique vétérinaire d'Oniris; CERVO-2017-8-V).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

MMC is Scientific Consultant for Haygain. The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹LABÉO Frank Duncombe, Caen, France. ²Normandie Université, UniCaen, BIOTARGEN, Caen, France. ³LUNAM Université, Oniris, NP3, Nantes, France. ⁴Royal Agricultural University, Cirencester, UK. ⁵Purdue University, College of Veterinary Medicine, West Lafayette, IN, USA.

Received: 4 May 2018 Accepted: 28 September 2018

Published online: 15 November 2018

References

- Pirie RS, Couëtil LL, Robinson NE, Lavoie J-P. Equine asthma: an appropriate, translational and comprehensible terminology? *Equine Vet J.* 2016;48:403–5.
- Pirie RS. Recurrent airway obstruction: a review. *Equine Vet J.* 2014;46:276–88.
- Couëtil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie J-P, Léguillette R, Richard EA. Inflammatory airway disease of horses - revised consensus statement. *J Vet Intern Med.* 2016;30:503–15.
- Debrue M, Hamilton E, Joubert P, Lajoie-Kadoch S, Lavoie J-P. Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005;105:25–31.
- Ainsworth DM, Wagner B, Erb HN, Young JC, Retallick DE. Effects of in vitro exposure to hay dust on expression of interleukin-17, -23, -8, and -1beta and chemokine (C-X-C motif) ligand 2 by pulmonary mononuclear cells isolated from horses chronically affected with recurrent airway disease. *Am J Vet Res.* 2007;68:1361–9.
- Henríquez C, Perez B, Morales N, Sarmiento J, Carrasco C, Morán G, et al. Participation of T regulatory cells in equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol.* 2014;158:128–34.
- Ramseyer A, Gaillard C, Burger D, Straub R, Jost U, Boog C, et al. Effects of genetic and environmental factors on chronic lower airway disease in horses. *J Vet Intern Med.* 2007;21:149–56.
- McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE. Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens. *Equine Vet J.* 1993;25:261–7.
- Pirie RS, Collie DDS, Dixon PM, McGorum BC. Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma). *Clin Exp Allergy.* 2003;33:676–83.
- Jackson CA, Berney C, Jefcoat AM, Robinson NE. Environment and prednisone interactions in the treatment of recurrent airway obstruction (heaves). *Equine Vet J.* 2000;32:432–8.
- Leclere M, Lefebvre-Lavoie J, Beauchamp G, Lavoie J-P. Efficacy of oral prednisolone and dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction in the presence of continuous antigen exposure: prednisolone in RAO. *Equine Vet J.* 2010;42:316–21.
- Cesarini C, Hamilton E, Picandet V, Lavoie JP. Theophylline does not potentiate the effects of a low dose of dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction. *Equine Vet J.* 2006;38:570–3.
- Clements JM, Pirie RS. Respirable dust concentrations in equine stables. Part 1: validation of equipment and effect of various management systems. *Res Vet Sci.* 2007;83:256–62.
- Whittaker AG, Hughes KJ, Parkin TDH, Love S. Concentrations of dust and endotoxin in equine stabling. *Vet Rec.* 2009;165:293–5.
- Clements JM, Pirie RS. Respirable dust concentrations in equine stables. Part 2: the benefits of soaking hay and optimising the environment in a neighbouring stable. *Res Vet Sci.* 2007;83:263–8.
- Moore-Colyer MJS, Taylor JLE, James R. The effect of steaming and soaking on the respirable particle, bacteria, mould, and nutrient content in hay for horses. *J Equine Vet Sci.* 2016;39:62–8.
- Moore-Colyer MJS, Lumbis K, Longland A, Harris P. The effect of five different wetting treatments on the nutrient content and microbial concentration in hay for horses. *PLoS One.* 2014;9:e114079.
- Gerber V, Lindberg A, Berney C, Robinson NE. Airway mucus in recurrent airway obstruction—short-term response to environmental challenge. *J Vet Intern Med.* 2004;18:92–7.
- Beeler-Marfisi J, Clark ME, Wen X, Sears W, Huber L, Ackerley C, et al. Experimental induction of recurrent airway obstruction with inhaled fungal

- spores, lipopolysaccharide, and silica microspheres in horses. *Am J Vet Res.* 2010;71:682–9.
20. Berndt A, Derksen FJ, Edward Robinson N. Endotoxin concentrations within the breathing zone of horses are higher in stables than on pasture. *Vet J.* 2010;183:54–7.
 21. Ivester KM, Couëtil LL, Moore GE, Zimmerman NJ, Raskin RE. Environmental exposures and airway inflammation in young thoroughbred horses. *J Vet Intern Med.* 2014;28:918–24.
 22. Ivester KM, Smith K, Moore GE, Zimmerman NJ, Couëtil LL. Variability in particulate concentrations in a horse training barn over time. *Equine Vet J Suppl.* 2012;43:51–6.
 23. Ferreira MAR, Matheson MC, Duffy DL, Marks GB, Hui J, Le Souëf P, et al. Identification of IL6R and chromosome 11q13.5 as risk loci for asthma. *Lancet.* 2011;378:1006–14.
 24. Ullah MA, Revez JA, Loh Z, Simpson J, Zhang V, Bain L, et al. Allergen-induced IL-6 trans-signaling activates $\gamma\delta$ T cells to promote type 2 and type 17 airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136:1065–73.
 25. Cordeau M-E, Joubert P, Dewachi O, Hamid Q, Lavoie J-P. IL-4, IL-5 and IFN-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004;97:87–96.
 26. Laan TT, Bull S, Pirie R, Fink-Gremmels J. The role of alveolar macrophages in the pathogenesis of recurrent airway obstruction in horses. *J Vet Intern Med.* 2006;20:167–74.
 27. Perkins GA, Viel L, Wagner B, Hoffman A, Erb HN, Ainsworth DM. Histamine bronchoprovocation does not affect bronchoalveolar lavage fluid cytology, gene expression and protein concentrations of IL-4, IL-8 and IFN-gamma. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;126:230–5.
 28. Richard EA, Depecker M, Defontis M, Leleu C, Fortier G, Pitel P-H, et al. Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid from horses with neutrophilic inflammatory airway disease. *J Vet Intern Med.* 2014; 28:1838–44.
 29. Holcombe SJ, Jackson C, Gerber V, Jefcoat A, Berney C, Eberhardt S, et al. Stabling is associated with airway inflammation in young Arabian horses. *Equine Vet J.* 2001;33:244–9.
 30. Moher D, Hopewell S, Schulz KF, Montori V, Gøtzsche PC, Devereaux PJ, et al. CONSORT 2010 explanation and elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ.* 2010;340:c869.
 31. Schulz KF, Altman DG, Moher D, CONSORT Group. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *PLoS Med.* 2010;7:e1000251.
 32. Tesarowski DB, Viel L, McDonnell WN. Pulmonary function measurements during repeated environmental challenge of horses with recurrent airway obstruction (heaves). *Am J Vet Res.* 1996;57:1214–9.
 33. Gerber V, Straub R, Marti E, Hauptman J, Herholz C, King M, et al. Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Vet J.* 2004;36:576–82.
 34. Depecker M, Richard EA, Pitel P-H, Fortier G, Leleu C, Couroucé-Malblanc A. Bronchoalveolar lavage fluid in Standardbred racehorses: influence of unilateral/bilateral profiles and cut-off values on lower airway disease diagnosis. *Vet J.* 2014;199:150–6.
 35. Orard M, Depecker M, Hue E, Pitel P-H, Couroucé-Malblanc A, Richard EA. Influence of bronchoalveolar lavage volume on cytological profiles and subsequent diagnosis of inflammatory airway disease in horses. *Vet J.* 2016; 207:193–5.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

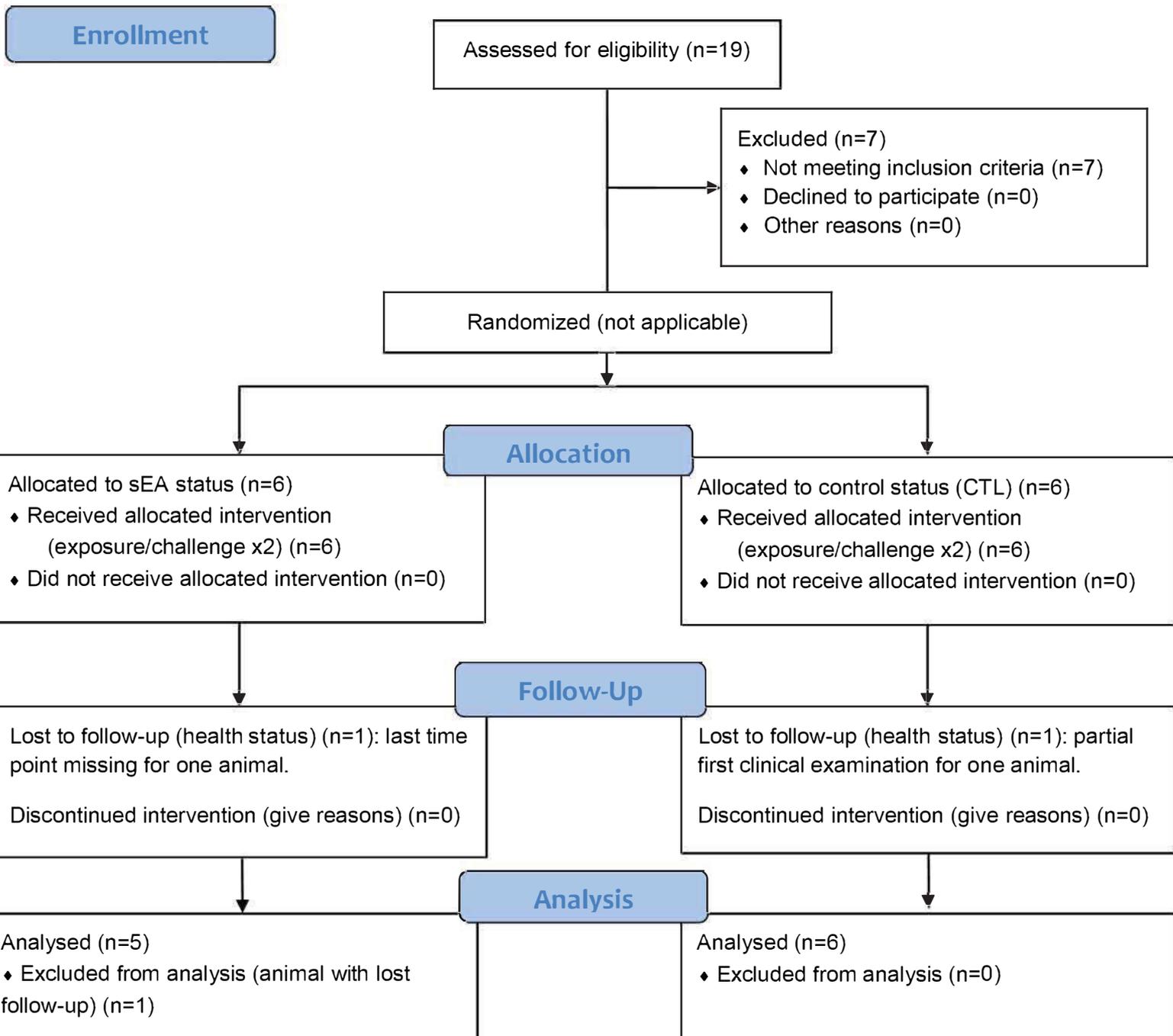
- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

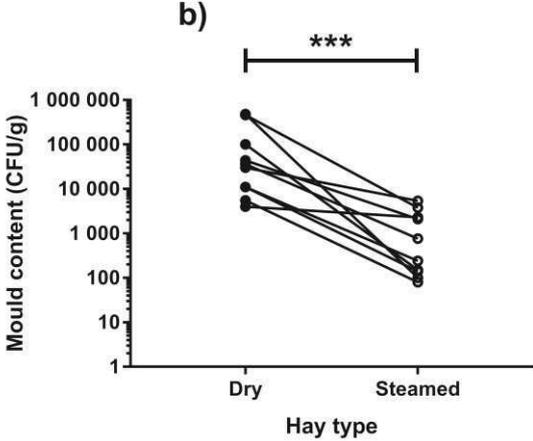
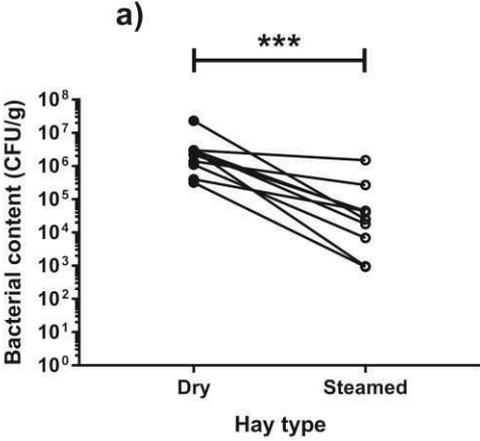
Learn more biomedcentral.com/submissions



CONSORT 2010 Flow Diagram: The influence of hay steaming on clinical signs and airway inflammation in severe asthmatic horses.



Additional file 2: Microbiological content in hay (n = 10), before and after steaming: a) bacterial content; b) mould content. *** significantly different (P < 0.001), based on paired t test.

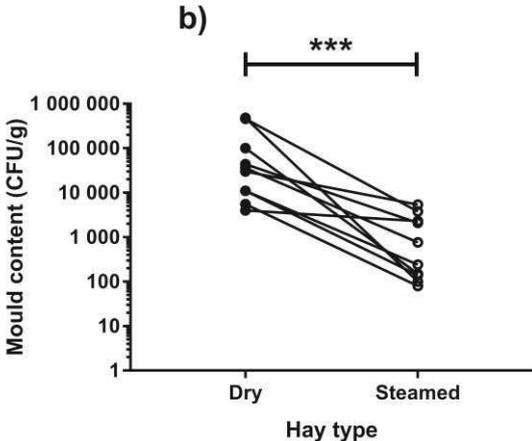
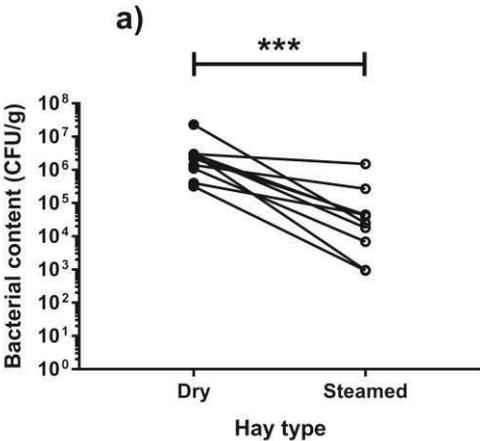


Additional file 3: Cytology of bronchoalveolar lavage fluid (BALF), before and after the initiation of each challenge.

	sEA horses				CTL horses			
	Steamed hay		Dry hay		Steamed hay		Dry hay	
	d-2	d+5	d-2	d+5	d-2	d+5	d-2	d+5
Recovery	42	44	42	38	58	59	58	59
(%)	(29 – 44)	(37 – 48)	(33 – 50)	(29 – 44)	(47 – 65)	(51 – 70)	(43 – 68)	(46 – 64)
Total cell count * (/mm ³)	415	250	400	310	320	330	320	450
	(285 – 655)	(220 – 565)	(370 – 460)	(230 – 690)	(213 – 475)	(263 – 428)	(210 – 488)	(373 – 515)
Metachromatic cells * (%)	2.0	1.0	1.0	1.0	2.0	2,5	3.0	2.0
	(1.8 – 3.0)	(0.8 – 1.3)	(1.0 – 2.0)	(1.0 – 2.0)	(1.0 – 3.8)	(1.3 – 3.8)	(2.0 – 3.8)	(2.0 – 2.8)
Eosinophils (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	2.5
	(0.0 – 0.0)	(0.0 – 0.0)	(0.0 – 0.0)	(0.0 – 0.0)	(0.0 – 0.0)	(0.0 – 4.3)	(0.0 – 3.8)	(1.0 – 6.3)
Macrophages (%)	51	40	40	45	55	56	49	56
	(50 – 54)	(34 – 45)	(35 – 50)	(32 – 48)	(51 – 64)	(51 – 68)	(41 – 64)	(51 – 60)
Lymphocytes # (%)	36	32	46	32	39	30	41	34
	(29 – 38)	(56 – 45)	(29 – 49)	(25 – 34)	(33 – 43)	(26 – 39)	(29 – 48)	(27 – 36)

sEA, severe equine asthma; CTL control; d-2, two days before challenge; d+5, five days after challenge. * overall significant difference between groups (sEA vs. CTL horses); # overall significant difference between time points (d+5 vs. d-2), based on ANOVA investigations

Additional file 4: Relative mRNA expression of cytokines in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), before and after the initiation of each challenge: a) interleukin (IL)-2; b) IL-5; c) IL-13; d) TGF- β ; e) IL-6; f) IL- 8; g) Interferon (IFN)- γ . sEA, severe equine asthma; CTL, control; d-2, 2 days before challenge; d + 5, 5 days after challenge.



Additional file 5: Correlations (95% confidence interval) between relative mRNA expression of cytokines and clinical/cytological parameters of sEA affected horses, before and after the initiation of each challenge.

Cytokines	Mucus score	Macrophages	Metachromatic cells
IL1- β	0.671 (0.313 – 0.862)	ns	ns
IL-4	ns	ns	0.503 (0.063 – 0.779)
IL-6R	0.645 (0.270 – 0.850)	-0.535 (-0.795 to -0.107)	ns
IL-8	0.607 (0.212 – 0.850)	ns	ns
IL-13	0.537 (0.110 – 0.797)	ns	ns
IL-23	0.756 (0.459 – 0.901)	ns	ns
TGF- β	0.675 (0.319 – 0.864)	ns	ns

IL, interleukin; (95% CI); ns, non-significant and/or absolute value of R < 0.5



CONSORT 2010 checklist of information to include when reporting a randomised trial*

Section/Topic	Item No	Checklist item	Reported on page No
Title and abstract			
	1a	Identification as a randomised trial in the title	Not applicable
	1b	Structured summary of trial design, methods, results, and conclusions (for specific guidance see CONSORT for abstracts)	Yes (Summary)
Introduction			
Background and objectives	2a	Scientific background and explanation of rationale	Yes (Introduction)
	2b	Specific objectives or hypotheses	Yes (Materials and Methods)
Methods			
Trial design	3a	Description of trial design (such as parallel, factorial) including allocation ratio	Yes (Materials and Methods)
	3b	Important changes to methods after trial commencement (such as eligibility criteria), with reasons	Yes (Materials and Methods)
Participants	4a	Eligibility criteria for participants	Yes (Materials and Methods)
	4b	Settings and locations where the data were collected	Yes (Materials and Methods)
Interventions	5	The interventions for each group with sufficient details to allow replication, including how and when they were actually administered	Yes (Materials and Methods)
Outcomes	6a	Completely defined pre-specified primary and secondary outcome measures, including how and when they were assessed	Yes (Materials and Methods)
	6b	Any changes to trial outcomes after the trial commenced, with reasons	Yes (Suppl. Data Flow Diagram)
Sample size	7a	How sample size was determined	No
	7b	When applicable, explanation of any interim analyses and stopping guidelines	Yes (Materials and methods)
Randomisation: Sequence	8a	Method used to generate the random allocation sequence	Not applicable

generation	8b	Type of randomisation; details of any restriction (such as blocking and block size)	No applicable
Allocation concealment mechanism	9	Mechanism used to implement the random allocation sequence (such as sequentially numbered containers), describing any steps taken to conceal the sequence until interventions were assigned	No applicable
Implementation	10	Who generated the random allocation sequence, who enrolled participants, and who assigned participants to interventions	No applicable
Blinding	11a	If done, who was blinded after assignment to interventions (for example, participants, care providers, those assessing outcomes) and how	Yes (Materials and methods)
	11b	If relevant, description of the similarity of interventions	Yes (Materials and methods)
Statistical methods	12a	Statistical methods used to compare groups for primary and secondary outcomes	Yes (Materials and methods)
	12b	Methods for additional analyses, such as subgroup analyses and adjusted analyses	Yes (Materials and methods)
Results			
Participant flow (a diagram is strongly recommended)	13a	For each group, the numbers of participants who were randomly assigned, received intended treatment, and were analysed for the primary outcome	Yes (Suppl. Data Flow Diagram)
	13b	For each group, losses and exclusions after randomisation, together with reasons	Yes (Suppl. Data Flow Diagram)
Recruitment	14a	Dates defining the periods of recruitment and follow-up	Yes (p5)
	14b	Why the trial ended or was stopped	Yes (Suppl. Data Flow Diagram)
Baseline data	15	A table showing baseline demographic and clinical characteristics for each group	No
Numbers analysed	16	For each group, number of participants (denominator) included in each analysis and whether the analysis was by original assigned groups	Yes (Results)
Outcomes and estimation	17a	For each primary and secondary outcome, results for each group, and the estimated effect size and its precision (such as 95% confidence interval)	Yes (Results)
	17b	For binary outcomes, presentation of both absolute and relative effect sizes is recommended	No
Ancillary analyses	18	Results of any other analyses performed, including subgroup analyses and adjusted analyses, distinguishing pre-specified from exploratory	Yes (Results)
Harms	19	All important harms or unintended effects in each group (for specific guidance see CONSORT for harms)	Yes (Suppl. Data Flow Diagram)

Discussion			
Limitations	20	Trial limitations, addressing sources of potential bias, imprecision, and, if relevant, multiplicity of analyses	Yes (Study limitation)
Generalisability	21	Generalisability (external validity, applicability) of the trial findings	Yes (Study limitation)
Interpretation	22	Interpretation consistent with results, balancing benefits and harms, and considering other relevant evidence	Yes (Discussion)
Other information			
Registration	23	Registration number and name of trial registry	Yes
Protocol	24	Where the full trial protocol can be accessed, if available	Yes (Suppl. Information items)
Funding	25	Sources of funding and other support (such as supply of drugs), role of funders	Yes

*We strongly recommend reading this statement in conjunction with the CONSORT 2010 Explanation and Elaboration for important clarifications on all the items. If relevant, we also recommend reading CONSORT extensions for cluster randomised trials, non-inferiority and equivalence trials, non-pharmacological treatments, herbal interventions, and pragmatic trials. Additional extensions are forthcoming: for those and for up to date references relevant to this checklist, see www.consort-statement.org.

Additional file 7: Clinical scoring system for respiratory conditions, adapted from Tesarowski *et al.* (1996) [1]

Variable	Descriptor	Score
Respiratory rate (breaths / min)	< 15	0
	16 – 20	1
	21 – 25	2
	26 – 29	3
	> 30	4
Nasal discharge	None	0
	Serous	1
	Mucopurulent	3
Abdominal lift	None	0
	Mild (perceptible heave line)	1
	Pronounced (abdomen, thorax and anal movement)	3
Nasal flaring	None	0
	Present	1
Tracheal sounds	Normal (tubular sound)	0
	Increase in intensity	1
	Mucus movement	3
Crackles	None	0
	Present	2
Wheezes	None	0
	Present	2
Cough	None	0
	Intermittent	1
	Paroxysmal	3
TOTAL		/ 21

1. Tesarowski DB, Viel L, McDonnell WN Pulmonary function measurements during repeated environmental challenge of horses with recurrent airway obstruction (heaves). *Am J Vet Res.* 1996 ;57:1214–1219

Additional file 8: Nucleotide sequences of equine-specific primers used in real-time PCR assays

Target	Primers and Probe (5'-3')	Product size (bp)	GenBank Accession	References
ACTB	Forward: AGCGAAATCGTGCGTGACA Reverse: GCCATCTCCTGCTCGAAGT Probe: CAAGGAGAAGCTCTGCTATGTCGCCCT	70	NM_001081838	[1]
β-GUS	Forward: GAAAGGTCTGCTGGAACAGTATCA Reverse: TCCAGATGAGCTCTCCAACCA Probe: CAAAACGCAAAGAAT	77	EF485029.1	This publication
GAPDH	Forward: AAGTGGATATTGTCGCCATCAAT Reverse: AACTTGCCATGGGTGGAATC Probe: ACTACATGGTCTACATGTTTCAGTA (#)	88	AF097178	adapted from [2]
IFN-γ	Forward: GGAGGACCTGTTCTGTTAAGTTCTTT (#) Reverse: TTTGCGCTGGACCTTCAGA Probe: ATTCAGATTCCGGTAAATGA	103	NM_001081949	adapted from [3]
IL-1β	Forward: CCGACACCAGTGACATGATGA Reverse: TCCTCCTCAAAGAACAGGTCATTC Probe: CTTACTGCAGCGGCAAT (#)	64	NM_001082526	adapted from [4]
IL-2	Forward: CAAGAATCCCAAACCTCCAAGAT Reverse: TCGAGAGAAAGTTTTTAGCATTTC Probe: CCCAAGAAGGCCACAGA (#)	134	NM_001085433	adapted from [2]
IL-4	Forward: TCGTGCATGGAGCTGACTGTA Reverse: CAGCCCTGCAGATTCCTTTC (#) Probe: GCCCGAAGAACACAGA (#)	76	NM_001082519	adapted from [5]
IL-5	Forward: TGCTTCTGCATTGAGTGTGCTA Reverse: TGTTTCATGGGACTTTCTACAGCAA Probe: CTCTTGGAGCTGCCTAC (#)	75	NM_001082499	adapted from [6]
IL-6	Forward: GATGCTTCCAATCTGGGTTC (#) Reverse: GCATAGTCTTGATGTTTTCCCTTTTC (#) Probe: ATCAGGCAGGTCTCCTG	132	NM_001082496	adapted from [4]
IL-6R	Forward: GAAGGCGGCTGGTTCTGA Reverse: CCTGGTAGCACGAATAGTTTCCA Probe: TTCCGTGCAGCTCAG (#)	63	XM_005610076	This publication
IL-8	Forward: GGGCCACACTGCGAAAACCT (#) Reverse: GCACAATAATCTGCACCCACTTT Probe: GAAATCATTGTAAAGCTCG (#)	97	NM_001083951	adapted from [7]
IL-10	Forward: GACATCAAGGAGCACGTGAACCTC Reverse: TGCTCCACTGCCTTGCTCTT Probe: GAAATCATTGTAAAGCTCG (#)	113	NM_001082490	adapted from [2]

Additional file 8: Nucleotide sequences of equine-specific primers used in real-time PCR assays
(continued)

Target	Primers and Probe (5'-3')	Product size (bp)	GenBank Accession	References
IL-12	Forward: ACCAGGCCAGGAATGTTCC Reverse: TGACGGTCCTCAGCAGGTTT Probe: TGCCTCAACCACTCC	59	NM_001082511	This publication
IL-13	Forward: CCCTGGAGTCCCTGAGCAA Reverse: CATCTCCGCGTGTTTTGG Probe: CCACCTGCAGTGCCAT (#)	59	NM_001143791	This publication
IL-17	Forward: ATCGTGAAGGCGGAATAGTAA Reverse: TCGTTTTCCGGTTAAGGACG Probe: ACAAGAACTTCCCTCAGAAT (#)	112	AY014959	adapted from [8]
IL-18	Forward: GAAATCAACCTGTGTTTGAGGATATG Reverse: TCACAGAGATGGTTACCGCTAGAC Probe: ATTGTACAGACAACGCACCC	126	NM_001082512	This publication
IL-23	Forward: CCCATATCCAGTGCAGGAT Reverse: CTTTGCAAGCAGGGCTGACT Probe: TGTGATCCTGAAGGACT	70	NM_001082522	This publication
TGF-β	Forward: TCCTGGCGTACTCTCAGTAAC Reverse: TGACATCAAAGGACAGCCATTC Probe: CTGCTGACCCCCAGCGACTCG	70	NM_001081849	[9]
TNF-α	Forward: CTTCTGCCTGCTGCACTTTG (#) Reverse: GGGCTACAGGCTTGCTCACTTG (#) Probe: CCAGACTCAGATCAT	134	NM_001081819	adapted from [3]

(#) represents modifications from previously published literature; ACTB, Actin beta; GUS, glucuronidase; GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; IFN, Interferon; IL, interleukin; TGF, Transforming Growth Factor; TNF, tumor necrosis factor

1. Coombs DK, Patton T, Kohler AK, Soboll G, Breathnach C, Townsend HGG, et al. Cytokine responses to EHV-1 infection in immune and non-immune ponies. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;111:109–16.
2. Colahan PT, Kollias-Baker C, Leutenegger CM, Jones JH. Does training affect mRNA transcription for cytokine production in circulating leucocytes? *Equine Vet J.* 2002;34:154–158.
3. Horohov DW, Breathnach CC, Sturgill TL, Rashid C, Stiltner JL, Strong D, et al. In vitro and in vivo modulation of the equine immune response by parapoxvirus ovis. *Equine Vet J.* 2008;40:468–72.

4. Saulez MN, Godfroid J, Bosman A, Stiltner JL, Breathnach CC, Horohov DW. Cytokine mRNA expressions after racing at a high altitude and at sea level in horses with exercise-induced pulmonary hemorrhage. *Am J Vet Res.* 2010;71:447–453.
5. Ainsworth DM, Appleton JA, Eicker SW, Luce R, Flaminio MJ, Antczak DF. The effect of strenuous exercise on mRNA concentrations of interleukin-12, interferon-gamma and interleukin-4 in equine pulmonary and peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003;91:61–71.
6. Davis MS, Malayer JR, Vandeventer L, Royer CM, McKenzie EC, Williamson KK. Cold weather exercise and airway cytokine expression. *J Appl Physiol.* 2005;98:2132–6.
7. Allen CA, Payne SL, Harville M, Cohen N, Russell KE. Validation of quantitative polymerase chain reaction assays for measuring cytokine expression in equine macrophages. *J Immunol Methods.* 2007;328:59–69.
8. Ainsworth DM, Wagner B, Erb HN, Young JC, Retallick DE. Effects of in vitro exposure to hay dust on expression of interleukin-17, -23, -8, and -1beta and chemokine (C-X-C motif) ligand 2 by pulmonary mononuclear cells isolated from horses chronically affected with recurrent airway disease. *Am J Vet Res.* 2007;68:1361–9.
9. Dahlgren LA, Mohammed HO, Nixon AJ. Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. *J Orthop Res.* 2005;23:84–92.

Annexe 4 : Article 2 (en préparation)

Development of multiplex nanoscale PCR to evaluate peripheral blood cytokines mRNA expression in healthy and severe asthmatic horses

Marie Orard*, Stéphanie Fougerolle*, Marie-Pierre Toquet, Romain Paillot, Stéphane Pronost, Eric A. Richard, Erika S. Hue

LABÉO Frank Duncombe, Unité BioTARGen, EA 7450, Normandie Université, Caen, France
(Orard, Fougerolle, Toquet, Paillot, Pronost, Richard, Hue)

Corresponding author: Erika Hue, LABÉO Frank Duncombe, 1 route de Rosel, 14053 Caen Cedex 4, France. erika.hue@laboratoire-labeo.fr

* These authors contributed equally to this work.

Running head:

1 **Abstract.**

2

3 **Key words:** Horse, nanoscale PCR, real-time PCR, cytokine expression, multiplex.

4

5 **Introduction**

6 In case of equine asthma described as airway hyper-responsiveness disease following inhalation
7 of dust particles commonly found in barns, it is interesting to determine the immune parameters
8 such as cytokine expression levels in cells from bronchoalveolar lavage fluid (BALF) or
9 peripheral blood.

10 Severe equine asthma is characterized as a local chronic airway inflammation characterize by
11 neutrophilic cytological profile and an increase in mRNA expression in bronchoalveolar lavage
12 fluid and peripheral blood of different cytokines compared to controls (Lavoie-Lamoureux *et*
13 *al.*, 2010). While neutrophils involvement in the pathophysiology of this disease is well defined,
14 the polarization of the immune response in terms of T-helper (Th)-1 and/or Th-2 is still
15 controversial. Previous studies have found an increase of mRNA expression of IL-4; IL-5 and
16 IL-13 and a decrease of Th1 cytokines as IFN- γ (Cordeau *et al.*, 2004; Lavoie *et al.*, 2001)
17 whereas others studies reported an increase in Th1 only or a combination with Th2 associated
18 cytokines (Ainsworth *et al.*, 2003; Giguère *et al.*, 2002; Horohov *et al.*, 2005). Involvement of
19 Th-17 pathway (Ainsworth *et al.*, 2007; Debrue *et al.*, 2005) and regulatory T cells (Treg;
20 Henríquez *et al.*, 2014) have also been suggested. Some studies compared the expression of
21 cytokines in BAL and peripheral blood. In asthmatics human, they shown that systemic
22 inflammation is representative of the local response and leads to immunological reactions
23 distant from the lungs (Bjermer *et al.*, 2007). In horses a study show that when horses RAO
24 and Control were stimulated with HDE (Hay dust extract), expression of mRNA of IL-4 and

25 IL-10 increase in RAO horses compared to control but no effect were detected on IFN- γ and
26 IL-13 (Lanz *et al.*, 2013).

27 There are currently very few study of systemic response in RAO horses and they are evaluated
28 the serum cytokines levels and not the expression of mRNA (Lavoie-Lamoureux *et al.*, 2012;
29 Niedźwiedź *et al.*, 2016).

30

31 The real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was initially developed as a
32 technique to amplify nucleic acid sequence and allow the detection and relative quantification
33 of target RNAs (Wang *et al.*, 1989). This technology has improved and the current level of
34 qPCR is the quantification of gene expression. Relative quantification of mRNA determines the
35 changes in steady-state mRNA levels of a sample gene and expresses it compared to the level
36 of a reference gene. This gene should be stably, expressed throughout all samples of the
37 experimentation and at least two or three reference genes should be used as standard to limit
38 large errors range (Thellin *et al.*, 1999; Vandesompele *et al.*, 2002). Using RT-qPCR represents
39 a powerful method to study gene expression due to its high sensitivity and specificity,
40 reproducibility and large range (Wong *et al.*, 2005). Moreover, Li *et al.*, 2013 shown that the
41 sensitivity of qPCR measurement is improve by performing reverse transcription with gene-
42 specific primers and by preamplifying the cDNA (Li *et al.*, 2013). Since the introduction of the
43 qPCR assay, new tools have been developed to combine the high-throughput performance while
44 decreasing the reaction volume (Shen *et al.*, 2010; (Kalinina *et al.*, 1997). A nanoliter-volume
45 real time PCR platform is commercially available. Only, 33 nanoliters real time PCR reaction
46 are necessary in each well on a 384 wells plate, making this platform potentially useful for
47 detection of multiple targets simultaneously compared to the standard method. The first study,
48 which describes the nanoliter high throughput quantitative PCR was published in 2006 (Colin
49 & Morrison, 2006). This technique, high throughput real-time qPCR platforms allows to target

50 a lot of cytokines per well so user can now easily complete most projects in days instead of
51 weeks, and generate from 1 to over 12,000 data points in a single run. This multiplex approach
52 was used for high-throughput detection of respiratory pathogens in veterinary diagnostics
53 (Goodman *et al.*, 2016). This high-throughput approach is a new perspective and an innovative
54 method in horses to understand cytokine genes expression. To our knowledge, the use of this
55 platform for detection of horse immune response has not yet been described.

56 We applied this nanoscale technology to study the influence of hay steaming on systemic
57 immune response in severe asthmatic horses. In this study, fifteen cytokines and one receptor
58 of cytokine were investigated with nanoscale PCR and 3 others cytokines with RT-qPCR. In
59 addition to the pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-6R and TNF- α), the
60 immunoregulator cytokine IL-10, the chemokine IL-8, the antiviral cytokines (IFN- α , IFN- β ,
61 IFN- γ) and the cytokines representing both subsets of Th1 (IL-2; IFN- γ ; IL-12 and IL-18), Th2
62 (IL-4, IL-5 and IL-13), Th17 (IL-17, IL-23) and Treg (IL-10; TGF- β). The different signalling
63 pathways, potentially implicated in immune response of the asthma syndrome, were
64 investigated. The most of publication investigate only one or two cytokines from signalling
65 pathway Th1 and Th2 due to the time of analysis which is consequent in qPCR standard. In our
66 study the cytokines were measured by nanoscale PCR which allows screening large numbers
67 of samples in a time and cost-efficient manner.

68 Material and Methods

69 The study was approved by the Institutional Ethic Committee for Clinical Research (CERVO-
70 2017-8-V; Nantes, France).

71

72 PBMC isolation and stimulation for validation of nanoscale PCR

73 Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from one horse (gelding, selle
74 français, 11 years) as previously described (Hue *et al.*, 2017) and cultured in medium (RMPI
75 1640, Sigma-Aldrich) supplemented with 5% FBS, 200 IU/ml Penicillin and 200 ng/ml
76 Streptomycin (Sigma-Aldrich). After 20h, PBMC were infected with medium of EHV-non-
77 infected cells (mock infection), with medium of infected RK13 cells with EHV-1 (MOI 0.01),
78 for 24h, Concanavalin A (ConA: 4 µg/ml) for 3h, Lipopolysaccharide (LPS: 10 µg/ml), Phorbol
79 12-myristate 13-acetate (PMA: 0.05 µg/ml) plus ionomycin (0.5 µg/ml) for 6h. Cells were
80 centrifuged in microtubes and dissociated in RNAprotect Cell Reagent (Qiagen, Courtaboeuf,
81 France). Total RNA were extracted from cell pellets using RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen,
82 France).

83

84 Blood mRNA extraction

85 Study design, hay characterisation, air quality, clinical score, tracheal mucus and
86 bronchoalveolar lavage fluid cytology were previously described in Orard *et al.* (2019). Briefly,
87 a cohort of 12 horses was used in the study, 6 control horses and 6 severe asthmatic horses. The
88 horses were placed in paddock by subgroups of three individuals. At day 0 of the trial, the
89 horses (sEA and CTL) were fed with steamed hay (challenge 1) for 5 consecutive days;
90 followed by a wash-out period of 26 days in a 4 ha pasture without hay prior to a second
91 challenge with similar distribution of dry hay (challenge 2) for 5 consecutive days. For the
92 challenge #1, the hay was steamed using the commercial device HG-600a (Haygain, Lambourn,

93 Royaume-Uni), according to manufacturer's recommendations, and immediately distributed to
94 horses. Two days before (d-2) and 5 days after (d+5) the initiation of each challenge, all horses
95 underwent a full clinical evaluation, as well as blood sample collected in PAXgene Blood RNA
96 tube (Ozyme, Montigny le Bretonneux, France). Total RNA were extracted using the PAXgene
97 blood RNA kit (Qiagen, France).

98

99 **Concentration and purity of total extracted RNA**

100 Concentration and purity of total extracted RNA was determined using NanoDrop® 2000c
101 Spectrophotometer (Thermoscientific, France). RNA integrity numbers (RIN) were estimated
102 using an Agilent 2100 Bioanalyzer and RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies). Mean RIN
103 value \pm SD was 9.54 ± 0.38 for PBMC samples and 9.73 ± 0.23 for all PAXgene RNA blood
104 samples.

105

106 **Primers and probes**

107 The targets of this study were 3 reference genes (β -actin ACTB; glyceraldehyde-3-phosphate
108 dehydrogenase, GAPDH; and β -glucuronidase, bGUS), 17 cytokines (IFN- α , IFN- β , IFN- γ ,
109 IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-23, TGF- β and TNF-
110 α) and one receptor (IL-6R) (supplementary Table 1).

111 Primers and probes were selected from mRNA sequences using Primer Express 3.0 (Applied
112 Biosystems) and validate by a proprietary algorithm was applied for a subset of Taqman assays
113 designed by Life Technologies Corp. Each primer and probe couple were selected for avoiding
114 primer self-annealing and hairpin loops, optimized percentage of CG, optimizing melting
115 temperatures and efficacy of PCR. The Open Array plate permit analyse by nanoscale PCR of
116 18 Taqman assays listed in supplementary Table 1 (3 reference genes, 14 cytokines among the
117 seven and IL-6R). All primers specific to the 18 equine cDNA targets used in nanoscale

118 PCR sought in this study composed the pool primers custom Open Array Preamp (Life
119 Technologies).

120

121 **cDNA synthesis**

122 Two distinct complementary DNA syntheses (cDNA) of each sample were generated using
123 SuperScript® VILO™ cDNA synthesis kit (Life Technologies, Saint-Aubin, France) from 200
124 ng of RNA in accordance with the manufacturer's recommendations.

125 The first cDNA synthesis (cDNA) was realized in absence of the pool primers custom Open
126 Array Preamp and the second in presence of this specific pool of primers. The cDNA synthesis
127 program consisted of 10 minutes at 25°C followed by 10 minutes at 42°C and 5 minutes at
128 85°C.

129

130 **qPCR amplification**

131 The cDNA synthesised without specific pool of primers were amplified with Taqman Universal
132 PCR Master Mix (Life Technologies) and the thermal cycling profile of 10 minutes at 95°C
133 following 50 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C as previously described (Hue *et al.*,
134 2017). The absolute concentration of each gene was obtained using standard curves.

135

136 **Preamplification**

137 Preamplification was carried out for only on cDNA synthesised in presence of pool primers
138 custom Open Array Preamp with the TaqMan Preamp master mix (Life technologies) and pool
139 primers custom according the manufacturer's instructions. Preamplification reaction was
140 performed at the following cycling conditions: 10 minutes at 95°C, followed by 14 cycles of 15
141 seconds at 95°C and 4 minutes at 60°C, and one step of 10 minutes at 99°C). Preamplification
142 products were diluted 1:20 in RNase free water and were used on the OpenArray Platform.

143

144 Nanoscale PCR amplification

145 The PCR mixture for Open Array analysis was composed of preamplified cDNA and
146 Taqman OpenArray real time master mix according to the manufacturer (Life technologies),
147 and was dispensed on Open Array plate by the automated sample loading system AccuFill (Life
148 technologies). The Open Array plate is organized in 48 subarrays with 64 through-holes
149 containing the 18 Taqman assays spotted in triplicate (Figure 1). Each through-hole is load with
150 individual Taqman assays and contains 33 nl of PCR mixture. Amplification occurred on Open
151 Array program (50 cycles, other data not supplied by the manufacturer) of QuantStudio 12K
152 Flex (Life technologies) in presence of standard curves with known quantity of plasmid for
153 each target. All samples, for which the amplification scores were greater than 0.99, $C_q < 30$
154 and whose amplification curve was characteristic, were analysed using Life Technologies
155 proprietary algorithm.

156

157 Gene expression

158 Using Normfinder, GAPDH and β -GUS were selected for normalization out of 3 putative
159 candidates (ACTB, GAPDH and β -GUS). The relative gene expression was calculated using
160 the ratio of the target gene absolute quantity (ng) divided by the mean absolute quantity of
161 GAPDH and β -GUS (ng) within each sample [14]. Gene expression was reported as the relative
162 variation (fold increase) to a calibrator sample (Applied Biosystems, 2008).

163

164 Quantification of sera cytokines

165 IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and TNF- α concentrations were measured in duplicates
166 by ELISA, according to the manufacturer's instructions with minor modifications
167 (Supplementary Table S2). Arbitrary values corresponding to the lowest and the highest

168 standard concentration were attributed to samples with, respectively, undetectable cytokines
169 and optical density values exceeding the range of quantification.

170

171 **Statistical analysis**

172 The continuous data were not normally distributed, as assessed by Shapiro-Wilk W test using.

173 Associations between Ct values and Cq values, between absolute quantities and between fold

174 difference obtained from qPCR and nsPCR were evaluated using Pearson's correlation

175 coefficient. The degree of agreement between the two methods was compared by applying the

176 Bland–Altman method. Measures of agreement for qPCR and nsPCR were evaluated using the

177 intra-class correlation coefficient (ICC).

178 For all horse-related parameters, effects of challenge (steamed *vs.* dry), time (d+5 *vs.* d-2) and

179 disease status (sEA *vs.* CTL) were investigated by 3-way analysis of variance (General Linear

180 Model) with age as covariate and Tukey-Kramer's post-hoc test. Analyses were conducted

181 using Prism 7 (GraphPad, La Jolla, CA) and NCSS12 (NCSS - LLC, Kaysville, UT). Values of

182 $P < 0.05$ were considered statistically significant.

183

184

185 Results**186 Validation of methodology**

187 Inclusiveness criteria and efficiency of qPCR for all targets have been verified and validated
188 beforehand load to Open Array plate. All primers and probes selected are specific of cytokines
189 mRNA sequences for each equine target, presented percentage of CG < 60%, are optimized
190 melting temperatures for primers ($60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ between primers) and probe ($60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), avoid
191 self-annealing and hairpin loops. The efficacy of each PCR target was validated by real-time
192 PCR with 6 distinct 5 ten-fold dilutions of plasmid and was comprised between 75 and 110%
193 (resumed in table 1). The mean bias and the linearity uncertainties (U_{LINi}) for each qPCR
194 presented an absolute bias value less than the critical bias value ($0.25 \log_{10}$) (Hue *et al.*, 2016).
195 All PCR designs passed validation criteria, although in view of low efficiency of ACTB, we
196 choose to load the commercial design Ec04176172_gH (Life technologies) in Open Array plate.
197 All efficiencies of each nanoscale PCR in Open Array plate were comprised between 91.7%
198 and 120.6 % (Table 1). We have stimulated PBMC with mock infection (CTL), EHV-1 for 24h,
199 ConA for 3h, LPS, PMA plus ionomycine for 6h before realized qPCR and nanoscale
200 amplification in parallel to validate the proceeding of the nanoscale amplification.

201 The mean difference of raw data between Ct (qPCR) and Cq (nsPCR) was approximately 13,95
202 $\pm 1,37$. This value corresponds to the 14 cycles of preamplification performed before the
203 nanoscale PCR. The different profiles of mRNA expression obtain with the qPCR (Figure 1A)
204 and the nsPCR (Figure 1B) were similar for each stimulation. Moreover, the Ct/Cq values
205 obtains with qPCR and nsPCR were correlated for each target (Supplementary Figure S1)
206 except for ACTB ($R=0.622$, $p=0.0998$), IL-8 ($R=0.586$; $p=0.1272$) and IL-18 ($R=0.478$;
207 $p=0.2305$). The absolute quantity obtains with qPCR and nsPCR were correlated for each target
208 (Supplementary Figure S2) except for ACTB ($R=0.416$, $p=0.3057$) and IL-18 ($R=0.602$;
209 $p=0.1146$). The fold difference of target obtains with qPCR and nsPCR were correlated for each

210 target (Supplementary Figure S3) except for IL-8 ($R=0.599$, $p=0.1170$) and IL-18 ($R=0.364$;
211 $p=0.3758$). The comparisons of the two methodologies were represented in Bland-Altman plots
212 for the Ct/Cq values, the absolute quantity and the fold difference of each target (Supplementary
213 Figures S4, S5 and S6). The intra-class correlation coefficient (ICC) were substantial and
214 almost perfect between the Ct and Cq values (supplementary Table 3), but the ICC decreased
215 for the absolute quantity and fold difference obtained for qPCR and nsPCR.

216 These results validate the proceeding of the nanoscale amplification for the study of mRNA
217 expression with up and down expression and expression of different target. But the absolute
218 quantity and fold difference for each target will to be obtained with one methodology for all
219 samples.

220

221 **Influence of hay steaming on systemic immune response in severe asthmatic horses**

222 One sEA horse exhibited fever during the wash-out period and was subsequently excluded from
223 the study. In the end, 5 sEA horses and 6 CTL horses completed both challenges as previously
224 described in Orard *et al.* (2018). We used the new nanoscale PCR technology to study the
225 influence of hay steaming on systemic immune response in severe asthmatic horses.

226 Unfortunately, the data of IFN- α , IFN- γ , IL-10 and IL-17 fall below the quality criteria of
227 nsPCR for this study. The mRNA expression of IFN- γ , IL-10 and IL-17 were analysed by
228 qPCR, the same as IL-2 and IL-23 not present on nsPCR.

229 Firstly, no challenge effect (steam hay vs. dry hay) was observed on the expression of the
230 cytokine mRNAs of the cells present in the blood. The mRNA expression of IL-5, IL-6, IL-
231 10, IL-12, IL-23 and TGF- β were significantly higher in CTL vs sEA (Figure 2). The gene
232 expression of IL-12 and IL-23 are positively correlated with the proportion of small
233 lymphocytes in the formula count. In addition, the mRNA expression of IL-6 and IL-23 were
234 negatively correlated with clinical score and mucus score. A negative correlation was observed

235 between small lymphocyte proportion and IL-23 expression, and between small and large
236 lymphocytes and IL-6 expression.

237 The mRNA expressions of IL-4, IL-13 and TNF- α are significantly increased in sEA horses
238 regardless of the challenge (Figure 2). In addition, the expression of IL-2 is both significantly
239 increased in sEA horses before the start of each challenge. The expression of IL-18 is
240 significantly increased post-challenge in AES horses. No significant variation was found
241 neither throughout challenge for relative mRNA expression of IFN- γ , IL-1 β , IL-6R, IL-8 and
242 IL-17 nor influence of the challenge type or any interaction between challenge and either time
243 or disease status was found for any cytokine relative expression in blood. Moreover, relative
244 mRNA expression of IL-10 and IFN- γ ($R=$); and IL-23 with IL-6, IL-13 and TGF- β were
245 correlated themselves ($R=$, $R=$ and $R=$ respectively). Relative mRNA expression of IL-6, IL-
246 12, IL-13, IL-23 and TNF- α were correlated with proportion of blood lymphocytes ($R=$, $R=$,
247 $R=$, $R=$ and $R=$ respectively).

248

249 The concentrations of IL-2 (692-1250, $p = 0.0162$) and IL-4 (91-147, $p = 0.0298$) were
250 significantly higher in sera of sEA affected horses when compared to CTL horses ($p = 0,0162$;
251 $p = 0,0298$ respectively). No significant variations were found for sera concentration of IFN- γ ,
252 IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α throughout challenge.

253

254 Correlations ELISA/mRNA?

255 Correlations ELISA/Clinical score?

256 Correlations ELISA/NF?

257

Discussion

Discussion validation: PCR validés sur échantillons de PBMC isolés. bonne corrélation entre RT-PCR et nanoscale PCR. Résultats similaires sur PBMC entre RT-PCR et nanoscale PCR. Avantages nanoscale (high throuput, qté moindre échantillon pour plus de datas,) gain de temps (48 samples par 18 PCR en triplicat pour une lame, 4 lames en parallèle soit 10 368 dépôts simultanés, cela représente 110 plaques 96 puits).

The high sample throughput of over 27 000 RT-PCR analyses per person per day, based on a workflow of 3 h to prepare four arrays and four processing runs per day per person, is a 24-fold increase in analytical throughput based on current 384-well microplates and opens new possibilities in genetic system analysis not currently possible. Multiplexed real-time qPCR analyses allow measuring multiple genes simultaneously in a single sample (Balashov *et al.*, 2005). Overall, this technique allows using a lowest volume of PCR without decrease data quality allowing increasing the number of analyses without consuming more reagents or sample. This technique allows a high precision and accuracy with low cost per data point and the gain in time is substantial compared to the standard qPCR. Clearly, the nanofluidic PCR array has the potential to span the space of genomic applications requiring the parallelism of hybridization microarrays with the specificity, accuracy, dynamic range and precision of solution phase PCR.

In this study, the expression of 17 cytokines was studied in case of severe equine asthma. Five cytokines analysed by nanoscale PCR were not detected in all PaxGene samples (IFN- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-17). The RT-qPCR for IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-17 were done to complete results and also 3 others cytokines no load in Open Array plate (IL-2, IL-23 and TGF- β). However, a previous study investigated the expression of inflammation-related genes in

283 peripheral blood leukocytes in local and early systemic inflammation (Vinther *et al.*, 2016).
284 They studied 22 genes including IL-10, IL-8 and IL-17 extracted from PaxGene blood sample
285 and analyze by RT-qPCR but contrary to us these cytokines mRNA are expressed using
286 Dynamic Array Integrated Fluidic circuits (IFC) on a Biomark Fluidigm thermocycler. Maybe
287 it is necessary to optimize the complementarity of probe and primers for these cytokines.
288 Moreover, the technology has been validated on PBMC and partially on PaxGene. A study in
289 human compared the using of RT-qPCR on blood sample in PaxGene and in PBMC cells
290 (Bondar *et al.*, 2014). The lack of expression for IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-17 could be explain
291 by the difference of the method to extract RNA. Another study showed that the PaxGene sample
292 had a decrease in the number of expressed genes and an higher variability compared to the
293 others methods as PBMC isolation (Min *et al.*, 2010). Moreover they shown that differential
294 probes expression between PaxGene and PBMC were correlated with the number of monocytes,
295 lymphocytes, neutrophils or erythrocytes (Min *et al.*, 2010). These results are concordant with
296 another transcriptomic study that shown that the highest number of transcripts was detected in
297 the PBMC samples and PBMC samples showed the highest correlation ($R^2=0.92$) and lowest
298 variability between the samples (Raghavachari *et al.*, 2009). PBMC seems to directly identify
299 changes in a well-defined immunological set of cells, such an assumption does not apply to
300 PaxGene sample blood (Bondar *et al.*, 2014). In PaxGene samples, more diverse cell
301 populations including neutrophils, eosinophils, platelets among other constituents reduce the
302 specific cell population of the study. Moreover, others studies shown that the quantification of
303 miRNA expression differs between PaxGene sample and PBMC
304 Finally, the amplification cycle number being lower in Open array technology compared to the
305 RT-qPCR can explain that we don't have a detection of cytokines. However to improve the
306 detection of cytokines expression, the 14 cycles preamplification on PaxGene RNA blood is
307 necessary.

308

309 Literature on systemic response in equine asthma is rare. This present study described the first
310 approach on the involvement of cytokine expression by nanoscale PCR in case of equine
311 asthma. Further studies are underway in order to investigate the mRNA cytokines expression
312 in the horses. In this study, we shown that mRNA expression of IL-12, IL-6, IL-23, TGF- β , IL-
313 10 and IL-5 were higher and IL-6, TNF- α , IL-13, and IL-4 in CTL compared to SEA horses.
314 The results are concordant with previous studies, particularly in mice and human in whom the
315 systemic response in asthma is better investigated. A study has shown that IL-23 suppress
316 airway hypersensitivity during challenge in mice (Masaki *et al.*, 2014) which can explain than
317 mRNA expression is lower in SEA horses. Moreover according to the mRNA expression of IL-
318 10 and TGF- β , several studies in humans shown that they have a role in inhibition of the
319 inflammation to protect the lung in injuries case and seem to be deficient in asthmatics subjects
320 (Bonfiel *et al.*, 1995) but no effect of challenge have been observed in SEA horses (Desjardins
321 *et al.*, 2004). In contrast to our results, mRNA expression of IL-10 increased in SEA horses
322 after challenge (Lanz *et al.*, 2013; Pacholewska *et al.*, 2015). The short duration of our challenge
323 and the good hay quality might explain that IL-10 mRNA expression didn't increase in SEA
324 horses. The higher expression of mRNA of IL-4 in SEA horses compared to CTL is concordant
325 with previous studies who shown the key role of this cytokine in asthma syndrome (Cordeau *et*
326 *al.*, 2004; Horohov *et al.*, 2005; Lanz *et al.*, 2013; Lavoie *et al.*, 2001). Moreover, our study
327 confirms that SEA horses exhibits a modified Th2 response characterize by the production of
328 IL-4 and IL-13 mRNA but not IL-5 mRNA in BAL (Horohov *et al.*, 2005). IL-5 is linked to
329 the eosinophilia proportion and in our study, the SEA horses didn't have an eosinophilia profile
330 which explain the lack of mRNA expression in SEA horses (Dixon *et al.*, 1995; Seahorn *et al.*,
331 1997). Likewise, the mRNA expression of IL-13 also increases. This cytokine uses the same
332 signaleptic way than IL-4 which can explain ours observations. Then, in our study mRNA

333 expression of TNF- α is higher in SEA horses which comforts previous studies whose found
334 that TNF- α concentration increases after ex-vivo stimulation with bacterial products in SEA.
335 mRNA expression of IL-18 is significantly higher after challenge but no difference has been
336 observed between SEA and CTL horses. IL-18 is an pro-inflammatory cytokines which can act
337 as a cofactor for Th2 cell development. Recently an IL-18 gene polymorphism was reported to
338 be associated with asthma severity and higher expression in serum level. mRNA expression of
339 IL-2 is higher in SEA horses compared to control. This cytokines isn't well study in equine
340 asthma literature particularly in systemic response of asthmatic horses. A study shown that IL-
341 2 levels are increased in bronchoalveolar lavage fluid from patients with symptomatic asthma
342 (Walker *et al.*, 1992). This idea is supported by the hypothesis that increased bronchoalveolar
343 lavage cells expression shows presence of IL-2 mRNA (Robinson *et al.*, 1993). But surprisingly
344 IL-2 mRNA expression is higher before challenge compared after challenge. Then we shown
345 that mRNA expression of IL-12 is higher in CTL horses compared to SEA. Several murine
346 studies have shown that this cytokine can potently inhibit allergic airway inflammation in
347 asthma and could be a therapeutic issue in asthma disease (Meyts *et al.*, 2006; Leonard, 2003).
348 The mRNA expression of IL-6 in blood was increased for CTL compared to SEA affected
349 horses and IL-6R not expressed anyway. To date, the relative expression of this receptor has
350 not been investigated in BALF or systemic response of horses. Interestingly, a genome-wide
351 association study identified a significant association between a single nucleotide polymorphism
352 in the IL-6R gene and the risk of asthma in humans (Ferreira *et al.*, 2011). Further investigations
353 are warranted to characterize the IL- 6 signaling pathway involvement in equine asthma,
354 especially in terms of subsequent T-helper (Th) polarisation as recently demonstrated in
355 humans (Ullah *et al.*, 2015). No difference in mRNA expression of IL-1 β , IL-8, IL-17 and IFN-
356 γ has been observed, may be the short duration of the challenge did not allowed to have an
357 mRNA expression of these cytokines contrary to the precedent study (Ainsworth *et al.*, 2003,

358 2007). To finish, the immune response of horses depend a lot of the allergens present in the
359 hay. In the majority of studies, the horses are submitted to hay dust of mouldy hay that contain
360 a lot of allergen. In our study, the horses are exposed to a good quality hay during a short time
361 that can explain the differences observed compared to the previous studies.

362

363 **Acknowledgments (if any)**

364 **Authors' contributions**

365 S.P., E.R. and E.H. conceived the study. S.P., E.R. and E.H. designed the experiments. M.O.,
366 S.F., M-P.T. and E.H. performed the experiments and contributed reagents/materials/analysis
367 tools. M.O., M-P.T. and E.H. analysed the data. M.O., S.F., R.P., S.P., E.R. and E.H. wrote the
368 paper. All authors provided final approval of the manuscript.

369 **Sources and manufacturers**

370 Funding for this study was provided by Haygain, LABÉO and Oniris.

371 **Declaration of conflicting interests**

372 The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship,
373 and/or publication of this article.

374 **Funding**

375 Funding for this study was provided by Haygain, LABÉO and Oniris.

376 **Ethics approval and consent to participate**

377 All owners signed an informed consent, and the study was approved by the Institutional Ethic
378 Committee for Clinical Research (CERVO-2017-8-V).

379 **References**

- 380 Ainsworth, D.M., Grünig, G., Matychak, M.B., Young, J., Wagner, B., Erb, H.N., and Antczak,
381 D.F. (2003). Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN- γ and IL-8
382 production in bronchoalveolar lavage cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* *96*, 83–91.
- 383 Ainsworth, D.M., Wagner, B., Erb, H.N., Young, J.C., and Retallick, D.E. (2007). Effects of in
384 vitro exposure to hay dust on expression of interleukin-17, -23, -8, and -1 β and chemokine
385 (C-X-C motif) ligand 2 by pulmonary mononuclear cells isolated from horses chronically
386 affected with recurrent airway disease. *Am. J. Vet. Res.* *68*, 1361–1369.
- 387 Allen, C.A., Payne, S.L., Harville, M., Cohen, N., and Russell, K.E. (2007). Validation of
388 quantitative polymerase chain reaction assays for measuring cytokine expression in equine
389 macrophages. *J. Immunol. Methods* *328*, 59–69.
- 390 Applied Biosystems (2008). Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression
391 Using Real-Time Quantitative PCR.
- 392 Atarod, S., Smith, H., Dickinson, A., and Wang, X.-N. (2014). MicroRNA levels quantified in
393 whole blood varies from PBMCs. *F1000Research* *3*, 183.
- 394 Bjermer, L. (2007). Time for a paradigm shift in asthma treatment: From relieving
395 bronchospasm to controlling systemic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* *120*, 1269–
396 1275.
- 397 Bondar, G., Cadeiras, M., Wisniewski, N., Maque, J., Chittoor, J., Chang, E., Bakir, M.,
398 Starling, C., Shahzad, K., Ping, P., *et al.* (2014). Comparison of Whole Blood and Peripheral
399 Blood Mononuclear Cell Gene Expression for Evaluation of the Perioperative Inflammatory
400 Response in Patients with Advanced Heart Failure. *PLoS ONE* *9*, e115097.
- 401 Colahan, P.T., Kollias-Baker, C., Leutenegger, C.M., and Jones, J.H. (2002). Does training
402 affect mRNA transcription for cytokine production in circulating leucocytes? *Equine Vet. J.* *34*,
403 154–158.
- 404 Coombs, D.K., Patton, T., Kohler, A.K., Soboll, G., Breathnach, C., Townsend, H.G.G., and
405 Lunn, D.P. (2006). Cytokine responses to EHV-1 infection in immune and non-immune ponies.
406 *Vet. Immunol. Immunopathol.* *111*, 109–116.
- 407 Cordeau, M.-E., Joubert, P., Dewachi, O., Hamid, Q., and Lavoie, J.-P. (2004). IL-4, IL-5 and
408 IFN- γ mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Vet. Immunol.*
409 *Immunopathol.* *97*, 87–96.
- 410 Dahlgren, L.A., Mohammed, H.O., and Nixon, A.J. (2005). Temporal expression of growth
411 factors and matrix molecules in healing tendon lesions. *J. Orthop. Res.* *23*, 84–92.
- 412 Davis, M.S. (2005). Cold weather exercise and airway cytokine expression. *J. Appl. Physiol.*
413 *98*, 2132–2136.
- 414 Debrue, M., Hamilton, E., Joubert, P., Lajoie-Kadoch, S., and Lavoie, J.-P. (2005). Chronic
415 exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17
416 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* *105*, 25–31.

- 417 Desjardins, I., Theoret, C., Joubert, P., Wagner, B., and Lavoie, J.-P. (2004). Comparison of
418 TGF-beta 1 concentrations in bronchoalveolar fluid of horses affected with heaves and of
419 normal controls. *Vet. Immunol. Immunopathol.* *101*, 133–141.
- 420 Dixon, P.M., Railton, D.I., and McGORUM, B.C. (1995). Equine pulmonary disease: a case
421 control study of 300 referred cases. Part 1: Examination techniques, diagnostic criteria and
422 diagnoses. *Equine Vet. J.* *27*, 416–421.
- 423 Ferreira, M.A., Matheson, M.C., Duffy, D.L., Marks, G.B., Hui, J., Le Souëf, P., Danoy, P.,
424 Baltic, S., Nyholt, D.R., Jenkins, M., *et al.* (2011). Identification of IL6R and chromosome
425 11q13.5 as risk loci for asthma. *The Lancet* *378*, 1006–1014.
- 426 Giguère, S., Viel, L., Lee, E., MacKay, R.J., Hernandez, J., and Franchini, M. (2002). Cytokine
427 induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled
428 fluticasone propionate. *Vet. Immunol. Immunopathol.* *85*, 147–158.
- 429 Henríquez, C., Perez, B., Morales, N., Sarmiento, J., Carrasco, C., Morán, G., and Folch, H.
430 (2014). Participation of T regulatory cells in equine recurrent airway obstruction. *Vet.*
431 *Immunol. Immunopathol.* *158*, 128–134.
- 432 Horohov, D.W., Beadle, R.E., Mouch, S., and Pourciau, S.S. (2005). Temporal regulation of
433 cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction. *Vet. Immunol.*
434 *Immunopathol.* *108*, 237–245.
- 435 Horohov, D.W., Breathnach, C.C., Sturgill, T.L., Rashid, C., Stiltner, J.L., Strong, D., Nieman,
436 N., and Holland, R.E. (2008). In vitro and in vivo modulation of the equine immune response
437 by parapoxvirus ovis. *Equine Vet. J.* *40*, 468–472.
- 438 Hue, E., Richard, E., Fortier, C., Fortier, G., Paillot, R., Raue, R., and Pronost, S. (2017). Equine
439 PBMC Cytokines Profile after In Vitro α - and γ -EHV Infection: Efficacy of a Parapoxvirus
440 Ovis Based-Immunomodulator Treatment. *Vaccines* *5*, 28.
- 441 Hue, E.S., Fortier, C.I., Laurent, A.M., Quesnelle, Y.F., Fortier, G.D., Legrand, L.J., and
442 Pronost, S.L. (2016). Development and Validation of a Quantitative PCR Method for Equid
443 Herpesvirus-2 Diagnostics in Respiratory Fluids. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- 444 Kalinina, O., Lebedeva, I., Brown, J., and Silver, J. (1997). Nanoliter scale PCR with TaqMan
445 detection. *Nucleic Acids Res.* *25*, 1999–2004.
- 446 Lanz, S., Gerber, V., Marti, E., Rettmer, H., Klukowska-Rötzler, J., Gottstein, B., Matthews,
447 J.B., Pirie, S., and Hamza, E. (2013). Effect of hay dust extract and cyathostomin antigen
448 stimulation on cytokine expression by PBMC in horses with recurrent airway obstruction. *Vet.*
449 *Immunol. Immunopathol.* *155*, 229–237.
- 450 Lavoie, J.-P., Maghni, K., Desnoyers, M., Taha, R., Martin, J.G., and Hamid, Q.A. (2001).
451 Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type
452 cytokine profile. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *164*, 1410–1413.
- 453 Lavoie, J.P., Cesarini, C., Lavoie-Lamoureux, A., Moran, K., Lutz, S., Picandet, V., Jean, D.,
454 and Marcoux, M. (2011). Bronchoalveolar Lavage Fluid Cytology and Cytokine Messenger
455 Ribonucleic Acid Expression of Racehorses with Exercise Intolerance and Lower Airway
456 Inflammation: Cytokine Expression in IAD. *J. Vet. Intern. Med.* *25*, 322–329.

- 457 Lavoie-Lamoureux, A., Maghni, K., and Lavoie, J.-P. (2010). Optimization of a procedure to
458 accurately detect equine TNF α in serum samples. *Vet. Immunol. Immunopathol.* *138*, 118–123.
- 459 Lavoie-Lamoureux, A., Leclere, M., Lemos, K., Wagner, B., and Lavoie, J.-P. (2012). Markers
460 of Systemic Inflammation in Horses with Heaves. *J. Vet. Intern. Med.* *26*, 1419–1426.
- 461 Li, P., Grigorenko, E., Funari, V., Enright, E., Zhang, H., and Kim, H.L. (2013). Evaluation of
462 a high-throughput, microfluidics platform for performing TaqMan™ qPCR using formalin-
463 fixed paraffin-embedded tumors. *Bioanalysis* *5*, 1623–1633.
- 464 Masaki, K., Suzuki, Y., Kagawa, S., Kodama, M., Kabata, H., Miyata, J., Tanaka, K., Fukunaga,
465 K., Sayama, K., Oguma, T., *et al.* (2014). Dual Role of Interleukin-23 in Epicutaneously-
466 Sensitized Asthma in Mice. *Allergol. Int.* *63*, 13–22.
- 467 Meyts, I., Hellings, P.W., Hens, G., Vanaudenaerde, B.M., Verbinnen, B., Heremans, H.,
468 Matthys, P., Bullens, D.M., Overbergh, L., Mathieu, C., *et al.* (2006). IL-12 Contributes to
469 Allergen-Induced Airway Inflammation in Experimental Asthma. *J. Immunol.* *177*, 6460–6470.
- 470 Min, J.L., Barrett, A., Watts, T., Pettersson, F.H., Lockstone, H.E., Lindgren, C.M., Taylor,
471 J.M., Allen, M., Zondervan, K.T., and McCarthy, M.I. (2010). Variability of gene expression
472 profiles in human blood and lymphoblastoid cell lines. *BMC Genomics* *11*, 96.
- 473 Niedźwiedź, A., Borowicz, H., Kubiak, K., Nicpoń, J., Skrzypczak, P., Jaworski, Z., Cegielski,
474 M., and Nicpoń, J. (2016). Evaluation of serum cytokine levels in recurrent airway obstruction.
475 *Pol. J. Vet. Sci.* *19*.
- 476 Orard, M., Hue, E.S., Couroucé, A.M., Bizon-Mercier, C., Toquet, M.-P., Moore-Colyer, M.,
477 Couetil, L.L., Pronost, S., Paillot, R., Demoor, M., *et al.* (2019). The influence of hay steaming
478 on clinical signs and airway immune response in severe asthmatic horses. *BMC Vet. Res.* *in*
479 *press*.
- 480 Pacholewska, A., Jagannathan, V., Drögemüller, M., Klukowska-Rötzler, J., Lanz, S., Hamza,
481 E., Dermitzakis, E.T., Marti, E., Leeb, T., and Gerber, V. (2015). Impaired Cell Cycle
482 Regulation in a Natural Equine Model of Asthma. *PLOS ONE* *10*, e0136103.
- 483 Saulez, M.N., Godfroid, J., Bosman, A., Stiltner, J.L., Breathnach, C.C., and Horohov, D.W.
484 (2010). Cytokine mRNA expressions after racing at a high altitude and at sea level in horses
485 with exercise-induced pulmonary hemorrhage. *Am. J. Vet. Res.* *71*, 447–453.
- 486 Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout,
487 A., and Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J.*
488 *Biotechnol.* *75*, 291–295.
- 489 Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and
490 Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by
491 geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* *3*, RESEARCH0034.
- 492 Vinther, A.M.L., Heegaard, P.M.H., Skovgaard, K., Buhl, R., Andreassen, S.M., and Andersen,
493 P.H. (2016). Characterization and differentiation of equine experimental local and early
494 systemic inflammation by expression responses of inflammation-related genes in peripheral
495 blood leukocytes. *BMC Vet. Res.* *12*.

496 **Figure 1:** Fold difference of cytokines expression after PBMC stimulation with EHV-1, EHV-
497 4, EHV-2, Zylexis, Concanavaline A, LPS and PMA-ionomycine obtained with qPCR (A) and
498 with nsPCR (B). *ACTB Actin beta; GUS glucoronidase; GAPDH Glyceraldehyde 3-phosphate*
499 *dehydrogenase; IFN Interferon; IL interleukin; TGF Transforming Growth Factor; TNF tumor*
500 *necrosis factor*

501 **Figure 2:** Fold difference of cytokines expression in the blood of CTL and sEA before and
502 after the initiation of each challenge. *sEA, severe equine asthma; CTL, control; d-2, two days*
503 *before challenge; d+5, five days after challenge. *, **, *** significant difference between*
504 *groups or timepoints ($P < 0.05, 0.01$ and 0.001 , respectively), based on ANOVA investigation.*

505 **Figure 3:** Concentrations of sera cytokines of CTL and sEA before and after the initiation of
506 each challenge. *sEA, severe equine asthma; CTL, control; d-2, two days before challenge;*
507 *d+5, five days after challenge. *, **, *** significant difference between groups or timepoints*
508 *($P < 0.05, 0.01$ and 0.001 , respectively), based on ANOVA investigation.*

509 **Supplementary Figure 1:** Pearson's correlations (95% confidence interval) between Ct values
510 (qPCR) and Cq values (nsPCR). *ACTB Actin beta; GUS glucoronidase; GAPDH*
511 *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; IFN Interferon; IL interleukin; TGF*
512 *Transforming Growth Factor; TNF tumor necrosis factor (95% CI); *, **, **, significant*
513 *correlation with absolute value of $R > 0.7$*

514 **Supplementary Figure 2:** Pearson's correlations (95% confidence interval) between the
515 absolute quantity obtained by qPCR and nsPCR. *ACTB Actin beta; GUS glucoronidase;*
516 *GAPDH Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; IFN Interferon; IL interleukin; TGF*
517 *Transforming Growth Factor; TNF tumor necrosis factor (95% CI); *, **, **, significant*
518 *correlation with absolute value of $R > 0.7$*

519 **Supplementary Figure 3:** Pearson's correlations (95% confidence interval) between the fold
520 difference of each target obtained by qPCR and nsPCR. *ACTB Actin beta*; *GUS glucoronidase*;
521 *GAPDH Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*; *IFN Interferon*; *IL interleukin*; *TGF*
522 *Transforming Growth Factor*; *TNF tumor necrosis factor (95% CI)*; *, **, ***, significant
523 correlation with absolute value of $R > 0.7$

524 **Supplementary Figure 4:** Bland-Altman Plot and 95 % limits of agreement of the difference
525 between the number of cycle threshold using qPCR (Ct values) and nsPCR (Cq values) from
526 mean of the two measurements. Black line represents the bias. The lower and the upper limit
527 of agreement were determined from bias -1.96 SD and bias +1.96 SD. *ACTB Actin beta*; *GUS*
528 *glucoronidase*; *GAPDH Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*; *IFN Interferon*; *IL*
529 *interleukin*; *TGF Transforming Growth Factor*; *TNF tumor necrosis factor*; *SD, standard*
530 *deviation*.

531 **Supplementary Figure 5:** Bland-Altman Plot and 95 % limits of agreement of the difference
532 the absolute quantity obtained by qPCR and nsPCR from mean of the two measurements. Black
533 line represents the bias. The lower and the upper limit of agreement were determined from bias
534 -1.96 SD and bias +1.96 SD. *ACTB Actin beta*; *GUS glucoronidase*; *GAPDH Glyceraldehyde*
535 *3-phosphate dehydrogenase*; *IFN Interferon*; *IL interleukin*; *TGF Transforming Growth*
536 *Factor*; *TNF tumor necrosis factor*; *SD, standard deviation*.

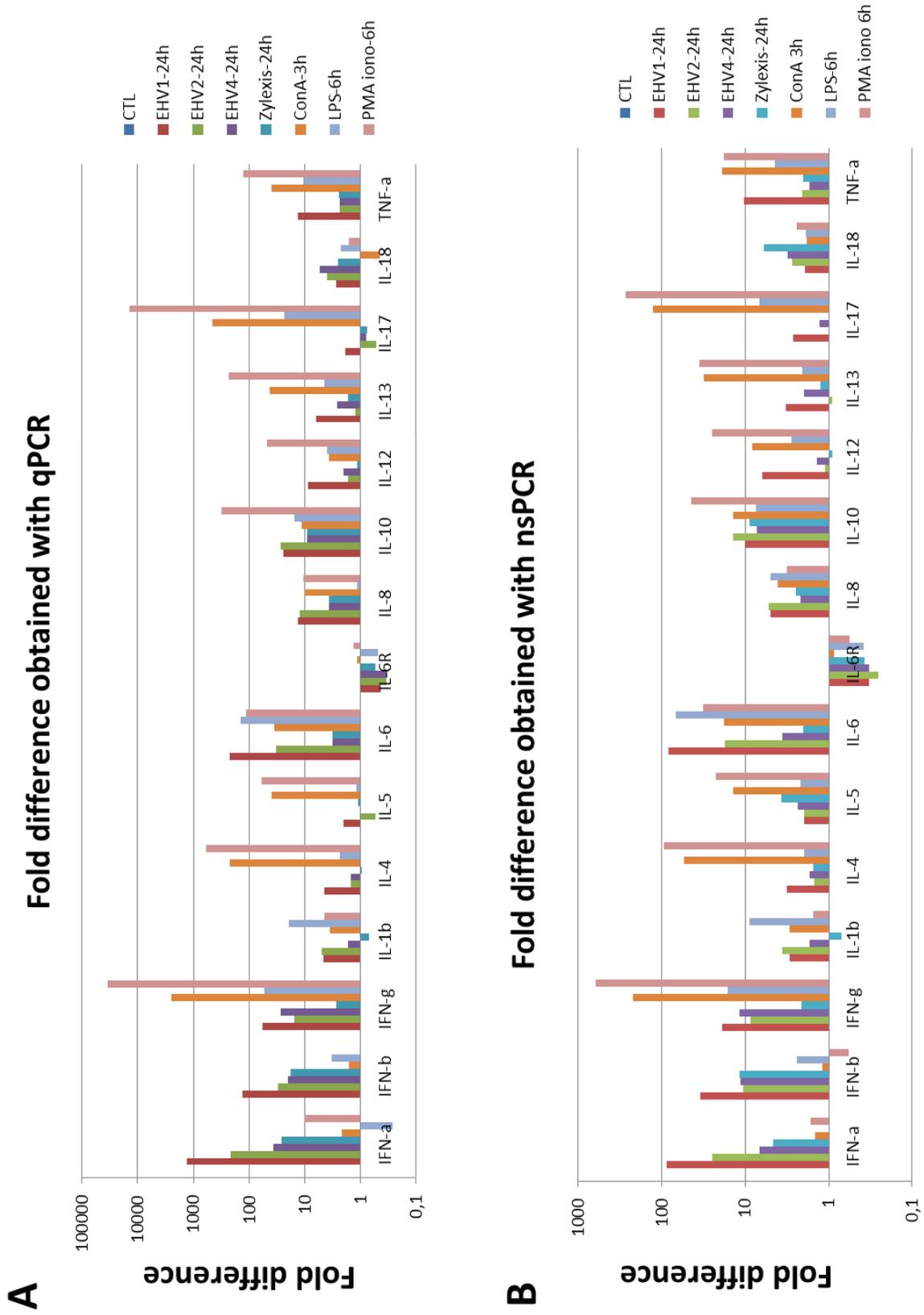
537 **Supplementary Figure 6:** Bland-Altman Plot and 95 % limits of agreement of the difference
538 between the fold difference of each target obtained by qPCR and nsPCR from mean of the two
539 measurements. Black line represents the bias. The lower and the upper limit of agreement were
540 determined from bias -1.96 SD and bias +1.96 SD. *ACTB Actin beta*; *GUS glucoronidase*;
541 *GAPDH Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*; *IFN Interferon*; *IL interleukin*; *TGF*
542 *Transforming Growth Factor*; *TNF tumor necrosis factor*; (95% CI); *SD, standard deviation*.

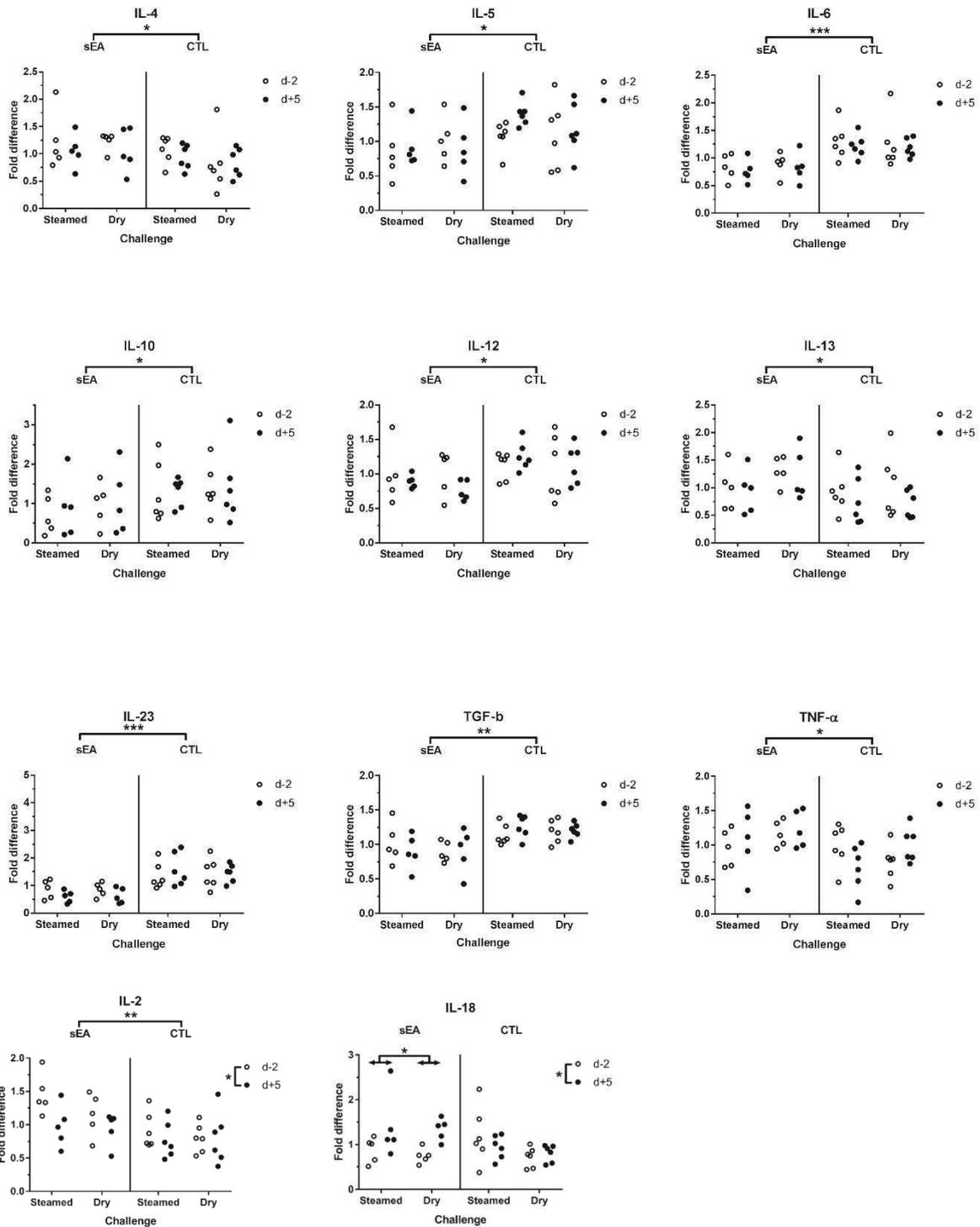
543 **Supplementary Table S1:** Nucleotide sequences of equine-specific primers used in real-time
544 PCR assays and/or nanoscale PCR. (#) represents modifications from previously published
545 literature; *ACTB* Actin beta; *GUS* glucoronidase; *GAPDH* Glyceraldehyde 3-phosphate
546 dehydrogenase; *IFN* Interferon; *IL* interleukin; *TGF* Transforming Growth Factor; *TNF* tumor
547 necrosis factor; *N.A.* not available

548 **Supplementary Table S2:** Characteristics of the ELISA used for measuring cytokine
549 concentrations in serum. *CA* capture antibody; *DA* detection antibody; *IFN* Interferon; *IL*
550 interleukin; *TNF* tumor necrosis factor.

551 **Supplementary Table 3:** Intra-class correlation coefficient (ICC) of each target (Ct/Cq values,
552 L-quant values and fold difference) based on evaluation of qPCR and nsPCR. *ACTB* Actin beta;
553 *GUS* glucoronidase; *GAPDH* Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *IFN* Interferon; *IL*
554 interleukin; *TGF* Transforming Growth Factor; *TNF* tumor necrosis factor; (95% CI).

555 **Figure 1:**



557 **Figure 2:**

558

559

560

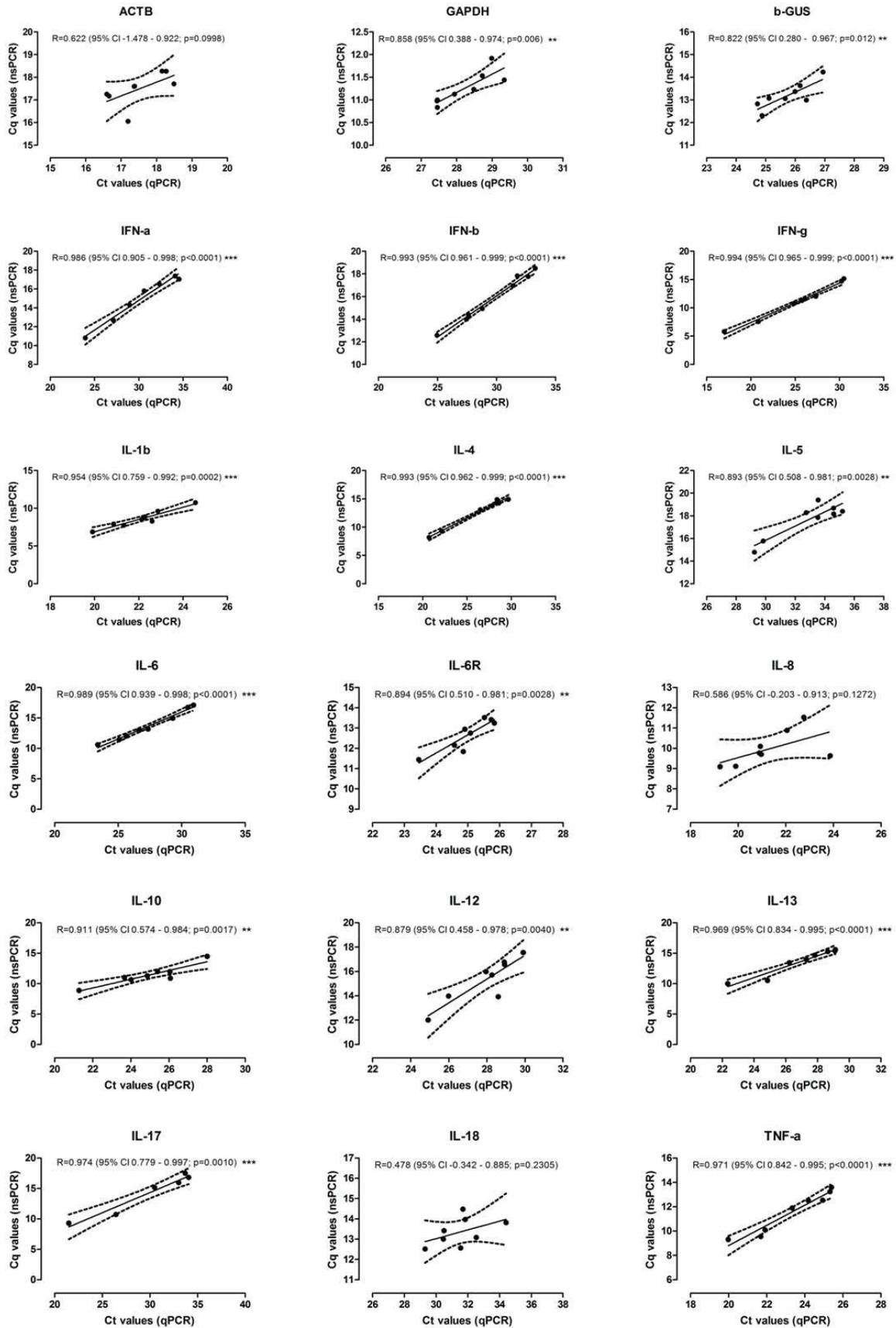
561

562

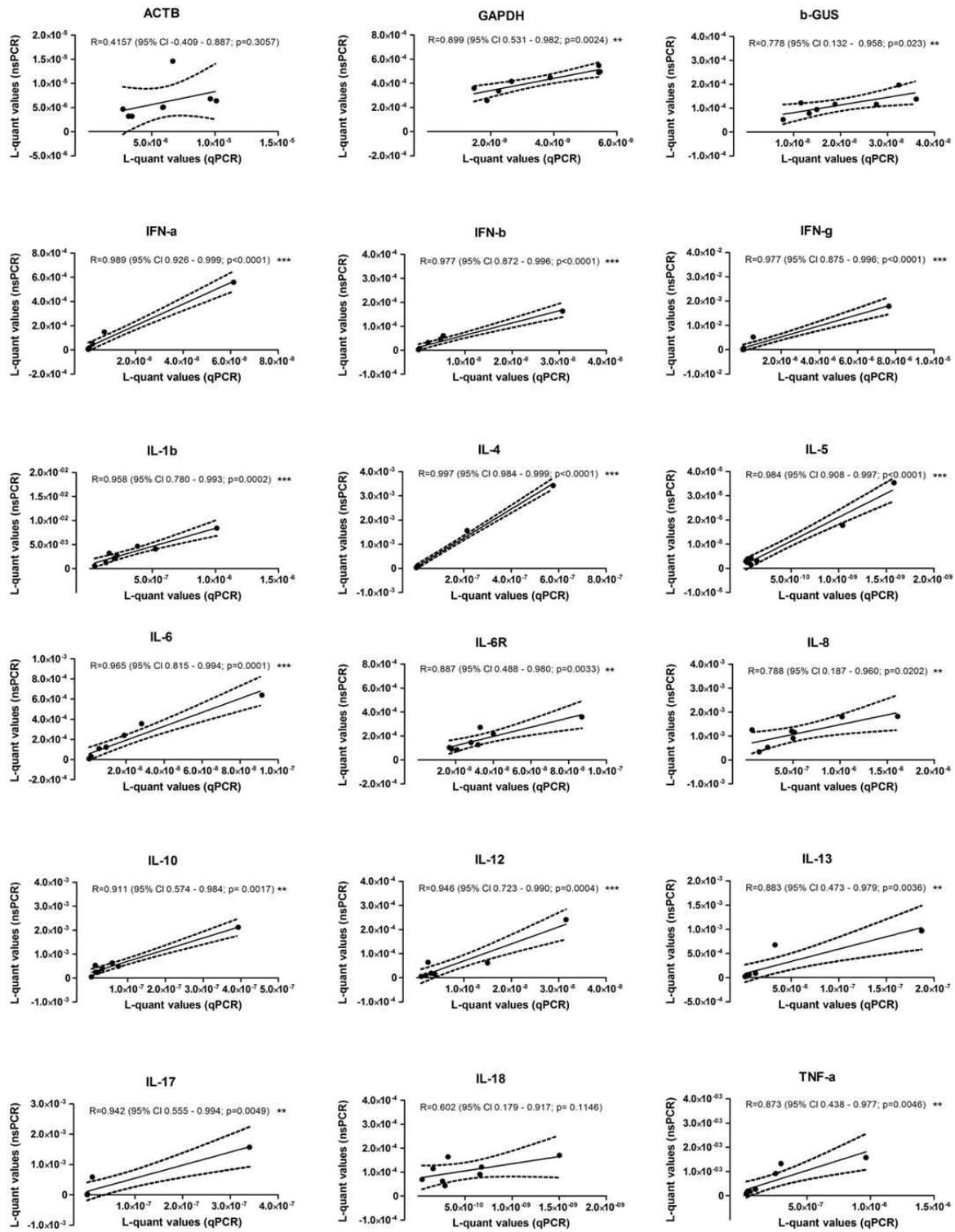
563 **Figure 3:**

564

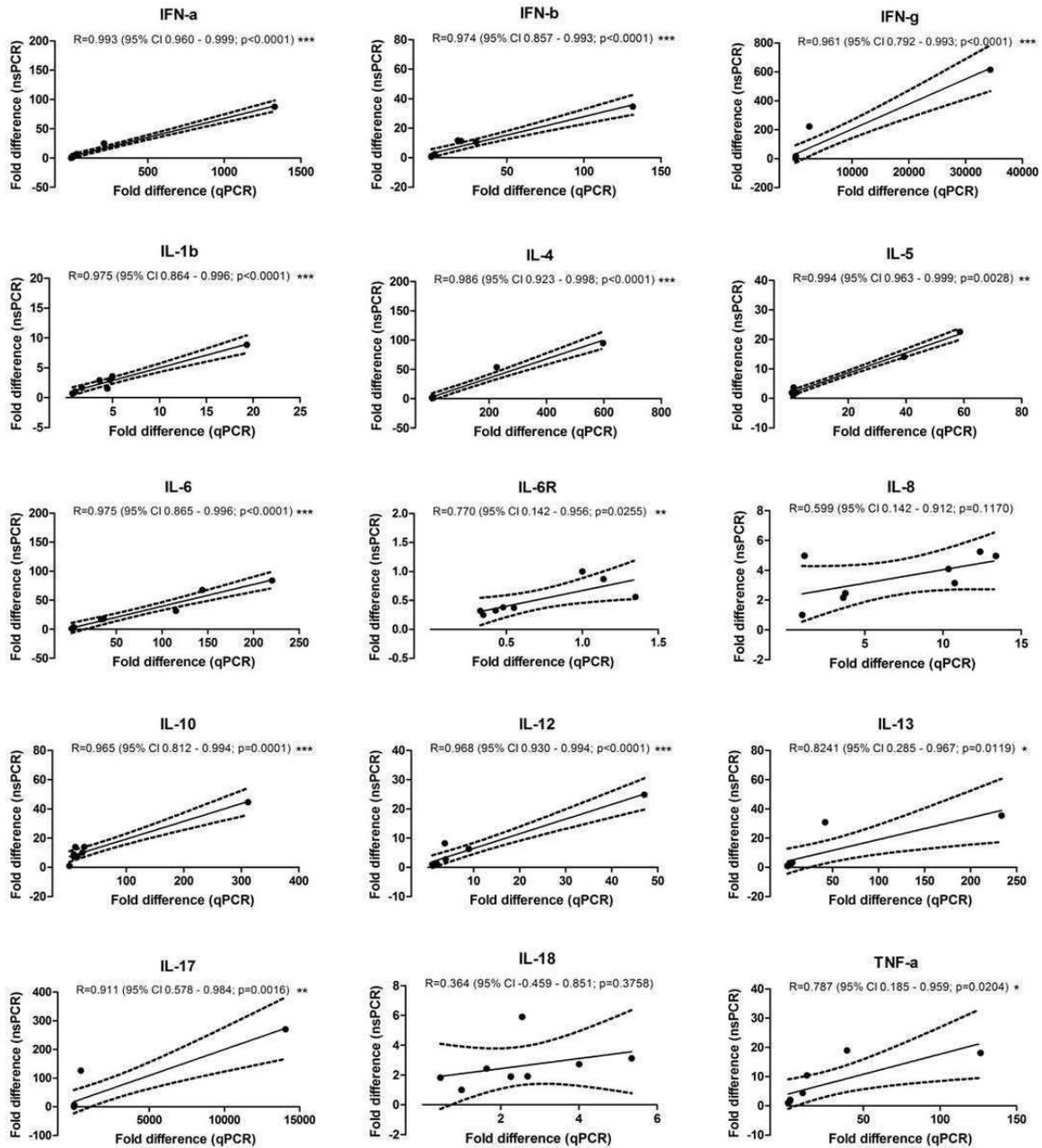
565 Supplementary Figure 1:



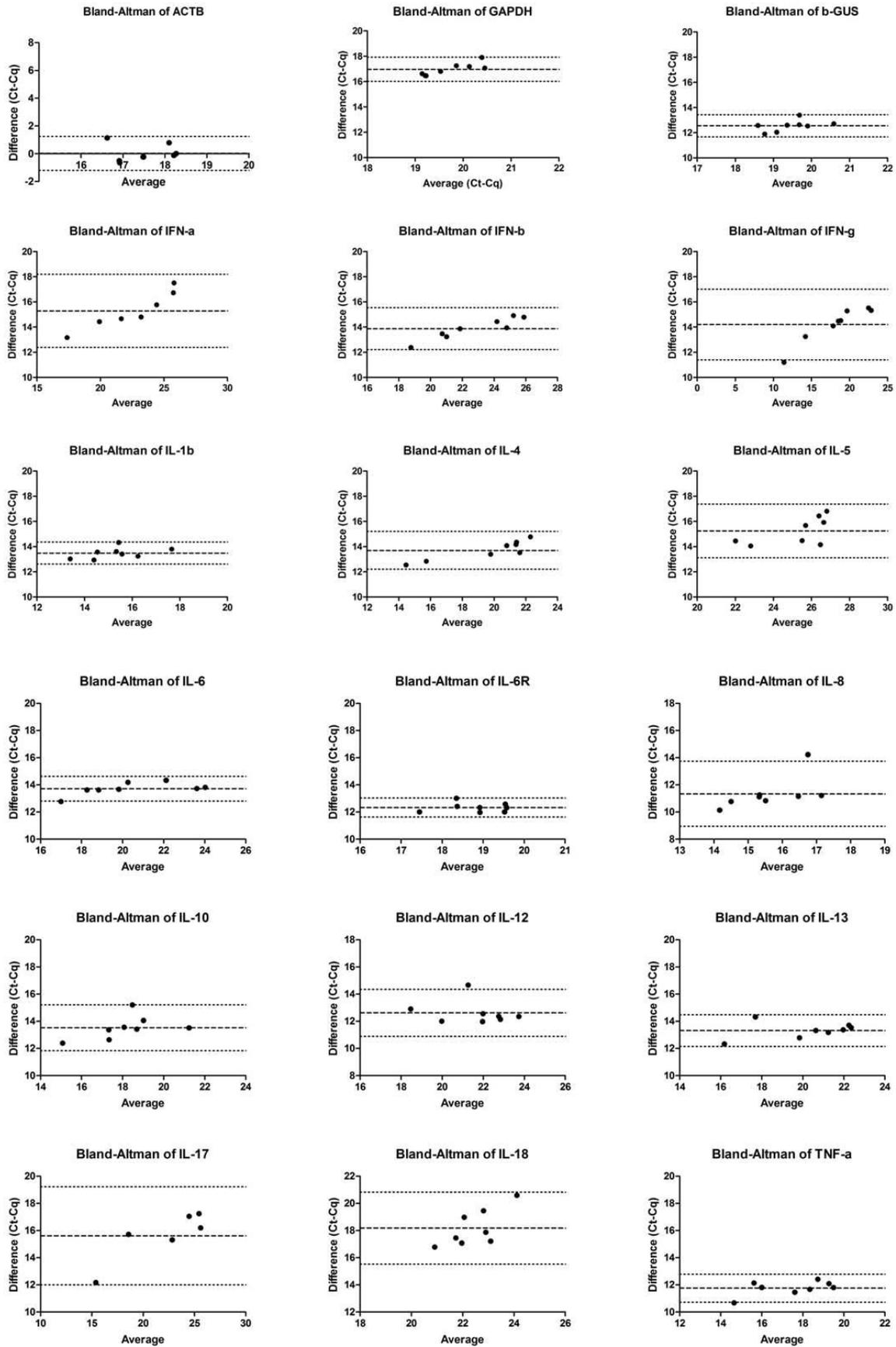
567 Supplementary Figure 2:

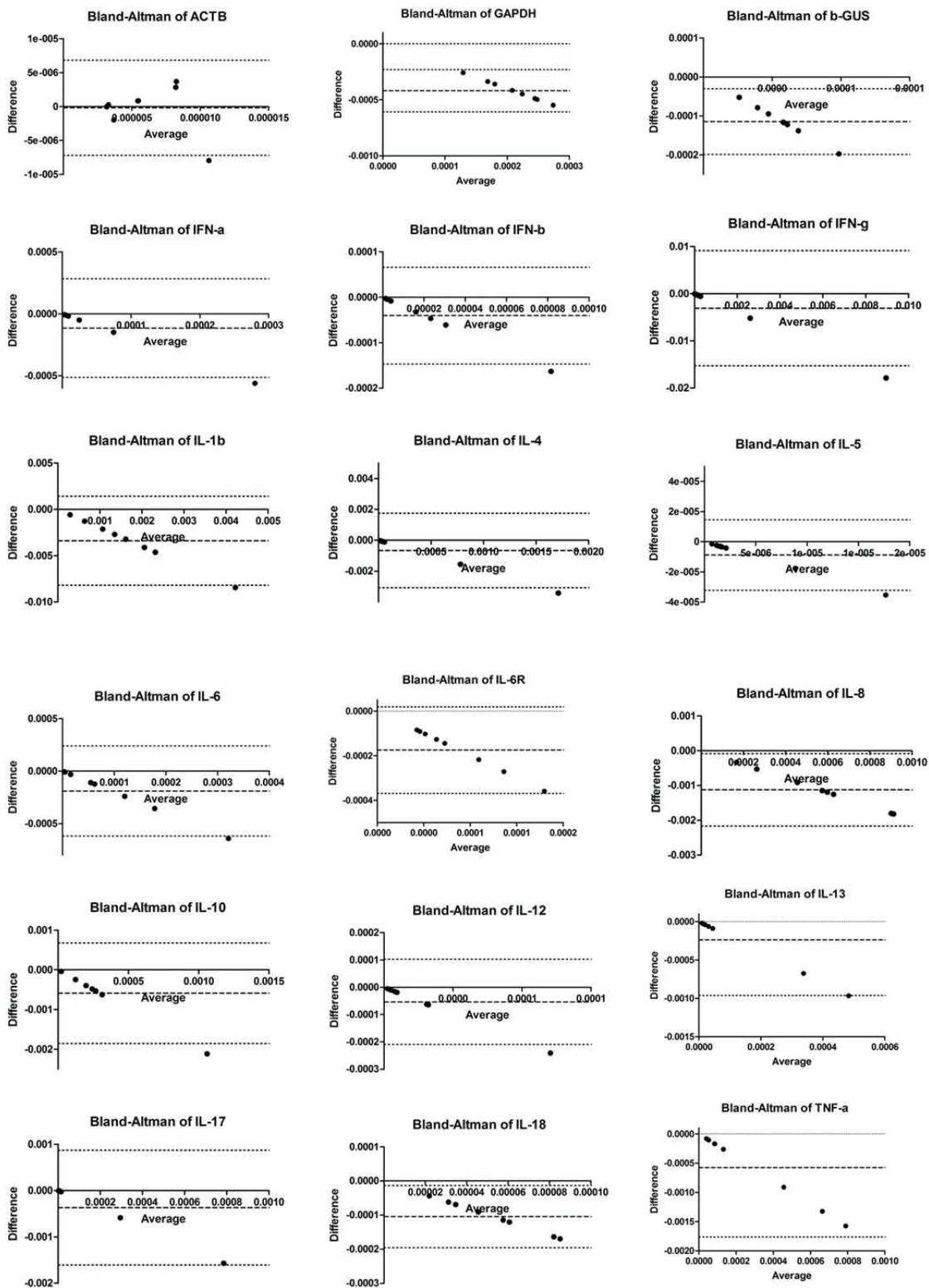


569 Supplementary Figure 3:

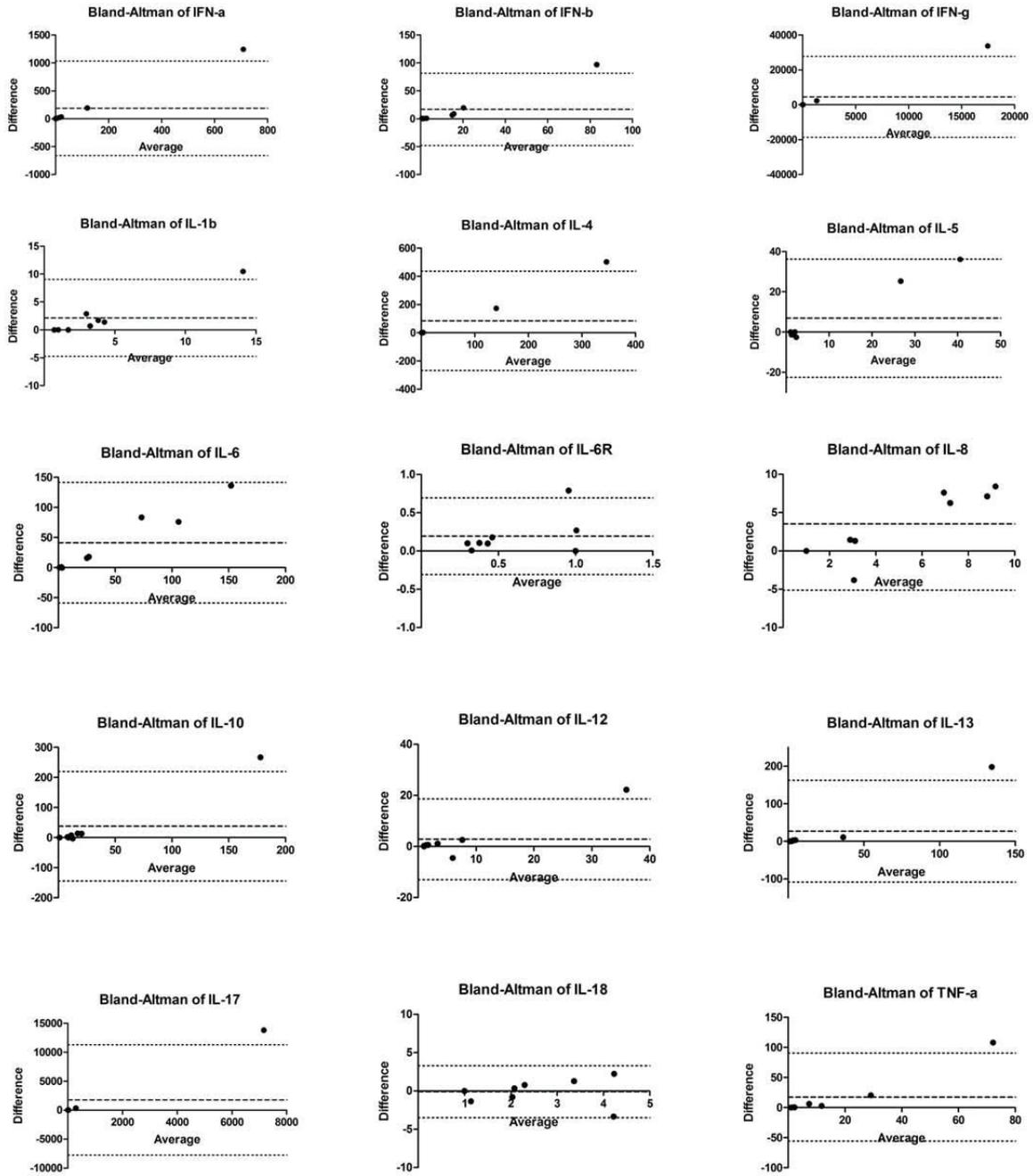


571 **Supplementary Figure 4:**



573 **Supplementary Figure 5:**

575 **Supplementary Figure 6:**



577 **Supplementary Table S1:**

Target	qPCR	nsPCR	Primers and Probe (5'-3')	Product size (bp)	GenBank Accession	References
ACTB	yes	no	Forward: AGCGAAATCGTGCGTGACA Reverse: GCCATCTCCTGCTCGAAGT Probe: CAAGGAGAAGCTCTGCTATGTCGCCCT	70	NM_001081838	(Coombs <i>et al.</i> , 2006)
ACTB	No	Yes	Ec04176172_gH (Life technologies)	N.A.	NM_001081838	N.A.
β-GUS	Yes	Yes	Forward: GAAAGGTCTGCTGGAACAGTATCA Reverse: TCCAGATGAGCTCTCCAACCA Probe: CAAAAACGCAAAGAAT	77	EF485029.1	(Orard <i>et al.</i> , 2019)
GAPDH	Yes	Yes	Forward: AAGTGGATATTGTCGCCATCAAT Reverse: AACCTGCCATGGGTGGAATC Probe: ACTACATGGTCTACATGTTTCAGTA (#)	88	AF097178	adapted from (Colahan <i>et al.</i> , 2002)
IFN-α	Yes	Yes	Forward: CCTTACTGATGGCCCTGGTG(#) Reverse: ATTCTCCTCATTTGTCCCAGGA (#) Probe: CTGCCTCACACCCATAG	124	NM_001099441	adapted from (Horohov <i>et al.</i> , 2008)
IFN-β	Yes	Yes	Forward: ACACCTGGCGTATTTTCAGAAGA Reverse: CACAAGGAGGTTCTTAACGATGGT Probe: CTAGCACTGGCTGGAATGA (#)	74	NM_001099440	(Horohov <i>et al.</i> , 2008)
IFN-γ	Yes	Yes	Forward: GGAGGACCTGTTCGTTAAGTTCTTT (#) Reverse: TTTGCGCTGGACCTTCAGA Probe: ATTCAGATTCCGGTAAATGA	103	NM_001081949	adapted from (Horohov <i>et al.</i> , 2008)
IL-1β	Yes	Yes	Forward: CCGACACCAGTGACATGATGA Reverse: TCCTCCTCAAAGAACAGGTCATTC Probe: CTTACTGCAGCGGCAAT (#)	64	NM_001082526	adapted from (Saulez <i>et al.</i> , 2010)
IL-2	Yes	No	Forward: CAAGAATCCCAAACCTCTCCAAGAT Reverse: TCGAGAGAAAGTTTTTTAGCATTTC Probe: CCCAAGAAGGCCACAGA (#)	134	NM_001085433	adapted from (Colahan <i>et al.</i> , 2002)
IL-4	Yes	Yes	Forward: TCGTGCATGGAGCTGACTGTA Reverse: CAGCCCTGCAGATTTCCTTTC (#) Probe: GCCCGAAGAACACAGA (#)	76	NM_001082519	adapted from (Ainsworth <i>et al.</i> , 2003)
IL-5	Yes	Yes	Forward: TGCTTCTGCATTTGAGTGTGCTA Reverse: TGTTTCATGGGACTTTCTACAGCAA Probe: CTCTTGGAGCTGCCTAC (#)	75	NM_001082499	adapted from (Davis, 2005)
IL-6	Yes	Yes	Forward: GATGCTTCCAATCTGGGTTC (#) Reverse: GCATAGTCTTGATGTTTTCTTTTC (#) Probe: ATCAGGCAGGTCTCCTG	132	NM_001082496	adapted from (Saulez <i>et al.</i> , 2010)
IL-6R	Yes	Yes	Forward: GAAGGCGGCTGGTTCTGA Reverse: CCTGGTAGCACGAATAGTTTCCA Probe: TTCCGTGCAGCTCAG (#)	63	XM_005610076	(Orard <i>et al.</i> , 2019)
IL-8	Yes	Yes	Forward: GGGCCACACTGCGAAAAC (#) Reverse: GCACAATAATCTGCACCCACTTT	97	NM_001083951	adapted from (Allen <i>et al.</i> , 2007)

			Probe: GAAATCATTGTAAAGCTCG (#)			
IL-10	Yes	Yes	Forward: GACATCAAGGAGCACGTGAACTC Reverse: TGCTCCACTGCCTTGCTCTT Probe: GAAATCATTGTAAAGCTCG (#)	113	NM_001082490	adapted from (Colahan <i>et al.</i> , 2002)
IL-12	Yes	Yes	Forward: ACCAGGCCAGGAATGTTT Reverse: TGACGGTCCTCAGCAGGTTT Probe: TGCCTCAACCACTCC	59	NM_001082511	(Orard <i>et al.</i> , 2019)
IL-13	Yes	Yes	Forward: CCCTGGAGTCCCTGAGCAA Reverse: CATCTTCCGCGTGTTTTGG Probe: CCACCTGCAGTGCCAT (#)	59	NM_001143791	(Orard <i>et al.</i> , 2019)
IL-17	Yes	Yes	Forward: ATCGTGAAGGCGGGAATAGTAA Reverse: TCGTTTTCCGGTTAAGGACG Probe: ACAAGAACTTCCCTCAGAAT (#)	112	AY014959	adapted from (Ainsworth <i>et al.</i> , 2007)
IL-18	Yes	Yes	Forward: GAAATCAACCTGTGTTTGAGGATATG Reverse: TCACAGAGATGGTTACCGCTAGAC Probe: ATTGTACAGACAACGCACCC	126	NM_001082512	(Orard <i>et al.</i> , 2019)
IL-23	Yes	No	Forward: CCCATATCCAGTGCGAGGAT Reverse: CTTTGCAAGCAGGGCTGACT Probe: TGTGATCCTGAAGGACT	70	NM_001082522	(Orard <i>et al.</i> , 2019)
TGF-β	Yes	No	Forward: TCCTGGCGCTACCTCAGTAAC Reverse: TGACATCAAAGGACAGCCATTC Probe: CTGCTGACCCCCAGCGACTCG	70	NM_001081849	(Dahlgren <i>et al.</i> , 2005)
TNF-α	Yes	Yes	Forward: CTCTGCCTGCTGCACTTIG (#) Reverse: GGGCTACAGGCTTGTCACCTG (#) Probe: CCAGACACTCAGATCAT	134	NM_001081819	adapted from (Horohov <i>et al.</i> , 2008)

579 **Supplementary Table S2:**

Cytokine	Manufacturer	CA ($\mu\text{g/ml}$)	DA ($\mu\text{g/ml}$)	Range (pg/ml)
IL-1 β	R&D Systems	2.0	0.15	23.44 – 3 000
IL-2	R&D Systems	0.8	0.2	35.16 – 4 500
IL-4	R&D Systems	0.8	0.8	15.63 – 2 000
IL-6	R&D Systems	0.8	0.1	46.88 – 3 000
IL-10	R&D Systems	0.8	0.1	115.63 – 14 800
IFN- γ	R&D Systems	0.4	0.1	31.25 - 2 000
TNF- α	R&D Systems	0.4	0.3	7.81 – 1 000

581 **Supplementary Table 3:**

	Ct/Cq values			Absolute quantity values			Fold difference		
	ICC	95% CI	concordance degree	ICC	95% CI	concordance degree	ICC	95% CI	concordance degree
ACTB	0,6210	0,1809 - 0,8539	substantial	0,4008	0,1186 to 0,7479	fair			
GAPDH	0,993	0,9793 - 0,9976	almost perfect	0,9159	0,7697 - 0,9709	almost perfect	ACTB		
bGUS	0,9816	0,9463 - 0,9937	almost perfect	0,8009	0,5060 - 0,9281	substantial	GAPDH		
IFN-a	0,7491	0,3625 - 0,9157	substantial	0,1555	0,4090 - 0,6339	slight	bGUS	0,02520	0,4935 - 0,5307
IFN-b	0,7877	0,4789 - 0,9230	substantial	0,2384	0,2919 - 0,6566	fair	IFN-a	0,3682	0,1561 - 0,7306
IFN-g	0,5898	0,1329 - 0,8400	moderate	0,122	0,3979 - 0,5826	slight	IFN-b	0,04211	0,4634 - 0,5269
IL-1b	0,9385	0,8279 - 0,9788	almost perfect	0,521	0,03402 - 0,8081	moderate	IFN-g	0,6142	0,1702 - 0,8509
IL-4	0,7226	0,3533 - 0,8970	substantial	0,1432	0,3795 - 0,5967	slight	IL-1b	0,2114	0,3177 - 0,6401
IL-5	0,9027	0,7367 - 0,9661	almost perfect	0,2374	0,2928 - 0,6560	fair	IL-4	0,5405	0,06104 - 0,8173
IL-6	0,7851	0,4737 - 0,9220	substantial	0,2998	0,2302 - 0,6927	fair	IL-5	0,4675	0,03687 - 0,7820
IL-6R	0,9746	0,9265 - 0,9914	almost perfect	0,641	0,2129 - 0,8627	substantial	IL-6	0,5787	0,1162 - 0,8349
IL-8	0,9415	0,8359 - 0,9799	almost perfect	0,7167	0,3427 - 0,8946	substantial	IL-6R	0,06680	0,4437 - 0,5446
IL-10	0,8895	0,7044 - 0,9614	almost perfect	0,3205	0,2084 - 0,7044	fair	IL-8	0,1568	0,3676 - 0,6055
IL-12	0,8809	0,6837 - 0,9682	almost perfect	0,2032	0,3254 - 0,6350	fair	IL-10	0,7660	0,4357 - 0,9145
IL-13	0,8169	0,5396 - 0,9343	almost perfect	0,1912	0,3365 - 0,6275	slight	IL-12	0,2142	0,3151 - 0,6418
IL-17	0,6194	0,07036 - 0,8804	substantial	0,1697	0,4479 - 0,6777	slight	IL-13	0,0453	0,5625 - 0,4973
IL-18	0,9798	0,9412 - 0,9931	almost perfect	0,743	0,3914 - 0,9053	substantial	IL-17	0,3612	0,1640 - 0,7268
TNF-a	0,8446	0,6000 - 0,9448	almost perfect	0,3391	0,1884 - 0,7147	fair	IL-18	0,1621	0,3629 - 0,6090
							TNF-a		

Annexe 5 : Article Orard et *al.*, 2015

Influence of bronchoalveolar lavage volume on cytological profiles and subsequent diagnosis of inflammatory airway disease in horses. *Vet J.* 2015.

Marie Orard , Marianne Depecker, Erika Hue, Pierre-Hugues Pitel, Anne Couroucé-Malblanc, Eric A. Richard.



Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tvj

Short Communication

Influence of bronchoalveolar lavage volume on cytological profiles and subsequent diagnosis of inflammatory airway disease in horses

Marie Orard ^a, Marianne Depecker ^b, Erika Hue ^{a,c}, Pierre-Hugues Pitel ^a, Anne Couroucé-Malblanc ^b, Eric A. Richard ^{a,*}^a Normandie Université, UNICAEN, SF 4206 – ICORE/LABÉO Frank Duncombe, 1 route de Rosel, 14053 Caen cedex 4, France^b LUNAM Université, ONIRIS, UPSP 5304 – Laboratoire de Physiopathologie animale et de Pharmacologie fonctionnelle, Atlanpôle – La Chantrerie, BP40706, 44307 Nantes cedex 3, France^c Normandie Université, UNICAEN, EA 4655 – U2RM, 14032 Caen, France

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 29 September 2015

Keywords:

Horse

Bronchoalveolar lavage fluid

Cytology

Inflammatory airway disease

ABSTRACT

The aim of the study was to determine whether instillation of either 250 mL or 500 mL of saline for bronchoalveolar lavage (BAL) would influence cytological confirmation of inflammatory airway disease (IAD). Thirty client-owned Standardbred racehorses were sampled via endoscopy with 250 mL of saline in one lung and 500 mL in the contralateral lung. The procedure was repeated 72 h later, reversing the volume per lung. The proportions of BAL fluid (BALF) recovered were significantly higher and neutrophil percentages significantly lower with the larger volume. A poor agreement was found between methodologies in terms of final diagnosis, when based on proportions of neutrophils (>10% from at least one lung). Within the recommended range (250–500 mL), the instilled volume significantly influenced cytological profiles. Establishing specific BALF reference values is warranted.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Inflammatory airway disease (IAD) is characterised clinically by poor-performance, coughing and excess tracheal mucus (Robinson, 2003). The final diagnosis is confirmed by cytological examination of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid (BALF) (Couëtil et al., 2007), which reveals moderately increased proportions of neutrophils and/or mast cells and/or eosinophils.

Few data are available about the volume of fluid instilled and the subsequent BALF cytology obtained. Higher proportions of neutrophils and lower proportions of mast cells were found following instillation of small (50 mL) compared to larger (350 mL) volumes (Sweeney et al., 1992). A total volume of 250–500 mL of BALF has been recommended for performing BAL (Robinson, 2001), but this is a wide range. Also, BALF samples collected simultaneously from both lungs of the same horses were recently found to differ; neutrophil percentages were significantly higher in the right compared to the left lung (Depecker et al., 2014). The aim of the present study was to determine whether instillation of the highest volume of the recommended range (250–500 mL) in both lungs would influence BALF cytological profiles and the subsequent diagnosis of IAD in racehorses.

Thirty client-owned Standardbred racehorses (aged 3–9 years), located in three different training centres (10 per centre) and actively involved in training or racing, were randomly included

whatever their level of performance. Horses were free of any clinical evidence of respiratory disease at rest. The study was approved by the Animal Ethic Committee (CEEA-PdL 2015.70; 15 July 2015), and informed consent was provided by all owners.

Samples were performed by the same operator at 72 h interval, both in the left and right lungs according to previously published procedures (Depecker et al., 2014). On Day 1, the endoscope was randomly introduced within one lung and 250 mL (two boluses of 125 mL) was manually instilled and immediately aspirated. The channel was flushed and the endoscope introduced in the contralateral lung, where 500 mL (two boluses of 250 mL) was instilled and aspirated. On Day 4, the procedure was repeated, reversing the volume instilled per lung. Samples were kept in EDTA tubes at +4 °C for cytological preparation within 12 h.

All laboratory analyses were conducted in a blinded manner. Total cell count was performed automatically (ADVIA 120, Siemens Healthcare Diagnostics); 300 µL of BALF samples was cytocentrifuged (80 g, 10 min), stained with May–Grünwald–Giemsa, and differential cell counts performed on 300 leukocytes. Horses exhibiting BALF samples with >10% neutrophils were classified as 'IAD'. Any BALF samples with ≤10% neutrophils were classified as 'control' (CTL) cytology.

Continuous data that were not normally distributed, as assessed by Shapiro–Wilk *W* test, were log-transformed (Prism, GraphPad). The effect of instilled volume on cytological profiles was evaluated by ANOVA and Tukey–Kramer post-hoc test (General Linear Model), with sampling day and training centre as covariates (NCSS). Agreement among methodologies for IAD diagnosis was

* Corresponding author. Tel.: +33 231 471 915.

E-mail address: eric.richard@calvados.fr (E.A. Richard).

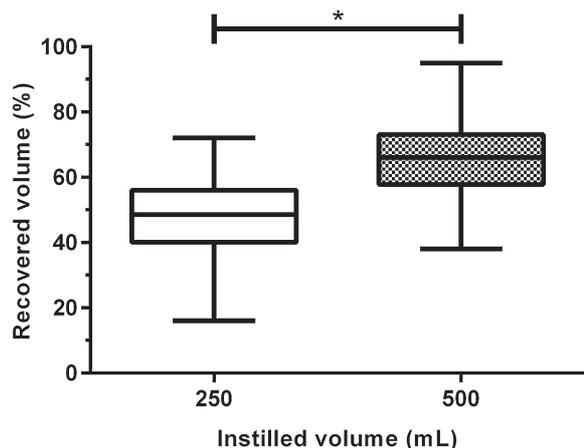


Fig. 1. Proportions of bronchoalveolar lavage fluid recovered from both lungs of 29 horses after instillation of either 250 mL or 500 mL of saline. *Significantly different ($P < 0.05$).

measured using Cohen's kappa (κ) coefficient; the corresponding proportions were compared by McNemar test with continuity correction. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

One horse was excluded because of reluctance during BAL procedure on Day 4. A total of 29 horses (116 BALF samples) were investigated. Total cell count ($P = 0.02$), as well as lymphocyte, macrophage and neutrophil proportions ($P < 0.001$) were significantly influenced by the horse's training centre of origin. Also, BALF samples collected on Day 4 yielded a higher proportion of neutrophils than on Day 1 ($P = 0.03$), mainly for horses from one training centre (Appendix: Supplementary Fig. S1). Controlling for these confounding factors, proportions of recovered BALF were significantly higher ($P < 0.001$; Fig. 1) and neutrophil percentages were significantly lower ($P = 0.02$; Table 1) when instilling 500 mL compared with 250 mL. No significant differences were observed in total cell count or in proportions of other cell types (Table 1).

When 250 mL was instilled, five horses were diagnosed as CTL (both lungs) and 24 exhibited BALF cytology from at least one lung that was consistent with IAD. Similarly, 11 horses were CTL (both lungs) and 18 were compatible with IAD (≥ 1 lung) when instilling 500 mL. Overall, 25 horses were classified as IAD from at least one lung. Among these, the final diagnosis matched for 17 horses and conclusions were divergent among methodologies for 8/25 (32%) horses. A poor agreement only ($\kappa = 0.30$; CI 0.02–0.70) was found between volumes. The proportions of horses classified as CTL or IAD according to volume were however not significantly different ($P = 0.08$).

Table 1

Total and differential cell counts (median; 1st to 3rd quartile) in bronchoalveolar lavage fluid from both lungs of 29 horses after instillation of either 250 mL or 500 mL of saline.

BALF cell type	Instilled volume	
	250 mL	500 mL
Total cell count (/mm ³)	430; 323–585	340; 265–505
Neutrophils (%)	14.0; 7.8–20.3*	10; 6.8–16.0*
Eosinophils (%)	0.0; 0.0–0.0	0.0; 0.0–0.0
Mast cells (%)	2.0; 1.0–2.0	2.0; 1.0–3.0
Lymphocytes (%)	43.0; 28.8–52.5	35.0; 26.0–52.0
Total macrophages (%)	38.5; 31.8–56.0	47.5; 34.8–55.3
Haemosiderophages (%)	2.0; 0.0–4.3	2.0; 0.0–10.3

* Significantly different from each other ($P < 0.05$), controlling for training centres and day of sampling.

This is, to our knowledge, the first study in which the influence on BALF cytology of two different volumes of lavage fluid within the recommended range (250–500 mL) has been investigated with a subsequent diagnosis. A significant influence of the sampling day on BALF neutrophil proportions was observed, in accordance with previous data describing a transient (48 h) inflammation induced by the procedure (Sweeney et al., 1994). A 72 h washout period between both samples might be insufficient when investigating horses in training.

Neutrophil proportions in BALF were significantly lower when instilling a large volume, according to the previous study by Sweeney et al. (1992). Very small volumes (50 mL) might however represent bronchial lavage rather than bronchoalveolar lavage (Pickles et al., 2002). A total of 250 mL or 500 mL was instilled in the present study, as recommended for BAL (Robinson, 2001). Also, we selected a higher cut-off value (10%) than has been previously recommended to define neutrophilic IAD (5%; Robinson, 2003). Higher cut-off values were shown to increase the agreement between left and right lung BALF cytology for IAD diagnosis, when instilling 250 mL (Depecker et al., 2014).

Despite poor agreement between methodologies, the volume instilled did not significantly influence the proportions of horses, in terms of final diagnosis. Such a result should however be interpreted with caution. Sampling one lung only is enough for the cytological confirmation of IAD, while sampling both lungs is required to definitively classify the horse as CTL (Depecker et al., 2014). Our findings highlight the relevance of standardising the BAL procedure, which should be performed consistently with the same volume of fluid. Furthermore, BALF cytology for confirmation of IAD should always be interpreted within its clinical context, including racing performances.

In conclusion, the volume of lavage fluid administered, even complying with the previously recommended range, significantly influenced BALF cytological profiles. Establishing BALF reference values for each of the extreme volumes (250–500 mL) is warranted for cytological confirmation of IAD.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

Preliminary results were presented as an Abstract at the 2nd Dorothy Russel Havemeyer Foundation Workshop on Inflammatory Airway Disease, Cabourg, 13–14 October 2014. The authors wish to thank Marie-Pierre Toquet, Ludovic Petit, Claudine Hary and Sylvie Dumontier for their kind collaboration. Financial support was provided by LABÉO, CISCO-Oniris and AVEF (The French Association of Equine Veterinary Practitioners).

Appendix: Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.tvjl.2015.09.027.

References

- Couëtil, L.L., Hoffman, A.M., Hodgson, J., Buechner-Maxwell, V., Viel, L., Wood, J.L., Lavoie, J.P., 2007. Inflammatory airway disease of horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21, 356–361.
- Depecker, M., Richard, E.A., Pitel, P.H., Fortier, G., Leleu, C., Courouge-Malblanc, A., 2014. Bronchoalveolar lavage fluid in Standardbred racehorses: Influence of unilateral/bilateral profiles and cut-off values on lower airway disease diagnosis. *The Veterinary Journal* 199, 150–156.

- Pickles, K., Pirie, R.S., Rhind, S., Dixon, P.M., McGorum, B.C., 2002. Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 1: Comparison of sequential and pooled aliquots. *Equine Veterinary Journal* 34, 288–291.
- Robinson, N.E., 2001. International workshop on equine chronic airway disease. *Equine Veterinary Journal* 33, 5–19.
- Robinson, N.E., 2003. Inflammatory airway disease: Defining the syndrome. Conclusions of the Havemeyer workshop. *Equine Veterinary Education* 15, 61–63.
- Sweeney, C.R., Rossier, Y., Ziemer, E.L., Lindborg, S.R., 1992. Effects of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses. *American Journal of Veterinary Research* 53, 1376–1379.
- Sweeney, C.R., Rossier, Y., Ziemer, E.L., Lindborg, S.R., 1994. Effect of prior lavage on bronchoalveolar lavage fluid cell population of lavaged and unlavaged lung segments in horses. *American Journal of Veterinary Research* 55, 1501–1504.

Annexe 6 : Article en révision depuis le 22/09/2018

Asymmetrical pulmonary cytokine profiles are linked to bronchoalveolar lavage fluid cytology of horses with mild equine asthma. *Vet Immunol Immunopathol.* 2018. (en révision).

Erika HUE, Marie Orard, Marie-Pierre Toquet, Marianne Depecker, Anne Couroucé, Stephane Pronost, Romain Paillot, Eric Richard

Manuscript Details

Manuscript number	VETIMM_2018_253_R1
Title	Asymmetrical pulmonary cytokine profiles are linked to bronchoalveolar lavage fluid cytology of horses with mild airway inflammation
Article type	Short Communication

Abstract

Few data on cytokine profiles in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) are available for racehorses with mild/moderate equine asthma; cytological diagnosis being most frequently made from only one lung. The purpose of the study was to compare cytokine mRNA expressions and protein concentrations in BALF from both lungs. As part of a larger study, 250 ml saline was randomly instilled in one lung and 500 ml in the contralateral lung of 30 clinically healthy Standardbred racehorses. This procedure was repeated 72h later, inverting the volume per lung. Cytological cut-off values for diagnosis of mild airway inflammation was neutrophils proportions > 10% when instilling 250 ml. Eleven horses that exhibited unilateral mild inflammatory cytology (i.e. normal cytology [$<10\%$ neutrophils] in the other lung) were enrolled. Protein concentrations were not significantly different between lungs, for any of the investigated cytokines. Relative mRNA expression of IL-1 β (3.887 ± 0.929) and IL-10 (3.225 ± 0.516) were significantly higher in BALF from mild inflammatory lungs when compared with non-inflammatory ones (1.408 ± 0.337 and 1.488 ± 0.420 , respectively); and also significantly correlated with neutrophil proportions ($R = 0.45$ and $R = 0.58$, respectively). These findings suggest that specific inflammatory response and/or regulation locally occurs within the lower airways.

Keywords	Horse; airway inflammation; bronchoalveolar lavage fluid; neutrophils; IL-10; IL-1 β
Taxonomy	Cytokine Detection Assays, Neutrophil, Asthma
Corresponding Author	Eric Richard
Corresponding Author's Institution	LABÉO Frank Duncombe
Order of Authors	Erika HUE, Marie Orard, Marie-Pierre Toquet, Marianne Depecker, Anne Couroucé, Stephane Pronost, Romain Paillot, Eric Richard

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover Letter_v2.docx [Cover Letter]

Response 2 Reviewers.docx [Response to Reviewers]

Highlights_v2.docx [Highlights]

Manuscript_v2.docx [Manuscript File]

Fig_1.tif [Figure]

Fig_2.tif [Figure]

Fig_3.tif [Figure]

Suppl_Information.docx [Supporting File]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

Dear Dr. Scheerlinck,

Thank you for positively considering our manuscript VETIMM_2018_253 entitled: "Asymmetrical pulmonary cytokine profiles are linked to bronchoalveolar lavage fluid cytology of horses with mild airway inflammation".

The reviewer's comments were greatly appreciated and their suggestions have been accordingly incorporated into the revised version of the manuscript.

Sincerely yours,

Eric A. Richard
DVM, PhD, HDR
LABÉO Frank Duncombe
Clinical Biology / Research Unit
14053 Caen cedex 4, France
eric.richard@laboratoire-labeo.fr

Highlights

- BALF cytokine mRNA and proteins were investigated from left/right lungs of horses
- Both lungs were compared within horses with unilaterally mild asthma-likeinflammatory cytology
- IL-1 β and IL-10 expression were higher in asthma-like mild inflammatory BALF than contralateral ones
- IL-1 β and IL-10 mRNA expression were correlated to BALF neutrophil proportions
- Protein levels of cytokine in BALF were not significantly different between lungs

1
2
3 1 **SHORT COMMUNICATION**
4

5 2 **Asymmetrical pulmonary cytokine profiles are linked to bronchoalveolar lavage fluid**
6
7
8 3 **cytology of horses with mild equine asthma airway inflammation**
9

10 4
11
12 5 Erika Hue ^{1,2}, Marie Orard ^{1,2}, Marie-Pierre Toquet ^{1,2}, Marianne Depecker ^{3,#}, Anne Couroucé
13
14 6 ³, Stéphane Pronost ^{1,2}, Romain Paillot ^{1,2}, Eric A. Richard ^{1,2*}
15
16
17 7

18
19 8 ¹ LABÉO Frank Duncombe, 1 route de Rosel, 14053 Caen cedex 4, France.
20

21 9 ² Normandie Université, Unicaen, BIOTARGEN, 3 rue Nelson Mandela, 14280 Saint-Contest,
22
23 France.
24 10

25
26 11 ³ LUNAM Université, Oniris, NP3, 102 route de Gachet, 44300 Nantes, France.
27

28 12
29
30 13 * Corresponding author (ER); e-mail address: eric.richard@laboratoire-labeo.fr
31

32 14 # Present address: Clinique équine de Conques, 33420 Saint Aubin de Branne
33
34
35 15
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59

60
61
62 **Abstract**
63

64
65 17 Few data on cytokine profiles in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) are available for
66
67 18 racehorses with mild/moderate equine asthma (~~mEA~~); cytological diagnosis being most
68
69 19 frequently made from only one lung. The purpose of the study was to compare cytokine
70
71 20 mRNA expressions and protein concentrations in BALF from both lungs. As part of a larger
72
73 21 study, 250 ml saline was randomly instilled in one lung and 500 ml in the contralateral lung
74
75 22 of 30 clinically healthy Standardbred racehorses. This procedure was repeated 72h later,
76
77
78 23 inverting the volume per lung. Cytological cut-off values for diagnosis of mild airway
79
80 24 inflammation~~EA diagnosis~~ was neutrophils proportions > 10% when instilling 250 ml. Eleven
81
82 25 horses that exhibited unilateral ~~mEA~~ representativemild inflammatory cytology (i.e.
83
84 26 normal/~~control~~ [CTL] cytology [<10% neutrophils] in the other lung) were enrolled. Protein
85
86 27 concentrations were not significantly different between lungs, for any of the investigated
87
88 28 cytokines. Relative mRNA expression of IL-1 β (3.887 \pm 0.929) and IL-10 (3.225 \pm 0.516) were
89
90 29 significantly higher in BALF from ~~mEA~~ mild inflammatory lungs when compared with non-
91
92 30 inflammatory~~CTL~~ ones (1.408 \pm 0.337 and 1.488 \pm 0.420, respectively); and also significantly
93
94 31 correlated with neutrophil proportions (R = 0.45 and R = 0.58, respectively). These findings
95
96 32 suggest that specific inflammatory response and/or regulation locally occurs within the
97
98
99
100 33 lower airways.
101
102
103
104

105 **Keywords**
106

107 36 Horse; equine asthmaairway inflammation; bronchoalveolar lavage fluid; neutrophils; IL-10;
108
109 37 IL-1 β
110
111
112 38

119
120
121 **39 Introduction**
122

123 40 Based on the multiple similarities shared with asthma in humans, equine asthma (EA) is a
124
125
126 41 translational terminology which has recently been suggested to describe horses of any age
127
128 42 with chronic, reversible and mainly environment related lower airway inflammation (Couëtil
129
130 43 et al., 2016; Lavoie, 2015). This broad syndrome may further be divided in two major
131
132 44 phenotypes, mainly based on the severity of the observed clinical signs. Despite some
133
134 45 phenotypic overlap, both mild/moderate and severe EA do not necessarily represent a
135
136 46 disease continuum over time (Couëtil et al., 2016). Severe EA is characterized by recurrent
137
138 47 episodes of increased respiratory effort at rest (laboured breathing), as well as largely
139
140 48 increased proportions of neutrophils measured by bronchoalveolar lavage fluid (BALF)
141
142 49 cytology (Couëtil et al., 2007; Robinson, 2001). Mild/moderate equine asthma (~~mEA~~),
143
144 50 previously known as inflammatory airway disease (IAD), is clinically characterized by poor
145
146 51 performance and occasional coughing (mainly at an early stage during exercise), and also
147
148 52 further evidenced by excess tracheobronchial mucus and/or abnormal BALF cytological
149
150 53 profiles (Couëtil et al., 2016; Robinson, 2003).
151
152
153
154
155
156

157 55 The pathophysiology of mild/moderate EA, and subsequent corresponding endotypes,
158
159 56 remains poorly understood. Elucidating local and systemic immune responses associated
160
161 57 with ~~mEA~~ lower airway inflammation has, furthermore, been recommended as one research
162
163 58 priority by the recently revised Consensus Statement on IAD (Couëtil et al., 2016). Very few
164
165 59 studies have been performed to date, investigating cytokine mRNA expression or protein
166
167 60 concentrations in BALF of horses with mild/moderate EA, and leading to equivocal results
168
169 61 (Beekman et al., 2012; Hughes et al., 2011; Lavoie et al., 2011; Richard et al., 2014). The
170
171 62 variety of cytological profiles involved in the current definition of this syndrome (increased
172
173
174
175
176
177

178
179
180 63 proportions of BALF neutrophils and/or metachromatic cells and/or eosinophils) probably
181
182 64 highlights the involvement of multiple immune pathways (Richard and Robinson, 2016).
183
184
185 65 Activation of the innate immune response and Th1/Th17 polarization has been associated
186
187 66 with neutrophilic ~~mEA~~-subtype (Beekman et al., 2012; Hughes et al., 2011; Lavoie et al.,
188
189 67 2011; Richard et al., 2014). On the other hand, involvement of the adaptive immune
190
191 68 response with Th2 polarization has also mainly been associated with mastocytic ~~mEA~~
192
193 69 subtype (Beekman et al., 2012; Lavoie et al., 2011; Richard et al., 2014).
194
195
196 70

197
198 71 Either RT-PCR or ELISA has been performed previously, in order to determine BALF cytokine
199
200 72 profiles of horses with mild/moderate EA. To date, mRNA expression for up to 10 different
201
202 73 cytokines have been documented (Beekman et al., 2012; Hughes et al., 2011; Lavoie et al.,
203
204 74 2011); protein concentrations have also been measured in a large number of horses, but for
205
206 75 a limited panel of cytokines only (Richard et al., 2014). No study combining both
207
208 76 methodologies (RT-PCR and ELISA) has currently been performed in horses with
209
210 77 mild/moderate EA; while inconsistencies were previously documented in BALF of healthy
211
212 78 horses undergoing histamine bronchoprovocation (Perkins et al., 2008). Furthermore, one
213
214 79 lung only was sampled in most of these studies (Beekman et al., 2012; Hughes et al., 2011;
215
216 80 Lavoie et al., 2011), while cytological profiles of BALF simultaneously collected from left and
217
218 81 right lungs have been found non-equivalent in horses with mild/moderate EA (Depecker et
219
220 82 al., 2014). One previous study was based on BALF sampled from both lungs, but horses with
221
222 83 discrepancy between lungs (one lung with CTL cytology and the contralateral lung with
223
224 84 ~~minflammatoryEA-representative~~ cytology) were systematically excluded (Richard et al.,
225
226 85 2014).
227
228
229
230
231
232 86

237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295

87 To date, the possibility of a local and specific immune response in horses with mild airway
88 inflammationEA still remains to be considered. We hypothesized that BALF cytological
89 discrepancy between lungs within the same horse would be associated with specific BALF
90 cytokine profiles, especially with regard to the T-helper (Th) polarization. The aim of this
91 study was to investigate the pattern of mRNA expression and corresponding protein
92 concentration for a large panel of cytokines, in BALF harvested from both lungs of horses
93 with unilateral mild inflammatoryEA representative cytology.

94

95 **Materials and Methods**

96 **Horses**

97 A total of 30 client-owned Standardbred racehorses (aged 3-9 years), located in three
98 different training centres, were randomly included in this prospective observational study.
99 Horses had no recent history of coughing or nasal discharge and were free of any clinical
100 evidence of respiratory disease when examined at rest, as described previously (Orard et al.,
101 2016). The study was approved by the 'Comité d'Éthique en Expérimentation Animale Pays
102 de la Loire' (CEEAPdL 2015.70), and informed consent was provided by all owners.

103

104 Study design and BALF collection

105 BALF samples from dorsal lung lobes were systematically collected twice at 72h interval;
106 both in the left and right lungs by the same operator, according to the methodology
107 previously described (Orard et al., 2016). For each horse on Day 1, a total volume of 250 ml
108 of sterile isotonic solution was manually instilled and immediately aspirated in the randomly
109 selected lung. The channel was then flushed and the endoscope introduced in the

296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354

110 contralateral lung, where 500 ml was sequentially instilled and aspirated. On Day 4, the
111 procedure was repeated, reversing the volume instilled per lung.

112
113 Only BALF samples originating from instillations of 250 ml were investigated in the current
114 study. One aliquot for each sample (4 ml) was kept refrigerated (+4°C) in EDTA tubes until
115 cytological preparation within 12h. For cytokine investigations, 50 ml of BALF were
116 immediately centrifuged (600 g, 15 min, 4°C) and cell pellets dissociated in RNAprotect Cell
117 Reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France). Both cells and supernatants were kept frozen (-80°C)
118 until further used.

120 ***BALF cytology and case definition***

121 BALF total cell count was performed automatically (ADVIA 120, Siemens Healthcare
122 Diagnostics, Saint-Denis, France). Differential cell count was performed on 300 leukocytes,
123 after cytocentrifugation of 300 µl BALF (80 g, 10 min) and May-Grünwald-Giemsa staining
124 (Orard et al., 2016). Any BALF samples with $\leq 10\%$ neutrophils were considered as ‘non-
125 inflammatory’. Any BALF samples with neutrophil proportions above this cut-off value was
126 considered as demonstrating cytological evidence of mild inflammation‘mEA’ (Couëtil et al.,
127 2016).

128
129 Horses were then classified in three groups, based on BALF status from each lung. Each
130 horse exhibiting two ‘non-inflammatory’ BALF samples was classified as ‘CTL (-)’; each horse
131 exhibiting two ‘mild inflammatoryEA’-like BALF samples was classified as ‘CTL (+)’; each
132 horse exhibiting one ‘non-inflammatory’ and one ‘mild inflammatoryEA’-like BALF was
133 classified as ‘Mixed’. For comparisons within groups, paired BALF samples for each horse

355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413

134 were further categorized as 'high' and 'low' according to the corresponding neutrophil
135 differential count, irrespectively to the lung side of origin.

136

137 ***RNA isolation and real-time RT-PCR***

138 Total RNA was extracted from cell pellets using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf,
139 France) and RNA quality assessed using NanoDrop 2000c Spectrophotometer
140 (Thermoscientific, Villebon-sur-Yvette, France). cDNA were generated in a total volume of 20
141 μ l using Superscript First Strand System for RT-PCR (Life Technologies, Saint-Aubin, France),
142 and stored at -20°C until further use. Based on previously described sequence-specific
143 primers and probes for cytokine relative quantification (Supplementary Table 1), expression
144 of the following cytokines has been assessed: interferon (IFN)- γ , interleukin (IL)-1 β , IL-4, IL-6,
145 IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-23, and tumour necrosis factor (TNF)- α . For each reaction, cDNA
146 was amplified in a 25 μ l standard reaction (Taqman Universal PCR Master Mix, Life
147 Technologies, Saint-Aubin, France). Thermal cycling profile used was: 10 minutes at 95°C
148 following 50 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C.

149

150 Changes in cytokine gene expression were calculated by relative quantitation using the $\Delta\Delta$ Ct
151 method (Livak and Schmittgen, 2001), where $\Delta\Delta$ Ct = (cytokine gene Ct- GAPDH Ct)_{Lung 2} -
152 (cytokine gene Ct- GAPDH Ct)_{Lung 1}; lung 1 and lung 2 respectively correspond to BALF
153 samples with the lowest and highest neutrophil proportions for the same horse, and Ct is the
154 crossing point above background fluorescence. Variation in cytokine gene expression for
155 each horse was calculated with GenEx6 (bioMCC, Freising, Germany).

156

157 ***Quantification of BALF cytokines***

414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472

158 After concentrating the BALF 10-fold (Amicon Ultra-4 3K, Merck Millipore, Billerica MA,
159 USA), IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-10, IL-17 and TNF- α concentrations were measured in
160 duplicates by ELISA, according to the manufacturer's instructions with minor modifications
161 (Supplementary Table 2). Concentrations were expressed per volume of fluid recovered, as
162 previously recommended (Haslam and Baughman, 1999). Arbitrary values corresponding to
163 the lowest and the highest standard concentration were attributed to samples with,
164 respectively, undetectable cytokines and optical density values exceeding the range of
165 quantification.

166

167 **Statistical analyses**

168 Continuous data which were not normally distributed, as assessed by Shapiro-Wilk W test,
169 were log 10 transformed. Within each group of horses, fold-changes in cytokine gene
170 expression and protein concentrations were evaluated by ANOVA (General Linear Model)
171 and Tukey-Kramer's post-hoc test, with sampling day and training centre as covariates.
172 Correlations between neutrophil proportions and cytokines mRNA expression were
173 determined by Pearson's correlation coefficient. Neutrophil proportions and cytokine
174 concentrations were expressed as median (1st – 3rd quartile); cytokine gene expressions per
175 paired samples were expressed as mean fold change \pm SEM. Analyses were conducted using
176 NCSS9 (NCSS - LLC, Kaysville UT, USA) and Prism 7 (GraphPad, La Jolla CA, USA).

177

178 **Results and discussion**

179 BALF sample on Day 4 was unavailable for one horse, which was subsequently excluded from
180 the study, as were two other horses for which extracted RNA was of insufficient quality. Full
181 data were then collected from 27 horses, leading to a total of 54 BALF samples available.

473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531

182 Among these, four horses were classified as 'CTL (-)', 12 horses as 'CTL (+)' and 11 were
183 classified as 'Mixed', based on BALF neutrophil proportions (Table 1). Within each group,
184 proportions of recovered fluid and BALF total cell counts were not significantly different
185 among lungs. Neutrophil percentages were significantly different between lungs from the
186 'Mixed' group ($P < 0.001$) but not in any of the 'CTL' groups (Fig. 1).

187
188 This study aimed to investigate the local immune response associated with mild airway
189 inflammationEA, which has recently been recommended as one research priority for equine
190 asthma (Couëtil et al., 2016). In this manner, investigations were mainly focused on horses
191 with BALF cytological discrepancy between lungs, representing 37.9% (11/29) of sampled
192 horses. Classification of samples (as 'non-inflammatory' or 'mild inflammatoryEA'-like) was
193 indeed based on BALF cytology, in absence of obvious respiratory clinical sign in this
194 population of athletic horses. To date, BALF cytological profiles, along with tracheal mucus
195 scoring, are consensually used for diagnostic confirmation of mild/moderate EA, since
196 investigations of pulmonary function is still not readily available for most of
197 practitioners/clinicians. The likely influence of sampling methodology (Jean et al., 2011;
198 Orard et al., 2016), the questionable pathological cut-off values (Couëtil et al., 2016), and the
199 large variability of cell proportions observed in both mild/moderate (Depecker et al., 2014)
200 and severe EA (Bullone and Lavoie, 2017) would however probably tend to preclude the use
201 of cytological profiles as a definitive diagnostic gold standard in the next future (Bullone and
202 Lavoie, 2017; Richard and Robinson, 2016).

203
204 Relative mRNA expression of both IL-12 and IL-23 within the 'Mixed' group were significantly
205 influenced by the horse's training centre of origin ($P = 0.008$ and $P = 0.01$, respectively), and

532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590

206 IL-4 mRNA expression within both 'Mixed' and 'CTL (+)' groups was significantly influenced
207 by the day of sampling (P = 0.01 and P = 0.04, respectively). Horses were sampled at rest on
208 their site of origin, in order to avoid any potential influence of previous exercise (Davis et al.,
209 2007) or transportation on BALF cytokine profiles. However, samples were harvested on two
210 separate occasions in this study, as being a part of a larger research project. Controlling for
211 these confounding factors, none of these cytokine however exhibited significantly difference
212 in relative expressions between lungs. Even not assessed in this study, the specific ambient
213 environment originating from the three barns might contribute to such a potential bias.
214 Respirable particles and endotoxin concentrations were previously associated with excess
215 tracheal mucus (Millerick-May et al., 2015) and eosinophilic airway inflammation (Ivester et
216 al., 2014) in racehorses; while association between immune response and airborne stimuli
217 warrants further investigation (Couëtil et al., 2016).

218
219 Within the 'Mixed' group (Fig. 1), relative expression of IL-1 β (3.887 ± 0.929 ; P = 0.003) and
220 IL-10 (3.225 ± 0.516 ; P = 0.01) were significantly higher in 'mild inflammatoryEA'-like BALF
221 samples, when compared with 'non-inflammatory' samples from the contralateral lung
222 (respectively 1.408 ± 0.337 and 1.488 ± 0.420), controlling for confounding factors. Protein
223 concentrations in BALF for either IL-1 β or IL-10 were not significantly different among
224 between lungs (Fig. 2). Neutrophil proportions in BALF were significantly even moderately
225 correlated (Fig. 3) with relative mRNA expressions of both IL-1 β (R = 0.45, 95% CI 0.03 - 0.73,
226 P = 0.04) and IL-10 (R = 0.58, 95% CI 0.21 - 0.80, P = 0.01), but not with their corresponding
227 protein concentrations. Relative mRNA expressions of IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-17, IL-23, IL6, IL-8
228 and TNF- α , as well as protein concentrations of IFN- γ , IL-4, IL-17, IL-8 and TNF- α in BALF of
229 horses from the 'Mixed' group were not significantly different between 'mild

591
592
593 230 inflammatoryEA'-like and 'non-inflammatory' samples (Supplementary Table 3). No
594
595
596 231 significant difference between lungs was observed within either 'CTL (+)' or 'CTL (-)' groups,
597
598 232 for either BALF mRNA expression or protein concentration of any investigated cytokine (Fig.
599
600 233 1; Fig. 2; Supplementary Table 4).
601

602 234
603
604 235 The higher relative mRNA expression of IL-1 β in the 'mild inflammatoryEA'-like BALF is in
605
606 236 agreement with previous studies for which neutrophilic mild/moderate EA subgroups were
607
608
609 237 compared with controls (Beekman et al., 2012; Lavoie et al., 2011). This pro-inflammatory
610
611 238 cytokine has also been shown to be upregulated during exacerbation of severe EA (Giguère
612
613 239 et al., 2002), as well as in BALF from horses exercised while breathing cold air (Davis et al.,
614
615
616 240 2005). Interestingly, neither IL-6 nor IL-8 was differently expressed among lungs, which
617
618 241 might be partially explained by the somehow limited inflammation (*i.e.* BALF neutrophil
619
620 242 proportions ranging 13 – 32%) in 'mild inflammatoryEA'-like samples of the current study.
621
622
623 243 Expression of IL-8, a potent chemokine for neutrophils has been repeatedly observed in
624
625 244 horses with severe EA (Pirie, 2014), while controversial results with regard to mild/moderate
626
627 245 EA have been reported previously (Beekman et al., 2012; Lavoie et al., 2011). Another
628
629 246 explanation might be provided by the concomitant higher relative mRNA expression of IL-10
630
631 247 in 'mild inflammatoryEA'-like BALF. This anti-inflammatory cytokine was also significantly
632
633
634 248 correlated to neutrophil proportions, as described previously (Beekman et al., 2012).
635
636 249 Surprisingly, mRNA expression of IL-10 in BALF from horses with severe EA was not
637
638 250 significantly influenced by various environmental challenges (Laan et al., 2006), nor even
639
640
641 251 detected during disease exacerbation in another study (Giguère et al., 2002). The potentially
642
643 252 beneficial influence of IL-10 in both mild/moderate and severe EA warrants further
644
645 253 investigation, as suggested in a previous clinical trial (Klier et al., 2012).
646
647
648
649

650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708

254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277

Similarly to IL-6 and IL-8, relative mRNA expression of IL-17 was not significantly different between 'mild inflammatoryEA'-like and 'non-inflammatory' samples. Overexpression of IL-17 has previously been documented for mild/moderate EA in one study only (Beekman et al., 2012), and also associated with chronicity of severe EA (Ainsworth et al., 2007; Debrue et al., 2005). Relative expression of IL-23, which contributes to the development of Th17 cells (Annunziato et al., 2015), was correspondingly not influenced by the lung status in the current study, leading to a questionable implication of Th17 polarization in neutrophilic mild/moderate EA. In accordance with previous studies relating to neutrophilic subgroups of horses suffering from mild/moderate EA (Beekman et al., 2012; Lavoie et al., 2011), mRNA for IL-4, IFN- γ , IL-12 and TNF- α in BALF were also not differently expressed among lungs. As per Th17, no evidence for a Th1 or Th2 polarization associated with mEA was found in the current study. It should also be emphasized that mild/moderate EA is a chronically progressive disease, and horses were likely to be sampled at various time points in relation to the inflammatory/immune process. Unlike severe asthma, mild/moderate EA is indeed not reproducible experimentally, and all BALF samples were harvested on a single occasion, either in the field or from horses referred to a veterinary hospital (Beekman et al., 2012; Hughes et al., 2011; Lavoie et al., 2011; Richard et al., 2014). No longitudinal follow-up has been performed to date for horses suffering from mild/moderate EA, and the kinetics of immune response within the lower airways of still remains to be elucidated.

Alike previous studies on horses suffering from mild/moderate EA (Beekman et al., 2012; Hughes et al., 2011), relative mRNA expressions were only assessed in a pairwise fashion. Since BALF samples were systematically compared within the same horse for each group

709
710
711 using the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001), comparisons between groups ('CTL'
712
713 and 'mixedEA') were not available. On the other hand, comparisons between mRNA
714
715 expression and protein concentrations in BALF have been performed in this study. The
716
717 increased relative mRNA expression of IL-1 β and IL-10 were not confirmed at protein level,
718
719 and data from both methodologies were not correlated for any of the cytokines
720
721 investigated. This may be partially explained by post-transcriptional regulation and/or
722
723 temporal differences, since all analyses were simultaneously performed from the same
724
725 samples. Such inconsistency has previously been reported in BALF of healthy horses
726
727 undergoing histamine bronchoprovocation, for which IL-4 mRNA expression was detected
728
729 and the corresponding protein not detected at any time despite a 10-fold concentration
730
731 increase (Perkins et al., 2008). Measuring BALF cytokine concentrations using commercially
732
733 available ELISA kits also lacks sensitivity, since many samples showed undetectable cytokine
734
735 concentrations in the current study, as previously described (Richard et al., 2014). To date,
736
737 investigation has been limited to whole BALF with mixed cell populations (Beekman et al.,
738
739 2012; Hughes et al., 2011; Lavoie et al., 2011; Richard et al., 2014). Characterization of
740
741 cytokine profiles specific to different BALF cell populations will require further investigations.
742
743
744
745
746
747
748
749

295 **Conclusions**

750
751
752 This study confirms that immune microenvironment could greatly differ from one lung to the
753
754 other in the same horse suffering from mild airway inflammationEA. Results reported here
755
756 support previous cytological evidences highlighting a specific but localized and asymmetrical
757
758 inflammatory / regulatory response. This study however provides no evidence for a Th
759
760 polarization associated with mild neutrophilic airway inflammationEA. Further
761
762
763
764
765
766
767

768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826

301 investigations are needed concerning the unbalanced pro- and anti-inflammatory cytokines
302 pattern in the airways of horses with EA.

303
304 **Acknowledgements**
305 The authors wish to thank horse's owners and trainers, as well as Sylvie Dumontier, Claudine
306 Hary and Ludovic Petit (LABÉO) for their kind collaboration. Preliminary results were
307 presented as an abstract at BEVA (British Equine Veterinary Association) congress, Liverpool,
308 September 9–12, 2015 and VCRS (Veterinary Comparative Respiratory Society) symposium,
309 Edinburgh, October 8-10, 2015.

310
311 **Funding sources**
312 This work was partly supported by French Association of Equine Veterinary Practitioners
313 (AVEF), which had no involvement in study design; collection, analysis and interpretation of
314 data; writing of the report and decision to submit the article for publication.

315
316 **Declarations of interest**
317 None

318
319 **References**
320 Ainsworth, D.M., Wagner, B., Erb, H.N., Young, J.C., Retallick, D.E., 2007. Effects of in vitro
321 exposure to hay dust on expression of interleukin-17, -23, -8, and -1beta and chemokine
322 (C-X-C motif) ligand 2 by pulmonary mononuclear cells isolated from horses chronically
323 affected with recurrent airway disease. *Am. J. Vet. Res.* 68, 1361–1369.

827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885

324 Annunziato, F., Romagnani, C., Romagnani, S., 2015. The 3 major types of innate and
325 adaptive cell-mediated effector immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 626–635.

326 Beekman, L., Tohver, T., Léguillette, R., 2012. Comparison of cytokine mRNA expression in
327 the bronchoalveolar lavage fluid of horses with inflammatory airway disease and
328 bronchoalveolar lavage mastocytosis or neutrophilia using REST software analysis. *J. Vet.*
329 *Intern. Med.* 26, 153–161.

330 Bullone, M., Lavoie, J.-P., 2017. Science-in-brief: Equine asthma diagnosis: Beyond
331 bronchoalveolar lavage cytology. *Equine Vet. J.* 49, 263–265.

332 Couëtil, L.L., Cardwell, J.M., Gerber, V., Lavoie, J.-P., Léguillette, R., Richard, E.A., 2016.
333 Inflammatory airway disease of horses - revised consensus statement. *J. Vet. Intern.*
334 *Med.* 30, 503–515.

335 Couëtil, L.L., Hoffman, A.M., Hodgson, J., Buechner-Maxwell, V., Viel, L., Wood, J.L.N., Lavoie,
336 J.-P., 2007. Inflammatory airway disease of horses. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 356–361.

337 Davis, M.S., Malayer, J.R., Vandeventer, L., Royer, C.M., McKenzie, E.C., Williamson, K.K.,
338 2005. Cold weather exercise and airway cytokine expression. *J. Appl. Physiol.* 98, 2132–
339 2136.

340 Davis, M.S., Williams, C.C., Meinkoth, J.H., Malayer, J.R., Royer, C.M., Williamson, K.K.,
341 McKenzie, E.C., 2007. Influx of neutrophils and persistence of cytokine expression in
342 airways of horses after performing exercise while breathing cold air. *Am. J. Vet. Res.* 68,
343 185–189.

344 Debrue, M., Hamilton, E., Joubert, P., Lajoie-Kadoch, S., Lavoie, J.-P., 2005. Chronic
345 exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-
346 17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 105, 25–31.

886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944

347 Depecker, M., Richard, E.A., Pitel, P.-H., Fortier, G., Leleu, C., Couroucé-Malblanc, A., 2014.
348 Bronchoalveolar lavage fluid in Standardbred racehorses: influence of unilateral/bilateral
349 profiles and cut-off values on lower airway disease diagnosis. *Vet. J.* 199, 150–156.

350 Giguère, S., Viel, L., Lee, E., MacKay, R.J., Hernandez, J., Franchini, M., 2002. Cytokine
351 induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled
352 fluticasone propionate. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 85, 147–158.

353 Haslam, P.L., Baughman, R.P., 1999. Report of ERS Task Force: guidelines for measurement
354 of acellular components and standardization of BAL. *Eur. Respir. J.* 14, 245–248.

355 Hughes, K.J., Nicolson, L., Da Costa, N., Franklin, S.H., Allen, K.J., Dunham, S.P., 2011.
356 Evaluation of cytokine mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells from horses
357 with inflammatory airway disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 140, 82–89.

358 Ivester, K.M., Couëtil, L.L., Moore, G.E., Zimmerman, N.J., Raskin, R.E., 2014. Environmental
359 exposures and airway inflammation in young thoroughbred horses. *J. Vet. Intern. Med.*
360 28, 918–924.

361 Jean, D., Vrins, A., Beauchamp, G., Lavoie, J.-P., 2011. Evaluation of variations in
362 bronchoalveolar lavage fluid in horses with recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.*
363 72, 838–842.

364 Klier, J., Fuchs, S., May, A., Schillinger, U., Plank, C., Winter, G., Coester, C., Gehlen, H., 2012.
365 A nebulized gelatin nanoparticle-based CpG formulation is effective in immunotherapy
366 of allergic horses. *Pharm. Res.* 29, 1650–1657.

367 Laan, T.T., Bull, S., Pirie, R., Fink-Gremmels, J., 2006. The role of alveolar macrophages in the
368 pathogenesis of recurrent airway obstruction in horses. *J. Vet. Intern. Med.* 20, 167–174.

369 Lavoie, J.-P., 2015. Is the time primed for equine asthma? *Equine Vet. Educ.* 27, 225–226.

- 945
946
947 370 Lavoie, J.P., Cesarini, C., Lavoie-Lamoureux, A., Moran, K., Lutz, S., Picandet, V., Jean, D.,
948
949 371 Marcoux, M., 2011. Bronchoalveolar lavage fluid cytology and cytokine messenger
950
951 ribonucleic acid expression of racehorses with exercise intolerance and lower airway
952 372
953 inflammation. *J. Vet. Intern. Med.* 25, 322–329.
954 373
955
956 374 Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time
957
958 quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–
959 375
960 408.
961 376
962
963 377 Millerick-May, M.L., Karmaus, W., Derksen, F.J., Berthold, B., Robinson, N.E., 2015. Airborne
964
965 particulates (PM10) and tracheal mucus: A case-control study at an American
966 378
967 Thoroughbred racetrack. *Equine Vet. J.* 47, 410–414.
968 379
969
970 380 Orard, M., Depecker, M., Hue, E., Pitel, P.-H., Couroucé-Malblanc, A., Richard, E.A., 2016.
971
972 Influence of bronchoalveolar lavage volume on cytological profiles and subsequent
973 381
974 diagnosis of inflammatory airway disease in horses. *Vet. J.* 207, 193–195.
975 382
976
977 383 Perkins, G.A., Viel, L., Wagner, B., Hoffman, A., Erb, H.N., Ainsworth, D.M., 2008. Histamine
978
979 bronchoprovocation does not affect bronchoalveolar lavage fluid cytology, gene
980 384
981 expression and protein concentrations of IL-4, IL-8 and IFN-gamma. *Vet. Immunol.*
982 385
983 *Immunopathol.* 126, 230–235.
984 386
985
986 387 Pirie, R.S., 2014. Recurrent airway obstruction: A review. *Equine Vet. J.* 46, 276–288.
987
988 388 Richard, E.A., Depecker, M., Defontis, M., Leleu, C., Fortier, G., Pitel, P.-H., Couroucé-
989
990 Malblanc, A., 2014. Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid from horses
991 389
992 with neutrophilic inflammatory airway disease. *J. Vet. Intern. Med.* 28, 1838–1844.
993 390
994
995 391 Richard, E.A., Robinson, N.E., 2016. Inflammatory airway disease congress: One syndrome,
996
997 multiple pathways - A Dorothy Russell Havemeyer Symposium. *Equine Vet. Educ.* 28, 9–
998 392
999 12.
1000 393
1001
1002
1003

1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020
1021
1022
1023
1024
1025
1026
1027
1028
1029
1030
1031
1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039
1040
1041
1042
1043
1044
1045
1046
1047
1048
1049
1050
1051
1052
1053
1054
1055
1056
1057
1058
1059
1060
1061
1062

394 Robinson, N.E., 2003. Inflammatory airway disease: defining the syndrome. Conclusions of
395 the Havemeyer Workshop. Equine Vet. Educ. 15, 61–63.
396 Robinson, N.E., 2001. International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Equine Vet.
397 J. 33, 5–19.

398

1063
1064
1065
1066
1067
1068
1069
1070
1071
1072
1073
1074
1075
1076
1077
1078
1079
1080
1081
1082
1083
1084
1085
1086
1087
1088
1089
1090
1091
1092
1093
1094
1095
1096
1097
1098
1099
1100
1101
1102
1103
1104
1105
1106
1107
1108
1109
1110
1111
1112
1113
1114
1115
1116
1117
1118
1119
1120
1121

399 **Figure 1.** (a.) Neutrophil proportions (median – quartiles) and relative mRNA expression
400 (mean fold change ± SEM) of (b.) IL-1β and (c.) IL-10, in BALF from each lung for horses
401 within ‘CTL (-)’, ‘CTL (+)’ and ‘Mixed’ groups; corresponding mean difference with 95% CI
402 within each group for (a'.) neutrophils, (b'.) IL-1β and (c'.) IL-10
403
404 ‘Low’ BALF sample with the lowest neutrophil proportions for a given horse (paired with the
405 contralateral ‘high’ BALF); ‘High’ BALF sample with the highest neutrophil proportions for a
406 given horse (paired with the contralateral ‘low’ BALF); ‘CTL (-)’ horses with BALF neutrophil
407 counts below cut-off value for both lungs; ‘CTL (+)’ horses with BALF neutrophil counts above
408 cut-off value for both lungs; ‘Mixed’ horses with BALF neutrophil counts respectively below
409 and above cut-off value for each lung; + mean; ● outliers; * / ** / *** significant difference
410 (P < 0.05, 0.01 and 0.001, respectively)

1122
1123
1124
1125
1126
1127
1128
1129
1130
1131
1132
1133
1134
1135
1136
1137
1138
1139
1140
1141
1142
1143
1144
1145
1146
1147
1148
1149
1150
1151
1152
1153
1154
1155
1156
1157
1158
1159
1160
1161
1162
1163
1164
1165
1166
1167
1168
1169
1170
1171
1172
1173
1174
1175
1176
1177
1178
1179
1180

411 **Figure 2.** Protein concentration (median – quartiles) of (a.) IL-1 β and (b.) IL-10 in BALF from
412 each lung for horses within ‘CTL (-)’, ‘CTL (+)’ and ‘Mixed’ groups; corresponding mean
413 difference with 95% CI within each group for (a.) IL-1 β and (b.) IL-10
414
415 ‘Low’ BALF sample with the lowest neutrophil proportions for a given horse (paired with the
416 contralateral ‘high’ BALF); ‘High’ BALF sample with the highest neutrophil proportions for a
417 given horse (paired with the contralateral ‘low’ BALF); ‘CTL (-)’ horses with BALF neutrophil
418 counts below cut-off value for both lungs; ‘CTL (+)’ horses with BALF neutrophil counts above
419 cut-off value for both lungs; ‘Mixed’ horses with BALF neutrophil counts respectively below
420 and above cut-off value for each lung; + mean; ● outliers

1181
1182
1183
1184
1185
1186
1187
1188
1189
1190
1191
1192
1193
1194
1195
1196
1197
1198
1199
1200
1201
1202
1203
1204
1205
1206
1207
1208
1209
1210
1211
1212
1213
1214
1215
1216
1217
1218
1219
1220
1221
1222
1223
1224
1225
1226
1227
1228
1229
1230
1231
1232
1233
1234
1235
1236
1237
1238
1239

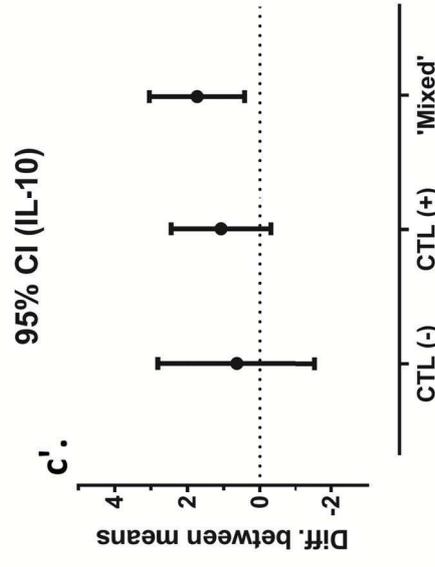
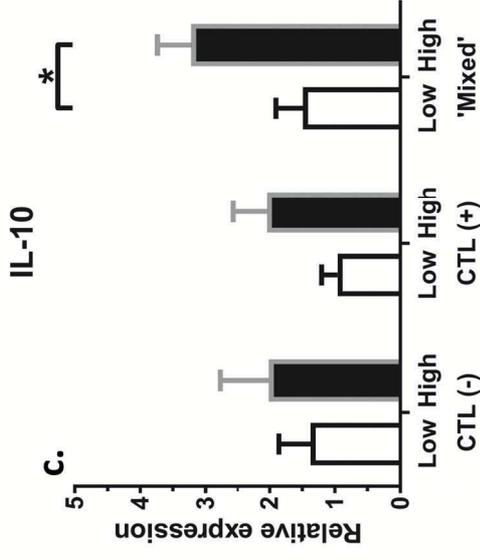
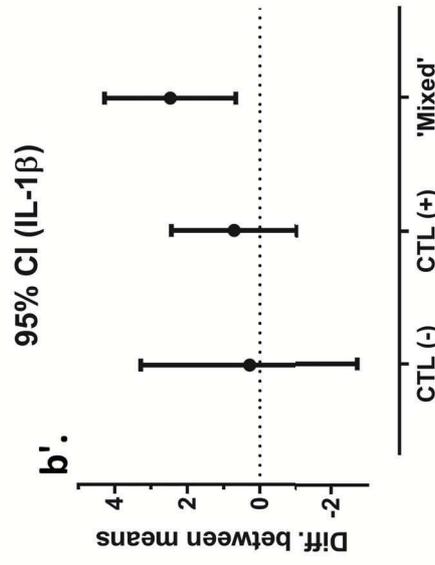
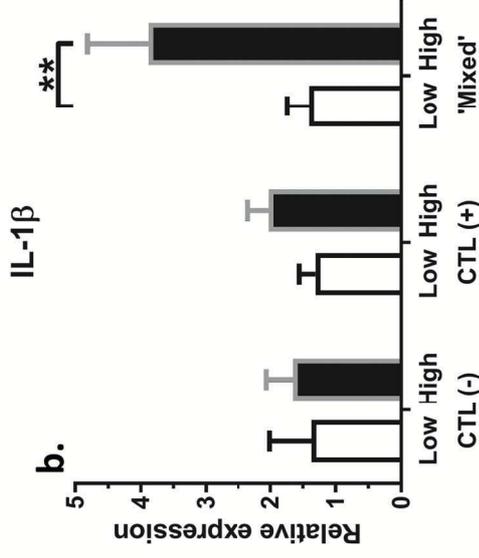
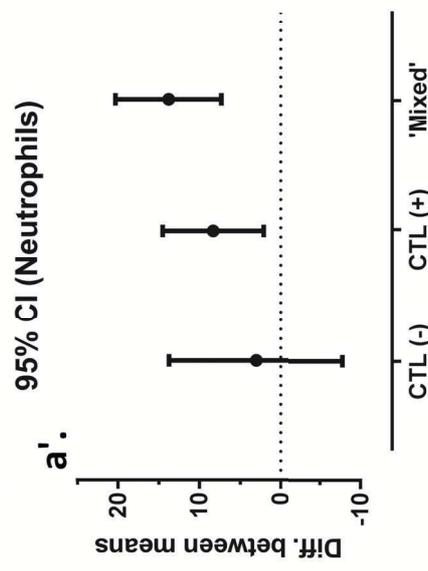
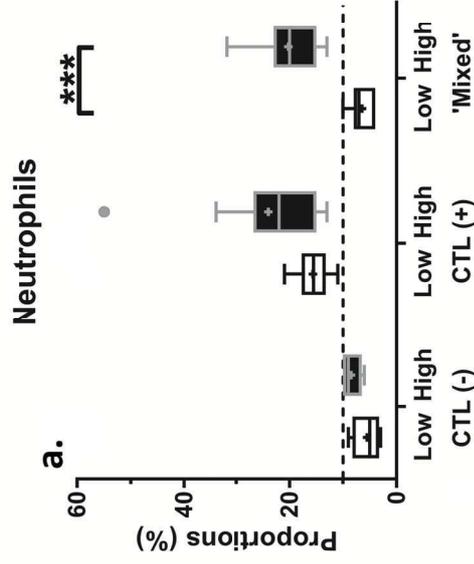
421 **Figure 3.** Association between BALF neutrophil proportions and relative mRNA expressions
422 of (a.) IL-1 β and (b.) IL-10 for horses within 'Mixed' group
423
424 *White circles:* BALF samples with the lowest neutrophil proportions for a given horse; *black*
425 *circles:* BALF sample with the highest neutrophil proportions for a given horse; '*Mixed*'
426 horses with BALF neutrophil counts respectively below and above cut-off value for each
427 lung; *straight line:* linear regression; *dotted lines:* 95% confidence interval

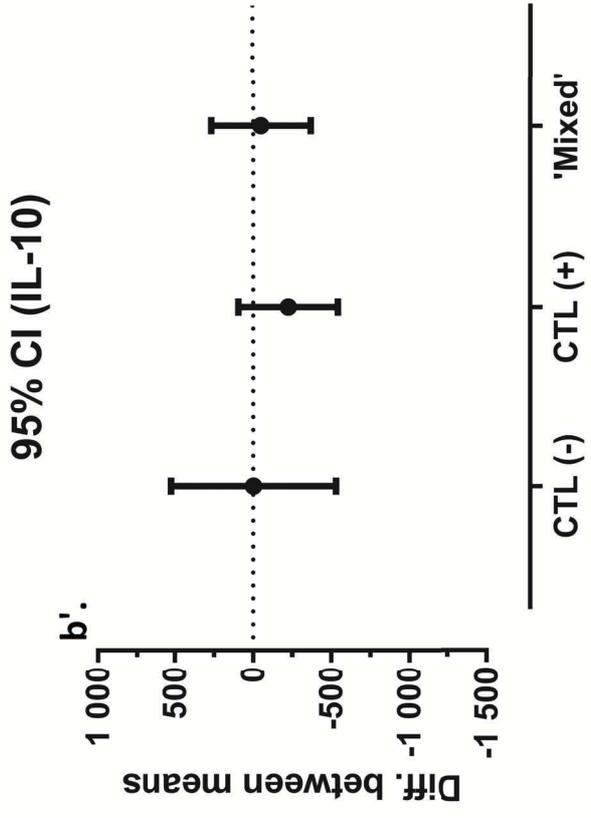
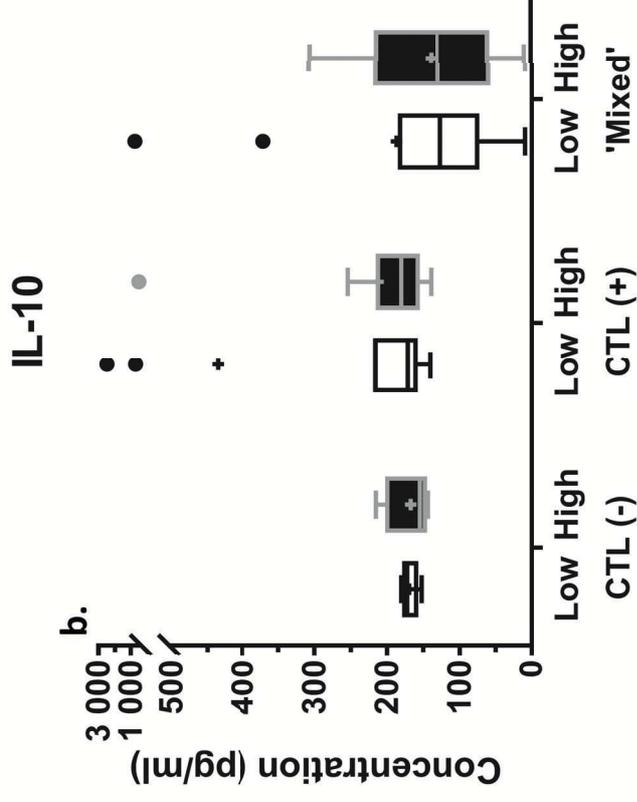
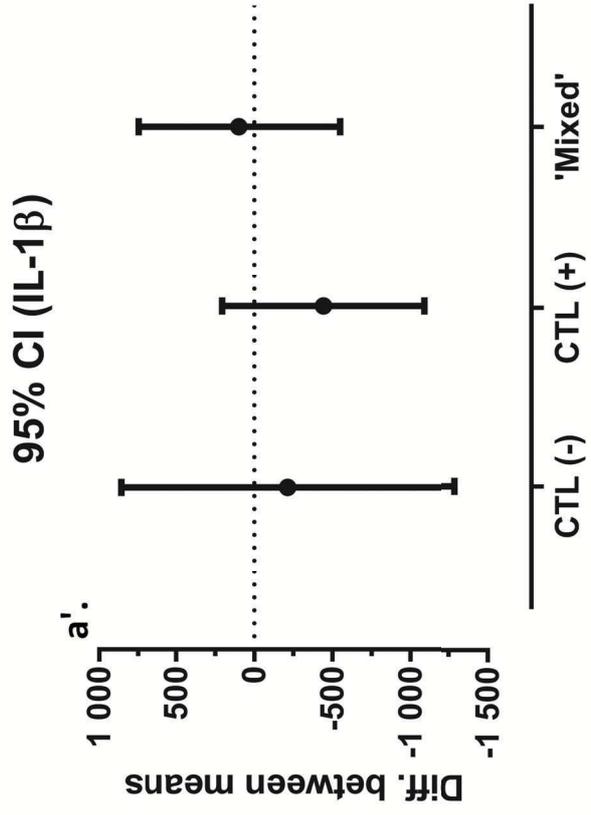
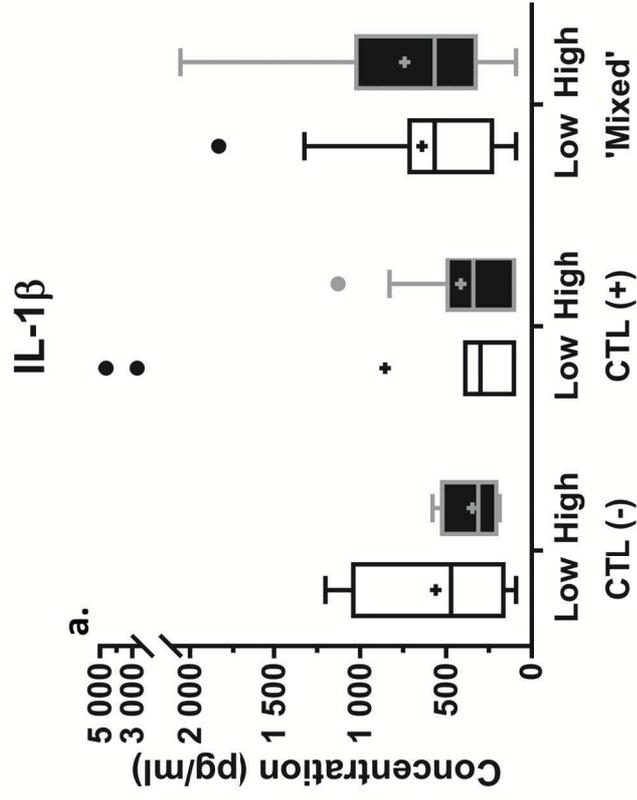
1240
1241
1242
1243
1244
1245
1246
1247
1248
1249
1250
1251
1252
1253
1254
1255
1256
1257
1258
1259
1260
1261
1262
1263
1264
1265
1266
1267
1268
1269
1270
1271
1272
1273
1274
1275
1276
1277
1278
1279
1280
1281
1282
1283
1284
1285
1286
1287
1288
1289
1290
1291
1292
1293
1294
1295
1296
1297
1298

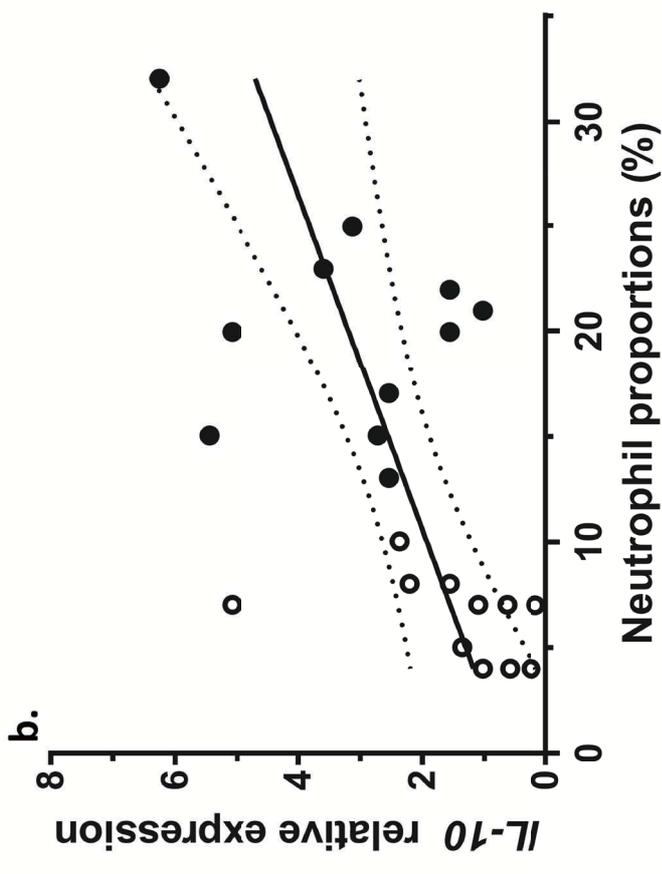
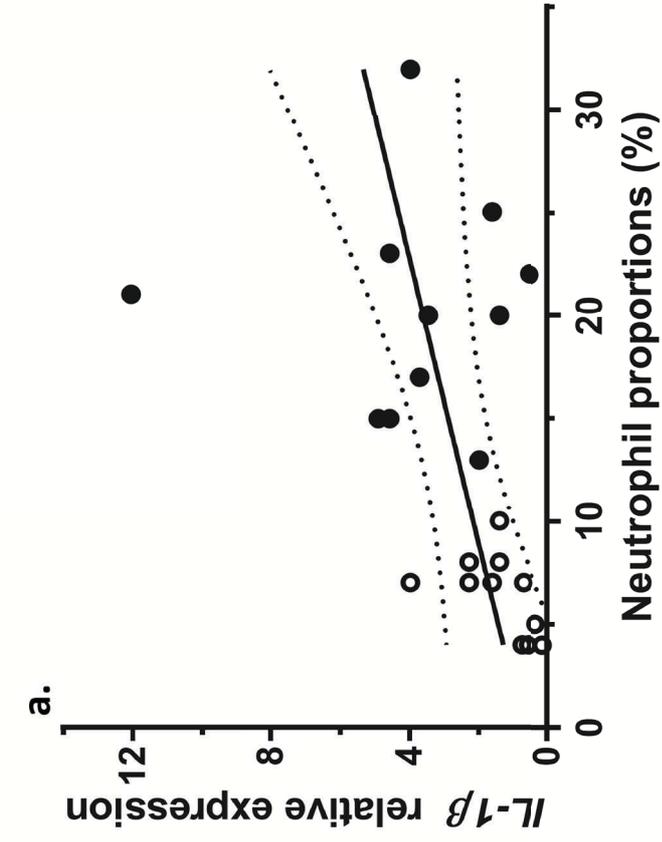
428 **Table 1:** Sampling and BALF cytological features of the 27 horses prospectively investigated.

Horse	Stable	Sampling day		Recovered fluid (%)		Total cell count (/mm ³)		Neutrophil proportions (%)		Group
		Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right	
1	A	Day 4	Day 1	48,0	58,4	300	500	14	14	CTL (+)
2	A	Day 1	Day 4	45,6	41,6	590	860	5	25	Mixed
3	A	Day 4	Day 1	51,6	55,2	750	690	26	13	CTL (+)
4	A	Day 4	Day 1	48,4	51,6	230	210	13	11	CTL (+)
5	A	Day 4	Day 1	52,8	35,2	670	340	34	21	CTL (+)
6	A	Day 1	Day 4	37,6	48,0	120	430	18	20	CTL (+)
7	A	Day 4	Day 1	61,6	39,6	330	220	9	10	CTL (-)
8	A	Day 1	Day 4	49,2	52,8	220	540	7	20	Mixed
9	A	Day 4	Day 1	48,8	37,6	650	400	55	14	CTL (+)
10	A	Day 1	Day 4	44,8	55,6	320	690	10	32	Mixed
11	B	Day 4	Day 1	64,0	72,4	740	1030	14	22	CTL (+)
12	B	Day 1	Day 4	30,0	48,8	370	570	4	20	Mixed
13	B	Day 4	Day 1	53,6	60,8	330	476	12	14	CTL (+)
14	B	Day 1	Day 4	54,0	46,8	220	230	17	18	CTL (+)
15	B	Day 1	Day 4	44,8	63,6	500	550	22	17	CTL (+)
16	B	Day 4	Day 1	48,8	59,2	340	340	27	17	CTL (+)
17	B	Day 1	Day 4	63,2	46,4	380	410	4	13	Mixed
18	B	Day 1	Day 4	69,2	66,0	610	512	7	22	Mixed
19	B	Day 4	Day 1	32,8	40,0	210	430	8	3	CTL (-)
21	C	Day 1	Day 4	47,6	48,4	720	630	15	8	Mixed
22	C	Day 1	Day 4	46,0	55,6	390	570	15	4	Mixed
23	C	Day 4	Day 1	44,0	23,2	370	300	8	21	Mixed
24	C	Day 1	Day 4	66,4	51,2	520	330	20	23	CTL (+)
25	C	Day 1	Day 4	54,0	40,4	570	340	23	7	Mixed
27	C	Day 4	Day 1	52,0	58,8	690	530	17	7	Mixed
29	C	Day 1	Day 4	56,0	36,0	490	640	10	6	CTL (-)
30	C	Day 1	Day 4	38,0	41,2	550	1000	6	4	CTL (-)

429 Horses 20, 26 and 28 were excluded from the study. 'CTL (-)' horses with BALF neutrophil
 430 counts below cut-off value for both lungs; 'CTL (+)' horses with BALF neutrophil counts above
 431 cut-off value for both lungs; 'Mixed' horses with BALF neutrophil counts respectively below
 432 and above cut-off value for each lung







Supplementary Table 1: Nucleotide sequences of equine-specific primers used in real-time

PCR assays

Target	Primers and Probe (5'-3')	Product size (bp)	GenBank Accession	References
GAPDH	Forward: AAGTGGATATTGTCGCCATCAAT Reverse: AACTTGCCATGGGTGGAATC Probe: ACTACATGGTCTACATGTTTCAGTA (#)	88	AF097178	adapted from Colahan et al., 2002
IFN-γ	Forward: AGCAGCACCAGCAAGCT Reverse: TTTGCGCTGGACCTTCAGA Probe: ATTCAGATTCCGGTAAATGA	72	NM_001081949	Horohov et al., 2008
IL-1β	Forward: CCGACACCAGTGACATGATGA Reverse: TCCTCCTCAAAGAACAGGTCATTC Probe: CTTACTGCAGCGGCAAT (#)	64	NM_001082526	adapted from Saulez et al., 2010
IL-4	Forward: TCGTGCATGGAGCTGACTGTA Reverse: GCCCTGCAGATTTCTTTCC Probe: GCCCGAAGAACACAGA (#)	74	AF305617	adapted from Ainsworth et al., 2003
IL-6	Forward: GGATGCTTCCAATCTGGGTTCAT Reverse: TCCGAAAGACCAGTGGTGATTTT Probe: ATCAGGCAGGTCTCCTG	65	NM_001082496	Saulez et al., 2010
IL-8	Forward: GCCACACTGCGAAACTCA Reverse: GCACAATAATCTGCACCCACTTT Probe: GAAATCATTGTAAAGCTCG (#)	95	AF062377	adapted from Allen et al., 2007
IL-10	Forward: GACATCAAGGAGCACGTGAACTC Reverse: TGCTCCACTGCCTTGCTCTT Probe: TGCGGCGCTGTCATCGATTTCTG	113	NM_001082490	Colahan et al., 2002
IL-12	Forward: TCAAGCTCTGCATCCTTCTTCAT Reverse: CAGATAGCCCATCATCTGTTG Probe: CCTTCAGAATCCGCGCAGTGACCA	71	Y11130	Ainsworth et al., 2003
IL-17	Forward: ATCGTGAAGGCGGGAATAGTAA Reverse: TCGTTTTCCGGTTAAGGACG Probe: ACAAGAACTCCCTCAGAATGTGAAGATCAA	112	AY014959	Ainsworth et al., 2009
IL-23	Forward: CCCATATCCAGTGCAGGAT Reverse: CTTTGCAAGCAGGGCTGACT Probe: TGTGATCCTGAAGGACT	70	AY704416	This publication
TNF-α	Forward: TTACCGAATGCCTTCCAGTCAAT Reverse: GGGCTACAGGCTTGCACTT Probe: CCAGACACTCAGATCAT	85	NM_001081819	Horohov et al., 2008

(#) represents modifications from previously published literature; *GAPDH* Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *IFN* Interferon; *IL* interleukin; *TNF* tumor necrosis factor

Supplementary Table 2: Characteristics of the ELISA used for measuring cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid.

Cytokine	Manufacturer	CA ($\mu\text{g/ml}$)	DA ($\mu\text{g/ml}$)	Range (pg/ml)	Minor modifications
IL-1 β	Kingfisher Biotech	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	372.5-20000	Incubation with TMB for 10-30 min <i>instead of 30 min.</i>
IL-4	R&D Systems	0.8	0.8	31.25-2000	Blockage solution for 2h <i>instead of 1h.</i>
IL-8	Kingfisher Biotech	3.0	0.2	18.75-1200	Incubation with sample for 2h <i>instead of 1h.</i> Incubation with TMB for 5 min <i>instead of 30 min.</i> [CA] at 1 $\mu\text{g/ml}$ <i>instead of 0,8 $\mu\text{g/ml}$.</i>
IL-10	R&D Systems	1.0	0.1	39.06-2500	CA incubation at 2-8°C <i>instead of room temperature.</i> Blockage solution for 2h <i>instead of 1h.</i>
IL-17	Kingfisher Biotech	6.5	2.5	78-5000	Incubation with sample for 2h <i>instead of 1h.</i>
IFN- γ	R&D Systems	0.4	0.4	31.25-2000	Incubation with CA at 2-8°C <i>instead of room temperature.</i> Incubation with sample for 2h <i>instead of 1h.</i> CA incubation at 2-8°C <i>instead of room temperature.</i>
TNF- α	R&D Systems	0.4	0.3	3.6-500	[DA] at 0,3 $\mu\text{g/ml}$ <i>instead of 0,2 $\mu\text{g/ml}$.</i> Incubation with sample for 2h <i>instead of 1h.</i>

CA capture antibody; DA detection antibody; TMB tetramethylbenzidine; *n.d.* not determined; IFN Interferon; IL interleukin; TNF tumor necrosis factor

Supplementary Table 3: Relative mRNA expression (mean fold change \pm SEM) and protein concentration (median – quartiles) of cytokines in BALF from each lung for horses within the ‘Mixed’ group

Cytokine	mRNA relative expression		Protein concentration (pg/ml)	
	<i>Low</i>	<i>High</i>	<i>Low</i>	<i>High</i>
IFN- γ	1.5 \pm 0.5	1.2 \pm 0.3	31.3 (31.3 – 33.4)	31.3 (31.3 – 124.2)
IL-6	1.6 \pm 0.5	1.4 \pm 0.2	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
IL-8	1.2 \pm 0.3	2.0 \pm 0.4	141.8 (102.0 – 227.2)	204.1 (125.2 – 464.5)
IL-12	1.4 \pm 0.4	1.7 \pm 0.3	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
IL-23	1.1 \pm 0.2	1.4 \pm 0.2	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
TNF- α	1.2 \pm 0.3	1.2 \pm 0.2	14.2 (3.6 – 27.6)	37.6 (12.6 – 108.5)
IL-4	1.5 \pm 0.4	1.9 \pm 0.5	31.7 (31.3 – 46.6)	31.3 (31.3 – 38.8)
IL-17	0.8 \pm 0.1	1.7 \pm 0.60	1525 (725 – 2538)	1892 (578 – 3510)

‘Low’ BALF sample with the lowest neutrophil proportions for a given horse (paired with the contralateral ‘high’ BALF); ‘High’ BALF sample with the highest neutrophil proportions for a given horse (paired with the contralateral ‘low’ BALF); ‘Mixed’ horses with BALF neutrophil counts respectively below and above cut-off value for each lung; *n.d.* not determined

Supplementary Table 4: Relative mRNA expression (mean fold change \pm SEM) and protein concentration (median – quartiles) of cytokines in BALF from each lung for horses within ‘CTL (-)’ and ‘CTL (+)’ groups

Cytokine	CTL (-)				CTL (+)			
	mRNA (r.e.)		Protein (pg/ml)		mRNA (r.e.)		Protein (pg/ml)	
	Low	High	Low	High	Low	High	Low	High
IFN-g	1.1	1.5	31.3	31.3	1.3	3.6	31.3	31.3
	± 0.2	± 0.3	(31.3 – 35.9)	(31.3 – 31.3)	± 0.3	± 2.1	(31.3 – 34.6)	(31.3 – 31.8)
IL-1	1.4	1.7	488.2	386.6	1.3	2.0	372.5	372.5
	± 0.6	± 0.4	(372.5 – 753.2)	(372.5 – 445.2)	± 0.3	± 0.3	(372.5 – 400.8)	(372.5 – 458.1)
IL-6	1.1	1.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1.2	1.2	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	± 0.3	± 0.4			± 0.2	± 0.2		
IL-8	1.1	0.9	197.3	180.1	1.2	1.4	196.3	188.6
	± 0.3	± 0.3	(11.3 – 346.1)	(101.8 – 324.0)	± 0.2	± 0.3	(136.7 – 270.2)	(140.2 – 271.4)
IL-10	1.4	2.0	172.2	154.8	3.2	5.3	171.4	182.2
	± 0.5	± 0.8	(166.6 – 174.9)	(146.4 – 175.6)	± 2.2	± 3.3	(158.1 – 215.9)	(166.0 – 204.9)
IL-12	1.3	0.9	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	3.7	9.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	± 0.4	± 0.5			± 2.5	± 7.7		
IL-23	1.1	1.2	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1.1	1.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	± 0.2	± 0.6			± 0.2	± 0.3		
TNF-a	1.3	2.0	10.1	8.2	1.3	1.0	22.5	21.4
	± 0.6	± 0.5	(3.6 – 23.0)	(3.6 – 14.9)	± 0.3	± 0.2	(3.6 – 37.0)	(5.2– 47.1)
IL-4	1.4	1.4	31.3	31.3	2.0	2.0	31.3	31.3
	± 0.7	± 0.3	(31.3 – 31.3)	(31.3 – 31.3)	± 1.0	± 0.6	(31.3 – 31.3)	(31.3 – 31.3)
IL-17	1.0	0.8	2944	1369	1.6	22.0	3260	669
	± 0.2	± 0.2	(2241 – 3411)	(151 – 3172)	± 0.5	± 16.3	(1857 – 5000)	(292 – 2391)

‘Low’ BALF sample with the lowest neutrophil proportions for a given horse (paired with the contralateral ‘high’ BALF); ‘High’ BALF sample with the highest neutrophil proportions for a given horse (paired with the contralateral ‘low’ BALF); ‘CTL (-)’ horses with BALF neutrophil counts below cut-off value for both lungs; ‘CTL (+)’ horses with BALF neutrophil counts above cut-off value for both lungs; *n.d.* not determined; *r.e.* relative expression

References

Ainsworth, D.M., Appleton, J.A., Eicker, S.W., Luce, R., Julia Flaminio, M., Antczak, D.F., 2003.

The effect of strenuous exercise on mRNA concentrations of interleukin-12, interferon-gamma and interleukin-4 in equine pulmonary and peripheral blood mononuclear cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91, 61-71.

Ainsworth, D.M., Matychak, M., Reyner, C.L., Erb, H.N., Young, J.C., 2009. Effects of in vitro

exposure to hay dust on the gene expression of chemokines and cell-surface receptors in primary bronchial epithelial cell cultures established from horses with chronic recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.* 70, 365-372.

Allen, C.A., Payne, S.L., Harville, M., Cohen, N., Russell, K.E., 2007. Validation of quantitative

polymerase chain reaction assays for measuring cytokine expression in equine macrophages. *J. Immunol. Methods* 328, 59-69.

Colahan, P.T., Kollias-Bakert, C., Leutenegger, C.M., Jones, J.H., 2002. Does training affect

mRNA transcription for cytokine production in circulating leucocytes? *Equine Vet. J. Suppl.* 154-158.

Horohov, D.W., Breathnach, C.C., Sturgill, T.L., Rashid, C., Stiltner, J.L., Strong, D., Nieman, N.,

Holland, R.E., 2008. In vitro and in vivo modulation of the equine immune response by parapoxvirus ovis. *Equine Vet. J.* 40, 468-472.

Saulez, M.N., Godfroid, J., Bosman, A., Stiltner, J.L., Breathnach, C.C., Horohov, D.W., 2010.

Cytokine mRNA expressions after racing at a high altitude and at sea level in horses with exercise-induced pulmonary hemorrhage. *Am. J. Vet. Res.* 71, 447-453.

Annexe 7 : Abstract de la communication orale présentée au congrès de l'AVEF, le 7 novembre 2018, Bordeaux, France

Titre: La purification du foin a-t-elle une influence sur les signes cliniques et la réponse immune des chevaux atteints d'asthme sévère?

Marie Orard^{1,2}, Erika Hue^{1,2}, Anne Couroucé³, Céline Bizon-Mercier³, Marie-Pierre Toquet^{1,2}, Meriel Moore-Colyer⁴, Laurent Couëtil⁵, Stéphane Pronost^{1,2}, Romain Paillot^{1,2}, Magali Demoor², Eric A. Richard^{1,2*}

¹ LABÉO Frank Duncombe, Caen, France.

² Normandie Univ, UniCaen, BIOTARGEN, Caen, France

³ LUNAM Université, Oniris, NP3, Nantes, France

⁴ Royal Agricultural University, Cirencester, United Kingdom

⁵ Purdue University, College of Veterinary Medicine, West Lafayette, IN, United States of America

* auteur correspondant

Conflit d'intérêt :

MMC est consultante scientifique pour HayGain

Comité d'éthique :

L'étude a été approuvée par le comité d'éthique institutionnel pour la Recherche Clinique (CERVO-2017-8-V).

Sources de financement:

Le financement de l'étude est assuré par Haygain, LABÉO et Oniris.

Introduction: Il a été démontré que le retrait des stimuli antigéniques diminuait significativement l'obstruction respiratoire des chevaux avec asthme équin sévère (AES). À ce jour, aucune étude publiée n'a investigué l'influence potentielle du traitement du foin par la vapeur sur les voies respiratoires profondes de chevaux avec AES.

Objectifs: Déterminer les réponses cliniques, cytologiques et cytokiniques des voies respiratoires de chevaux AES et contrôles (CTL), exposés expérimentalement à du foin sec ou traité à la vapeur.

Matériel et méthodes: Une cohorte de 12 chevaux a été utilisée dans l'étude. 6 chevaux CTL et 6 chevaux AES en rémission, précédemment diagnostiqués sur base d'examens cliniques, d'une cytologie du LBA et d'une obstruction réversible des voies respiratoires après traitement. Deux semaines avant le début du challenge, les chevaux ont été rassemblés au pré sans accès à du foin. De plus, le foin distribué au cours de l'étude a été caractérisé pré- et post-traitement à la vapeur avant le début du challenge. À partir du premier jour (j0), les deux groupes ont été nourris avec du foin traité à la vapeur pendant 5 jours consécutifs, puis les chevaux ont été placés au pré sans foin pendant 26 jours avant d'être nourris avec du foin sec pendant 5 jours consécutifs. Les investigations effectuées 2 jours avant (j-2) et 5 jours après (j+5) chaque challenge incluaient un score clinique, un score de mucus trachéal et respectivement une cytologie et un profil d'expression génique de cytokines dans le lavage bronchoalvéolaire (LBA).

Résultats: Traiter le foin à la vapeur diminue significativement la teneur en moisissures du foin ($P < 0.001$) et le score de mucus chez les chevaux ($P = 0,01$) comparativement au foin sec. Cependant, aucun effet du challenge n'a été observé sur le score clinique. Les proportions de

neutrophiles ($P < 0.001$) et l'expression d'ARNm des cytokines IL-1 β ($P = 0.024$), IL-6R ($P = 0.021$), IL-18 ($P = 0.009$) et IL-23 ($P = 0.036$) dans le LBA des chevaux AES était significativement augmentée après chacun des challenges (foin sec et foin traité à la vapeur). L'expression relative pour IL-1 β , IL-6R, IL-8 et IL-23 était également significativement corrélée aux proportions de neutrophiles dans le LBA ainsi qu'au score clinique et de mucus trachéal.

Conclusion: Traiter le foin diminue significativement la teneur en moisissures et est associé à une diminution du score de mucus trachéal chez les chevaux AES. La pertinence de la vapeur sur le foin mériterait d'être étudiée à la fois dans le cadre de la prévention et du traitement des chevaux asthmatiques modérés à l'entraînement, ainsi que pour la prévention à long terme du développement de l'AES.

Annexe 8 : Abstract de la communication orale présentée au congrès du WEAS, le 15 juillet 2017, Copenhague, Danemark.

Title: Hay dust particles measured by flow cytometry in steamed *versus* dry hay

Marie Orard (1, 2), Erika Hue (1, 2), Marilyne Guillamin (3), Meriel Moore Colyer (4), Anne Couroucé-Malblanc (5), Laurent Couëtil (6), Magali Demoor (2), Eric A. Richard (1, 2).

- (1) LABÉO Frank Duncombe, 1 route de Rosel, 14053 CAEN Cedex 4, France.
- (2) Normandie Université, UNICAEN, EA7450 BIOTARGEN, 3 rue Nelson Mandela, 14280 SAINT CONTEST, France
- (3) Plateau de cytométrie en flux, SFR ICORE, Normandie Université - UMR-S 1075 Inserm/Unicaen - COMETE, 14032, Caen, France.
- (4) Royal Agricultural University, CIRENCESTER, GL7 6JS, United Kingdom
- (5) LUNAM University, Oniris, Unité de Recherche NP3, 102 route de Gachet, 44300 NANTES, France.
- (6) Purdue University, College of Veterinary Medicine, 625 Harrison Street, WEST LAFAYETTE, IN 47907, United States of America

Tel.: +33.231.47.19.19. Email address: marie.orard@laboratoire-labeo.fr

Introduction

Hay contains many particles contributing to exposure of horses to high levels of inhalable dust (< 100 µm). Among these, the respirable fraction (particles < 5 µm) is likely to be central in the pathophysiology of equine asthma. Immersing or soaking dry hay significantly decreased respirable particulate exposure, while limited data are currently available concerning steamed hay. Flow cytometry is a robust method used to quantify suspended particles < 50 µm, and might easily and accurately quantify particles suspended from hay samples. Our hypothesis is that steaming hay is responsible for a significant while only transient decrease of respirable particulate concentrations.

Objectives

To sequentially compare the concentrations of total and respirable hay dust fractions suspended from dry and steamed hay over a 48h period, using flow cytometry.

Methods

Hay samples (1 kg) were collected from 14 square bales, before and 24 hours after steaming by HG-600 (Haygain) and systematically kept in a storage bag. Among these bales, 6 were also harvested immediately (T0), 6h and 48h after steaming. Each sample was shaken manually 30 minutes and the resulting dust sieved through a 2 mm grid then on a 1000-100 µm column. For 'dry' samples, hay dust suspension (HDS) was obtained by adding 10 ml sterile saline per gram of dust collected. After steaming, hay dust was suspended in the same volume of saline used for corresponding dry samples. HDS was filtered through 48 µm pores and diluted in PBS with a known number of 5 µm beads as standard. Samples were analysed by flow cytometry, providing absolute particle counts and relative concentrations (particles/µl). Data were compared by paired Student *t* test and repeated (one-way) ANOVA, and expressed as mean ± SD; *p*<0.05 was considered significant.

Results

Steaming hay resulted at 24h in lower levels of both respirable (29805 ± 31198 vs. 576449 ± 316162 particles/ μl ; $p < 0.001$) and inhalable (419 ± 365 vs. 4895 ± 2200 ; $p < 0.001$) dust fractions. Moreover, there was a significant ($p < 0.01$) reduction of particles at T0, 6h, and 48h after steaming when compared to dry hay; while no significant difference was observed between post-steaming time points.

Conclusions

Flow cytometry showed that steaming hay significantly and sustainably decreased both inhalable and respirable particles generated by hay shaking. Further investigations are warranted, to characterise size distribution of particles $< 5 \mu\text{m}$ and their implication in initiation/maintenance of equine asthma.

Annexe 9 : Abstract de la communication orale présentée lors du congrès The Dorothy Russel Havemeyer Foundation IAD Workshop, le 13 octobre 2014, Cabourg, France

Effect of bronchoalveolar lavage (BAL) volume on cytological results and subsequent inflammatory airway disease (IAD) diagnosis

Marie Orard (1), Marianne Depecker (2), Erika Hue (1), Marie Pierre Toquet (1), Anne Couroucé-Malblanc (2), Eric Richard (1).

(1) LABEO Frank Duncombe, 1 route de Rosel, 14053 Caen cedex 4, France.

(2) CISCO- ONIRIS, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation de Nantes-Atlantique, Atlanpôle - La Chantrerie, BP40706, 44307 Nantes, France.

Tel.: +33 6 72 60 06 83. Email address: m.orard@calvados.fr

Rationale: The diagnosis of IAD mainly depends on cytological analysis of BAL. Nevertheless, the recommended volume interval, to perform the BAL, is wide (250ml-500ml) which might explain discrepancy among the various studies.

Objectives: To determine if extremes recommended volumes (250ml-500ml) influence cytological profiles and subsequent IAD diagnosis.

Material and methods: Ten French Trotters per stable (n=30) in active training were included in the study. A volume of 250ml was randomly instilled via endoscopy in a lung and 500ml was instilled in the contralateral lung. This procedure was repeated 72h later inverting the lung volume. Fluids were cytocentrifuged and stained with May-Grünwald-Giemsa within 12hours of collection. Cut-off values used for neutrophilic IAD diagnosis was neutrophils>10%. Data were compared by a repeated two-way ANOVA and a Fisher's exact test.

Results: The stable significantly influences total cell count, macrophages and lymphocytes proportions ($P<0,05$). Neutrophils proportion is significantly influenced by sampling day and stable. Moreover, the total liquid recovery is significantly higher ($64,4\% \pm 12,8, P<0,001$) and the neutrophils proportion lower ($11,7\% \pm 7,5, P=0,015$) instilling 500ml compared to 250ml ($48,4\% \pm 11,2; 15,1\% \pm 9,2$, respectively). No significant differences were found for the other cell types. Regarding the diagnosis, we obtained 5 controls and 24 neutrophilic IAD for at least one lung with 250ml volume and 11 controls and 18 neutrophilic IAD for at least one lung for 500ml ($P=0,053$).

Conclusions: Within the recommended interval, the volume influences the cytological profiles but not the neutrophilic IAD diagnosis. Further studies are warranted to find the interval volume which will allow the more accurate IAD diagnosis.

Influence du foin « à la vapeur » sur la réponse immunitaire des chevaux asthmatiques : du challenge d'exposition (*in vivo*) à la stimulation (*in vitro*) des macrophages alvéolaires

L'asthme équin est une maladie obstructive récurrente des voies respiratoires. De nombreux facteurs étiologiques ont été déterminés comme pouvant initier ou maintenir l'asthme équin sévère (AES), cependant l'exposition au foin reste le facteur de risque principal. L'utilisation de traitements à base de corticoïdes sont efficaces en cas de crise mais inefficaces en l'absence de mesures sanitaires. Ainsi, depuis quelques années un dispositif permettant de « purifier » le foin à la vapeur a été développé, afin de diminuer la teneur en poussières et les antigènes microbiologiques présents dans le foin. La physiopathologie de l'AES est complexe. Parmi les principaux acteurs de cette réponse immunitaire, les macrophages alvéolaires ont un rôle prédominant dans l'initiation et l'orientation de la réponse immunitaire. Ainsi étudier le rôle des macrophages des chevaux AES permettrait de mieux comprendre l'initiation de la réponse immunitaire dans l'AES. Dans ce contexte, nous nous sommes interrogés sur l'influence du foin « à la vapeur » sur la réponse immunitaire des chevaux AES lors d'un challenge *in vivo* et lors de la stimulation *in vitro* des macrophages alvéolaires. Ainsi nous avons d'abord étudié la réponse systémique et locale des chevaux soumis à un challenge d'exposition *in vivo* à du foin sec ou « à la vapeur ». La première partie de ce travail nous a permis d'observer un effet bénéfique du foin « à la vapeur » sur le score de mucus trachéal des chevaux CTL et AES cependant nous n'avons pas observé un effet bénéfique significatif du foin « à la vapeur » sur la réponse cytologique et immunitaire. La deuxième partie du travail a permis d'étudier la réponse au foin « à la vapeur » à l'échelle des macrophages alvéolaires. La microscopie en temps réel a mis en évidence des différences dans le comportement des macrophages en réponse (1) à différents stimuli, (2) entre les chevaux AES et CTL, (3) entre les HDS provenant de foin sec ou de foin « à la vapeur ». La concentration en IL-1 β était significativement plus élevée et la concentration en IL-10 significativement plus faible chez les MA des chevaux AES comparés aux chevaux CTL. Une concentration en TNF- α plus élevée après stimulation *in vitro* a été observée chez les MA des chevaux AES et CTL. Cet état des lieux sur la réponse des macrophages alvéolaires stimulés *in vivo* et *in vitro* pourra servir de base aux études futures nécessaires pour conclure sur le rôle des MA dans le cas de l'AES. Cette triple approche à l'échelle du cheval, du poumon et de la cellule permet une vision globale de la réponse à un challenge d'exposition à du foin sec ou « à la vapeur » et permet tout de même d'avoir un regard optimiste sur l'utilisation du foin « à la vapeur » pour les chevaux atteints d'AES.

Mots clés : asthme équin sévère, foin “à la vapeur”, macrophages alvéolaires, réponse immunitaire

Influence of steamed hay on the immune response of asthmatic horses : From (*in vivo*) exposure challenge to (*in vitro*) stimulation of the alveolar macrophages

Equine asthma is a recurrent obstructive disease of respiratory tract. Several aetiological factors are known to induce or maintain the severe equine asthma (sEA), however the hay exposure is the main risk factor. The use of treatments with corticoids are effective in case of crisis, but ineffective in the absence of sanitary measures. So, since several years a device allowing to purify the hay with steam was developed, in order to decrease the dust content and the microbiological antigens within the hay. The pathophysiology of sEA is complex. Among the main actors of this immune response, the alveolar macrophages have an important role in the intiation and orientation of the immune response. So, investigating the role of the equine alveolar macrophages of sEA horses would allow to better understand the initiation of the immune response in the sEA. In this context, we focused on the influence of steamed hay on the immune response of sEA horses during an *in vivo* challenge and an *in vitro* stimulation of the alveolar macrophages. First, we studied the systematic and local responses of horses submitted to an *in vivo* challenge exposure to dry and steamed hay. The first part of this work allowed us to show a beneficial effect of the steamed hay on the mucus tracheal score of sEA horses, however we did not observe any beneficial effect of the steamed hay on the cytological and immune response. The second part of the study allowed us to investigate the response of the alveolar macrophages to steamed hay. The real time microscopy showed differences in the behavior of macrophages in response (1) to various stimuli, (2) between sEA and CTL horses (3) between HDS resulting from dry hay or from steamed hay. Moreover, the protein quantification of IL-1 β was signifantly higher and the concentration of IL-10 significantly lower in AM supernatant of sEA horses compared to CTL. The TNF- α concentration was higher on AM after *in vitro* stimulation in sEA and CTL horses. These results on the alveolar macrophages reponse after both *in vivo* challenge and *in vitro* stimulation, can be used as a basis for future studies in order to further characterize the role of AM in case of sEA. This triple approach on the horse, the lung and the cell scale allows a global vision of the response to an exposure challenge to dry or steamed hay and allows having an optimistic preliminary look on the use of the steamed hay for sEA horses.

Key words : severe equine asthma, steamed hay, alveolar macrophages, immune response