

Université de Montréal

**Étude du remodelage du muscle lisse bronchique chez
les chevaux asthmatiques légers à modérés**

par

Florence DUPUIS-DOWD

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)

en sciences vétérinaires, option sciences cliniques

Août 2021

© Florence DUPUIS-DOWD, 2021

Ce mémoire intitulé

**Étude du remodelage du muscle lisse bronchique chez les chevaux asthmatiques
légers à modérés**

Présenté par

Florence Dupuis-Dowd

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Mathilde Leclère

Présidente-rapporteuse

Jean-Pierre Lavoie

Directeur de recherche

Pierre Hélie

Membre du jury

Résumé

L'asthme équin est une condition inflammatoire fréquente affectant les voies respiratoires inférieures. Cette maladie est caractérisée par une bronchoconstriction, une hyperréactivité bronchique, ainsi que des changements des différentes couches tissulaires des voies respiratoires que l'on regroupe sous le terme de remodelage pulmonaire. Le remodelage du muscle lisse bronchique dans l'asthme comprend une hyperplasie, une hypertrophie, ainsi qu'une altération des propriétés contractiles des myocytes. Bien que ces changements aient été décrits dans la forme sévère de l'asthme équin, la présence de telles altérations chez les chevaux atteints des formes légères à modérées de l'asthme demeure incertaine. L'objectif de notre étude est donc de déterminer si le muscle lisse bronchique présente un remodelage chez les chevaux asthmatiques légers à modérés.

Des biopsies endobronchiques provenant de 18 chevaux asthmatiques et de 7 chevaux contrôles ont été étudiées. Le diagnostic était basé sur les signes cliniques et confirmé par cytologie du lavage bronchoalvéolaire. La prolifération des cellules du muscle lisse bronchique était évaluée par l'expression du *proliferating cell nuclear antigen* marqué par immunohistochimie, et l'expression génique de l'isoforme rapide de la myosine, une protéine hypercontractile, a été mesurée par RT-qPCR.

Cette étude a permis de mettre en évidence une surexpression de l'isoforme rapide de la myosine chez les chevaux asthmatiques légers à modérés. Malgré l'absence de différence dans le taux de prolifération cellulaire du muscle lisse bronchique entre les groupes, le pourcentage de myocytes en prolifération était corrélé à l'inflammation pulmonaire neutrophilique ainsi qu'à l'expression de l'isoforme rapide de la myosine chez les chevaux asthmatiques.

Cette première étude évaluant le remodelage du muscle lisse bronchique chez les chevaux asthmatiques légers à modérés a démontré une altération fonctionnelle du muscle lisse bronchique dans les formes légères de l'asthme équin, une possible influence de la neutrophilie pulmonaire sur la prolifération du muscle lisse, ainsi qu'une association entre les phénotypes prolifératifs et contractiles. Les altérations identifiées pourraient servir de biomarqueurs potentiels dans l'évolution de la maladie et de la réponse aux traitements.

Mots-clefs : Asthme équin, remodelage des voies respiratoires, prolifération du muscle lisse bronchique, isoforme SMB de la myosine, hyperréactivité des voies respiratoires

Abstract

Equine asthma is a common inflammatory condition affecting the lower airways. This disease is characterised by bronchoconstriction, airway hyperreactivity, and changes in the different tissue layers of the airways, which are referred to as airway remodelling. Remodelling of the smooth muscle in asthma includes hyperplasia, hypertrophy, and altered contractile properties of the myocytes. Although these changes have been described in severe equine asthma, their presence in horses with milder forms of asthma remains unclear. The aim of our study was therefore to determine whether airway smooth muscle remodelling occurs in horses with mild to moderate asthma.

Endobronchial biopsies from 18 asthmatic horses and 7 control horses were studied. The diagnosis was based on clinical signs and confirmed by bronchoalveolar lavage cytology results. Airway smooth muscle cell proliferation was assessed by the expression of immunohistochemically labelled proliferating cell nuclear antigen, and the gene expression of the fast contracting myosin isoform, a hypercontractile protein, was measured by RT-qPCR.

This study showed overexpression of the fast contracting myosin isoform in horses with mild to moderate asthma. Although there was no difference in the proliferation rate of airway smooth muscle myocyte between groups, it was correlated with neutrophilic lung inflammation as well as with the expression of the fast myosin isoform in asthmatic horses.

This first study evaluating airway smooth muscle remodelling in mild to moderate asthmatic horses has demonstrated a functional alteration of airway smooth muscle in mild equine asthma, as well as a possible influence of pulmonary neutrophilia on smooth muscle proliferation, and an association between proliferative and contractile phenotypes. The identified alterations could eventually serve as biomarkers in the evolution of the disease and the response to treatments.

Keywords : Equine asthma, airway remodelling, bronchial smooth muscle proliferation, myosin SMB isoform, airway hyperreactivity.

Table des matières

RÉSUMÉ	3
ABSTRACT	4
TABLE DES MATIÈRES	5
LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES SIGLES, DES ABRÉVIATIONS ET DES ACRONYMES	11
REMERCIEMENTS	14
INTRODUCTION	15
1 CHAPITRE 1 – RECENSION DES ÉCRITS	16
1.1 PHYSIOLOGIE.....	16
1.1.1 <i>Anatomie des voies respiratoires</i>	16
1.1.2 <i>Fonction pulmonaire</i>	16
1.1.2.1 Résistance pulmonaire.....	16
1.1.2.2 Physiologie respiratoire à l'exercice.....	18
1.1.3 <i>Muscle lisse bronchique</i>	19
1.1.3.1 Particularité du muscle lisse bronchique.....	19
1.1.3.2 Mécanisme de contraction.....	19
1.1.3.2.1 Appareil contractile du muscle lisse.....	20
1.1.3.2.2 Glissement des filaments.....	21
1.1.3.3 Isoformes de la myosine des muscles lisses.....	22
1.1.3.4 Plasticité contractile.....	23
1.1.3.5 Plasticité phénotypique.....	24
1.2 ASTHME ÉQUIN.....	26
1.2.1 <i>Définition</i>	26
1.2.2 <i>Classification des formes de la maladie</i>	26
1.2.2.1 Asthme équin léger à modéré.....	26
1.2.2.2 Asthme équin sévère.....	27
1.2.2.3 Classification phénotypique.....	27
1.2.3 <i>Facteurs de risques</i>	28
1.2.3.1 Exposition antigénique.....	28
1.2.3.2 Microbiote pulmonaire.....	29
1.2.4 <i>Méthodes diagnostiques</i>	29

1.2.4.1	Tests de fonction respiratoire	30
1.2.4.2	Lavage bronchoalvéolaire.....	31
1.2.4.3	Biomarqueurs	32
1.2.4.4	Remodelage pulmonaire	32
1.2.5	<i>Traitements</i>	33
1.2.5.1	Changements de régie.....	33
1.2.5.2	Corticostéroïdes	34
1.2.5.3	Bronchodilatateurs.....	35
1.2.5.4	Autres	36
1.2.6	<i>Comparaison avec asthme humain</i>	36
1.3	REMODELAGE PULMONAIRE DANS L'ASTHME	38
1.3.1	<i>Remodelage des composantes des voies respiratoires</i>	38
1.3.2	<i>Remodelage du muscle lisse</i>	39
1.3.2.1	Impact sur l'effet des respirations profondes	40
1.3.2.2	Changements fonctionnels.....	41
1.3.2.2.1	Influence de la vitesse de contraction	41
1.3.2.2.2	Altération intrinsèque du muscle lisse dans l'asthme.....	41
1.3.2.2.3	Rôle de l'insert(+)	42
1.3.2.2.4	Autres protéines hypercontractiles.....	43
1.3.2.3	Changements structuraux	43
1.3.2.3.1	Augmentation de la masse.....	43
1.3.2.3.2	Hyperplasie	45
1.3.2.3.3	Hypertrophie	47
1.3.2.3.4	Inclusion de matrice extracellulaire dans le muscle lisse bronchique	48
1.3.2.3.5	Changements structuraux des voies périphériques et centrales	48
1.3.3	<i>Facteurs menant au remodelage</i>	49
1.3.3.1	Inflammation	49
1.3.3.2	Bronchoconstriction	50
1.3.3.3	Domages épithéliaux.....	51
1.3.3.4	Instauration du remodelage.....	51
2	CHAPITRE 2 – ARTICLE	53
2.1	ABSTRACT.....	56
2.2	INTRODUCTION	57
2.3	MATERIALS AND METHODS.....	58
2.3.1	<i>Animals</i>	58
2.3.2	<i>Bronchoalveolar lavage fluid cytology</i>	58
2.3.3	<i>Endobronchial biopsies</i>	58

2.3.4	<i>(+)insert SMMHC expression</i>	59
2.3.5	<i>Histomorphometry</i>	59
2.3.6	<i>Statistical analysis</i>	60
2.4	RESULTS.....	61
2.4.1	<i>Animals</i>	61
2.4.2	<i>Bronchoalveolar lavage cytology</i>	61
2.4.3	<i>(+)insert SMMHC isoform expression in bronchial smooth muscle</i>	61
2.4.4	<i>Morphometric results</i>	61
2.4.5	<i>Correlation between ASM phenotypes</i>	62
2.4.6	<i>Correlation between pulmonary inflammation and ASM characteristics</i>	62
2.5	DISCUSSION.....	63
2.6	TABLES.....	68
2.7	FIGURES.....	69
2.8	REFERENCES	73
3	CHAPITRE 3 - DISCUSSION GÉNÉRALE	78
3.1	RÉSULTATS DE L'ÉTUDE.....	78
3.1.1	<i>Hypercontractilité : une anomalie intrinsèque au muscle lisse bronchique</i>	78
3.1.2	<i>Taux de prolifération et masse du muscle lisse bronchique</i>	79
3.2	LIMITES.....	80
3.2.1	<i>Sélection des chevaux</i>	80
3.2.1.1	Fonction pulmonaire	80
3.2.1.2	Lavages bronchoalvéolaires	81
3.2.1.3	Perspectives sur les critères de sélection	82
3.2.2	<i>Méthodes de laboratoire</i>	83
3.2.2.1	Volet insert(+) <i></i>	83
3.2.2.2	Volet histomorphométrique.....	84
3.2.2.2.1	Évaluation du PCNA.....	84
3.2.2.2.2	Qualité des biopsies	86
3.2.3	<i>Échantillonnage</i>	87
3.3	OUVERTURES	89
3.3.1	<i>Rôle des neutrophiles</i>	89
3.3.2	<i>Comparaison avec des études précédentes</i>	90
3.3.2.1	Lien avec les biomarqueurs sanguins	90
3.3.2.2	Lien avec le remodelage des autres composantes tissulaires des bronches.....	91
3.3.3	<i>Perspectives en lien avec le développement des formes sévères</i>	92

4	CHAPITRE 4 - CONCLUSION	94
	BIBLIOGRAPHIE	95
	ANNEXE I	119

Liste des tableaux

Tableau I. Valeurs seuils d'inflammation du liquide du lavage bronchoalvéolaire.....	31
Tableau II. (Tableau 1. article) Sequence of primers used for the quantification of the smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC) isoforms by RT-qPCR.....	68
Tableau III. (Tableau 2. article) Signalment and characteristics of each studied group.....	68
Tableau IV. Liste d'articles illustrant la variabilité des critères de sélection utilisés dans l'étude des chevaux asthmatiques légers à modérés.....	81

Liste des figures

Figure 1. Influence du diamètre des voies respiratoires sur les propriétés du flux d'air et la résistance en décollant.....	17
Figure 2. Composition de l'appareil contractile du muscle lisse bronchique.....	20
Figure 3. Cycle de la contraction musculaire.....	22
Figure 4. Illustration des différentes isoformes de l'extrémité amino-terminale de la chaîne lourde de la myosine.....	23
Figure 5. Remodelage pulmonaire associé à l'asthme équin sévère.....	38
Figure 6. Changements structuraux menant à l'augmentation de la masse de muscle lisse.....	44
Figure 7. (Figure 1. article) Example of proliferating cell nuclear antigen nuclei.....	69
Figure 8. (Figure 2. article) Measure of airway smooth muscle (ASM) area.....	70
Figure 9. (Figure 3. article) Differential cell count of bronchoalveolar lavage fluids (BALF).....	70
Figure 10. (Figure 4. article) Gene expression and histomorphometric analyses of airway smooth muscle (ASM).....	71
Figure 11. (Figure 5. article) Correlations between proliferation rate and ratio expression of the (+)insert isoform over Total SMMHC.....	71
Figure 12. (Figure 6. article) Correlations between neutrophilic inflammation and airway smooth muscle phenotypes expression.....	72
Figure 13. Ratio de l'expression génique de l'isoforme insert(+) de la chaîne lourde de la myosine dans les voies respiratoires de chevaux.....	84
Figure 14. Pourcentage de myocytes en prolifération évalués sur des biopsies endobronchiques.....	85
Figure 15. Score de qualité des biopsies.....	87
Figure 16. Regroupement de cellules PCNA positives.....	89
Figure 17. Comparaison des ratios de l'expression génique de l'isoforme insert(+) de la chaîne lourde de la myosine.....	91
Figure 18. Comparaison du remodelage du muscle lisse bronchique au remodelage structurel des composantes pulmonaires mesuré par le score semi-quantitatif histomorphométrique.....	92

Liste des sigles, des abréviations et des acronymes

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

ATPase : Enzymes hydrolysant les molécules d'adénosine triphosphate

BTRE : Biobanque de Tissus Respiratoires Équins

Ca²⁺ : Calcium

COPD : Chronic Obstructive Pulmonary Disease

CRP : C Reactive Protein

EBUS : Endoscopic Bronchial UltraSound

EGF : Epidermal Growth Factor

Elk1 : Facteur de transcription de l'ADN ETS Like-1

FEV₁ : Forced Expiratory Volume in 1 second

IAD : Inflammatory Airway Disease

IL : Interleukine

IOS : Impulsed Oscillometry System

Ki67 : Surfactant des chromosomes mitotiques utilisé comme marqueur de la prolifération

LABA : Long Acting Beta Agonists

LBA : Lavage bronchoalvéolaire

LC₁₇ : Chaînes essentielles de la myosine

LC₂₀ : Chaînes régulatrices de la myosine

LDNs : Low-Density Neutrophils

LPS : Lipopolysaccharide (endotoxine)

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases

Mg²⁺ : Magnésium

MLCK : Myosin Light Chain Kinase

MMPs : Matrix Metalloproteinases

NETs: Neutrophils Extracellular Traps

OM : Oscillatory Mechanics

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

Pi : Phosphate inorganique

qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction

RAO : Recurrent Airway Obstruction

ROS : Reactive Oxygen Species

RT : Reverse Transcriptase

SAA : Sérum amyloïde A

SMA : Isoforme lente de la chaîne lourde de la myosine de l'extrémité amino-terminale

SMB : Isoforme rapide de la chaîne lourde de la myosine de l'extrémité amino-terminale

SMMHC : Smooth Muscle Myosin Heavy Chain

SM1, SM2 : Isoformes de la chaîne lourde de la myosine de l'extrémité carboxyle-terminale

SPAOPD : Summer Pasture-Associated Obstructive Pulmonary Disease

SP-D : Surfactant Protein D

SRF : Serum Response Factor

sTREM-1 : Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 1

TGF : Transforming Growth Factor

Th1, Th2, Th17 : Profil d'inflammation T helper cell de types 1, 2 et 17

TNF : Tumor Necrosis Factor

V_E : Volume d'air inspiré par minute

« Sapere aude »
Horace

Remerciements

À mon directeur de recherche, Dr Jean-Pierre Lavoie, je tiens tout d'abord à vous exprimer ma gratitude de m'avoir accordé la chance d'intégrer l'équipe de votre laboratoire afin d'y réaliser mon projet de maîtrise. C'est assise en tailleur sur le tapis d'une salle pleine à craquer du Moscone Center que j'ai été introduite avec fascination à la complexité de l'asthme équin. J'étais loin de me douter, ce matin-là, que j'y découvrirais ce qui allait devenir mon sujet de maîtrise. De conférencier à directeur de recherche, votre passion et votre façon d'aborder les choses ont été pour moi une source d'inspiration. Merci pour votre confiance et votre encadrement sans failles tout au long de l'accomplissement de ce projet.

Aux membres du jury d'évaluation de ce mémoire, Dre Mathilde Leclère et Dr Pierre Hélie, je vous remercie d'avoir accepté de vous prêter à l'exercice. Je suis convaincue que vos commentaires enrichiront ce mémoire qui, je l'espère, vous sera d'une agréable lecture.

À tous les membres du laboratoire, je tiens à vous remercier pour votre aide précieuse : Khristine pour avoir eu la patience de répondre à mes innombrables questions; Esther et Selma pour votre aide indispensable avec les capricieux protocoles d'immunohistochimies; Sheila pour m'avoir enseigné l'art du RT-qPCR; Sophie pour ta bonne humeur et ton franc-parler qui m'a fait réfléchir à plus d'une reprise!

À mes acolytes du laboratoire, Flavie et Rosalie, je vous remercie pour votre soutien moral et pour tous ces moments de bonheur impromptus, partagés quelque part entre les locaux 2425, 2432 et 3433.

À mes fantastiques colocataires de l'appartement 3, Laury et Rosie, merci de votre oreille attentive à chacune de mes répétitions et je m'excuse de vous avoir martelé *ad nauseum* pendant près de deux ans avec la phrase : « L'asthme équin est une condition inflammatoire fréquente ».

À mes chers parents, Pierre et Sylvie, qui ont toujours été là pour m'encourager dans tous mes projets, quels qu'ils soient, depuis le jour un, merci pour chacun de vos inestimables conseils et votre support inconditionnel.

À la jeune insolente qui s'interrogeait jadis sur la plus-value de la réalisation d'un projet de recherche, je lui dirais aujourd'hui que cette opportunité lui permettrait d'apprendre, de découvrir et de réaliser plus de choses qu'elle ne pourrait se l'imaginer.

Introduction

L'asthme équin est une maladie fréquente partageant plusieurs similitudes avec l'asthme humain. Les chevaux atteints présentent différentes manifestations respiratoires, comme des écoulements nasaux, de la toux et, dans les cas d'asthme équin sévère, de la détresse respiratoire au repos. Étant donnée la vocation athlétique des chevaux de sport, l'asthme équin peut également être une source de baisses de performances. Alors qu'on estime qu'environ 15% des chevaux des pays de climat tempéré sont atteints des formes sévères de la maladie (1), le pourcentage de chevaux affectés des formes légères frôle 80% dans certaines populations de chevaux de course (2). Comme l'intolérance à l'effort peut être la seule manifestation clinique de la maladie, l'asthme est possiblement sous diagnostiqué chez les chevaux utilisés pour un sport de moins haute intensité.

L'asthme se caractérise entre autres par une bronchoconstriction ainsi qu'un remodelage des bronches. Parmi ces changements, le remodelage du muscle lisse est possiblement l'altération contribuant le plus au développement d'une obstruction bronchique (3). Chez les chevaux asthmatiques sévères, la masse du muscle lisse bronchique atteint plus du double de celle des chevaux sains (4, 5), et, malgré l'instauration d'un traitement, l'augmentation de la masse du muscle lisse bronchique des chevaux affectés ne demeure que partiellement réversible (6, 7). Par conséquent, la compréhension des mécanismes menant à l'augmentation de la masse de muscle lisse est primordiale, afin de traiter adéquatement les individus et ainsi, limiter l'implantation de ces changements du muscle lisse bronchique. Cette compréhension implique par conséquent l'étude des changements présents dans le muscle lisse bronchique des formes légères à modérées de l'asthme équin.

En plus de présenter une masse supérieure à la normale, le muscle lisse bronchique des asthmatiques sévères présente une hypercontractilité en périphérie (8) ainsi qu'une surexpression de l'isoforme rapide de la chaîne lourde de la myosine, nommée insert(+) (9). Cet isoforme, conférant au muscle lisse une rapidité de contraction supérieure (10, 11), pourrait également contribuer à l'hyperréactivité bronchique (12). Cependant, la présence de l'isoforme rapide dans les premiers stades de la maladie reste encore à déterminer.

1 Chapitre 1 – Recension des écrits

1.1 Physiologie

1.1.1 Anatomie des voies respiratoires

Afin de permettre un apport d'oxygène essentiel au métabolisme aérobie et l'élimination du dioxyde de carbone en résultant, l'air doit cheminer par les voies respiratoires du milieu externe jusqu'aux alvéoles où les échanges gazeux ont lieu. L'installation d'un gradient de pression fait entrer l'air d'abord par les voies respiratoires supérieures (conduits nasaux, pharynx, larynx) puis dans les voies respiratoires inférieures. Celles-ci débutent après le larynx par la trachée, comprenant une portion extra et intra-thoracique, et se composent ensuite par de multiples bifurcations bronchiques, dont le diamètre se rétrécit graduellement des bronches principales aux bronchioles. Chez les chevaux, l'arborisation des bronches suit une ramification monopodiale, comparable d'un cheval à l'autre permettant ainsi de cataloguer les différentes bronches segmentaires (13). La zone de conduction respiratoire, correspondant à l'espace mort anatomique, prend fin au commencement des canaux alvéolaires, desquels prennent forme les sacs alvéolaires. Les échanges gazeux ont lieu dans les alvéoles présents à l'extrémité de ces conduits distaux formant la zone respiratoire pulmonaire. (14)

1.1.2 Fonction pulmonaire

1.1.2.1 *Résistance pulmonaire*

Afin de permettre une expansion de la cage thoracique, le travail respiratoire déployé par les muscles inspiratoires doit surmonter les deux principales sources de résistance pulmonaire: 1) la résistance élastique des tissus pulmonaires et 2) la résistance de l'air (15). D'abord, l'application d'une pression transpulmonaire négative permet l'augmentation du volume pulmonaire dont l'expansion dépend des propriétés d'étirement des tissus. Cette caractéristique, nommée compliance, est une fonction inverse de l'élastance (16), qui définit plutôt la rigidité d'un tissu. Plus un tissu comporte de fibres de collagènes et de fibres élastiques, moins il est compliant, et plus son élastance est élevée (16). L'effort nécessaire requis pour accroître un volume pulmonaire donné sera alors plus important. La seconde source de résistance respiratoire provient de la résistance de l'air et varie au long de son passage dans l'arbre trachéo-bronchique. Dans les voies respiratoires où le débit d'air est rapide, le flot d'air est principalement turbulent, augmentant la

résistance engendrée (17). Vers la périphérie de l'arbre bronchique, un flot lamellaire s'installe et la loi de Hagen-Poiseuille régit alors la résistance de l'air (Figure 1). Bien que le flux d'air dans les voies respiratoires ne soit pas constamment linéaire, cette loi illustre l'importance du diamètre des voies respiratoires sur la résistance, puisqu'une réduction du diamètre d'un conduit augmente de façon exponentielle la résistance de l'air. Malgré tout, dans l'arbre bronchique, les voies respiratoires périphériques, correspondant aux bronchioles et aux voies se prolongeant au-delà de celles-ci, contribuent à la minorité de la résistance pulmonaire (18). En effet, bien que les voies périphériques n'aient qu'un diamètre de moins de 2 mm, la quantité importante de voies périphériques parallèles explique la faible contribution de cette zone à la résistance pulmonaire inspiratoire (19). La tension exercée par le parenchyme pulmonaire sur les voies respiratoires contribue au maintien de leur ouverture contrant les forces de fermetures comme la contraction

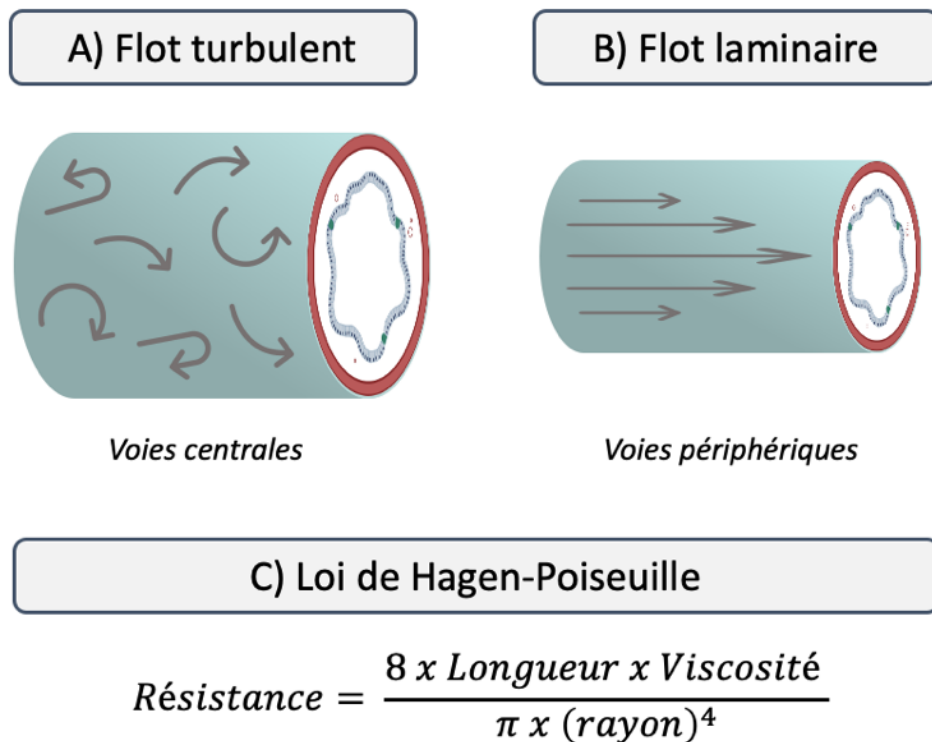


Figure 1. Influence du diamètre des voies respiratoires sur les propriétés du flux d'air et la résistance en décollant. A) Un flot turbulent est caractérisé par un mouvement anarchique des molécules d'air engendrant plusieurs collisions, une plus grande résistance s'opposant au passage de l'air en résulte. B) Une organisation des particules d'air s'établit avec le ralentissement du flot d'air dans un conduit cylindrique. Les particules voyageant au centre du courant sont dotées d'une plus grande vitesse que celles en périphérie. C) La résistance engendrée par un flot d'air laminaire répond à la loi de Hagen-Poiseuille. Selon cette loi, bien que la longueur d'un conduit et la viscosité d'une substance influencent la résistance, le diamètre du conduit est la variable la plus importante de l'équation.

du muscle lisse et l'affaissement élastique du poumon (20). Puisque les bronchioles sont dépourvues de cartilage et intégrées au parenchyme pulmonaire, leur ouverture dépend directement de l'expansion du volume pulmonaire, du moins, tant que les forces d'expansion exercées par le parenchyme ne sont pas altérées par une composition anormale, ou excédées par une rigidité supérieure de la voie respiratoire ou l'application de force de fermeture par le muscle lisse (21). Cette interdépendance entre le volume pulmonaire et le degré d'ouverture des voies explique que la résistance pulmonaire est une fonction inverse du volume pulmonaire (22). Bien que parfois négligé dans le calcul du travail respiratoire chez l'humain, l'effort nécessaire pour contrer l'inertance pulmonaire, soit pour générer une accélération des gaz et des tissus des voies respiratoires, semble plus important chez les chevaux possiblement étant donné la taille considérable du système respiratoire (23).

1.1.2.2 Physiologie respiratoire à l'exercice

À l'exercice, les besoins en oxygène augmentent considérablement, le volume d'air inspiré par minute (V_E) atteignant chez les chevaux de course près de 27 fois la valeur de repos (24). Le flot sanguin pulmonaire s'accélère également, réduisant le temps de diffusion de l'oxygène jusqu'aux globules rouges (22). À haut niveau d'intensité sportive, les capacités pulmonaires sont poussées à l'extrême, se traduisant par une hypoxémie augmentant avec l'intensité de l'exercice (24-26). Conséquemment, le facteur limitant de l'exercice chez le cheval a été attribué au système respiratoire (27), notamment à cause de la résistance de l'air (28) et de l'inertance pulmonaire (23) s'opposant aux échanges gazeux. Considérant que l'acheminement de l'air doit se faire de façon optimale pour répondre aux besoins physiologiques, une obstruction des voies respiratoires, même légère, entraîne conséquemment le développement plus rapide d'une hypoxémie (26, 29). L'hypoxémie étant associée à une fatigue locomotrice et centrale (30), celle-ci se manifeste principalement par une intolérance à l'effort. Une obstruction plus importante des voies respiratoires se solde par une hypoventilation présente même au repos, conséquence des iniquités de ventilation et de perfusions de certaines régions pulmonaires (22). Une obstruction sévère entraîne donc une hypoxémie détectable même au repos, qui s'amplifie à l'exercice, même lors d'intensité sous-maximale, et s'accompagne alors d'une augmentation du métabolisme anaérobie, compromettant grandement les capacités sportives de l'animal souffrant d'une telle condition (31).

1.1.3 Muscle lisse bronchique

1.1.3.1 Particularité du muscle lisse bronchique

Alors que la composition des voies respiratoires change progressivement des voies centrales aux voies périphériques, les segments bronchiques, de la trachée aux bronchioles, sont entourés par du muscle lisse disposé de façon hélicoïdale (32). Bien que présent dans les parois de l'ensemble de l'arbre bronchique, le rôle du muscle lisse demeure incertain. Alors que certains soutiennent que le muscle lisse contribue à améliorer la clairance ciliaire (33), ou qu'il pourrait contribuer à maintenir un ratio de ventilation-perfusion optimal, et limiter une expansion excessive dommageable des voies respiratoires lors de l'inspiration, d'autres mécanismes physiologiques suffisent pour répondre à ces besoins, rendant le muscle lisse accessoire (34). Certains qualifieront même la présence du muscle lisse de vestigiale, dont la fonction serait limitée à entraîner une bronchoconstriction néfaste en cas de maladie pulmonaire (35). Toutefois, le muscle lisse pourrait être impliqué dans l'augmentation de l'efficacité d'expectoration de la toux et dans le développement pulmonaire fœtal (34). En effet, le muscle lisse contribue à la génération de vagues de fluide pulmonaire essentielles à la morphogenèse des voies respiratoires (36).

1.1.3.2 Mécanisme de contraction

La contraction du muscle lisse peut, sur certains points, se comparer à la contraction du muscle strié. Dans les deux cas, le raccourcissement des sarcomères résulte du glissement des filaments d'actine et de myosine par l'intermédiaire de ponts d'unions entre ces deux molécules (37, 38). Toutefois, malgré les parallèles entre ces types de muscles, plusieurs différences sont notables. Le muscle lisse se caractérise entre autres par un cytosquelette beaucoup plus désorganisé, un ancrage des filaments d'actine au sarcomère sur des zones spécifiques nommées corps denses (39), et un contrôle involontaire de la contraction musculaire qui peut être régulée par des hormones ou d'autres stimuli (38, 40). Ces caractéristiques confèrent au muscle lisse une plus grande flexibilité contractile, soit la possibilité d'exercer une contractilité phasique ou tonique, ainsi que la capacité d'optimiser la génération de force en s'adaptant à différentes longueurs.

1.1.3.2.1 Appareil contractile du muscle lisse

L'appareil contractile du muscle lisse est composé, à l'instar du muscle squelettique, de filaments épais et de filaments fins, illustrés par la Figure 2. La myosine de type II est l'élément principal des filaments épais. Il s'agit d'une protéine motrice dont les filaments composent les deux chaînes lourdes (SMMHC). Elle s'accompagne de deux chaînes légères alcalines non phosphorylables (LC_{17}), aussi appelées chaînes essentielles, et deux chaînes légères régulatrices (LC_{20}) (41, 42). Les chaînes lourdes ont une extrémité globulaire, représentant le domaine moteur, responsable de former les liens actine-myosine et de catalyser le complexe magnésium-adénosine triphosphate ($Mg^{2+}ATP$) en magnésium-adénosine diphosphate ($Mg^{2+}ADP$). La contraction musculaire est entraînée par le changement de configuration de la tête de la myosine, dont l'activité est régulée par les chaînes légères régulatrices (41). Pour qu'une contraction ait lieu, la LC_{20} doit être phosphorylée par la kinase des chaînes légères (MLCK), elle-même activée par la calmoduline liée au calcium (Ca^{2+} -calmoduline), le tout étant initié par une entrée de calcium dans le myocyte. L'activation de la LC_{20} permet alors l'interaction actine-myosine (40). La phosphatase

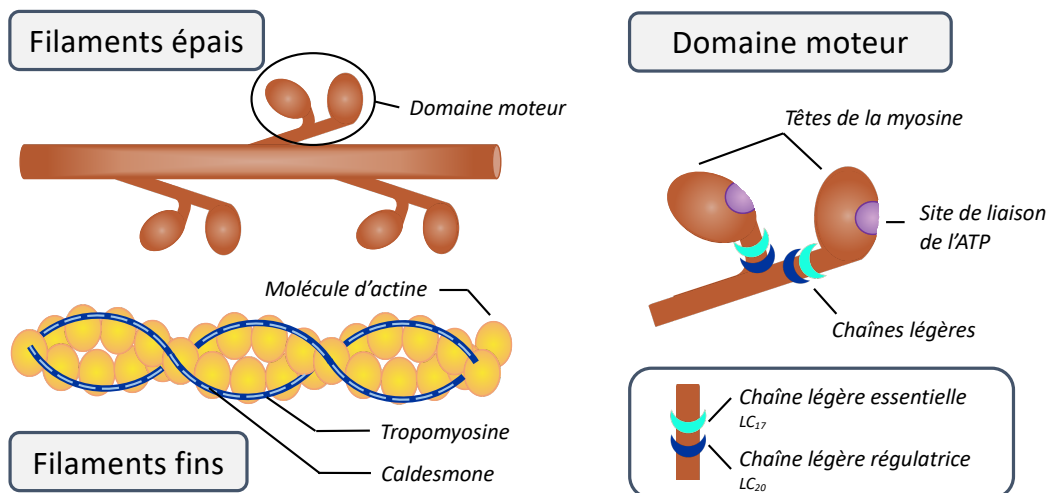


Figure 2. Composition de l'appareil contractile du muscle lisse bronchique. La figure illustre les extrémités globulaires des chaînes lourdes de la myosine ainsi que les chaînes légères régissant la conformation des têtes de la myosine, ces structures formant le domaine moteur. Les filaments fins, composés de molécules d'actines polymérisées, comprennent également différentes molécules modulant la liaison des têtes de myosine à l'actine, dont la tropomyosine et la caldesmone. ATP : Adénosine Triphosphate

des chaînes légères entraîne quant à elle la relaxation du muscle lisse (40). Les filaments fins sont composés de molécules d'actine polymérisées dotées de la capacité de se moduler pour s'adapter aux besoins de la cellule (39), et comportent plusieurs protéines régulatrices, comme la tropomyosine ou la caldesmone, déclenchant une augmentation ou une diminution, respectivement, de l'activité ATPase (43, 44).

1.1.3.2.2 Glissement des filaments

La contraction des myocytes résulte du glissement des filaments d'actine, entraîné par la formation de ponts d'union actine-myosine. Ces jonctions se font en plusieurs étapes dépendantes de l'hydrolyse de l'ATP (Figure 3), et permettent la transmission de la force de déplacement engendrée par la myosine au cytosquelette du myocyte, en passant par les filaments d'actine (39). Les phases pendant lesquelles l'actine et la myosine sont solidement reliées (étapes 1 et 5 de la Figure 3) forment les étapes de « travail ». Le temps requis pour compléter ces étapes limite la rapidité avec laquelle le cycle est achevé (45). Par extrapolation, la vitesse de relâche de l'ADP et de liaison à l'ATP influence la vitesse à laquelle le cycle s'effectue (11, 45, 46). La prolongation de la phase de travail correspond à la formation de ponts d'union lents nommés « ponts fixes » (*latch-bridges*) et provoque un ralentissement du glissement des filaments (47, 48). Une transition des ponts d'union à cycles rapides vers la formation de ponts fixes explique pourquoi la majeure portion de la contraction survient dans les premières secondes (49-51), et que la fin du raccourcissement du muscle est atteinte au moment où le nombre de ponts rapides est contrebalancé par la force des ponts fixes (52). Cet état d'équilibre, comportant un nombre supérieur de ponts fixes, correspondrait également à une rigidité accrue du muscle. Toutefois, puisqu'un étirement important permet un assouplissement du muscle lisse, Fredberg *et coll.* émettent la théorie qu'avec la respiration, ces ponts fixes sont constamment rompus, permettant d'éviter le stade d'équilibre et de maintenir une compliance du muscle (52). Ce mécanisme de bronchodilatation physiologique pourrait toutefois être compromis si la contraction musculaire se retrouvait accélérée, ou si les inspirations régulières n'étaient plus suffisantes pour permettre une relaxation du muscle, comme en présence d'une maladie pulmonaire (52).

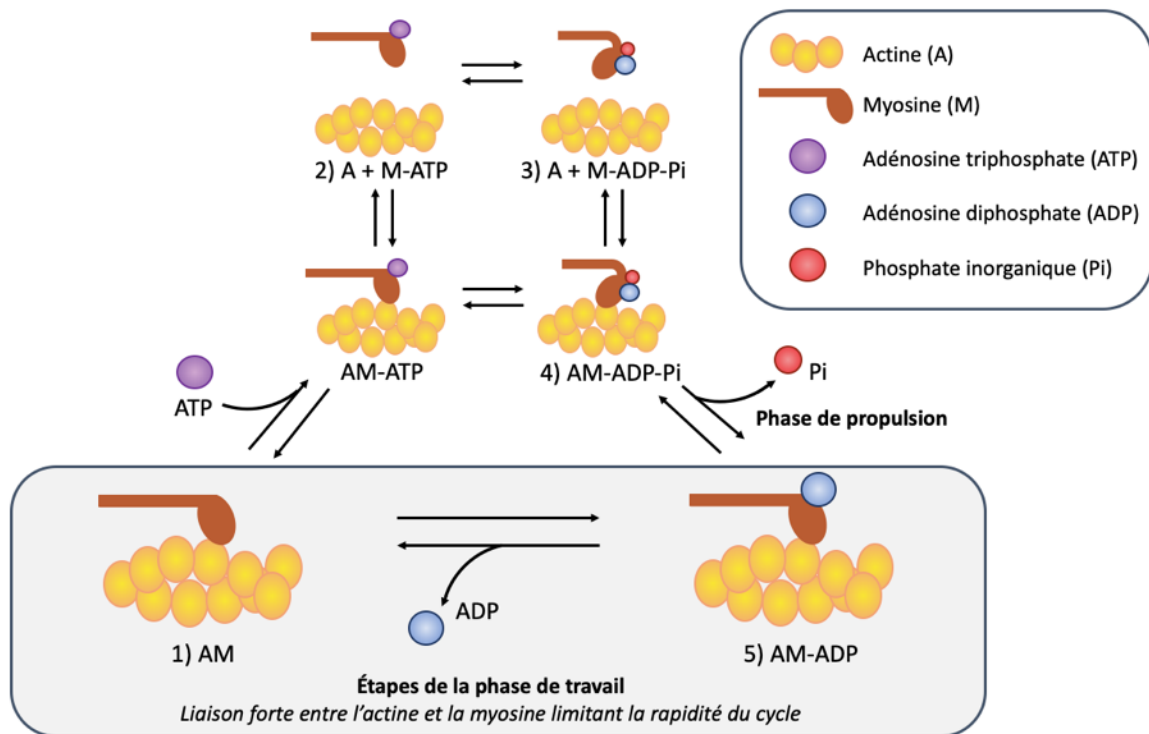


Figure 3. Cycle de la contraction musculaire. 1) À la suite de l'activation de la LC_{20} , le cycle débute par la liaison de l'actine à la myosine (AM). 2) Le pont d'union actine-myosine est ensuite rompu par la liaison de l'ATP à la myosine (A + M-ATP). 3) L'hydrolyse de l'ATP en ADP + Pi (A + M-ADP-Pi) change la configuration de la tête de myosine qui gagne alors en énergie potentielle et peut se rattacher faiblement au filament d'actine (4) AM-ADP-Pi). La relâche de la molécule de phosphate (Pi) permet à la tête de myosine de s'attacher fermement au filament d'actine (5) AM-ADP), et changer de configuration entraînant la propulsion du filament fin. La tête de la myosine reste ensuite fermement attachée et relâche l'ADP pour compléter le cycle (AM) (45, 53).

1.1.3.3 Isoformes de la myosine des muscles lisses

La chaîne lourde de la myosine comporte quatre isoformes résultant de l'épissage alternatif : deux à son extrémité carboxyle-terminale (3'), SM1 et SM2, et deux à son extrémité amino-terminale (5'), SMA et SMB, dont les diverses combinaisons SM1A, SM2A, SM1B et SM2B sont possibles (54, 55). Les isoformes de l'extrémité amino-terminale influencent la vitesse de contraction, alors que la contribution des deux premiers est incertaine (41, 56). L'isoforme SMB se caractérise par la présence d'une insertion de 21 nucléotides, codant pour une chaîne de sept acides-aminés, à la jonction 25/50 kDa près du site de liaison de l'ATP dans la région du domaine moteur de la tête de la myosine (54, 57) (Figure 4). Un lien direct entre la présence de cette insertion et l'activité Mg^{2+} -ATPase a été établi, suggérant son implication dans la vitesse de

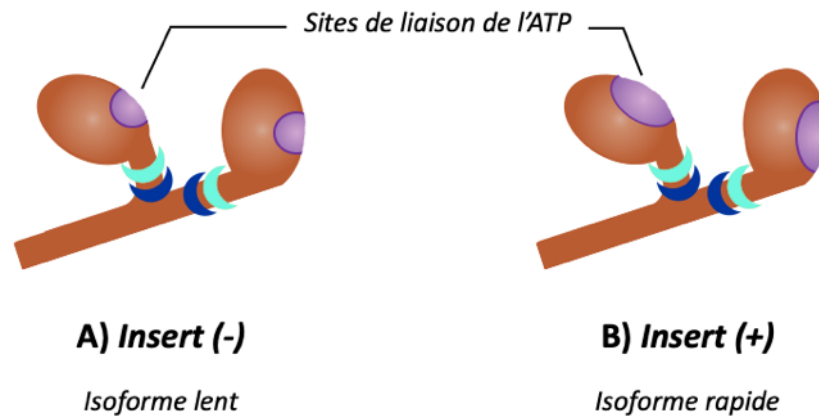


Figure 4. Illustration des différentes isoformes de l'extrémité amino-terminale de la chaîne lourde de la myosine. A) Illustration de l'isoforme SMA, aussi nommée insert(-) et dépourvu de l'ajout de sept acides aminés près du site de liaison de l'ATP caractérisant l'isoforme SMB, ou insert(+) (B)).

contraction (57). Bien que l'activité ATPase soit associée à l'expression de la chaîne légère acide (LC17_a) (56, 57), Rovner *et coll.* (10) ont démontré que la présence de l'insertion à elle seule expliquait une efficacité enzymatique ATPase deux fois plus élevée, indépendamment de l'activité de la chaîne légère, concordant avec les résultats d'autres études (11, 46, 57). Le rendement accru de l'isoforme SMB, aussi appelée insert(+) ou isoforme rapide, serait attribuable à une diminution de la phase de travail du cycle d'attachement actine-myosine. En effet, l'ajout de sept acides aminés réduirait l'encombrement stérique au site de liaison de l'ATP, augmentant ainsi l'efficacité de relâche de la $Mg^{2+}ADP$ et de liaison à la $Mg^{2+}ATP$ (11, 46). L'influence de l'insert(+) sur la rapidité de contraction, explique son expression plus élevée dans les organes plutôt phasiques, comme l'intestin ou la vessie, et plus basse dans les muscles plus toniques, comme ceux de l'aorte ou de l'utérus (10, 54, 57, 58). Bien que la fonction de l'organe dicte normalement l'expression de l'insert(+), celle-ci est également modulée par certaines conditions pathologiques (41, 59), dont l'asthme (9, 12).

1.1.3.4 Plasticité contractile

Le muscle lisse bronchique est constamment soumis à des fluctuations de charges et de longueurs, devant s'allonger à chaque inspiration pour accompagner la distension des voies respiratoires. Afin de se contracter efficacement malgré ces variations, le muscle lisse doit constamment s'adapter pour maintenir un chevauchement adéquat entre ses filaments d'actine

et de myosine (60). Cette particularité du muscle lisse correspond à la plasticité contractile, une autre caractéristique le distinguant du muscle squelettique (61). L'adaptation à ces degrés d'étirement variables se fait d'abord par une réorganisation de l'appareil contractile, pendant laquelle la force maximale est temporairement réduite, et est suivie par une récupération complète des capacités contractiles de la cellule maintenant adaptée à sa nouvelle longueur (62). Pendant la première phase d'adaptation, un assemblage ou une réorganisation des filaments de myosine a lieu, et permet ainsi la récupération de la force initiale après cinq ou six contractions (61). Une configuration des filaments épais en parallèle ou en série permet de répondre aux besoins mécaniques de la cellule en augmentant, respectivement, la force ou la vitesse de contraction (63). À l'instar des filaments épais, la modulation des filaments fins d'actine et du cytosquelette contribue également à la plasticité mécanique (39, 64).

L'adaptation du muscle lisse a toutefois une certaine limite menant à une perte momentanée de contractilité suivant un étirement important (64-67). Au même titre que la déconnexion des ponts d'union actine-myosine, cette diminution de la capacité contractile est nécessaire pour le maintien physiologique d'un faible tonus musculaire, et permet une bronchodilatation suivant une respiration profonde chez les sujets sains (68).

1.1.3.5 Plasticité phénotypique

En plus de son rôle contractile, le muscle lisse possède également la capacité d'afficher un profil prolifératif, parfois nommé synthétique. Cette polyvalence, nommée plasticité phénotypique, permet au muscle lisse de réagir différemment face à divers stimuli, et ainsi de se moduler selon le microenvironnement dans lequel il se trouve (69). En effet, lorsque des cellules musculaires sont mises en culture *in vitro* conjointement à des agents spasmogènes, des différences notables au niveau de l'organisation des myofilaments et des organelles intracellulaires s'installent (69, 70). La reconnaissance de nombreux filaments d'actine et de myosine caractérise une maturation cellulaire vers le phénotype contractile, alors qu'une augmentation du nombre de cellules en mitose et d'organelles synthétiques à l'intérieur du cytoplasme reflète plutôt le phénotype prolifératif/synthétique (69-71). De manière intéressante, la composition du phénotype prolifératif s'apparente à celle des myofibroblastes, et certains suggèrent que cette ressemblance pourrait influencer les résultats *in vitro* de plusieurs études (72), élargissant le spectre de propriétés attribuées au muscle lisse. Bien que parfois perçus comme deux sous-populations distinctes (69), le profil prolifératif et le profil contractile

représentent plutôt les extrêmes d'un continuum fonctionnel entre lesquelles la cellule musculaire oscille (69-71). L'adoption d'un phénotype est réversible, mais cette flexibilité peut être réduite dans certains cas (70, 71). Du fait de son action paracrine (69) et de son influence sur la bronchoconstriction (3), le muscle lisse influence le maintien de l'homéostasie pulmonaire. Une perturbation de l'équilibre entre ses fonctions synthétiques et contractiles pourrait donc influencer le développement de remodelage pulmonaire associé à plusieurs conditions respiratoires chroniques, dont l'asthme (70, 71).

1.2 Asthme équin

1.2.1 Définition

Souffle (*heaves*), *recurrent airway obstruction* (RAO), *Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (COPD), *Inflammatory Airway Disease* (IAD), *Summer Pasture-Associated Obstructive Pulmonary Disease* (SPAOPD), la liste autrefois exhaustive des termes référant à une obstruction inflammatoire non infectieuse des voies respiratoires inférieures chez le cheval est maintenant regroupée sous le terme d'asthme équin. Cette terminologie, basée sur les similitudes avec l'asthme humain, simplifie les communications avec les propriétaires de chevaux et uniformise la littérature (73, 74). Par définition, l'asthme est une condition hétérogène, caractérisée par une inflammation chronique des voies respiratoires inférieures, et associée à la présence de signes cliniques respiratoires (75). Chez les chevaux, ces signes cliniques se manifestent par la présence de toux chronique, d'une intolérance à l'effort ou d'efforts respiratoires augmentés (76). Cette condition prévalente mondialement, ne présente pas de prédisposition de race ou de sexe (1), et dans sa forme sévère, est caractérisée par une hyperréactivité bronchique, un remodelage pulmonaire et un bronchospasme soutenu (77). Une exposition à des antigènes, comme l'accès à du foin, ou une stabulation à l'intérieur fait généralement partie des antécédents des chevaux asthmatiques.

1.2.2 Classification des formes de la maladie

1.2.2.1 Asthme équin léger à modéré

Les formes légères à modérés de l'asthme équin affectent une population hétérogène de chevaux de tous âges, présentant des signes cliniques transitoires ou persistants (76), ainsi qu'une inflammation pulmonaire pouvant être éosinophilique, mastocytaire, neutrophilique ou mixte (77). Dans la forme légère, les signes cliniques peuvent se limiter à une intolérance à l'effort, alors qu'une toux chronique et un jetage nasal sont également présents en cas d'asthme modéré (78). Ces signes cliniques reflètent possiblement l'hyperréactivité bronchique présente chez ces chevaux (79, 80), mais leur subtilité implique toutefois un risque de sous-diagnostic des formes légères en cas d'activités sportives de moindre intensité (81). Malgré tout, les formes légères de l'asthme sont hautement prévalentes dans les populations de chevaux de sports mondialement (2, 82, 83), atteignant jusqu'à 80% des individus dans certaines populations dont le diagnostic repose sur la présence d'inflammation pulmonaire (2, 82). Bien que l'expression de signes

cliniques compatibles avec le diagnostic d'asthme équin léger à modéré prédispose au développement d'asthme sévère (84), les données épidémiologiques obtenues sur certaines populations de chevaux au Royaume-Unis démontrent qu'environ 15% des chevaux présentent un diagnostic d'asthme sévère (1). Comme la proportion de chevaux atteints des formes sévères est considérablement moindre, les stades léger et modéré de la maladie ne peuvent être considérés comme un continuum menant inévitablement à la forme sévère (76). Toutefois, un certain nombre de chevaux asthmatiques légers à modérés pourraient être prédisposés à développer la forme sévère (77).

1.2.2.2 Asthme équin sévère

La forme sévère de l'asthme équin est classiquement diagnostiquée chez des chevaux plus âgés (1) et est caractérisée par une importante neutrophilie pulmonaire (85) ainsi que par la présence de détresse respiratoire au repos (76, 86). L'obstruction bronchique des voies respiratoires centrales et périphériques, résultant du remodelage pulmonaire, du bronchospasme et de l'accumulation de mucus (77), cause une augmentation de l'élastance des tissus et de la résistance de l'air, obligeant le cheval à générer une plus grande différence de pression à l'inspiration et à l'expiration (87). Alors que la respiration des chevaux implique normalement, tant à l'inspiration qu'à l'expiration, une phase active nécessitant le recrutement des muscles respiratoires, et une passive où les mouvements de la cage thoracique dépendent de l'élasticité des tissus (88), les chevaux asthmatiques sévères tronquent les étapes passives, éliminant la motion biphasique de la respiration (89). Celle-ci se fait à un plus haut volume pulmonaire, permettant de maximiser les flots d'air à l'inspiration et à l'expiration (90). Une dilatation des naseaux et un effort abdominal marqué sont aisément identifiables lors de crise (87). De plus, la présence de toux, ainsi que l'intolérance à l'effort sont généralement plus marquées que dans les formes légères (76). Différentes stratégies de traitement peuvent être instaurées afin de rétablir la fonction pulmonaire et ainsi permettre au cheval d'atteindre un stade asymptomatique de rémission, mais la forme sévère de l'asthme équin demeure incurable (76).

1.2.2.3 Classification phénotypique

Bien que la division de l'asthme équin en stades léger, modéré et sévère reflète la sévérité des signes cliniques, différents phénotypes de la maladie sont reconnus (74). Un phénotype décrit les caractéristiques observables d'une condition (91) et permet ainsi de regrouper des individus

partageant certaines similarités dans la présentation clinique d'une maladie. Dans l'asthme humain, la reconnaissance de différents phénotypes permet d'établir une médecine personnalisée, répondant plus spécifiquement aux besoins de chaque patient. Un traitement basé sur les signes cliniques observés ne cible toutefois pas directement les différentes pathophysiologies sous-jacentes, expliquant qu'une corrélation entre les phénotypes et la réponse aux traitements ne soit pas bien démontrée (75). Une sous-classification basée plutôt sur les endotypes de la maladie, soient les différentes pathophysiologies de l'asthme (91), permettrait une médecine de précision (92) ciblant les divers mécanismes menant au syndrome complexe et hétérogène de l'asthme (93). Or, une meilleure connaissance de ces endotypes, passant par l'établissement de différents biomarqueurs (92), est d'abord requise. Dans les formes légères de l'asthme équin, différents phénotypes d'inflammation pulmonaire sont reconnus, soient un phénotype neutrophilique, mastocytaire, éosinophilique ou mixte (74). Par contre, la pathophysiologie de l'asthme équin est encore mal définie et l'identification inconstante des profils inflammatoires Th1, Th2 et Th17 (94-99) ainsi que la contribution de plusieurs gènes dans le développement de la maladie (100) suggèrent que divers mécanismes sont impliqués dans le développement de l'asthme équin (74, 101). L'approche par médecine personnalisée dans le traitement de l'asthme équin est donc un idéal dont l'atteinte est limitée par nos connaissances actuelles des différents endotypes de la maladie (102).

1.2.3 Facteurs de risques

1.2.3.1 Exposition antigénique

L'exposition de chevaux susceptibles à des antigènes est le facteur déclencheur de l'asthme équin. Chez des chevaux asthmatiques sévères, une exposition à un milieu riche en poussières organiques suffit à induire une crise d'exacerbation de la condition (103, 104). Plusieurs particules aériennes organiques et inorganiques présentes dans les écuries sont susceptibles d'entraîner une réaction inflammatoire, notamment les spores, les moisissures, les endotoxines, les β -glucanes (une composante de la paroi des levures et des moisissures), les micro-organismes, les particules d'ammonium, ou des polluants atmosphériques (76, 105). Parmi celles-ci, certaines ont été directement associées à l'exacerbation de la maladie, comme les antigènes aérosolisés d'*Aspergillus fumigatus* et de *Saccharopolyspora rectivirgula* (auparavant *Micropolyspora* et *Faenia* spp) (103), ou les endotoxines (lipopolysaccharide (LPS)) (106). Une exposition aux particules respirables contenues dans le foin et la paille déclenche également une inflammation

pulmonaire malgré des concentrations estimées d'endotoxines beaucoup plus faibles (106). Cette réaction reflète l'effet synergique des endotoxines avec les autres constituants des poussières d'écurie, comme les moisissures et les β -glucanes (107), et suggère que les endotoxines ne représentent pas les seuls éléments déclencheurs des crises d'asthme. En effet, une augmentation de la concentration des β -glucanes, reflétant la quantité de moisissures et de levures, est associée au développement d'une neutrophilie pulmonaire (107, 108). La présence de champignons à la cytologie du lavage trachéal représente également un facteur de risque de l'asthme équin léger à modéré (109). Bien que la majorité des études démontrant la causalité d'une exposition antigénique dans l'exacerbation de signes respiratoires ont été réalisées sur des chevaux atteints d'asthme sévère, l'étroite corrélation entre l'exposition antigénique et l'inflammation pulmonaire suggère que les formes légère et sévère de l'asthme partagent une étiologie similaire (110).

1.2.3.2 *Microbiote pulmonaire*

Une augmentation de la prévalence de l'asthme humain a été associée au milieu urbain, dans lequel une exposition à une biodiversité réduite pourrait diminuer la richesse du microbiote, réduire la tolérance du système immunitaire, et prédisposer au développement de réaction de type allergique (111). Parallèlement, chez les chevaux l'environnement semble influencer la composition du microbiote des voies respiratoires (112, 113). De plus, certaines évidences de dysbiose des voies respiratoires inférieures dans l'asthme équin léger à modéré (114, 115), ainsi que dans l'asthme sévère en exacerbation (112) suggèrent une altération du microbiote pulmonaire dans l'asthme équin.

1.2.4 *Méthodes diagnostiques*

Le diagnostic d'asthme se base principalement sur un historique de signes cliniques compatibles avec la maladie, soit une intolérance à l'effort, la présence de toux chronique, de jetage nasal mucoïde et, dans le cas de l'asthme sévère, d'une détresse respiratoire au repos lors d'une exposition antigénique (76). Comme ces signes peuvent être vagues, la confirmation du diagnostic se fait d'abord par l'élimination d'autres conditions pulmonaires ou extra-pulmonaires pouvant entraîner des signes similaires, et ensuite par la confirmation d'une inflammation des voies respiratoires inférieures. Une objectivation et une quantification d'une obstruction respiratoire peuvent également faire partie de l'examen initial dans certains centres de référence.

1.2.4.1 Tests de fonction respiratoire

L'obstruction pulmonaire, secondaire au bronchospasme et au remodelage caractéristiques de l'asthme équin sévère, induit des signes cliniques respiratoires tels qu'une intolérance à l'exercice, un élargissement des naseaux et un effort abdominal expiratoire. Bien qu'en présence d'une obstruction sévère ces signes soient facilement identifiables, leur manifestation est peu représentative de la fonction pulmonaire réelle (87). L'objectivation de la fonction respiratoire dans l'asthme permet donc de préciser l'étendue de l'obstruction, de localiser l'obstruction en périphérie ou dans les voies centrales, et de suivre la réponse au traitement. Plusieurs méthodes ont été décrites et validées chez les chevaux asthmatiques sévères. Parmi celles-ci, les mécaniques respiratoires standards (traduit du terme anglais « *standard lung mechanics* ») sont une méthode fréquemment utilisée pour évaluer la fonction respiratoire. Elles sont effectuées à l'aide d'un cathéter œsophagien, placé au tiers distal de l'œsophage, qui détecte les variations de pressions transœsophagiennes reflétant les pressions intra-thoraciques (89). Un pneumotachographe enregistre le flot d'air que le cheval respire alors qu'un masque recouvre ses naseaux, permettant ainsi de calculer plusieurs paramètres témoignant des capacités pulmonaires. Les mécaniques peuvent être combinées à un test de broncho-provocation avec un agoniste contractile, tel que l'histamine, afin d'évaluer l'hypersensibilité et l'hyperréactivité bronchique (116, 117). Bien que les mécaniques standards détectent les changements pulmonaires lors de crise d'exacerbation, elles ne sont pas suffisamment sensibles pour détecter des changements de fonction pulmonaire en présence d'une légère hyperréactivité sous clinique (104). Plus sensible, la mesure du volume maximal expiré en une seconde (FEV₁) est possible chez le cheval, mais requiert un système complexe et invasif (118, 119). Autrement, les mécaniques à oscillations forcées (OM), incluant les systèmes à une seule fréquence et l'oscillométrie d'impulsion (*impulsed oscillometry system* (IOS)), sont également utilisées chez les chevaux (120). Bien que l'IOS n'identifie aucune différence entre les chevaux asthmatiques en rémission et les chevaux contrôles (121), il démontre une sensibilité supérieure aux mécaniques respiratoires dans la détection de l'obstruction résiduelle post-bronchodilatateur chez les chevaux en exacerbation (121), ainsi que dans la diminution de fonctions respiratoires de chevaux atteints d'asthme léger (122). Malgré l'existence de plusieurs tests de fonction pulmonaire, aucun n'est présentement adapté à une utilisation hors des centres

de référence (81), et leur sensibilité, sans test de broncho-provocation, est limitée chez les chevaux asthmatiques sévères en rémission ou les chevaux atteints des formes légères.

1.2.4.2 Lavage bronchoalvéolaire

L'objectivation de l'inflammation pulmonaire confirmant le diagnostic d'asthme équin repose sur la cytologie du fluide obtenu par lavage bronchoalvéolaire (LBA) (76). Plusieurs techniques de lavages bronchoalvéolaires sont décrites (123), mais le principe général demeure le même, soit d'échantillonner sous sédation la population cellulaire des voies respiratoires périphériques et des alvéoles d'une section du poumon. Pour ce faire, 300 mL à 500 mL de saline isotonique tiède sont instillés par un tube ou un vidéo-endoscope coincé au niveau d'une bronche distale, avant d'être récupérés par succion (124). Un différentiel du pourcentage de chaque type cellulaire peut ensuite être effectué sur la couche monocellulaire obtenue par étalement ou cyto centrifugation du liquide du lavage bronchoalvéolaire (123). Le décompte est généralement fait sur 400 cellules (123). Afin d'éviter une sous-estimation du compte de cellules métachromatiques, une coloration permettant d'identifier les granules des mastocytes, telles qu'une coloration May-Grünwald Giemsa ou une coloration supplémentaire au bleu de toluidine, devrait être effectuée (125). Des valeurs permettant d'identifier la présence d'inflammation pulmonaire ont été proposées (Tableau I), mais l'absence de standardisation de la technique complique l'établissement de valeurs seuils délimitant une valeur normale d'une inflammation légère (76). Un comptage total des cellules récupérées par unité de volume estimé par hématimètre est rapporté dans plusieurs études (126-129). Cependant, la grande variabilité des résultats, également influencés par les différentes techniques de lavage bronchoalvéolaire utilisées, limite son utilisation comme critère diagnostique.

Tableau I – Valeurs seuils du liquide du lavage bronchoalvéolaire définissant la présence d'inflammation pulmonaire (76, 130)

	Absence d'inflammation	Asthme léger à modéré		Asthme sévère	
	<i>Consensus 2016</i>	<i>Consensus 2007</i>	<i>Consensus 2016</i>	<i>Consensus 2007</i>	<i>Consensus 2016</i>
Neutrophiles (%)	≤5	Légère neutrophilie	>10	>20	>25
Mastocytes (%)	≤2	>2	>5		
Éosinophiles (%)	≤1	>0.1	>5		
Lymphocytes (%)		Lymphocytose			Diminué
Macrophages (%)		Monocytose			Diminué

Bien que certaines études démontrent une association entre la présence de mucus trachéal et la manifestation de certains signes cliniques (131, 132), justifiant la réalisation d'une endoscopie des voies respiratoires supérieures dans l'investigation d'asthme équin, le manque de précision de ce test (109) témoigne de la nécessité d'objectiver l'inflammation pulmonaire par un lavage bronchoalvéolaire. Celle-ci est d'ailleurs liée à l'expression de signes cliniques de l'asthme équin. Dans les formes légères, alors qu'une inflammation neutrophilique est associée à la présence de toux (133), une neutrophilie pulmonaire ou un comptage élevé de mastocytes sont tous les deux associés à une baisse de performance (2) et une augmentation des mastocytes ou des éosinophiles sont reliés à une altération de la fonction pulmonaire (122). Une neutrophilie légère est également associée à la présence de dommages tissulaires des bronches périphériques sans signes cliniques (134), alors qu'une élévation marquée du nombre de neutrophiles corrèle avec la présence d'efforts inspiratoires exagérés au repos ainsi qu'une intolérance à l'exercice (82).

1.2.4.3 *Biomarqueurs*

Similairement aux patients asthmatiques présentant un phénotype neutrophilique (135), certains paramètres d'inflammation systémique sont augmentés chez les chevaux asthmatiques sévères (101), menant à l'investigation de biomarqueurs systémiques dans l'asthme équin, tels que le sérum amyloïde A (SAA), la protéine C réactive (CRP), la sécrétoglobine, l'haptoglobine, le récepteur de déclenchement exprimé sur les cellules myéloïdes 1 (sTREM-1), ainsi que l'expression de différentes cytokines (78, 136-138). Parmi ces paramètres, le *surfactant protein D* (SP-D), une protéine spécifique aux dommages pulmonaires augmentée chez les chevaux asthmatiques, pourrait s'avérer un biomarqueur éventuel (78, 137, 139). Autrement, la concentration des neutrophiles de faible densité (LDNs), étant augmentée chez les chevaux asthmatiques sévères pourrait également présenter un certain potentiel comme marqueur (140), mais son augmentation en cas d'inflammation systémique est peu spécifique de l'asthme (141).

1.2.4.4 *Remodelage pulmonaire*

Bien que l'étude du remodelage ne serve pas en soi de méthode diagnostique reconnue (81), des changements tissulaires sont détectables par biopsies endobronchiques et permettent de différencier les chevaux sains de chevaux asthmatiques. En effet, un score histomorphométrique, basé sur des lésions typiques de l'asthme équin affectant l'épithélium, la

sous-muqueuse et le muscle lisse, a été développé (142). Un score global supérieur à 5/14 permet de différencier les chevaux asthmatiques sévères en exacerbation, ainsi que les chevaux asthmatiques légers à modérés, des chevaux contrôles (142, 143). Le développement d'une technique d'échographie endobronchique, dont les résultats *in vivo* corrèlent bien avec les mesures histologiques, permet également de mesurer la présence de remodelage du muscle lisse dans les voies respiratoires centrales chez des chevaux sous sédation (144). De plus, l'association entre un bronchospasme résiduel et la présence de remodelage du muscle lisse en région périphérique (6, 7), ainsi que la corrélation entre les dommages présents sur des biopsies pulmonaires transcutanées et une fonction pulmonaire anormale (145) suggèrent que le remodelage pulmonaire contribue à la diminution des capacités respiratoires et pourrait refléter un moyen indirect d'évaluer celles-ci.

1.2.5 Traitements

Le traitement de l'asthme équin vise principalement une réduction de l'inflammation pulmonaire (76, 105). L'amélioration de celle-ci, étroitement liée à la fonction pulmonaire et aux performances sportives, nécessite une diminution de l'exposition antigénique, une corticothérapie pouvant y être combinée. Une amélioration temporaire de la fonction pulmonaire peut également être atteinte par l'utilisation de bronchodilatateurs. Ces trois stratégies, utilisées séparément ou conjointement, forment la base du traitement de l'asthme équin. Toutefois, la littérature caractérisant les effets des traitements étant beaucoup plus complète dans la forme sévère de l'asthme équin, les traitements des formes légères à modérés en sont majoritairement extrapolés (76).

1.2.5.1 Changements de régim

L'élément déclencheur des signes cliniques de l'asthme équin étant une exposition antigénique, une réduction de l'exposition à des particules organiques et inorganiques respirables est le principal objectif visé dans la prévention et le traitement de la maladie. Au niveau de la zone respirable du cheval, le type d'alimentation est le principal facteur déterminant la quantité de particules de poussières (146). Le remplacement du foin sec par de l'ensilage (146), une diète à base de granulés de luzerne (147), ou même par du foin préalablement submergé dans l'eau (148) permet de diminuer la quantité de poussières présente dans la zone respirable de l'animal. De leurs côtés, la pasteurisation du foin améliore ses propriétés hygiéniques en réduisant sa charge

bactérienne et en moisissures (149, 150) et l'utilisation d'un système enrobant les fibres de foin d'huile permet d'améliorer la fonction pulmonaire des chevaux (151). Toutefois, bien que le foin soit la principale source de particules antigéniques, le type de litière utilisée contribue à près de 30% de celles-ci (146). Ainsi, une alimentation à base de granulés, combinée à un changement d'une litière de paille pour une litière de copeaux de bois (152), ou de papier (153), permet de réduire de moitié la poussière ambiante (152) et d'améliorer la fonction pulmonaire (153). D'autre part, nonobstant qu'une meilleure ventilation diminue la charge de particules présentes dans l'air (154, 155), un endroit contenant du foin et de la paille, même bien ventilé, possède une concentration cinq fois plus élevée en endotoxines et possède près de 90% plus de poussières (156), démontrant donc l'importance du remplacement de la paille et du foin dans l'environnement d'un cheval asthmatique. Lorsque l'exposition antigénique est minimisée, soit avec un remplacement complet du foin sec, une litière appropriée, ainsi qu'une bonne ventilation, la concentration de poussières organiques, et proportionnellement la quantité d'endotoxines (157), est diminuée. Cependant, la quantité de poussières en suspension dans l'air varie malgré tout d'une écurie conventionnelle à l'autre (157), et peut être influencée par moult détails, tels que la distribution du foin dans un filet (155), la température ambiante (158), et le nettoyage des box (148, 159). La mise au pâturage de chevaux asthmatiques sévères permet de diminuer au minimum l'exposition à des particules respirables et d'atteindre un stade de rémission, caractérisé par une normalisation de la fonction pulmonaire (6, 7, 104, 160, 161). Toutefois, dans le cas particulier de l'asthme équin associé au pâturage, une exacerbation des signes est observée pendant les mois d'été chez des chevaux gardés la majorité du temps à l'extérieur (162).

1.2.5.2 Corticostéroïdes

Puisque l'instauration de changements environnementaux exige de la rigueur, qu'une normalisation des fonctions pulmonaires peut nécessiter plusieurs semaines (153) et qu'une hypersensibilité bronchique sous-clinique persiste lorsque les chevaux sont gardés à l'intérieur d'une écurie même « faible en poussière » (104), les corticostéroïdes sont souvent utilisés dans la gestion de l'asthme équin. Leurs impacts sur la répression génomique de facteurs inflammatoires et la stimulation de la transcription de gènes anti-inflammatoires, ainsi que leurs actions directes par liaison aux récepteurs membranaires (163) induisent une amélioration de la fonction respiratoire plus rapide qu'une éviction antigénique seule (6, 7). Plusieurs corticostéroïdes ont démontré une efficacité dans le traitement de l'asthme équin sévère.

Certains sont administrés par voie systémique, dont la dexaméthasone, la prednisolone (164), ou la triamcinolone (165), et d'autres par inhalation, comme le dipropionate de bécloéthasone (166, 167), la fluticasone (6), le cyclésonide (168) ou encore le budésonide (169). Parmi ceux-ci, seul le cyclésonide est présentement homologué pour le traitement de l'asthme chez les chevaux. L'utilisation des corticostéroïdes pour le traitement de l'asthme équin léger à modéré est majoritairement extrapolée des résultats obtenus pour le traitement de l'asthme sévère, faute de données suffisantes sur les formes légères. Un article a toutefois démontré une diminution de l'hyperréactivité bronchique de chevaux asthmatiques légers à modérés suite à un traitement de dexaméthasone systémique ou de fluticasone inhalé (80). Les mécanismes d'actions des corticostéroïdes sont multiples, mais il est possible que l'amélioration de l'hyperréactivité soit liée à leur action directe sur la contractilité du muscle lisse bronchique (8, 9, 170), en plus de leur effet indirect via la répression de l'inflammation pulmonaire (163). À plus long terme, les corticostéroïdes ont également un effet bénéfique sur le remodelage pulmonaire présent dans l'asthme équin sévère (6, 7). Leur combinaison avec des bronchodilatateurs possède en outre un effet synergique sur le remodelage de certaines composantes tissulaires (7). Malgré ses effets anti-inflammatoires, une corticothérapie seule ne normalise pas les pourcentages de granulocytes présents dans le lavage bronchoalvéolaire (6, 80, 163), rappelant l'importance des changements de régulation dans le traitement de l'asthme.

1.2.5.3 Bronchodilatateurs

Bien que les corticostéroïdes puissent accélérer la normalisation de la fonction pulmonaire (6, 7), les bronchodilatateurs permettent de renverser plus rapidement, mais temporairement, le bronchospasme caractéristique de l'asthme. Puisque la contraction du muscle lisse bronchique est principalement stimulée par le système parasympathique (17), les bronchodilatateurs sont majoritairement sympathomimétiques ou parasympatholytiques. L'administration de salmétérol (171), d'albutérol (172) ou de l'énantiomère lévalbutérol (173), des agonistes β_2 -adrénergiques sympathomimétiques, sous forme d'aérosols a démontré des évidences d'amélioration de la fonction respiratoire et des signes cliniques chez des chevaux asthmatiques sévères. Bien qu'ils permettent tous les trois de réduire environ de moitié la bronchoconstriction, le salmétérol est le seul dont la durée des effets perdure jusqu'à six heures post-inhalation, le classant ainsi dans la catégorie des agonistes β_2 -adrénergiques de longue action (LABA). De son côté, l'administration *per os* de clenbutérol, le seul agoniste β_2 -adrénergique homologué pour le traitement d'asthme

équin, permet d'améliorer les signes cliniques de 75% des chevaux asthmatiques traités pendant 10 jours (174). D'autre part, les agents parasympholytiques, comme l'atropine ou le bromure de N-butylscopolamine, permettent également une bronchodilatation, mais peuvent s'accompagner de répercussions systémiques importantes (105). L'administration par inhalation de l'anticholinergique bromure d'itrapromium démontre également une amélioration de la fonction respiratoire, en améliorant notamment la résistance pulmonaire (175). D'autres molécules, comme les dérivés des xanthines peuvent agir comme bronchodilatateurs (176, 177). L'aminophylline a toutefois été associée à une agitation et à une augmentation de la fréquence cardiaque (176), et la biodisponibilité de la pentoxifylline est inconstante (177). Malgré leur forte utilité comme drogues d'urgences (105), l'administration de bronchodilatateurs doit se faire parallèlement à une réduction de l'exposition antigénique afin d'éviter une inhalation plus importante de poussières organiques (76) et pour permettre une amélioration clinique au-delà des quelques heures d'efficacité des bronchodilatateurs (178).

1.2.5.4 *Autres*

Plusieurs autres traitements ayant obtenus des résultats prometteurs chez les humains, dont des inhibiteurs de la phosphodiesterase et de la protéine kinase activée par le mitogène p38 (MAPK), des modulateurs des leucotriènes, des agents mucolytiques ou encore des stabilisateurs des mastocytes (cromoglycate sodique), ont obtenu des résultats variables lorsque testés sur des chevaux asthmatiques sévères (101, 105), malgré que le cromoglycate sodique permette une amélioration des scores respiratoires dans l'asthme équin léger à modéré (179). Le tamoxifène, un modulateur des récepteurs des estrogènes pouvant potentiellement diminuer la neutrophilie pulmonaire, n'a pas démontré de résultats cliniques supportant son utilisation (180). Bien que certains accordent une certaine place aux antibiotiques dans le traitement de l'asthme équin (181), l'absence d'effets directs d'une monothérapie d'azithromycine, ou de ceftiofur (161), ainsi qu'une préoccupation du développement d'antibiorésistance (181) freinent leur utilisation comme thérapie de première ligne.

1.2.6 Comparaison avec asthme humain

L'asthme humain se définit comme une condition hétérogène, caractérisée par une inflammation chronique des voies respiratoires inférieures, et associée à un historique de respiration sifflante, de sentiment d'oppression thoracique, d'un souffle court s'accompagnant

d'une obstruction variable du flot d'air à l'expiration (75). L'asthme humain partage des similitudes remarquables avec l'asthme équin dans sa présentation clinique, son évolution temporelle, et son remodelage pulmonaire caractéristique (73, 101, 182). L'asthme chez l'humain est classiquement décrit par un phénotype inflammatoire majoritairement éosinophilique (183), contrairement à l'asthme équin sévère qui est plutôt neutrophilique (85, 86). Toutefois, le phénotype neutrophilique est également reconnu chez l'humain (183) et est associé à une mauvaise réponse aux corticothérapies ainsi qu'à des conséquences plus sévères de la maladie (135, 141, 184). Les nombreux parallèles entre l'asthme humain et équin justifient l'utilisation du cheval comme modèle animal d'asthme humain (77, 101, 182, 185). Certaines distinctions dans la classification des deux conditions doivent toutefois être mentionnées, une différence notable se situant dans la classification de la sévérité de la maladie. Chez les chevaux, la distinction entre les stades légers à modérés et la forme sévère est établie par la présence de détresse respiratoire au repos (76, 86). Chez l'humain, le degré de sévérité se reflète plutôt par le contrôle des signes cliniques obtenu après l'initiation d'une thérapie, une réponse réfractaire à l'instauration de deux à trois mois de traitements définissant un asthme sévère (75). Une nuance doit donc être accordée lors de l'extrapolation des résultats d'une espèce à l'autre puisqu'il est possible que les endotypes de la condition varient entre les espèces.

1.3 Remodelage pulmonaire dans l'asthme

1.3.1 Remodelage des composantes des voies respiratoires

Le remodelage se définit comme un changement de composition et d'organisation du contenu moléculaire, cellulaire et tissulaire des composantes des voies respiratoires (62). Les changements caractéristiques de l'asthme humain et équin incluent une desquamation de l'épithélium, une hyperplasie épithéliale et des cellules à gobelet, une fibrose de la lamina propria, une angiogenèse, ainsi qu'une augmentation de la masse de muscle lisse des bronches et des bronchioles (77, 186-188) (Figure 5). Un épaissement de la membrane basale épithéliale peut également être présent chez l'humain, mais n'est pas une caractéristique l'espèce équine (77). Le remodelage du muscle lisse ne peut donc être regardé comme un évènement unique, sans prendre en considération les structures adjacentes. En effet, la composition de la matrice extracellulaire, de l'épithélium et de l'ensemble des structures bronchiques étant tous altérés, tant dans l'asthme humain (189) que dans l'asthme équin (77, 187, 190), contribuent à la perte de fonction pulmonaire (191, 192), positionnant ainsi le remodelage pulmonaire au cœur de la maladie (193). Il existe également une influence bidirectionnelle entre le remodelage du muscle lisse et le remodelage des autres structures environnantes. En effet, le muscle lisse ne subit pas simplement les conséquences des perturbations des voies de signalisation des tissus qui

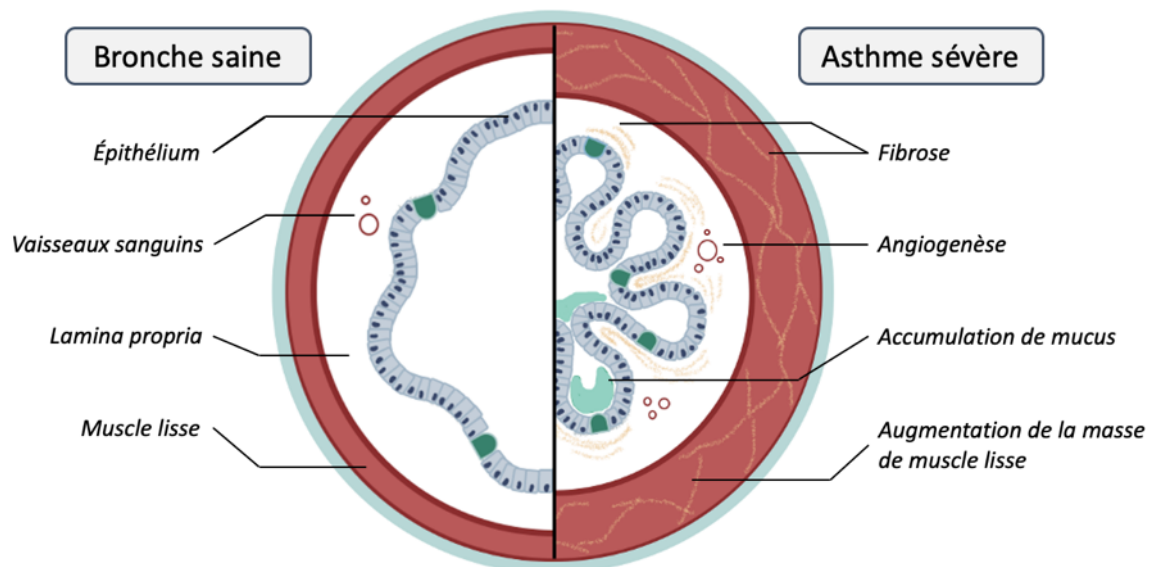


Figure 5. Remodelage pulmonaire associé à l'asthme équin sévère. Illustration des principales altérations des structures des voies respiratoires contribuant à l'obstruction bronchique.

l'entourent, mais participe plutôt aux échanges de signaux par voie paracrine (191, 194). De plus, le remodelage des autres structures, comme l'accumulation de mucus intra-luminal, l'hyperplasie épithéliale ainsi que l'augmentation de l'épaisseur de la lamina propria, potentialise le rétrécissement de la lumière bronchique engendrée par la contraction du muscle lisse en obstruant davantage les voies respiratoires (21, 195). De surcroît, une augmentation de la rigidité de la matrice extracellulaire entraîne une transition des jonctions myocytes-myocytes vers des jonctions myocytes-matrice extracellulaire, optimisant ainsi la force déployée par le muscle lisse (196). La composition de la matrice extracellulaire influence également le phénotype exprimé par les cellules du muscle lisse (71).

Par ailleurs, certains suggèrent que le remodelage des structures des parois des voies aériennes est un mécanisme de défense pour contrer la force excessive engendrée par le muscle lisse (197). En effet, le rétrécissement des voies respiratoires régulé par le muscle lisse dépend des forces opposées générées par les structures avoisinantes, soient les propriétés élastiques des voies respiratoires, la fixation et la tension du parenchyme et l'épaisseur de la portion de la voie respiratoire interne au muscle lisse (20, 198). Si celles-ci sont augmentées, le raccourcissement du muscle lisse devrait, en théorie, s'en retrouver minimisé. Par contre, les évidences démontrent que les effets délétères du remodelage pulmonaire surpassent les bénéfiques potentiels (62).

1.3.2 Remodelage du muscle lisse

L'asthme se caractérise par une hypersensibilité bronchique, définie comme une réponse exagérée face à un stimulus donné, et une hyperréactivité bronchique, soit un raccourcissement excessif du muscle lisse entraînant un rétrécissement anormal des voies respiratoires (199-201). Comme le muscle lisse est le principal acteur régissant le diamètre des voies respiratoires, une altération de ses propriétés physiologiques joue un rôle crucial dans l'établissement d'une bronchoconstriction excessive et le développement d'une hyperréactivité bronchique (3, 202-204). L'altération de ses propriétés contractiles peut être associée à des changements tant structuraux que fonctionnels (3). Alors que certains soulèvent l'importance d'une force de contraction supérieure générée par une masse de muscle lisse augmentée (205, 206), d'autres soulignent la contribution d'une vitesse de contraction accrue dans le développement de l'hyperréactivité bronchique dans l'asthme (207-210). À ces deux mécanismes, plusieurs auteurs s'accordent pour ajouter le remodelage des structures pulmonaires avoisinantes au muscle lisse dans la perturbation des propriétés de celui-ci, comme une altération des propriétés mécaniques

des voies respiratoires et l'établissement d'un microenvironnement permettant au muscle lisse d'accroître sa contractilité sans altération de ses composantes (203).

L'association de propriétés hypercontractiles à une hyperréactivité bronchique juvénile physiologique souligne l'importance du muscle lisse dans le développement anormal d'une bronchoconstriction (60). De plus, l'implication du muscle lisse dans l'obstruction respiratoire se reflète par l'amélioration clinique du contrôle de l'asthme et l'amélioration de la qualité de vie après un traitement de thermoplastie bronchique (211). Ce traitement symptomatique visant le remodelage pulmonaire permet une diminution de la masse de muscle lisse en appliquant de l'énergie thermique contre la paroi des voies respiratoires de plus de 2 mm (211, 212). Cette réduction de la masse de muscle lisse permet de diminuer les crises chez des patients de différents phénotypes ne répondant plus aux traitements médicaux alternatifs utilisés pour les cas d'asthme incontrôlé.

1.3.2.1 Impact sur l'effet des respirations profondes

Les inspirations profondes jouent un rôle à la fois broncho-protecteur, soit réduisant les effets d'un agent spasmogène, et bronchodilatateur important pour le maintien d'un diamètre physiologique des voies respiratoires (68). Toutefois, une inspiration profonde ne semble pas obtenir le même effet relaxant chez les patients asthmatiques (213-217). Bien que plusieurs mécanismes, incluant le contrôle neuronal, l'action de neurohormones, ou encore la composition des tissus pulmonaires soient possiblement impliqués dans l'altération de la réponse des sujets atteints d'asthme face à une inspiration profonde (68), il est clair qu'un dérèglement de la contractilité du muscle lisse bronchique occupe un rôle prédominant (200, 203, 215). D'ailleurs, l'étirement *in vitro* de cellules musculaires provenant du muscle lisse bronchique de patients asthmatiques démontre une inhibition moindre des capacités contractiles, démontrant la présence d'une altération intrinsèque du muscle lisse (206). Bien qu'une augmentation de la masse de muscle lisse puisse en elle seule contrer les bienfaits d'une inspiration profonde (206), un défaut de désengagement des têtes de myosine aux filaments d'actine (52, 218), ou une adaptation rapide aux changements de longueurs par une plasticité contractile accrue (64) pourraient également contribuer à ce phénomène. Alors que chez l'humain le muscle lisse contribue indéniablement à la perte de l'effet protecteur d'une inspiration profonde demeure, cette particularité demeure à établir chez les chevaux.

1.3.2.2 Changements fonctionnels

1.3.2.2.1 Influence de la vitesse de contraction

Plusieurs évidences suggèrent que la vitesse de contraction du muscle lisse bronchique a une incidence sur le développement de l'hyperréactivité bronchique (210). La théorie proposée par Solway *et coll.* soutient que le raccourcissement du muscle lisse survenant pendant la phase d'expiration serait le facteur déterminant du diamètre des voies respiratoires (207). Par extrapolation, ceci implique qu'une vitesse de raccourcissement supérieure à la fréquence respiratoire permettrait au muscle d'atteindre un rétrécissement important, entraînant une bronchoconstriction marquée et soutenue (200, 207). La majeure partie du raccourcissement du muscle lisse survient dans les premières secondes de contraction (49-51), soit avant l'établissement de ponts d'union actine-myosine fixes (« *latch-bridges* ») (48). Ainsi, la vitesse de formation des cycles de liaisons actine-myosine, reflétant la vitesse de contraction globale du muscle, déterminerait la capacité de raccourcissement maximale du muscle lisse bronchique (209), une contraction plus rapide signifiant alors une contraction plus importante (50). Cette théorie concorde avec les résultats expérimentaux démontrant qu'un raccourcissement plus prononcé est associé à une vitesse de contraction plus rapide (49, 51, 208, 219). En plus d'avoir un effet direct sur le rétrécissement de la lumière bronchique, la vitesse accrue de contraction pourrait enrayer en partie l'effet bronchodilatateur suivant une respiration profonde chez les patients atteints d'asthme (215-217). L'interdépendance entre la vitesse de contraction et le degré de bronchoconstriction reflète donc les conséquences potentielles de l'altération de cette propriété du muscle lisse.

1.3.2.2.2 Altération intrinsèque du muscle lisse dans l'asthme

Une altération de l'augmentation de la force maximale générée, de la rapidité de contraction, de la capacité de raccourcissement ou encore de la capacité des composantes contractiles à s'adapter à des longueurs extrêmes peuvent toutes contribuer au développement d'hyperréactivité bronchique (66). Bien que des études *in vitro* ont permis de démontrer une hypercontractilité chez des modèles animaux sensibilisés (49, 50) et des humains asthmatiques (51, 220) ou sensibilisés (219), d'autres n'ont pas mis en évidence de différence dans la vitesse de contraction du muscle lisse entre les asthmatiques et des sujets contrôles (66, 67, 221) ou même de certains modèles animaux sensibilisés (209). Chez les chevaux atteints d'asthme équin sévère en exacerbation, le muscle lisse des voies périphériques présente une vitesse de contraction

maximale supérieure à celui des chevaux contrôles ou asthmatiques en rémission, en dépit que la vitesse de propulsion des filaments d'actine par la myosine ne soit pas différente entre les groupes (8). Il demeure incertain si la présence d'une altération intrinsèque des propriétés contractiles du muscle lisse est en cause dans l'asthme, ou si l'hyperréactivité résulte plutôt de l'établissement d'un environnement permettant au muscle lisse d'accroître sa contractilité sans altération de ses composantes (203).

1.3.2.2.3 Rôle de l'insert(+)

L'implication de l'isoforme insert(+) de la myosine dans l'asthme a été suggérée à plusieurs reprises (42, 44, 222). Cette isoforme est liée à une vitesse accrue de contraction du muscle lisse bronchique (10-12, 46, 58). Par extrapolation, elle pourrait donc contribuer à l'augmentation de la vitesse de rétrécissement du muscle lisse bronchique et ainsi promouvoir l'hyperréactivité bronchique. Cette théorie est d'ailleurs appuyée par la surexpression de l'isoforme rapide chez des modèles murins d'hyperréactivité bronchique (12, 222), ainsi que dans le muscle lisse de patients asthmatiques (12). Parallèlement, une diminution de la contractilité du muscle lisse concorde avec une diminution de l'expression de l'insert(+) chez le modèle murin (223). Dans l'asthme équin sévère, une surexpression de l'insert(+) de deux à trois fois supérieure aux chevaux contrôles a été démontrée, tant dans les voies respiratoires de petites que de grandes tailles (9). En outre, ces résultats, ainsi que la concordance avec la surexpression de facteurs favorisant l'épissage alternatif de l'isoforme rapide (224), suggèrent une implication d'une surexpression de l'isoforme rapide dans le maintien d'une bronchoconstriction dans l'asthme équin. Une normalisation de la fonction pulmonaire avant la normalisation de l'expression de l'insert(+), indique toutefois que, bien que l'isoforme puisse être impliquée dans l'établissement d'une hyperréactivité bronchique, cette dernière résulte probablement de la combinaison de plusieurs mécanismes parallèles (9). D'ailleurs, certaines études ont montré une dissociation entre l'expression de l'insert(+) et l'hyperréactivité bronchique (8, 51, 225). Toutefois, Ma *et coll.* (51) n'ont décelé aucune présence de l'insert dans le muscle lisse étudié, soulevant certains doutes sur la méthodologie, puisque la détection d'un faible niveau d'insert(+) est minimalement attendue, ne serait-ce que par la contribution de la myosine provenant des vaisseaux sanguins (58). De plus, Siddiqui *et coll.* (225), ayant évalué l'expression de l'insert(+) une semaine post-challenge antigénique, pourraient avoir manqué l'élévation initiale du taux d'expression, puisque celui-ci tend à se normaliser dans un délai d'une semaine (59). De façon plus inattendue, dans

une seconde étude comparant des chevaux asthmatiques sévères et contrôles, aucune différence dans les taux d'expression de l'isoforme n'a été soulevée, bien que le muscle périphérique fût doté d'une contractilité accrue dans le groupe de chevaux malades (8). L'utilisation de méthodologies distinctes dans les études pourrait expliquer la différence de résultats, ainsi que la variation d'expression entre les animaux testés, reflétant possiblement différents endotypes de la condition.

1.3.2.2.4 Autres protéines hypercontractiles

Comme le prédit une modélisation, une augmentation de la vitesse de phosphorylation, et donc du cycle actine-myosine, accélère la contraction du muscle lisse (209). L'étude de plusieurs enzymes et protéines régulant et influençant ce processus revêt donc un certain intérêt (42, 203). D'ailleurs, la MLCK, surexprimée chez des sujets asthmatiques (12, 51, 226), a été associée à une contractilité musculaire supérieure (8, 60). Récemment, plusieurs protéines favorisant une contractilité accrue ont été identifiées dans le muscle lisse de patients asthmatiques (221). Ces résultats supportent donc l'hypothèse que l'altération de la contraction musculaire menant à l'hyperréactivité est probablement multifactorielle et n'implique pas seulement les isoformes de la chaîne lourde de la myosine (42, 222). Toutefois, comme une étude réalisée sur des chevaux sévèrement asthmatiques n'a pas démontré de changements dans la composition biochimique du muscle lisse en fonction du stade de la maladie (8), il est possible que d'autres facteurs, tels que l'organisation même des structures à l'intérieur des myocytes (64) ou encore les jonctions intercellulaires du muscle lisse (196), soient altérés chez les sujets asthmatiques et que ces phénomènes contribuent au développement d'hyperréactivité bronchique. Il est également possible que la disparité des résultats relève de différences méthodologiques, ou de différents endotypes de l'asthme et de l'hétérogénéité de la condition.

1.3.2.3 *Changements structuraux*

1.3.2.3.1 Augmentation de la masse

La présence d'un épaissement de la couche de muscle lisse chez les patients asthmatiques a été démontrée à de nombreuses reprises, tant chez les humains (195, 226-234), que chez les chevaux (4-7, 144, 187). Plusieurs modèles mathématiques soutiennent que l'augmentation de la masse de muscle lisse, par la force excessive générée ou par l'hétérogénéité

contractile en résultant, contribue au bronchospasme et limite ainsi les échanges gazeux chez les sujets asthmatiques (205, 206, 235). Ces modèles comportent par contre certaines limites, soient d'assumer une charge constante dans un modèle statique (205), d'utiliser des bandelettes de muscle lisse ayant perdu leurs propriétés géométriques (206), ou d'interpréter les résultats en négligeant l'aspect tridimensionnel des voies respiratoires (235). Par ailleurs, certaines études réalisées sur des tissus de sujets asthmatiques ont démontré une association entre la masse de muscle lisse et la sévérité de la maladie (226, 228, 230-232), ainsi qu'avec la fréquence d'exacerbation des signes cliniques (236) suggérant que l'augmentation de la masse de muscle lisse est proportionnelle au degré d'obstruction *in vivo*. D'ailleurs, le bronchospasme résiduel objectivé chez des chevaux asthmatiques sévères en rémission a été attribué à la persistance d'une augmentation de la masse de muscle lisse, suggérant sa contribution à la diminution de la fonction pulmonaire (6). L'augmentation de la masse de muscle lisse résulte potentiellement de la combinaison de plusieurs processus regroupés à la Figure 6.

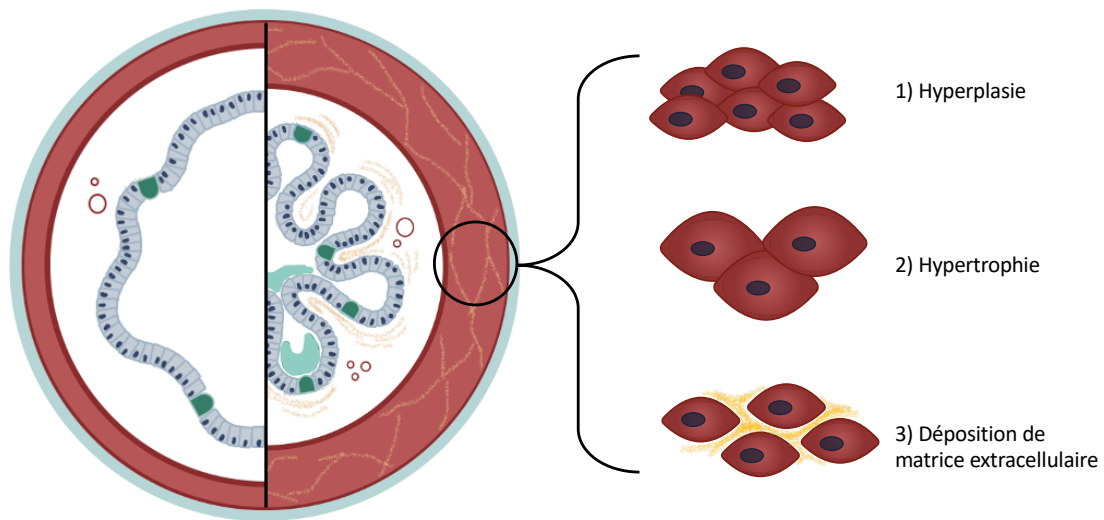


Figure 6. Changements structuraux menant à l'augmentation de la masse de muscle lisse. L'hyperplasie (1), l'hypertrophie (2), et la déposition de matrice extracellulaire entre les myocytes du muscle lisse bronchique (3) sont tous des mécanismes contribuant en partie à ce phénomène (203, 237), et les voies de signalements potentiellement impliquées sont multiples (204, 238). Malgré les nombreuses études réalisées sur les changements morphologiques des myocytes formant la couche de muscle lisse bronchique, le degré de contribution de chacun des mécanismes menant aux différents phénotypes de muscle lisse demeure incertain (239).

1.3.2.3.2 Hyperplasie

L'hyperplasie se définit comme une augmentation du nombre de cellules dans un tissu causant un élargissement anormal de celui-ci. Dans les voies respiratoires, elle peut se mesurer en comptant le nombre de noyaux de cellules du muscle lisse bronchique et en normalisant ce compte par longueur de la membrane basale épithéliale. Suivant cette méthode, plusieurs études ont démontré que l'hyperplasie contribue à l'augmentation de la masse de muscle lisse chez les patients asthmatiques (227, 231, 233). Chez les chevaux asthmatiques sévères, une corrélation positive entre le nombre de cellules en prolifération (4), ainsi qu'une augmentation du nombre de noyaux normalisés par longueur de membrane basale (5) confirme que l'hyperplasie participe à l'augmentation de la masse de muscle lisse dans l'asthme équin. Divers mécanismes peuvent mener à une hyperplasie dont une hausse de la prolifération, une baisse d'apoptose ou d'un recrutement de cellules mésenchymateuses (189, 240).

1.3.2.3.2.1 Augmentation de la prolifération

L'augmentation de la prolifération est possiblement un des principaux mécanismes menant à une hyperplasie du muscle lisse. Celle-ci peut être stimulée par un effet mécanique direct de l'étirement des cellules, par la relâche de certains agents épithéliaux à la suite d'un stress mécanique, ou encore par de nombreuses cytokines inflammatoires (191). Malgré l'influence potentielle de mécanismes variés, un taux de prolifération des cellules musculaires des asthmatiques intrinsèquement élevé pourrait également être en cause (241). Afin d'évaluer la prolifération cellulaire à partir de biopsies endobronchiques, différents marqueurs de la prolifération cellulaire peuvent être identifiés par immunohistochimie. Le Ki67, la cycline D ou le *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), sont toutes des molécules exprimées à différentes étapes du cycle de réplication cellulaire permettant donc d'estimer le nombre de noyaux/cellules en prolifération dans un tissu. Des taux de prolifération augmentés du muscle lisse bronchique chez des sujets asthmatiques humains (229, 242), équins (4-6) et sur des modèles d'animaux sensibilisés (223, 243) ont ainsi été démontrés par marquage du PCNA, un cofacteur de l'ADN polymérase servant d'ancrage pour la machinerie impliquée dans la phase S du cycle de réplication cellulaire (244, 245). L'ensemble de ces résultats pointent vers un dérèglement du taux de prolifération dans l'asthme menant à une hyperplasie.

Toutefois, d'autres études utilisant le PCNA ne rapportent aucune différence dans les taux de prolifération du muscle lisse entre des patients atteints d'asthme sévère et des sujets contrôles

(234). D'autres encore ne rapportent même aucune expression dans le muscle lisse de la cycline D1 (246), ou du Ki67 (226). Une étude récente ayant comparé l'expression de ces trois marqueurs dans le muscle lisse a observé des taux d'expression atteignant des seuils non physiologiques, en plus d'obtenir des résultats variables d'un marqueur à l'autre, remettant en doute leur validité (195). Ces résultats sont directement opposés aux corrélations positives trouvées précédemment entre les taux de PCNA et du Ki67 (229), compliquant l'interprétation de ces résultats divergents. Néanmoins, le double marquage du PCNA et de l' α -actine du muscle lisse bronchique a permis d'identifier avec constance, un taux de prolifération plus marqué dans le muscle lisse de chevaux asthmatiques sévères (4, 5), suggérant que l'augmentation de la prolifération contribue à l'augmentation de la masse de muscle lisse dans l'asthme équin sévère.

1.3.2.3.2.2 Diminution de l'apoptose

Les évidences qu'une réduction du taux d'apoptose contribue à l'hyperplasie du muscle lisse bronchique dans l'asthme sont rares, bien qu'en théorie plusieurs facteurs inflammatoires présents dans l'asthme aient le potentiel de moduler le taux de mort cellulaire (203, 247). Alors qu'une augmentation de la masse de muscle lisse chez des rats sensibilisés semblerait en plus grande partie attribuable à une réduction de l'apoptose des myocytes (243), une altération de l'apoptose n'a pas été démontrée sur des myocytes humains (195, 248). Chez les chevaux atteints d'asthme sévère, une augmentation du taux d'apoptose des cellules musculaires accompagne plutôt l'augmentation de la prolifération (4-6, 249). Ces résultats supportent ainsi l'hypothèse qu'un renouvellement cellulaire accéléré secondaire à l'inflammation chez les chevaux atteints d'asthme sévère est la cause primaire de l'augmentation de la masse de muscle lisse, reléguant l'apoptose comme mécanisme compensatoire secondaire servant à limiter la croissance du muscle lisse.

1.3.2.3.2.3 Recrutement des fibroblastes

Vers la fin des années 1990, un groupe de chercheurs a mis en évidence l'activation et le recrutement de nombreux myofibroblastes en région sous-épithéliale à la suite d'une stimulation antigénique chez des sujets asthmatiques (250). L'association de cette découverte à une réaction inflammatoire suggère que la différenciation de fibroblastes en myofibroblastes pourrait contribuer à l'augmentation de la masse musculaire présente dans l'asthme. Plusieurs autres études ont par la suite appuyé cette théorie, en démontrant la capacité de différenciation des

fibroblastes en myofibroblastes (251) ainsi qu'en décelant un recrutement plus élevé de fibroblastes chez des patients asthmatiques (226, 242). D'autres ont également démontré une capacité accrue des myofibroblastes de sujets asthmatiques à relâcher des cytokines pro-inflammatoires *in vitro* (246). Une augmentation du nombre de myofibroblastes, secondaire à divers mécanismes (72), pourrait donc contribuer à l'inflammation perpétuelle présente chez les asthmatiques, et indirectement stimuler la prolifération du muscle lisse (72, 251), en plus de participer directement à l'ajout de cellules formant le muscle lisse. Alternativement, la migration du muscle lisse et sa dédifférenciation en myofibroblastes pourraient également participer à l'élargissement de la couche de muscle lisse (252).

1.3.2.3.3 Hypertrophie

L'hypertrophie des myocytes du muscle lisse est souvent mentionnée dans la pathophysiologie de l'asthme, mais les évidences supportant une augmentation du volume moyen des myocytes sont moins explicites que pour l'hyperplasie (240). Plusieurs mécanismes peuvent mener à une hypertrophie des myocytes, comme une stimulation mécanique par étirements répétés des cellules, ou l'activation par différentes voies de signalisation, telles que le SRF (191). Certaines études démontrent une hypertrophie chez des patients atteints d'asthme (233), celle-ci ayant été corrélée au degré de sévérité (226), ou encore associée à une hyperplasie en cas d'asthme sévère (231). Toutefois, d'autres n'ont pas démontré d'évidence d'hypertrophie des myocytes malgré la présence de changements structuraux du muscle lisse (195, 227). Il est possible que les variations entre les résultats des différentes études proviennent des différentes techniques utilisées, dont une épaisseur de coupe des biopsies supérieure à 0.5 μm (195, 226, 227) associée à une variation plus élevée dans l'estimation du volume cellulaire (253). La présence d'hypertrophie soulevée seulement chez certains patients asthmatiques (233) ouvre la possibilité que cette altération ne s'exprime que dans certains phénotypes d'asthme. Les traitements non uniformisés entre les patients et les différents degrés de sévérité des cohortes étudiées pourraient aussi contribuer à la divergence de résultats. Par ailleurs, une diminution de la densité de noyaux dans la couche de muscle lisse (5), ainsi qu'une réduction de la masse de muscle lisse associée à une diminution du volume cellulaire moyen suite à l'instauration d'un traitement (7) suggèrent une contribution de l'hypertrophie des myocytes du muscle lisse bronchique dans l'asthme équin. De plus, une étude démontre une surexpression du SRF et de son co-activateur la

myocardine favorisant le développement du phénotype contractile et hypertrophique dans le muscle lisse périphérique chez les chevaux asthmatiques sévères en exacerbation (254).

1.3.2.3.4 Inclusion de matrice extracellulaire dans le muscle lisse bronchique

Une déposition accrue de matrice extracellulaire au sein de la couche de muscle lisse est également un processus contribuant à l'augmentation de l'épaisseur de la couche de muscle lisse (191). Cette déposition excessive est, entre autres, stimulée par la production de protéines composant la matrice, comme le collagène, la fibronectine, et certaines métalloprotéases matricielles, ainsi que par le muscle lisse lui-même (191). À l'inverse, la matrice extracellulaire régule à son tour les propriétés contractile et synthétique du muscle lisse, certaines protéines stimulant un profil prolifératif (194). Résultant possiblement de ces mécanismes, la déposition de matrice extracellulaire est augmentée dans la couche de muscle lisse dans l'asthme sévère chez les humains (231), en plus d'être associée à une hyperplasie et une hypertrophie. La fraction de matrice extracellulaire est également plus élevée dans le muscle lisse bronchique de chevaux asthmatiques sévères, et ce, tant dans les voies centrales que périphériques (7).

1.3.2.3.5 Changements structuraux des voies périphériques et centrales

Le remodelage du muscle lisse bronchique est hétérogène au long de l'arbre bronchique (233), et les conséquences sur la sévérité des signes cliniques résultant d'un remodelage des voies centrales ou périphériques sont conflictuelles. Alors que dans les bronchioles, l'augmentation de la masse de muscle lisse bronchique est présente chez des sujets atteints d'asthme non fatal et fatal, une nette accentuation de la quantité de muscle lisse dans les voies respiratoires centrales est associée à la forme fatale de l'asthme (230, 232). Un remodelage des voies centrales pourrait donc entraîner des répercussions plus importantes, se traduisant par des défauts de ventilations plus sévères (255), ainsi que des altérations plus marquées des valeurs obtenues aux mécaniques standards (202, 256). Cependant, bien qu'une augmentation de la masse de muscle lisse limitée aux petites voies périphériques ne soit pas courante (233), ce phénomène n'est observé que chez des patients asthmatiques sévères. Ces résultats concordent avec ceux d'une autre étude ayant démontré une augmentation de la masse de muscle lisse dans les voies périphériques entre les sujets contrôles et asthmatiques, seulement une fois les patients présentant un l'asthme léger à modéré retirés de l'analyse (195). Parallèlement, des changements extensifs dans la composition des petites voies respiratoires, contribuant à une dégradation de la fonction pulmonaire,

pourraient être plus ardues à résoudre par utilisation de thérapie inhalée, puisque la quantité de particules se déposant dans cette région est probablement variable (256).

Chez les chevaux asthmatiques sévères, des évidences d'une augmentation de la masse de muscle lisse dans les voies respiratoires centrales (4, 7, 144) et périphériques sont rapportées (4, 5, 7). Alors qu'une corrélation entre l'augmentation de la masse de muscle lisse dans les deux régions a été rapportée (7), d'autres démontrent une hausse de la masse de muscle lisse beaucoup plus extensive en périphérie (4, 5). Le remodelage du muscle lisse bronchique n'a toujours pas fait l'objet d'étude chez les chevaux asthmatiques légers à modérés.

1.3.3 Facteurs menant au remodelage

1.3.3.1 Inflammation

L'inflammation pulmonaire contribue au développement d'un remodelage pulmonaire. Dans l'asthme équin sévère, une surexpression des cytokines IL-17 et IL-8 suggère une perte de régulation des processus inflammatoires chez les chevaux atteints d'asthme sévère (96, 97). Ce débalancement entraîne la production de nombreuses cytokines et d'agents spasmogènes, causant une stimulation de la contraction du muscle lisse bronchique, une fibrose pulmonaire, ainsi qu'un remodelage des différentes composantes tissulaires des bronches (257). Bien que l'asthme se définisse comme une condition inflammatoire des voies respiratoires inférieures, l'établissement d'un consensus sur le profil prédominant dans l'asthme équin est entravé par l'identification variable des profils inflammatoires Th1, Th2 et Th17 chez les chevaux asthmatiques sévères (94-97), ainsi que chez les chevaux asthmatiques légers à modérés (98, 99, 258). Ceci dit, le remodelage du muscle lisse bronchique peut être stimulé par des cytokines associées aux différents profils inflammatoires (191). De plus, des corrélations relevées entre l'aire du muscle lisse et la présence de différentes cytokines des profils Th1 et Th2, chez l'humain, suggèrent qu'une combinaison des deux profils détermine le degré de remodelage atteint (259).

Les neutrophiles sont les principales cellules impliquées dans l'asthme équin sévère (85, 86). Ils sont recrutés par diverses chimiokines, dont principalement IL-8 (260), régulée notamment par IL-17 (261) surexprimée chez les chevaux asthmatiques sévères (96). Leur activation déclenche la production de nombreux facteurs entraînant un remodelage ou des dommages tissulaires, tels que des réactifs oxydatifs (*Reactive Oxygen Species (ROS)*) (141, 262), des trappes extracellulaires (NETs) (263), et des exosomes (264). La présence de ROS peut alors déclencher l'activation de nombreuses cytokines inflammatoires (TNF-alpha, IL-4, IL-5-, IL-6, IL-13) (262),

contribuant ainsi au maintien d'un milieu inflammatoire. De leur côté, les mastocytes et les éosinophiles sont associés à la relâche d'IL-4, IL-5, IL-13, et de leucotriènes, auxquels s'ajoutent le TNF-alpha et l'histamine pour les mastocytes (265). Certaines de ces cytokines, dont l'IL-4 et l'IL-13, peuvent stimuler un profil « asthmatique » hyperprolifératif du muscle lisse (71). Les lymphocytes T peuvent également produire des cytokines de type Th2 contribuant à la promotion de l'inflammation et du remodelage pulmonaire (243), et leur implication est suspectée dans l'asthme équin sévère (94, 101).

1.3.3.2 Bronchoconstriction

Malgré les nombreuses évidences d'interdépendance entre l'inflammation et le remodelage pulmonaire (192), certaines études ont démontré une dissociation de ces deux phénomènes (234, 266, 267). Une étude *in vivo* a d'ailleurs rapporté la présence de changements tissulaires, soit un épaissement de la membrane basale épithéliale, suite à une bronchoconstriction induite par la méthacholine (268). La bronchoconstriction, provoquant une réduction de la lumière bronchique, entraîne une diminution de l'espace disponible pour les composantes de la paroi bronchique, dont l'épithélium qui forme alors de nombreux replis et se retrouve comprimé par endroits (266). Lorsque soumises à des forces de compression *in vitro*, les cellules épithéliales relâchent différents facteurs, dont le TGF- β 1 et l'endothéline, stimulant le remodelage des voies respiratoires (269), ou d'autres facteurs ayant une action directe sur la prolifération et la contractilité des cellules musculaires (267). De plus, une perte d'intégrité de la barrière épithéliale peut résulter de l'application de forces mécaniques anormales sur celle-ci (266), entraînant subséquemment une surexpression de facteurs promouvant le remodelage (192). Parallèlement, la bronchoconstriction pourrait aussi se perpétuer par le développement d'un tonus supérieur exercé par le muscle lisse, suite à sa stimulation par des agents contractiles et son adaptation à une longueur plus courte (270). Le muscle lisse ainsi comprimé peut alors lui-même relâcher des molécules promouvant sa contraction (266). Bien que peu d'études *in vivo* en confirment l'implication clinique dans l'asthme, la bronchoconstriction, sans présence d'inflammation, pourrait donc entraîner un remodelage des structures des voies respiratoires, et perpétuer elle-même une bronchoconstriction exagérée (267). Toutefois, l'amélioration limitée du remodelage des différentes couches tissulaires de chevaux asthmatiques sévères à la suite d'une monothérapie à base d'un bronchodilatateur démontre la nécessité d'études supplémentaires sur le sujet (7).

1.3.3.3 Dommages épithéliaux

L'intégrité épithéliale joue un rôle prépondérant dans la protection des voies respiratoires en agissant comme barrière principale contre les agents pathogènes ou les agressions externes (192). Sa compromission entraîne donc une voie d'entrée pour les agents infectieux, ou chimiques, et menace la préservation des mécanismes régulant la composition des voies respiratoires, puisque l'unité trophique épithélio-mésenchymateuse régit l'homéostasie des tissus pulmonaires par de multiples cascades de communication (271). Certains positionnent donc l'épithélium au centre du déséquilibre des réponses inflammatoires dans l'asthme en soutenant qu'une perte de l'intégrité épithéliale et une augmentation de sa perméabilité engendrent une production accrue de facteurs inflammatoires et de croissances, établissant un microenvironnement pulmonaire anormal (192, 271, 272). La sécrétion excessive de facteurs de croissance par l'épithélium, comme le *epidermal growth factor* (EGF), stimulant la transition épithélio-mésenchymateuse (271, 273), contribuent probablement à l'épaississement de la lamina propria retrouvée chez des sujets asthmatiques sévères (195). D'autre part, un décollement de l'épithélium expose les fibres nerveuses sensibles, activant ainsi le système parasympathique et la relâche d'acétylcholine entraînant une contraction musculaire réflexe (194). Le dérèglement des fonctions normales de protection et de réparation de l'épithélium pourrait donc contribuer à l'hyperréactivité bronchique, ainsi qu'au remodelage des structures des voies respiratoires, dont notamment le muscle lisse bronchique dans les maladies pulmonaires comme l'asthme (192, 272).

1.3.3.4 Instauration du remodelage

La présence d'altération du muscle lisse bronchique dans l'asthme tant humain qu'équin a été démontrée. Cependant, le modèle d'étude principalement utilisé pour évaluer le remodelage, soit l'étude du remodelage à un temps fixe, sans pouvoir suivre son évolution dans le temps, soulève des questionnements quant à l'établissement initial de tels changements (193). Alors que certaines études réalisées chez les humains démontrent que l'étendue des changements du muscle lisse corrèle avec la sévérité de la maladie, et non la durée de la condition (230, 274), d'autres supportent l'hypothèse que l'augmentation de la masse de muscle lisse serait plutôt reliée à la durée de la maladie (248, 259). Élucider les mécanismes d'implantation initiaux du remodelage nécessite l'étude des formes légères de la maladie, et même, idéalement, des formes

sous cliniques, la faisabilité de telles études étant toutefois problématique (193). Toujours chez l'humain, une augmentation de la masse de muscle lisse chez des enfants d'âge préscolaire présentant une respiration sifflante a été associée au développement d'asthme dans les années suivantes (275). Similairement, une hyperréactivité bronchique à un mois après la naissance a été liée au développement d'asthme avant l'âge de 6 ans (276). Toutefois, bien qu'une progression des signes cliniques de l'asthme équin soit suspectée chez certains sujets (84), des études évaluant le remodelage du muscle lisse bronchique dans les formes légères de l'asthme équin n'ont pas encore été réalisées, au même titre que des études longitudinales évaluant l'impact du remodelage ou de l'hyperréactivité bronchique à long terme.

2 Chapitre 2 – Article

Présentation de mémoire par article

La version incluse dans ce mémoire correspond à la version initialement soumise au *Equine*

Veterinary Journal le 1 juin 2021

Article accepté pour publication le 3 septembre 2021

Article DOI: [10.1111/EVJ.13514](https://doi.org/10.1111/EVJ.13514)

Airway Smooth Muscle Remodelling in Mild and Moderate Equine Asthma

Florence Dupuis-Dowd,¹ Jean-Pierre Lavoie¹

¹Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Department of Clinical Sciences, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

*Corresponding author email: jean-pierre.lavoie@umontreal.ca

Keywords: airway remodelling, horse, airway smooth muscle proliferation, SMB myosin isoform, airway hyperresponsiveness, hyperplasia

DECLARATIONS

Authorship: F. Dupuis-Dowd contributed to data collection, study execution, data analysis and interpretation, and preparation of the manuscript. J-P. Lavoie contributed to the study design, data interpretation and preparation of the manuscript. The authors attest the integrity of the data presented in the manuscript.

Source of Funding: This study was funded by the Equine Research Funds of the Université de Montréal and unrestricted research grant from Zoetis Canada, the Fonds du Centenaire of the Université de Montréal and the Canadian Institutes of Health Research (grant # PJT-148807).

Competing Interests: The authors have no competing interests to declare.

Ethical Animal Research: This study was performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and the protocol approved by the Ethics Committee of the Université de Montréal (Protocol Rech-1647).

Informed consent: All horse owners included in the study signed a consent form.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Respiratory Health Network of Quebec (RHN) for the tissue bank creation, Clementine Gy, DVM, DACVIM, and the personnel of the internal medicine department for the recruitment of the horses, Guy Beauchamps, PhD, and Tristan Juette, PhD, for their support with the statistical analysis, Carolyn Grimes, DVM, ASVCP for her contribution, and Kristine Picotte for technical support.

Data accessibility: The data that support the findings of this study are available openly available at <https://doi.org/10.5683/SP2/XW90QH>, reference number : 10.5683/SP2/XW90QH.

Corresponding author: Jean-Pierre Lavoie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200, rue Sicotte, Saint-Hyacinthe (Quebec), J2S 2M2; Tel (450) 773 8521 #8292, e-mail: jean-pierre.lavoie@umontreal.ca

2.1 ABSTRACT

Background: Airway smooth muscle (ASM) remodelling in severe equine asthma includes both thickening of ASM, resulting from hyperplasia and hypertrophy, and changes in contractility. However, ASM changes have not been studied in milder forms of the disease.

Objectives: To investigate bronchial smooth muscle remodelling in horses with mild and moderate asthma (MEA).

Study design: Retrospective case-control study.

Methods: The endobronchial biopsies from 18 horses with MEA referred to the Equine Hospital of the Université de Montréal and from 7 healthy age matched control horses were studied. The diagnosis was based on clinical signs and bronchoalveolar lavage fluid cytology. ASM cell proliferation was measured by quantifying the expression of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) using immunohistochemistry and histomorphometry. The expression of the (+)insert smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC) isoform, an hypercontractile protein, was assessed by RT-qPCR.

Results: Expression of the (+)insert SMMHC isoform in ASM was approximately 1.5 times greater in horses with MEA compared to controls ($P = 0.02$, mean difference 0.01). While there were no differences between groups in the proliferation of ASM cells ($P = 0.4$) or myocyte density ($P = 0.3$, mean difference -0.6), the percentage of proliferating myocytes was correlated to pulmonary neutrophilia in horses with neutrophilic inflammation ($P = 0.01$, $r = 0.80$) and to the expression of the (+)insert SMMHC isoform in asthmatic horses ($P = 0.03$, $r = 0.66$).

Main limitations: Small cohorts of horses were studied, and conclusions are limited to the central airways.

Conclusions: These results confirm the presence of bronchial smooth muscle remodelling in mild forms of equine asthma and pave the way for the development of biomarkers to measure asthma progression and response to therapy.

2.2 INTRODUCTION

Equine asthma is an inflammatory disease of the lower airways that is highly prevalent in the equine population worldwide.¹⁻³ Clinical signs, such as exercise intolerance, cough, and respiratory distress^{4,5} result mainly from the airflow obstruction caused by bronchoconstriction, airway hyperresponsiveness (AHR) and airway remodelling. Intra-luminal mucus accumulation, epithelial alterations, subepithelial fibrosis, and increased smooth muscle mass are all manifestations of airway remodelling in severe asthma in humans,^{6,7} as in horses.⁸ Thickening of all constituents of the airway wall contributes to the bronchial obstruction, but mathematical models suggest that the augmentation of airway smooth muscle (ASM) mass is the main contributor to a sustained bronchospasm,⁹ which reflects the finding that ASM thickness is related to the severity of the disease in humans.^{10,11} ASM thickening in human and equine severe asthma results from both increase in the number (hyperplasia) and the size (hypertrophy) of myocytes.¹²⁻

16

Airway hyperresponsiveness is defined as an excessive airway narrowing in response to contractile stimuli or agonist.¹⁷ It has previously been established that a faster shortening of ASM results in a more intensive contraction, thus any impairment leading to an increment in velocity of ASM contraction would contribute to AHR and increased airway resistance.¹⁸⁻²⁰ The (+)insert smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC) isoform, having a shortening velocity nearly two times faster than the (-)insert isoform,^{21,22} could contribute to the excessive narrowing of airways. This isoform originates from alternative splicing of the myosin gene, resulting in an insertion of a 7 amino-acid chain in the motor domain, near the ATP binding site.^{21,23} It is normally present in phasic organs,²⁴ but has also been found in higher expression levels in bronchial smooth muscle of horses with severe equine asthma (SEA).²⁵

Even though hyperplasia and changes in ASM contractility have been reported in SEA,^{12,15,16,25,26} studies of airway remodelling in mild and moderate equine asthma (MEA) are scarce,^{27,28} yet milder forms of asthma are highly prevalent in the equine athlete population.^{2,3} Therefore, this study aims to investigate bronchial smooth muscle remodelling in MEA to better define characteristic changes of ASM in affected horses. This knowledge could provide insight on the development of remodelling in early stages of equine asthma, and could be used to study the natural history of the disease. We hypothesize that the ASM of horses with MEA will present increased expression of the (+)insert SMMHC isoform, and a higher cell proliferation rate than control subjects.

2.3 MATERIALS AND METHODS

2.3.1 Animals

Cases were selected among horses presented to the Equine Hospital of the Université de Montréal between August 2014 and December 2019. Endobronchial biopsies from horses with MEA and controls were archived in the Equine Respiratory Tissue Biobank (ERTB: <http://www.btre.ca>). Horses with MEA had a history of coughing or decreased performance and lower airway inflammation documented by bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology (neutrophils >5%, mast cells \geq 2%, eosinophils \geq 1%). The control group was composed of horses exempt of respiratory symptoms and lower airway inflammation. All horses were deemed exempt of systemic inflammatory condition based on a complete physical exam, and the evaluation of haematological parameters. Any horses with a history of respiratory distress at rest compatible with the diagnosis of SEA⁴ were excluded from the study. The study was approved by the Animal Care Committee of the Université de Montréal (Protocol Rech-1647), client signed a consent form and procedures were performed according to guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

2.3.2 Bronchoalveolar lavage fluid cytology

Bronchoalveolar lavages were performed under sedation as described elsewhere.²⁹ Briefly, after desensitization of the airways with diluted lidocaine hydrochloride (0.5%), two boluses of 250 mL of warm isotonic saline were instilled in one main bronchus through a 1.6 m videoendoscope (Olympus Medical Systems Corp., Tokyo, Japan). Fluid was then aspirated with a suction pump and kept on ice until it was processed. Unfiltered BALF was cytocentrifuged (ROTOFIX 32A, Hettich, Tuttlingen, Germany) and stained with a May Grünwald Giemsa solution (Aerospray Hematology, EliTechGroup, Puteaux, France). Differential cell counts were performed blindly on at least 400 cells.

2.3.3 Endobronchial biopsies

Endobronchial biopsies were sampled on sedated animals using disposable forceps (EndoJaw, oval fenestrated ϕ 2.85 mm, 2.3 m, Olympus Medical Systems Corp, Tokyo, Japan) from randomly selected after BALF collection.³⁰ Biopsies intended for genomic studies were placed in RNAlater for 24 h at 4°C then stored at -80°C, as recommended by the manufacturer. Biopsies for histomorphometry were fixed in 10% formaldehyde for 2 to 4 hours, and then embedded in paraffin after a short cycle in alcohol. A minimum of two paraffin embedded biopsies and two RNAlater preserved biopsies were obtained per horse.

2.3.4 (+)insert SMMHC expression

Ratios of the mRNA expression of the (+)insert SMMHC isoform over total expression of SMMHC (NCBI reference sequence: XM_001916756.4) were performed following a two-step protocol of reverse-transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR) previously described, optimized and validated.²⁵ Biopsies were disrupted using TissueRuptor II (Qiagen, Burlington, Canada) and RNA extraction was performed using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Burlington, Canada) according to the manufacturer's recommendations. RNA concentration and quality (A_{260}/A_{280} ratio assessing RNA purity, and A_{230}/A_{260} ratio determining the presence of contaminants) were measured by spectrophotometry (Nanodrop1000, ThermoScientific, Wilmington, USA). Then, reverse transcription of 500 ng of mRNA was achieved using Oligo(DT) primers 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, and Superscript III 200 U/ μL , 0.1M DTT mixed with First Strand Buffer and RNaseOUT (Invitrogen, Burlington, Canada). The transcription step incubation time was 60 minutes at 50°C. Samples were purified using QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Burlington, Canada) prior to qPCR analysis. Quantitative real-time PCR (qPCR) was achieved using the Rotor-Gene RG3000 (Corbett Research, Sydney, Australia) with the intercalant dye QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Toronto, Canada). Sequences of reverse and forward primers are provided in a previous study²⁵ (Table 1). Samples were run in duplicate and an appropriate negative control for each sample-processing step was included.

2.3.5 Histomorphometry

Colocalization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) with smooth muscle α -actin (α -SMA) was studied on thin biopsy sections (4.5 μm) using immunohistochemistry as previously described.¹² Briefly, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was labelled with biotinylated antibody to the PC10 clone of PCNA (clone Ab-1, Calbiochem, San Diego, USA) and revealed with the alkaline phosphatase substrate BCIP/NBT (Vector Laboratories, San Francisco Bay Area, USA). α -SMA was identified with a biotinylated antibody (clone 1A4, Sigma Immunochemicals, Toronto, Canada) and revealed with VectorRed substrate (Vector Laboratories, San Francisco Bay Area, USA). MethylGreen (Vector Laboratories, San Francisco Bay Area, USA) was used to counter-stain negative nuclei. Antibody specificity was assessed by IgG isotype substitution (Sigma Immunochemicals, Toronto, Canada). Slides were then digitized with Panoptiq (ViewsIQ, Vancouver, Canada) at 40X magnification and ImageJ software (ImageJ 1.52k; Java 1.8.0 [64-bit], National Institutes of Health, Bethesda, USA) was used for the morphometric analyses. All nuclei contained within ASM area were counted on each slide to obtain the percentages of PCNA positive

myocytes (Figure 1). All nuclei showing detectable amount of indigo corresponding to the immunostaining of PCNA were considered positive. ASM area per biopsy was determined by threshold method (modified from Setlakwe & al. 2014³¹) and was used to measure ASM area (μm^2), ASM percentage (% of μm^2 ASM/ μm^2 biopsy) and myocyte density, which was obtained by dividing the number of nuclei by the ASM area (Figure 2). The analyses were all performed by the same person, blinded to health status of the horses.

2.3.6 Statistical analysis

Data were analysed using Prism 8 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Normality was assessed with Shapiro-Wilk test and visual inspection of quantile-quantile graphs, and F test confirmed homoscedasticity which was also visually verified.

Differences between groups composition were evaluated with Fisher's exact test for qualitative data (gender, activity, stalling), and for the quantitative data (age) an Unpaired t test was performed. For analyses of BALF cytology, differences between macrophages and lymphocytes count were assessed with Unpaired t test, Welch's t test, accounting for heteroscedasticity, was used for neutrophils, and mast cells and eosinophils were compared with Mann-Whitney because normality of distribution was not met. The number of biopsies studied between controls and asthmatics was compared with a Mann-Whitney test.

A Welch's t test was performed to compare the (+)insert SMMHC isoform expression, Mann-Whitney was used for the proliferation rate and the myocyte density was assessed with an Unpaired t test. As the two former parameters were expected to be higher in asthma group,^{12, 25} one-tailed tests were performed for both. All correlations were performed using nonparametric Spearman's test, as data were not normally distributed. Statistical difference was considered significant with $P < 0.05$.

2.4 RESULTS

2.4.1 Animals

From the 25 horses diagnosed with MEA and 18 horses categorized as control enrolled in the ERTB, respectively, 7 and 11 horses were excluded for lack of available biopsies. Therefore, 18 horses with MEA and 7 control horses were included in the study. For the genomic analyses, one control horse was excluded because its quantification cycle (Cq) fell outside the calibration curve, suggesting a lack of ASM in the biopsies. Similarly, 7 horses with asthma and 2 control horses were excluded from the histomorphometry analyses because the biopsies lacked ASM.

Respiratory symptoms were present for a mean of 1.8 ± 1.5 (mean \pm SD) years (range : 3 months to 5 years), and the mean age of onset was 5.0 ± 3.2 years. Clinical signs were composed of cough (n = 15), exercise intolerance (n = 8), or both (n = 6). Signalment and detailed composition of each group is summarized in Table 2. Age, gender, and housing were matched between the 2 groups (P > 0.05). One control horse was part of the teaching herd of the Université de Montréal.

2.4.2 Bronchoalveolar lavage cytology

BALF inflammation in horses presenting MEA was mostly neutrophilic (n = 12), followed by an elevated percentage of mast cells (n = 9), and abnormal eosinophil count (n = 2). Five horses in the asthmatic group presented mixed pulmonary granulocytic inflammation (elevation in both neutrophils and mast cells: n = 3, elevation in both neutrophils and eosinophils: n = 2)(Figure 3).

2.4.3 (+)insert SMMHC isoform expression in bronchial smooth muscle

The (+)insert SMMHC isoform was overexpressed in bronchial smooth muscle of central airways in horses with MEA (One-tailed Welch's t test: P = 0.02; difference of means = 0.01, 95% CI <0.001 to 0.03), with a mean expression about 1.5 times greater in the MEA group compared to healthy horses (Figure 4 A.).

2.4.4 Morphometric results

For histomorphometric analyses, only biopsy sections presenting a sufficient amount of ASM were studied (>25 nuclei in ASM area), with a mean of 1.6 and 1.7 biopsies analysed for the control and the MEA group respectively (median of 2 in both groups)(P > 0.9).

No significant difference was found in the cell proliferation rate of ASM (One-tailed Mann-Whitney: P = 0.4)(Figure 4. B) or myocyte density (Unpaired t test: P = 0.3; difference of means = -0.6, 95% CI -1.7 to 0.6)(Figure 4. C) between horses with MEA and controls. As airway wall constituents are thickened in asthma, total ASM area (μm^2) and ASM percentage (% of μm^2)

ASM/ μm^2 biopsy) were compared between groups but showed no statistical difference (Mann-Whitney & Unpaired t test: $P > 0.05$).

2.4.5 Correlation between ASM phenotypes

Because of the duality of ASM phenotypes (proliferative or contractile),³² we compared the results of the two phases of the study. A positive correlation was found between the expression rate of PCNA and of the (+)insert SMMHC isoform (Spearman: $r = 0.66$, 95% CI 0.086 to 0.91, $P = 0.03$)(Figure 5. B), but only in the asthmatic group.

2.4.6 Correlation between pulmonary inflammation and ASM characteristics

As inflammation may promote airway remodelling, we tested if the changes found in the ASM phenotype were correlated to the severity of lung inflammation. Pulmonary neutrophilia and PCNA expression were positively correlated in horses with BALF neutrophils $>5\%$ (Spearman: $r = 0.80$, $P = 0.01$), but not when all the horses within the asthma group were taken into account (Spearman: $r = 0.61$, 95% CI -0.011 to 0.89, $P = 0.05$)(Figure 6. A & B). There were no other significant correlations between the PCNA expression and other inflammatory phenotypes. The (+)insert isoform expression was not correlated to airway inflammation (Figure 6. C & D). No significant correlation between these parameters were found in the control group.

2.5 DISCUSSION

Airway smooth muscle remodelling is a hallmark of SEA. It is associated with structural and functional changes that alter pulmonary functions, resulting in increased respiratory effort at rest. Our study provides evidence of a remodelling of the ASM in horses with MEA by reporting the presence of an overexpression in (+)insert SMMHC isoform in ASM of affected horses. However, no significant difference was found in the proliferation rate between groups nor in the nuclei density, suggesting that smooth muscle hyperplasia and hypertrophy are not characteristic of this stage of the disease.

Overexpression of the (+)insert SMMHC isoform is believed to contribute to AHR³³ and is present in bronchial smooth muscle of horses suffering from SEA.²⁵ Here, we demonstrate that the mean expression of the (+)insert SMMHC isoform is also increased in horses with MEA. These results reveal for the first time changes in the contractile apparatus of horses with MEA, which could contribute to the onset of clinical signs reported in this group. As proposed by Leguillette and colleagues,³³ the (+)insert isoform, may lead to increased airway stiffness in part by counteracting the relaxing effect of airway stretch induced by length changing that occurs during tidal breathing, but also by increasing the degree of airway narrowing by contributing to greater shortening of ASM. As all asthmatic horses in this study had clinical signs suggesting abnormal function of the lower airways, the overexpression of the (+)insert SMMHC isoform might contribute to AHR in MEA.

Although mean level expression of the (+)insert isoform was about 1.5 greater in the asthmatic group than in the control one, not all asthmatic horses showed an increase in the expression of the isoform, which might be explained by the reversibility of the expression of the isoform.^{25,34} It is also possible that different endotypes of asthma translate into different ASM phenotypes, therefore an alteration in the expression of contractile proteins is only present in some horses. Of note, a previous study reported that after a month of antigenic exposure only certain horses with SEA had a three-fold increase in the (+)insert expression.²⁵ However, studies on a larger cohort would be warranted to further investigate this hypothesis. We also acknowledge the fact that the isoform was only assessed by mRNA expression levels. However, as previous studies showed a concordance between the gene and the protein expression of the (+)insert SMMHC isoform in respiratory tract of horses, in rabbit bladder and in various human organs,^{24,25,34} conclusions based on evaluation of the mRNA level were deemed reliable.

The proliferation rate of ASM cells in SEA is greater than in healthy horses and contributes to hyperplasia.^{12,26} The study of ASM proliferation is of particular interest as the increased amount of ASM present in SEA is only partly reversible by long-term antigen avoidance, corticosteroid therapy,¹⁵ or combination of inhaled corticosteroids and bronchodilators.¹⁶ Furthermore, those chronic changes might contribute to residual bronchospasm found in SEA.¹⁵ However, no difference in the proliferation rate of ASM from central airways between control horses and horses diagnosed with MEA was observed. Those findings are consistent with previous reports in humans, suggesting that hyperplasia is not a significant finding in mild forms of asthma,^{14,35,36} but differ with others.³⁷ The inclusion criteria, along with the technique used, might explain the variability in observations. PCNA expression, while sensitive to detect cell proliferation,³⁵ is also expressed in cells undergoing DNA repair, chromatin remodelling or epigenetic modification.³⁸ Consequently, small variations in the proliferation rate between control and horses with MEA could have been missed. Alternatively, an increase in ASM proliferation rate was also found in control horses following an antigen exposure.²⁶ Therefore, an increase in the proliferation rate could be unspecific to the asthmatic phenotype and might blunt the difference between a physiologic response to an inflammatory insult in a healthy animal and a slight increase in a mildly asthmatic horse, in which changes might not be as extensive as in a chronically and severely affected one. As no difference was found between groups, a significant increase in the proliferation rate of ASM might not be an intrinsic abnormality, as previously proposed,³⁹ but rather a loss of homeostatic control secondary to the ongoing stimulation or damage present in the chronic severe form of the disease.

Although there is evidence that hypertrophy contributes to the increase of ASM mass in SEA,^{16,26} our results show no difference in density of nuclei per area of ASM. Even if this result suggests that hypertrophy is not a characteristic of ASM in MEA, conclusions drawn on cell sizes from endobronchial biopsies should be interpreted with care as mean cell volume is subject to preparation artifacts that could lead to misinterpretation.⁴⁰ Even if no evidence of hypertrophy in central airways could be found, the presence of hypertrophy in peripheral airways of horses with MEA remains to be determined. Furthermore, because equine asthma is a heterogenous condition,^{41,42} the identification of subcategories of horses with MEA presenting hypertrophic or hyperplastic ASM phenotypes might require studies perform on larger cohorts. Moreover, neither total ASM area (μm^2) present on endobronchial biopsies, nor ASM percentage (% of μm^2 ASM/ μm^2 biopsy) were different between groups (data not shown). However, because the

amount of ASM yield on an endobronchial biopsy can be influenced by many variables, interpretation of ASM area could be misleading and quantification is deemed unreliable in horses.³⁰ Due to these limitations, whether an increase in ASM mass is present in horses with MEA remains to be determined.

Mature ASM cells can change from a contractile to a proliferative phenotype in response to different stimuli. This phenomenon has been referred to as phenotype plasticity.³² A contractile profile seems more predominant in MEA as the expression of (+)insert SMMHC was increased, but not the proliferation. Nevertheless, our results show a positive correlation between the percentage of proliferating myocytes and the gene expression of the hypercontractile (+)insert SMMHC isoform. This finding suggests that the two phenotypes may influence each other or share common causes. Previous results have shown that methacholine induced bronchoconstriction alone could stimulate mechanosensitive cells from the epithelium to release growth factors promoting airway remodelling.^{43,44} Increased ASM proliferation rate could thereby be secondary to the compression of the inner structures of airway walls caused by an extensive shortening of ASM. This order of events could be a potential explanation for the absence of difference in the proliferation rate between groups, whereas overexpression of the (+)insert SMMHC was present. Other possible explanations for this correlation would reside in the many complex molecular signalling pathways or mechanisms that influence both contractility and proliferation of ASM.^{32,45}

Whilst the causality relationship between inflammation and remodelling remains debatable,^{8,44} our results suggest an association between neutrophilic inflammation and proliferation rate of ASM myocytes. Although opposed to findings reported in humans,³⁶ this result is consistent with previous study showing the enhancement of ASM proliferation by equine neutrophil-derived exosomes.⁴⁶ As neutrophilic inflammation is the main phenotype observed in SEA and is closely related to the ASM cell proliferation rate, this reinforces the idea that increased expression of PCNA might be more extensive in the severe form of the disease. However, no correlation was found between (+)insert SMMHC expression and neutrophilia. This result is consistent with the dissociation between the (+)insert expression and BALF neutrophilia in SEA.²⁵ Myosin isoforms expression could therefore be influenced by mechanisms other than inflammation, such as mechanical loads³⁴ or the copresence of other factors, such as the myosin light chain kinase (MLCK) that is up-regulated in human patients with mild asthma.^{33,47} Given the low number of horses included in the study presenting an elevated percentage of mast cells or eosinophils on their BALF cytology, no correlations were found with other inflammatory

phenotypes. We recognise the increased risk of type I error of testing many correlations, but as the neutrophils are involved in perpetuate tissue damage leading to airway remodelling,⁴⁸ and given the strong correlation observed ($P = 0.01$, $r = 0.80$), we are confident the correlation is not solely random.

One of the main limitations of studies on airway remodelling, both in human and equine asthma, is the impossibility to sample the peripheral airways without invasive diagnostic methods. While the use of endobronchial biopsies provides reliable information of the structural components of bronchi, it yields small samples that are subject to variability and its utility remains limited to the study of central airways.^{49,50} Although previous equine studies have revealed the presence of morphological alterations of ASM along the bronchial tree,^{12,16,26} thickening and proliferation of the ASM was dependent of the diameter of the airways, with hyperplasia being more important in small peripheral airways.^{12,26} Therefore, variation in the degree of hyperplasia along the bronchial tree could have contributed to the lack of difference found between groups in our study. Hyperplasia in the central airways might be more specific of a more advanced stage of the disease, considering it has been related with fatal asthma in humans,¹¹ and consequences regarding airway resistance are greater in central airways.⁵¹

A challenge that can hardly be overcome in the study of MEA is the possible overlap between groups definition. While the clinical phenotype of SEA is well established, boundaries that distinguish mild manifestations of equine asthma from clinically normal horses are loosely defined.^{5, 8} The main difficulties emerge, on one hand, from a lack of sensible diagnostic tools that could measure minimal changes in lung function,⁵² and on the other, from the limited knowledge of physiological pulmonary variations of a normal horse.⁸ Despite high prevalence in some populations of horses showing signs compatible with MEA,^{2,3} only some horses will develop the severe form of the disease,⁵³ further illustrating the wide spectrum of phenotypes within MEA. Whether the (+)insert isoform expression could be used in the future as tools to predict horses predisposed to develop the severe form of the disease remains to be validated.

It is well recognized in humans that asthma is a heterogenous disease encompassing many endotypes,⁴² and recognition of different phenotypes is also arising in equine asthma.^{5,52} A better understanding of the multiple pathophysiology of asthma could lead to personalize targeted therapy, and ultimately prevent the development of the severe form of the disease. This study allowed the characterisation of ASM in MEA, leading to a better comprehension of the initial changes that occur in the development of the disease. Functional, but not structural changes were

present in ASM of horses with MEA, suggesting that structural changes might be specific of the severe form of the disease, although abnormal contractility of ASM and pulmonary neutrophilia may promote its development. Longitudinal studies following the clinical outcomes of animals presenting some evidence of remodelling could determine the relevance of the changes found in this study.

2.6 TABLES

Tableau II. (Tableau 1. article) – Sequence of primers used for the quantification of the smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC) isoforms by RT-qPCR

50 -ATTCTATGCACAGGCGAGTCTGGA-30	SMMHC (+)insert forward
50 -GTAGGCAAGAGGTGGGCCTTG-30	SMMHC (+)insert reverse
50 -TGAACAAGGCCCTGGACAAGAC-30	Total SMMHC forward
50 -TGCAGCTTCTCGTTGGTGTAGT-30	Total SMMHC reverse

Tableau III. (Tableau 2. article) – Signalment and characteristics of each group

	Genomic analyses of the (+)insert SMMHC isoform		Histomorphometric analyses (PCNA, cell size, ASM area)	
	Control (n = 6)	MEA (n = 18)	Control (n = 5)	MEA (n = 11)
Sex	Mares (n = 3) Geldings (n = 3)	Mares (n = 9) Geldings (n = 9)	Mares (n = 2) Geldings (n = 3)	Mares (n = 7) Geldings (n = 4)
Breeds	QH/associated breeds (n = 3) WB (n = 1) STB (n = 1) Morgan (n = 1)	QH/associated breeds (n = 10) WB (n = 6) TB (n = 1) Shire (n = 1)	QH/associated breeds (n = 3) WB (n = 1) Morgan (n = 1)	QH/associated breeds (n = 6) WB (n = 3) TB (n = 1) Shire (n = 1)
Housing	Stall (n = 4) Paddock (n = 2)	Stall (n = 12) Paddock (n = 6)	Stall (n = 3) Paddock (n = 2)	Stall (n = 7) Paddock (n = 4)
Use	Leisure (n = 5) Teaching herd (n = 1)	Sport (n = 12) Leisure (n = 6)	Leisure (n = 5)	Sport (n = 6) Leisure (n = 5)
Feeding	Dry hay (n = 6)	Dry hay (n = 14) Cubed alfalfa (n = 2) Wet hay (n = 1) Silage (n = 1)	Dry hay (n = 5)	Dry hay (n = 10) Wet hay (n = 1)

Abbreviations: QH: Quarter Horse, WB: Warmblood, STB: Standardbred, TB: Thoroughbred

2.7 FIGURES

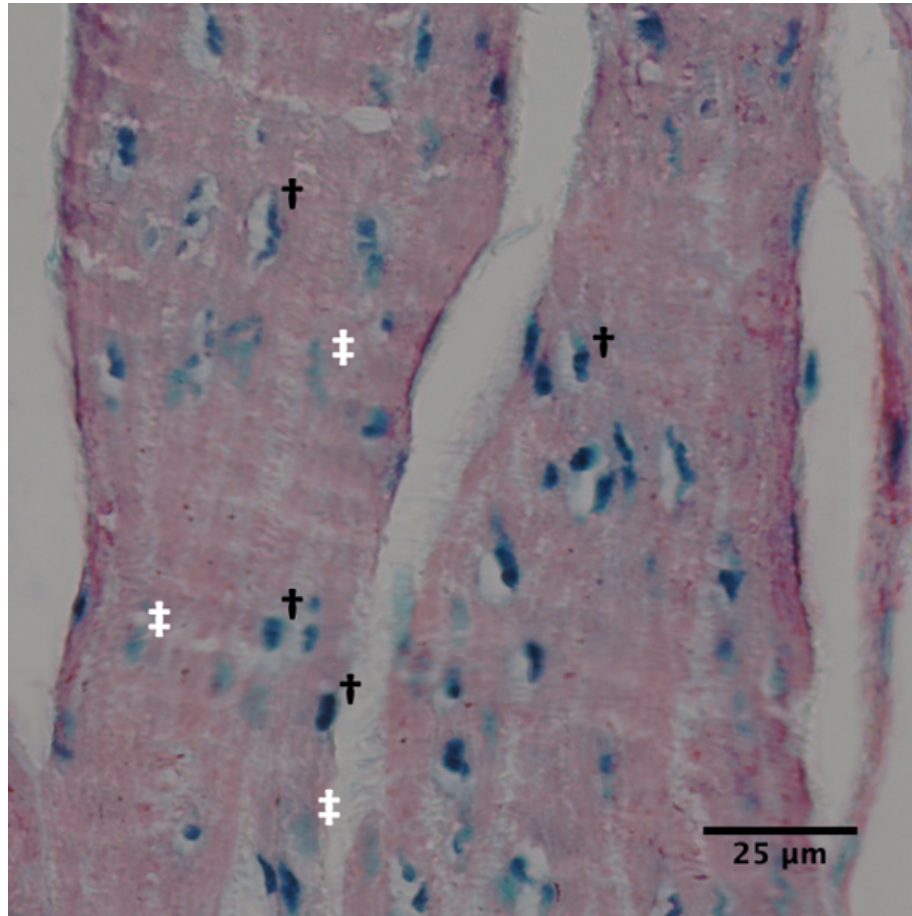


Figure 7. (Figure 1. article) Section of an airway smooth muscle area showing proliferating cell nuclear antigen (PCNA) positive (†) and PCNA negative (white ‡) nuclei.

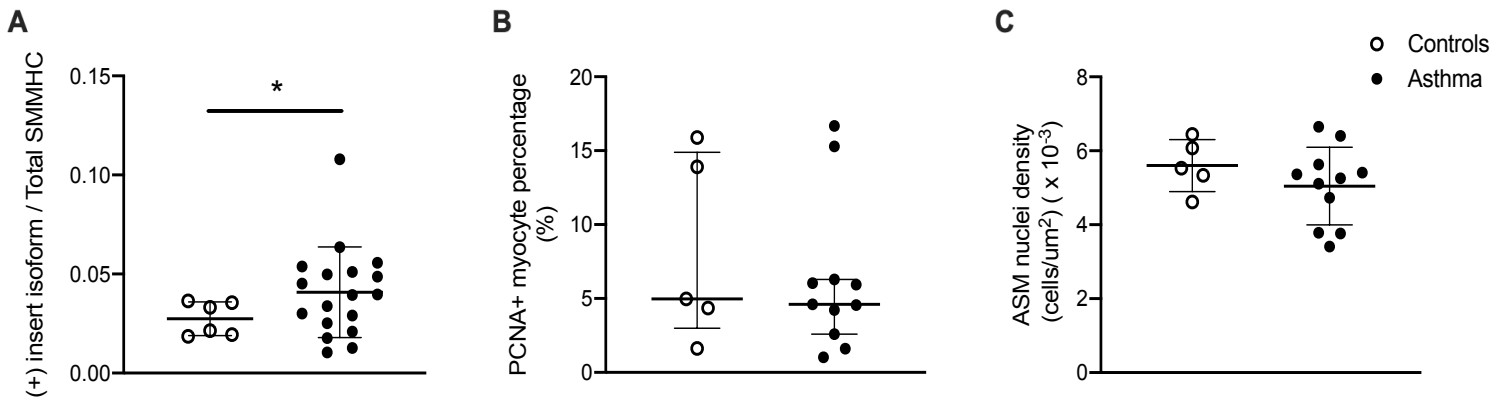


Figure 10. (Figure 4. article) Gene expression and histomorphometric analyses of airway smooth muscle (ASM). (A) Expression ratio of the (+)insert isoform over total smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC) obtained by mRNA extraction of endobronchial biopsies. (B) ASM cell proliferation rates. (C) Bronchial myocyte density. Horses with asthma, (A) $n = 18$, (B) & (C) $n = 11$; control horses, (A) $n = 6$, (B) & (C) $n = 5$. (A) & (C) Horizontal bars correspond to mean values \pm SD. (B) Horizontal bars correspond to median \pm IQR. * $P < 0.05$.

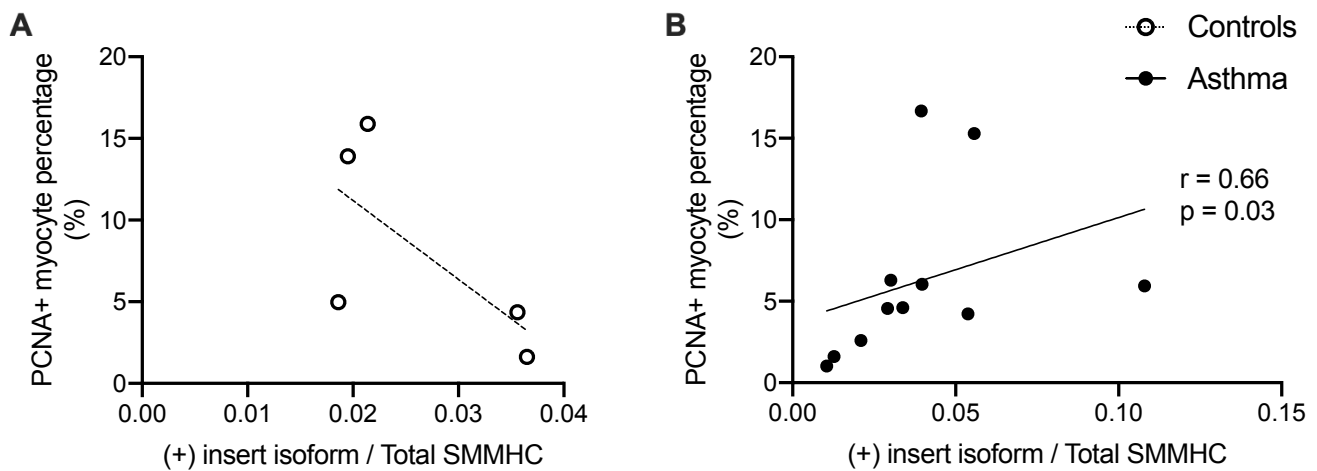


Figure 11. (Figure 5. article) Correlations between proliferation rate and ratio expression of the (+)insert isoform over Total SMMHC in (A) control horses ($n = 5$) and (B) horses with asthma ($n = 11$). The lines represent the linear regression.

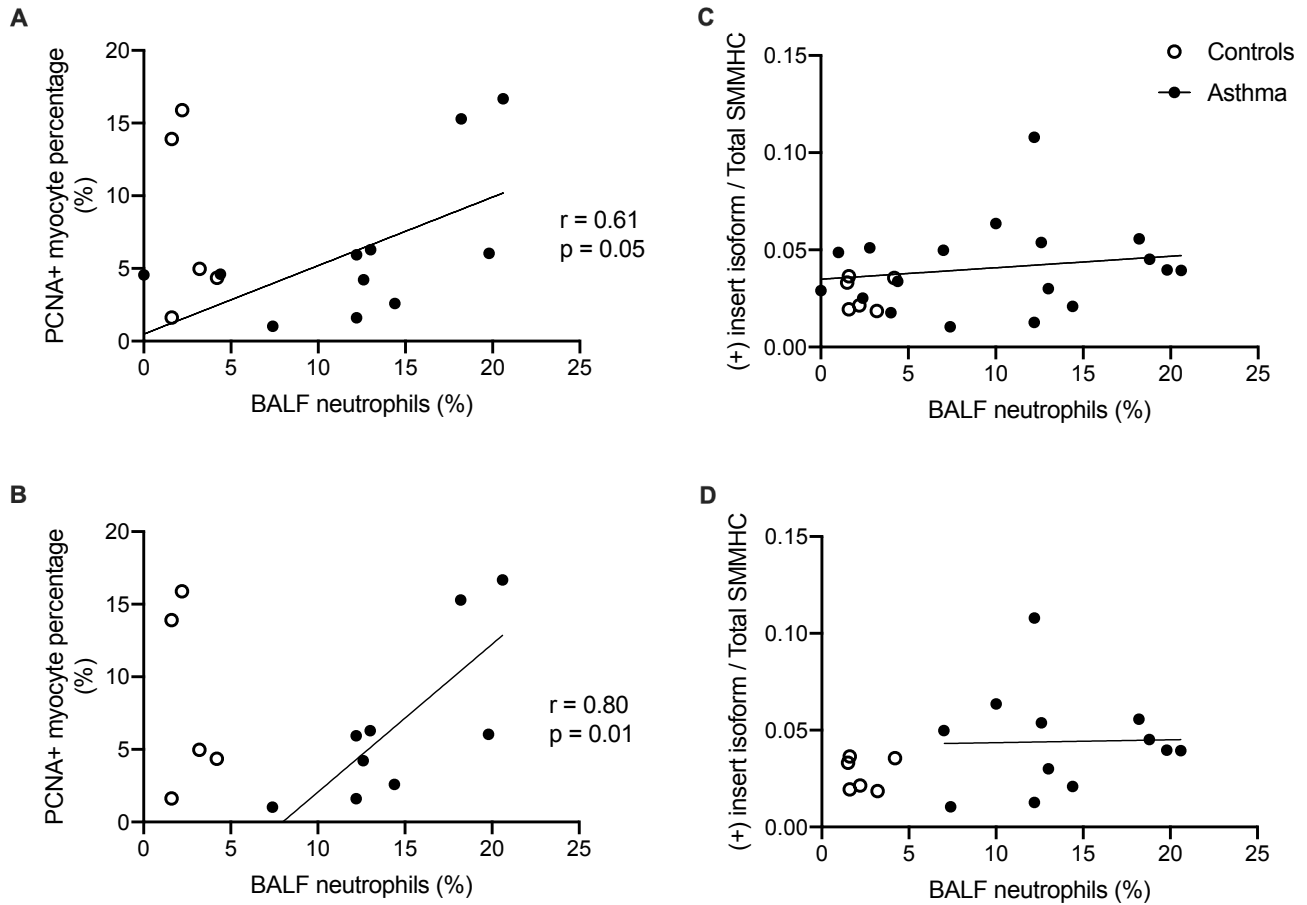


Figure 12. (Figure 6. article) Correlations between neutrophilic inflammation and (A) & (B) airway smooth muscle cells proliferation rate, and (C) & (D) expression ratio of the (+)insert isoform over total smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC). Panels (A) & (C) show correlations with all horses with asthma, while on panels (B) & (D) figure only the horses with pulmonary neutrophilic inflammation. Horses with asthma, (A) $n = 11$, (B) $n = 9$, (C) $n = 18$, (D) $n = 12$; control horses, (A) & (B) $n = 5$, (C) & (D) $n = 6$. The lines represent the linear regression.

2.8 REFERENCES

1. Hotchkiss JW, Reid SWJ, Christley RM. A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: Risk factors for recurrent airway obstruction. *Equine Vet J*. 2007;39(4):301-8.
2. Ivester KM, Couetil LL, Moore GE. An observational study of environmental exposures, airway cytology, and performance in racing thoroughbreds. *J Vet Intern Med*. 2018;32(5):1754-62.
3. Secombe CJ, Lester GD, Robertson ID, Cullimore AM. Retrospective survey of bronchoalveolar lavage fluid cytology in Western Australian horses presented for evaluation of the respiratory tract: effect of season on relative cell percentages. *Aust Vet J*. 2015;93(5):152-6.
4. Couetil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Leguillette R, Richard EA. Inflammatory Airway Disease of Horses--Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med*. 2016;30(2):503-15.
5. Bond S, Leguillette R, Richard EA, Couetil L, Lavoie JP, Martin JG, et al. Equine asthma: Integrative biologic relevance of a recently proposed nomenclature. *J Vet Intern Med*. 2018;32(6):2088-98.
6. Bergeron C, Tulic MK, Hamid Q. Airway remodelling in asthma: from benchside to clinical practice. *Can Respir J*. 2010;17(4):e85-93.
7. Hirota N, Martin JG. Mechanisms of airway remodeling. *Chest*. 2013;144(3):1026-32.
8. Bullone M, Lavoie JP. The equine asthma model of airway remodeling: from a veterinary to a human perspective. *Cell Tissue Res*. 2019.
9. Lambert RK, Wiggs BR, Kuwano K, Hogg JC, Pare PD. Functional significance of increased airway smooth muscle in asthma and COPD. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 1993;74(6):2771-81.
10. Pepe C, Foley S, Shannon J, Lemiere C, Olivenstein R, Ernst P, et al. Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(3):544-9.
11. James AL, Bai TR, Mauad T, Abramson MJ, Dolhnikoff M, McKay KO, et al. Airway smooth muscle thickness in asthma is related to severity but not duration of asthma. *Eur Respir J*. 2009;34(5):1040-5.
12. Herszberg B, Ramos-Barbon D, Tamaoka M, Martin JG, Lavoie JP. Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(2):382-8.

13. Bara I, Ozier A, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *Eur Respir J*. 2010;36(5):1174-84.
14. James AL, Elliot JG, Jones RL, Carroll ML, Mauad T, Bai TR, et al. Airway smooth muscle hypertrophy and hyperplasia in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(10):1058-64.
15. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Joubert P, Relave F, Setlakwe EL, Beauchamp G, et al. Corticosteroids and antigen avoidance decrease airway smooth muscle mass in an equine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;47(5):589-96.
16. Bullone M, Vargas A, Elce Y, Martin JG, Lavoie JP. Fluticasone/salmeterol reduces remodelling and neutrophilic inflammation in severe equine asthma. *Sci Rep*. 2017;7(1):8843.
17. Woolcock AJ, Peat JK. Epidemiology of bronchial hyperresponsiveness. *Clin Rev Allergy*. 1989;7(3):245-56.
18. Gil FR, Lauzon AM. Smooth muscle molecular mechanics in airway hyperresponsiveness and asthma. *Can J Physiol Pharmacol*. 2007;85(1):133-40.
19. Jiang H, Rao K, Liu X, Halayko AJ, Liu G, Stephens NL. Early changes in airway smooth muscle hyperresponsiveness. *Can J Physiol Pharmacol*. 1994;72(11):1440-7.
20. Fredberg JJ, Inouye DS, Mijailovich SM, Butler JP. Perturbed equilibrium of myosin binding in airway smooth muscle and its implications in bronchospasm. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(3):959-67.
21. Kelley CA, Takahashi M, Yu JH, Adelstein RS. An insert of seven amino acids confers functional differences between smooth muscle myosins from the intestines and vasculature. *J Biol Chem*. 1993;268(17):12848-54.
22. Lauzon AM, Tyska MJ, Rovner AS, Freyzo Y, Warshaw DM, Trybus KM. A 7-amino-acid insert in the heavy chain nucleotide binding loop alters the kinetics of smooth muscle myosin in the laser trap. *J Muscle Res Cell Motil*. 1998;19(8):825-37.
23. Low R, Leguillette R, Lauzon AM. (+)Insert smooth muscle myosin heavy chain (SM-B): from single molecule to human. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(11):1862-74.
24. Leguillette R, Gil FR, Zitouni N, Lajoie-Kadoch S, Sobieszek A, Lauzon AM. (+)Insert smooth muscle myosin heavy chain (SM-B) isoform expression in human tissues. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;289(5):C1277-85.
25. Boivin R, Vargas A, Lefebvre-Lavoie J, Lauzon AM, Lavoie JP. Inhaled corticosteroids modulate the (+)insert smooth muscle myosin heavy chain in the equine asthmatic airways. *Thorax*. 2014;69(12):1113-9.

26. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Gelinias-Lymburner E, David F, Martin JG, Lavoie JP. Effect of antigenic exposure on airway smooth muscle remodeling in an equine model of chronic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45(1):181-7.
27. Bessonnat A, Lavoie J-P. Évaluation du remodelage des voies respiratoires centrales de chevaux asthmatiques légers/modérés. [Montréal]: Université de Montréal; 2018.
28. ter Woort F, Caswell JL, Arroyo LG, Viel L. Histologic investigation of airway inflammation in postmortem lung samples from racehorses. *Am J Vet Res.* 2018;79(3):342-7.
29. Jean D, Vrins A, Beauchamp G, Lavoie JP. Evaluation of variations in bronchoalveolar lavage fluid in horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res.* 2011;72(6):838-42.
30. Bullone M, Chevigny M, Allano M, Martin JG, Lavoie JP. Technical and physiological determinants of airway smooth muscle mass in endobronchial biopsy samples of asthmatic horses. *J Appl Physiol (1985).* 2014;117(7):806-15.
31. Setlakwe EL, Lemos KR, Lavoie-Lamoureux A, Duguay JD, Lavoie JP. Airway collagen and elastic fiber content correlates with lung function in equine heaves. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014;307(3):L252-60.
32. Hirota JA, Nguyen TT, Schaafsma D, Sharma P, Tran T. Airway smooth muscle in asthma: phenotype plasticity and function. *Pulm Pharmacol Ther.* 2009;22(5):370-8.
33. Leguillette R, Laviolette M, Bergeron C, Zitouni N, Kogut P, Solway J, et al. Myosin, transgelin, and myosin light chain kinase: expression and function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179(3):194-204.
34. DiSanto ME, Stein R, Chang S, Hypolite JA, Zheng Y, Zderic S, et al. Alteration in expression of myosin isoforms in detrusor smooth muscle following bladder outlet obstruction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;285(6):C1397-410.
35. Hassan M, Jo T, Risse PA, Tolloczko B, Lemiere C, Olivenstein R, et al. Airway smooth muscle remodeling is a dynamic process in severe long-standing asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(5):1037-45 e3.
36. James AL, Noble PB, Drew SA, Mauad T, Bai TR, Abramson MJ, et al. Airway smooth muscle proliferation and inflammation in asthma. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985).* 2018;125(4):1090-6.
37. Woodruff PG, Dolganov GM, Ferrando RE, Donnelly S, Hays SR, Solberg OD, et al. Hyperplasia of smooth muscle in mild to moderate asthma without changes in cell size or gene expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169(9):1001-6.

38. Naryzhny SN. Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(23):3789-808.
39. Johnson PR, Roth M, Tamm M, Hughes M, Ge Q, King G, et al. Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(3):474-7.
40. Jones RL, Elliot JG, James AL. Estimating airway smooth muscle cell volume and number in airway sections. Sources of variability. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014;50(2):246-52.
41. Elliot JG, Jones RL, Abramson MJ, Green FH, Mauad T, McKay KO, et al. Distribution of airway smooth muscle remodelling in asthma: relation to airway inflammation. *Respirology.* 2015;20(1):66-72.
42. Jarjour NN, Erzurum SC, Bleecker ER, Calhoun WJ, Castro M, Comhair SA, et al. Severe asthma: lessons learned from the National Heart, Lung, and Blood Institute Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(4):356-62.
43. Grainge CL, Lau LC, Ward JA, Dulay V, Lahiff G, Wilson S, et al. Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma. *N Engl J Med.* 2011;364(21):2006-15.
44. Gosens R, Grainge C. Bronchoconstriction and airway biology: potential impact and therapeutic opportunities. *Chest.* 2015;147(3):798-803.
45. Prakash YS. Airway smooth muscle in airway reactivity and remodeling: what have we learned? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013;305(12):L912-33.
46. Vargas A, Roux-Dalvai F, Droit A, Lavoie JP. Neutrophil-Derived Exosomes: A New Mechanism Contributing to Airway Smooth Muscle Remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;55(3):450-61.
47. Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(10):1360-8.
48. Uberti B, Morán G. Role of neutrophils in equine asthma. *Anim Health Res Rev.* 2018;19(1):65-73.
49. Jeffery P, Holgate S, Wenzel S, Endobronchial Biopsy W. Methods for the assessment of endobronchial biopsies in clinical research: application to studies of pathogenesis and the effects of treatment. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(6 Pt 2):S1-17.
50. Woodruff PG, Innes AL. Quantitative morphology using bronchial biopsies. *European Respiratory Review.* 2006;15(101):157-61.
51. Martin JG, Duguet A, Eidelman DH. The contribution of airway smooth muscle to airway narrowing and airway hyperresponsiveness in disease. *Eur Respir J.* 2000;16(2):349-54.

52. Couetil L, Cardwell JM, Leguillette R, Mazan M, Richard E, Bienzle D, et al. Equine Asthma: Current Understanding and Future Directions. *Front Vet Sci.* 2020;7:450.
53. Bosshard S, Gerber V. Evaluation of coughing and nasal discharge as early indicators for an increased risk to develop equine recurrent airway obstruction (RAO). *J Vet Intern Med.* 2014;28(2):618-23.

3 Chapitre 3 - Discussion générale

3.1 Résultats de l'étude

Le développement de thérapie ciblée permettant de traiter spécifiquement le remodelage pulmonaire requiert d'abord une compréhension de ses mécanismes (77, 92, 193). L'étude actuelle s'inscrit donc dans cette foulée et rejoint également les objectifs établis par le dernier consensus d'experts sur l'asthme équin, soit de caractériser le remodelage survenant dans les voies respiratoires centrales de chevaux atteints d'asthme léger à modéré (76). Nos résultats démontrent que chez ces chevaux, une surexpression de l'isoforme insert(+) de la myosine est présente, mais que le taux de prolifération des cellules du muscle lisse bronchique n'est pas différent de celui des chevaux sains. Il semble toutefois exister une association entre l'expression de l'insert(+) et du PCNA chez les chevaux atteints d'asthme léger à modéré, suggérant une possible influence mutuelle des phénotypes contractile et prolifératif du muscle lisse, ou qu'une voie de signalisation commune à l'expression des deux phénotypes musculaires est impliquée dans l'asthme équin. Une association entre la neutrophilie pulmonaire, identifiée par cytologie sur lavage bronchoalvéolaire, et le taux de prolifération du muscle lisse bronchique, corrobore l'influence de l'inflammation pulmonaire sur le taux de renouvellement du muscle lisse bronchique.

3.1.1 Hypercontractilité : une anomalie intrinsèque au muscle lisse bronchique

Le rôle du muscle lisse dans l'établissement d'un bronchospasme semble indéniable (3). Cependant, certains doutes persistent quant à savoir si une contraction excessive est causée par la présence d'une anomalie contractile intrinsèque au muscle lisse ou résulte d'un dérèglement autre exerçant une influence sur la contractilité de celui-ci (203). La discordance de précédents résultats obtenus sur la contractilité du muscle lisse est d'ailleurs bien illustrée dans un article de synthèse précédent (62). Néanmoins, les résultats obtenus dans l'étude actuelle démontrent que chez certains chevaux asthmatiques légers à modérés, le muscle lisse bronchique présente une surexpression de l'isoforme rapide de la myosine, suggérant l'adoption d'un profil hypercontractile. Ces résultats, en accord avec d'autres études portant sur les changements fonctionnels du muscle lisse de chevaux asthmatiques sévères (8, 9), supportent l'hypothèse que des anomalies intrinsèques au muscle lisse contribuent au développement d'hyperréactivité

bronchique chez les chevaux asthmatiques. Toutefois, comme tous les chevaux du groupe asthmatique ne présentaient pas une augmentation de l'expression de l'insert(+), il est possible que d'autres changements, soient l'implication de diverses protéines contractiles du muscle lisse, une altération du contrôle nerveux de la contraction musculaire ou un remodelage d'autres composantes tissulaires des bronches, puissent également être impliqués dans l'établissement d'un bronchospasme.

3.1.2 Taux de prolifération et masse du muscle lisse bronchique

Alors que chez les chevaux asthmatiques sévères, un taux de prolifération du muscle lisse est présent même en période de rémission (5), les chevaux asthmatiques légers à modérés ne démontrent pas une augmentation du pourcentage de myocytes en prolifération. Ces données suggèrent donc qu'une perte de régulation du taux de prolifération est peu probable chez les chevaux atteints des formes légères de la maladie. Cependant, d'autres mécanismes pouvant mener à une hyperplasie du muscle lisse, tels qu'un recrutement de fibroblastes (72, 250, 251), ou encore une diminution de l'apoptose (243), pourraient faire l'objet d'études futures. Par ailleurs, il est possible que la masse de muscle lisse des chevaux asthmatiques légers à modérés ne soit pas augmentée dans les voies respiratoires centrales, expliquant leurs signes cliniques moins prononcés que dans la forme sévère. Dans un tout autre ordre d'idée, certains chevaux prédisposés pourraient avoir une masse de muscle lisse supérieure à la norme, suite à un débalancement survenu tôt au cours de la vie, secondaire à l'exposition d'antigènes ou de polluants, d'infections ou même à l'exposition de signaux maternels affectant le développement *in utero* (191, 277). Celle-ci serait alors indétectable par mesure du taux de prolifération cellulaire à un âge plus avancé.

Chez les chevaux asthmatiques sévères, la masse de muscle lisse est augmentée par rapport aux chevaux sains, et bien que cette augmentation soit plus marquée dans les bronchioles, elle est également présente dans les voies respiratoires centrales (4, 144, 249). L'étude actuelle, étant réalisée à partir de biopsies endobronchiques, ne permet toutefois pas d'évaluer la quantité totale de muscle lisse présent dans les voies respiratoires de chevaux asthmatiques légers à modérés (278). De façon complémentaire à cette étude, l'évaluation de la masse de muscle lisse dans les voies respiratoires centrales pourrait être évaluée par échographie endobronchique (Endoscopic Bronchial UltraSound; EBUS). Ce système minimalement invasif permet de visualiser les différentes composantes des bronches (144). À l'aide de cette technique, la présence d'une

augmentation de la masse de muscle lisse chez certains chevaux asthmatiques légers à modérés pourrait être évaluée, bien que les taux de prolifération détectés ne soient pas différents chez les chevaux modérément asthmatiques par rapport aux contrôles. Ceci permettrait de trouver des pistes de réponse quant au développement initial du remodelage pulmonaire, d'interpréter les résultats actuels sous une nouvelle perspective, et ainsi mieux comprendre les changements pathologiques du muscle lisse bronchique dans les formes légères de l'asthme.

3.2 Limites

3.2.1 Sélection des chevaux

3.2.1.1 *Fonction pulmonaire*

Le diagnostic d'asthme équin léger à modéré repose sur l'évidence de signes respiratoires, auxquels s'ajoute l'objectivation d'une inflammation pulmonaire par cytologie sur lavage bronchoalvéolaire (76), contrairement à l'asthme humain dont le diagnostic est confirmé par la mise en évidence d'obstruction respiratoire (75). Malgré l'appel au développement de techniques diagnostiques capables de détecter de légères baisses de fonction pulmonaire il y a de cela 20 ans (279), les tests de fonction pulmonaire disponibles chez les chevaux demeurent peu sensibles (104), ou invasifs (118), et peu portatifs. L'oscillométrie offre une plus grande sensibilité (121, 122), mais les résultats sont sujets à l'influence de problèmes des voies respiratoires supérieures (121), souvent concomitants avec les problèmes de voies respiratoires inférieures (280). Un test de broncho-provocation est alors nécessaire pour identifier la présence d'hyperréactivité bronchique dans les cas d'asthme équin léger et modéré. Sans objectivation de la fonction pulmonaire, le diagnostic repose en grande partie sur une observation des signes cliniques par le client. En médecine humaine, il est reconnu que les connaissances médicales du patient influencent sa description des signes cliniques (281). En médecine vétérinaire, il est fort probable que le même biais soit présent, auquel s'ajoutent d'autres facteurs comme le temps passé par le client à côtoyer son animal, le type d'entraînements ainsi que les aspirations sportives du client. Paradoxalement, les propriétaires de chevaux, passant beaucoup plus de temps à observer leurs animaux, évaluent mieux la manifestation de signes cliniques de leurs animaux que ne peut le faire un vétérinaire en une seule consultation (282). Du moins, ceci semble vrai pour une clientèle étant propriétaire de leur animaux depuis en moyenne 6 ans, et pratiquant en majorité l'équitation à un niveau compétitif. De plus, les signes cliniques, en particulier l'observation d'une

intolérance à l'effort sans présence de toux, ne sont pas spécifiques d'une condition des voies respiratoires inférieures. Chez les trois chevaux asthmatiques de l'étude ne rapportant pas de toux concomitante à l'intolérance à l'effort, malgré l'établissement d'une inflammation pulmonaire, une autre cause sous-jacente contribuant à la baisse de performances ne peut être exclue.

3.2.1.2 Lavages bronchoalvéolaires

En plus des signes cliniques rapportés, la sélection des chevaux asthmatiques de l'étude était donc confirmée par la présence d'une inflammation identifiée par la cytologie d'un lavage bronchoalvéolaire. Celle-ci était définie par une neutrophilie supérieure à 5%, un comptage de mastocytes plus grand ou égal à 2% ou un comptage d'éosinophiles plus grand ou égal à 1%. Cependant, plusieurs aléas peuvent influencer l'inflammation mesurée, dont, entre autres, le volume de saline instillé (283), le transport des chevaux préconsultation (284), le poumon échantillonné (285, 286), et l'exposition antigénique variable d'une écurie à l'autre (157). Contrairement aux signes cliniques clairement anormaux chez les chevaux asthmatiques sévères en crises et une inflammation pulmonaire généralement marquée (128), les limites définissant les chevaux asthmatiques légers à modérés des chevaux sains sont mal définies (74), laissant place à l'utilisation de différents critères d'inclusions entre les études (Tableau IV).

Tableau IV - Liste non exhaustive d'articles portant sur l'étude de populations de chevaux asthmatiques légers à modérés, illustrant la variabilité des critères de sélection utilisés

	LBA seul	LBA et signes cliniques	Signes cliniques seulement
<u>Neutrophiles</u>	>10% (98, 114, 122, 139)	>5% (78, 80, 109, 137, 138, 258)	Présence de sécrétions trachéales post-exercice (26)
	>5% (2, 79, 99)		
<u>Mastocytes</u>	5-10% (98)	≥2% (78, 138, 258)	
	>3% (114)	>2% (80, 109, 137)	
	>2% (2, 79, 122)		
	≥2% (99, 139)		
<u>Éosinophiles</u>	≥1% (99, 139)	≥1% (138, 258)	
	>1% (2, 79, 122)	>1% (78, 109, 137)	
	>0.5% (114)	>0.1% (80)	

Dans l'étude actuelle, tous les chevaux asthmatiques devaient présenter une intolérance à l'effort ou des signes respiratoires anormaux, comme la présence de toux chronique, limitant ainsi les faux positifs obtenus sur base de la cytologie uniquement. De plus, la méthode utilisée pour la réalisation des lavages bronchoalvéolaires était standardisée, diminuant ainsi certains biais potentiels. Malgré tout, le rejet de quatre chevaux présentant des signes cliniques sans inflammation pulmonaire, selon les critères utilisés dans cette étude, et, dans le scénario contraire, l'exclusion de 17 chevaux sains cliniquement, mais présentant une inflammation pulmonaire, pourrait avoir influencé les résultats. Un chevauchement dans les classifications est difficilement évitable étant donnée la possibilité d'une inflammation pulmonaire transitoire suivant une exposition à des allergènes chez des chevaux sains (106, 107, 112, 128, 136). Une association entre un comptage cytologique anormal au lavage bronchoalvéolaire et les baisses de performance illustre l'impact négatif d'une inflammation pulmonaire (2). Cependant, alors qu'une tendance de groupe est observable, les performances individuelles ne peuvent être prédites à partir de l'évaluation de l'inflammation pulmonaire considérant l'écart important entre les données.

3.2.1.3 Perspectives sur les critères de sélection

Un grand nombre de facteurs peuvent influencer la classification des chevaux sur lesquels un contrôle limité est possible : les chevaux proviennent de différents milieux, ils ont donc une exposition variable à des antigènes; ils performant dans différentes disciplines exigeant plus ou moins un effort maximal; la perception des clients quant aux performances de leur animal est subjective; dû à l'absence de tests de fonction pulmonaire, la confirmation du diagnostic se fait par objectivation d'une inflammation pulmonaire par lavage bronchoalvéolaire sujet à de nombreuses variations. Alors que tous ces éléments n'entravent généralement pas l'établissement d'un diagnostic à des fins cliniques, en situation de recherche, les nombreuses sources de variations compliquent l'interprétation des résultats obtenus et l'addition de facteurs confondants limite les conclusions obtenues, particulièrement sur une population hétérogène atteinte des formes légères de l'asthme.

Dans ce contexte, des tests de broncho-provocation, permettant d'illustrer la présence d'hyperréactivité bronchique présente chez les chevaux asthmatiques légers à modérés (79, 80), permettraient potentiellement de limiter les chevauchements entre les groupes sains et

asthmatiques légers à modérés, tout en permettant d'associer la présence de remodelage à la sévérité d'un paramètre clinique objectif et quantifiable. L'évaluation de ce paramètre, relié à une détérioration clinique chez les humains (287, 288), pourrait favoriser le développement de marqueurs permettant d'identifier, et de traiter, le plus tôt possible, les chevaux à risque de développer la forme sévère de la maladie. Une association entre une hyperréactivité bronchique et l'expression d'insert(+), telle que précédemment proposée (12), pourrait alors être confirmée chez les chevaux. Ce marqueur des capacités contractiles du muscle lisse s'avérerait dans ce cas un marqueur potentiel de l'intensité de la maladie et de la réponse aux traitements chez les chevaux où une obstruction bronchique n'est pas détectée par les mécaniques standards.

3.2.2 Méthodes de laboratoire

Les protocoles des manipulations réalisées en laboratoires avaient été précédemment optimisés et validés, tant pour le volet de la mesure de l'expression génique des isoformes de la chaîne lourde de la myosine (9) que pour le volet histomorphométrique (4-6). Toutefois, quelques ajustements ont été faits à partir de ces protocoles et quelques limites doivent tout de même être considérées.

3.2.2.1 Volet insert(+)

Bien que la réalisation des étapes d'extraction d'ARN, de transcriptase inverse et de qPCR ait été faite conformément à ce qui avait été précédemment établi, dans le projet actuel, par limite de matériel, seulement 500 ng d'ARN ont été utilisés, contrairement aux 1000 ng utilisés précédemment dans l'étude de Boivin *et coll.* (9). Cependant, malgré cette modification, les ratios d'insert(+) sur la myosine totale obtenus dans cette étude sont comparables aux résultats antérieurs pour les groupes contrôles (Figure 13). De manière intéressante, même si les résultats sont similaires, les valeurs du groupe contrôle de l'étude de Boivin *et coll.* (Figure 13 B) sont légèrement supérieures à celles du projet actuel (Figure 13 A). Cette différence pourrait être attribuable à une sélection moins stricte des sujets du groupe témoin, puisque certains chevaux contrôles présentaient une inflammation pulmonaire au lavage bronchoalvéolaire lors de la collecte des biopsies (9). L'âge des chevaux étudiés était également différent entre les études et pourrait possiblement constituer une autre source de variation. La différence entre les groupes asthmatiques reflète probablement la sévérité de la maladie et du bronchospasme présent. Malgré tout, la similitude des données confirme la validité des résultats obtenus ainsi que la

répétabilité de la méthode utilisée pour mesurer l'expression génique de l'insert(+) dans le muscle lisse bronchique de chevaux à partir de biopsies endobronchiques.

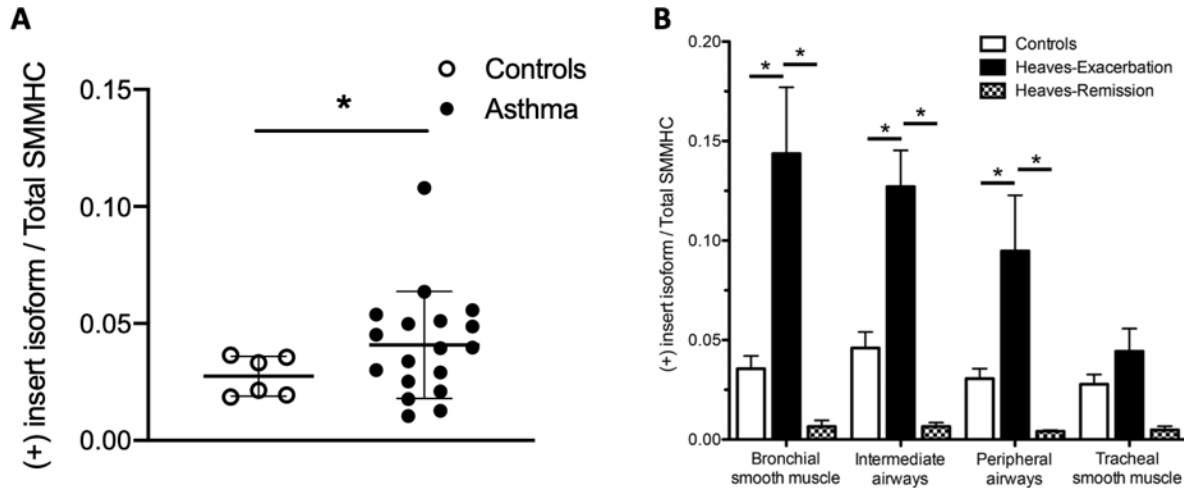


Figure 13. Ratio de l'expression génique de l'isoforme insert(+) de la chaîne lourde de la myosine dans les voies respiratoires de chevaux. A) Données du projet actuel comparant l'ARN obtenu de deux biopsies endobronchiques de chevaux contrôles avec des chevaux atteints d'asthme léger à modéré. B) Données tirées de l'étude de Boivin et coll. (9) réalisée à partir de tissus pulmonaires prélevés en post mortem comparant l'ARN messager contenu dans les voies respiratoires de chevaux contrôles, asthmatiques sévères en exacerbation et asthmatiques sévères en rémission. *Différence significative entre les groupes $p < 0.05$. B) Reproduit à partir de (9) avec la permission de BMJ Publishing Group Ltd.

3.2.2.2 Volet histomorphométrique

3.2.2.2.1 Évaluation du PCNA

Bien que différentes études s'accordent sur les conclusions obtenues par mesure du PCNA chez les chevaux asthmatiques sévères (4-6), une variabilité d'expression importante du PCNA est présente dans la littérature. En effet, alors que Hassan *et coll.* (229) et Ramos-Barbon *et coll.* (243) démontrent des taux de prolifération supérieurs chez les asthmatiques, avec des pourcentages d'expression variant en moyenne pour les contrôles, les asthmatiques légers et sévères de 5%, 12 et 32% respectivement (229), James *et coll.* (234) ne démontrent aucune différence entre les groupes avec des pourcentages d'expression oscillants autour de 30%. En comparant les résultats de cette étude avec une étude précédemment réalisée chez les chevaux, bien que les plages de valeurs s'entrecoupent, une certaine disparité des résultats entre les groupes contrôles est notable (Figure 14). Plus précisément, la moyenne du groupe contrôle de l'étude actuelle atteint près du double de celle précédemment rapportée. L'intensité de marquage du PCNA dans les

noyaux n'étant pas uniforme, l'interprétation varie alors selon le chercheur. Cette subjectivité, ne pouvant être outrepassée en l'absence d'une distinction claire et uniforme d'un noyau positif versus un noyau négatif, pourrait expliquer les résultats discordants précédemment compilés en recherche humaine (234) et entre les études présentées ici. Afin de définir le plus précisément possible un noyau positif, et ainsi rationaliser les comptes cellulaires, différents critères ont été établis dans le cadre de ce projet (voir étape 4. de l'Annexe I). Avec l'objectif de limiter au maximum les biais d'interprétation intralecteur, les paramètres susceptibles d'influencer la lecture ont été contrôlés et standardisés pour la réalisation du comptage des noyaux : la luminosité et la calibration de l'appareil de numérisation des lames; le grossissement auquel les images étaient analysées; la luminosité de l'écran, ainsi que la luminosité ambiante; l'ordinateur utilisé; et la couleur du fond d'écran. Une corrélation intraclasse a également été effectuée afin de valider la répétabilité des comptages (ICC >90%). Une corrélation interclasse aurait également pu être effectuée. Finalement, les comptes ont été réalisés à l'aveugle afin de prévenir un biais d'interprétation.

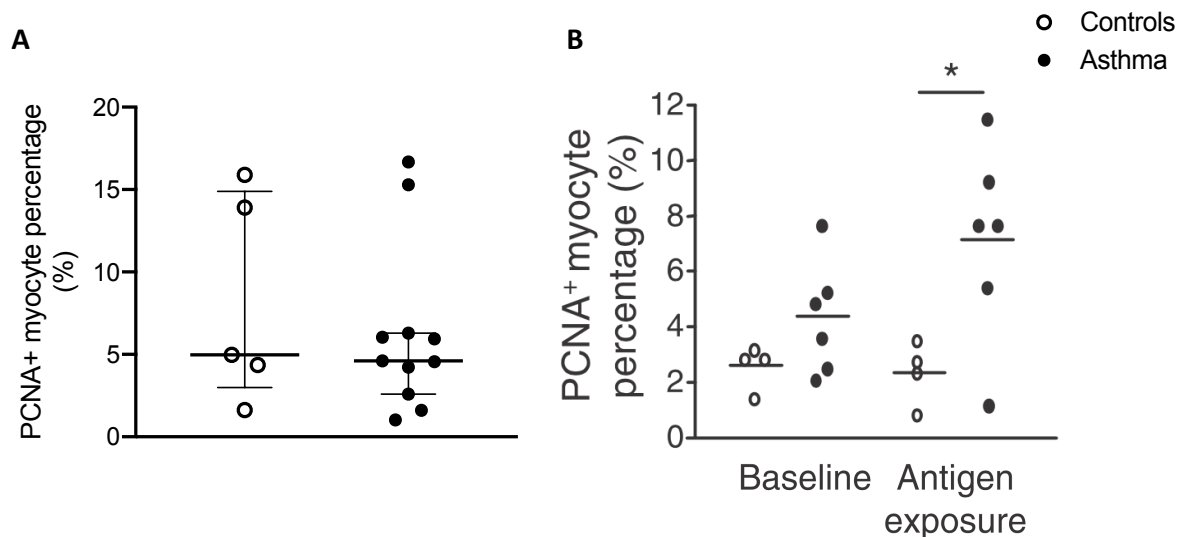


Figure 14. Pourcentage de myocytes en prolifération évalués sur des biopsies endobronchiques. A) Données tirées du projet actuel comparant le taux de prolifération du muscle lisse bronchique de chevaux asthmatiques légers à modérés à celui de chevaux contrôles. B) Données tirées de l'étude de Leclère et coll. (5) comparant le taux de prolifération du muscle lisse bronchique de chevaux asthmatiques sévères à celui de chevaux contrôles avant et après un mois d'exposition antigénique. Veuillez noter les différentes échelles entre les axes des ordonnées. B) Adapté avec la permission de l'American Thoracic Society. Droit d'auteur © American Thoracic Society. Tous droits réservés. Les lecteurs sont invités à lire l'intégralité de l'article pour connaître le contexte original à l'adresse : <https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0300OC>. Les auteurs, les rédacteurs et l'American Thoracic Society ne sont pas responsables des erreurs ou omissions dans les adaptations.

Il semble également pertinent de mentionner ici qu'un article récent ayant obtenu une moyenne de myocytes exprimant le PCNA dans le groupe contrôle environ 10% supérieure à la valeur obtenue avec la cycline D, ainsi que certains pourcentages de prolifération au-delà de 50% et même 60%, remet en question la validité d'un tel marqueur et suggère une révision de la littérature utilisant cette méthode (195). Le PCNA étant reconnu comme un marqueur sensible (229), mais peu spécifique d'une prolifération cellulaire (245, 289), pourrait effectivement être exprimé au-delà du seuil de réplication cellulaire physiologique. Ce manque de spécificité du PCNA, sans lui retirer toute sa crédibilité comme marqueur, pourrait toutefois limiter son utilisation dans la comparaison de stades légers de la maladie.

3.2.2.2 Qualité des biopsies

Un score mesurant la qualité histologique des biopsies endobronchiques a précédemment été établi, permettant de définir la préservation de l'architecture des structures échantillonnées par biopsies endobronchiques (278). De plus, comme la qualité des biopsies influence les mesures de surface du muscle lisse, les auteurs recommandent l'évaluation de tels paramètres seulement sur des biopsies de bonne qualité. Celles-ci incluent la limite externe du muscle lisse et permettent de corriger les mesures effectuées en utilisant la membrane basale comme référence (278). Malheureusement, une grande portion des biopsies étudiées dans le projet actuel ne correspondait pas à ces critères (Figure 15). Comme l'objectif premier était d'évaluer le pourcentage de myocytes en prolifération, et que ce paramètre est indépendant de la préservation de l'architecture globale des tissus, une qualité optimale des biopsies n'était alors pas jugée primordiale pour ce projet. De plus, l'évaluation du pourcentage de noyaux PCNA positifs sur la totalité des noyaux présents permet une normalisation entre les biopsies présentant plus ou moins de muscle lisse, comparativement à un compte absolu de noyaux. Cependant, les conclusions tirées à partir des mesures de surface comme la taille des cellules du muscle lisse bronchique, ou l'aire totale de muscle lisse, déjà susceptible à de nombreux artéfacts de préparation (290), sont en plus influencées par la qualité des biopsies (278). Conséquemment, bien que les résultats ne semblent pas indiquer la présence d'une hypertrophie des myocytes, cette éventualité ne peut être écartée chez les chevaux asthmatiques légers à modérés.

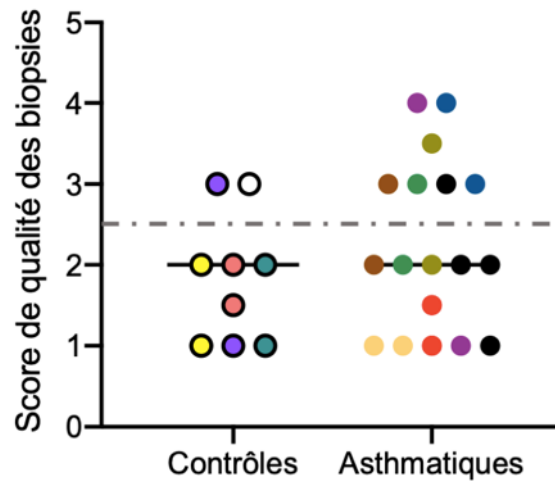


Figure 15 . Score de qualité des biopsies basé sur le score établi par Bullone et coll. (278). Les points d'une même couleur représentent les différentes biopsies analysées du même cheval. Les points noirs indiquent des chevaux pour lesquels une seule biopsie était disponible. La ligne pointillée indique la limite entre un score de qualité sous-optimal (score de 1 ou 2) ou acceptable (score ≥ 3).

3.2.3 Échantillonnage

Bien qu'une corrélation entre la masse de muscle lisse des voies centrales et périphériques ait été démontrée chez les chevaux asthmatiques sévères (7), les changements structuraux du muscle lisse sont beaucoup plus marqués dans les petites voies respiratoires périphériques (4, 5). Comme l'hyperréactivité bronchique résulte à la fois de la résistance centrale et de l'influence du parenchyme pulmonaire (256), les anomalies fonctionnelles du muscle lisse bronchique dans les voies respiratoires centrales pourraient s'accompagner de changements structuraux du muscle lisse en région périphérique. D'ailleurs, une étude post-mortem démontre que l'agression inflammatoire et les dommages des tissus sont plus extensifs en périphérie (134). Puisque le microenvironnement pulmonaire varie entre les voies respiratoires centrales et les voies périphériques (256), il est donc possible qu'une prolifération accrue du muscle lisse soit présente en périphérie, malgré l'absence de différence dans les voies centrales. Cependant, le développement parallèle d'altérations en périphérie pulmonaire contribuant à la perte de fonction respiratoire ne peut être exclu sans avoir recours à une méthode diagnostique plus invasive. Les biopsies prélevées par thoracoscopie offrent plus d'informations sur les changements périphériques (291), mais cette technique constitue une approche trop invasive pour des chevaux de clients dont la sévérité de la condition ne justifie pas une telle procédure.

De plus, l'identification de l'expression de l'isoforme rapide de la myosine par immunohistochimie révèle son expression parfois hétérogène au sein du muscle lisse (12, 55). Cette hétérogénéité pourrait refléter les différents phénotypes exprimés par chacun des myocytes (42). Il se doit d'être mentionné ici que des tentatives d'identification de l'insert(+) par immunobuvardage de type western ont été réalisées en vain chez les chevaux, aboutissant à un marquage non spécifique (données non publiées). La méthode de détection par RT-qPCR a été validée par comparaison à une analyse protéique par spectrométrie de masse et justifie donc son emploi pour la réalisation du projet actuel (292). Ceci dit, il est possible que la faible quantité de matériel récoltée par les biopsies endobronchiques soit sujette à une variabilité d'expression physiologique. Le chevauchement important entre les groupes étudiés pourrait alors refléter cette variabilité d'expression. Les chevaux asthmatiques n'exprimant que peu l'isoforme rapide pourraient donc avoir un phénotype asthmatique différent, ou le taux d'expression chez ces animaux a été sous-estimé par la méthode d'échantillonnage. Un plus grand nombre de biopsies aurait pu surmonter ces variations physiologiques.

De façon similaire, le PCNA a également une expression répartie de façon parfois hétérogène (Figure 16). Cette observation de regroupement de myocytes PCNA positifs, déjà relevée par le passé (5), pourrait refléter l'effet paracrine du muscle lisse (191). La singularité de cet événement, retrouvé seulement chez un cheval non asthmatique dans l'étude actuelle, rend toutefois sa signification difficile à interpréter. Ce phénomène illustre par contre la variabilité physiologique présente à travers le muscle lisse bronchique, un paramètre ayant pu influencer les résultats de cette étude. Alors qu'un minimum de trois biopsies est recommandé chez humain pour limiter les variations physiologiques (293), chez les chevaux, l'établissement de telles recommandations demeure à établir.

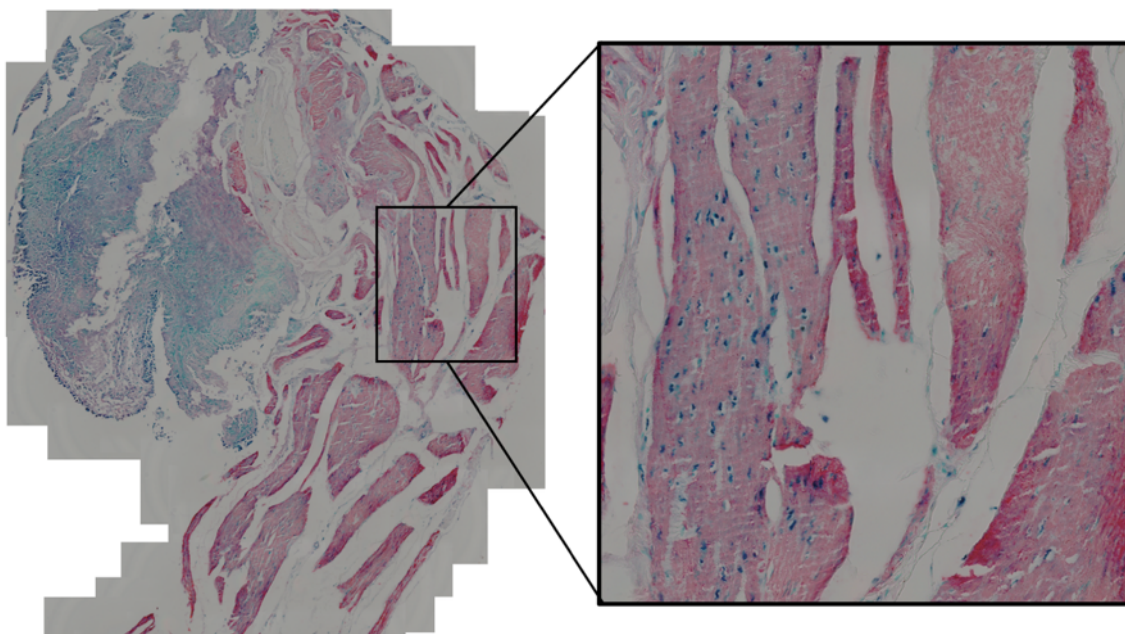


Figure 16. Regroupement de cellules PCNA positives. Agrandissement d'un faisceau musculaire d'un cheval du groupe contrôle montrant une majorité de noyaux PCNA positifs. Ce phénomène n'était observable que sur l'une des deux biopsies analysées appartenant au même cheval. Celui-ci fait partie des deux valeurs aberrantes du groupe contrôle visibles sur la Figure 4. C ou sur la Figure 16. A.

3.3 Ouvertures

3.3.1 Rôle des neutrophiles

Une association entre les dommages pulmonaires chez les chevaux asthmatiques et une importante neutrophilie à la cytologie du lavage bronchoalvéolaire est établie depuis plusieurs années (85). Plus récemment, la présence d'une neutrophilie supérieure à 5% chez des chevaux ne présentant aucun signe clinique a été associée à une réaction inflammatoire périphérique ainsi qu'à la sévérité des lésions pulmonaires (134). Un score d'hyperplasie épithéliale plus élevé corrèle également avec la neutrophilie pulmonaire (143). Dans notre étude, une corrélation positive entre la neutrophilie pulmonaire et la prolifération cellulaire a également été détectée. Une investigation plus approfondie des facteurs à l'origine de cette corrélation serait intéressante et pourrait révéler des voies de signalisation potentiellement ciblées par des thérapies prévenant un remodelage irréversible du muscle lisse. Les neutrophiles contribuent à l'inflammation bronchique, et agissent principalement par la libération de nombreux facteurs pouvant causer des dommages aux tissus normaux environnants (141, 262-264, 294). En plus de libérer différents

agents à la source d'un stress oxydatif, les neutrophiles relâchent des trappes extracellulaires (NETs), composées de fibres d'ADN et de divers réactifs oxydatifs. Bien que les NETs représentent initialement un moyen de défense contre les agents pathogènes, leur effet cytotoxique peut également engendrer des effets néfastes sur les tissus pulmonaires. En effet, un excès de NETs provoque des dommages épithéliaux, altérant ainsi la communication épithélio-mésenchymateuse et entraînant la sécrétion de facteurs favorisant le remodelage et la prolifération des cellules du muscle lisse bronchique par les cellules épithéliales (295). Les NETs sont présents en plus grande proportion dans le lavage bronchoalvéolaire de chevaux asthmatiques sévères (263), et considérant leur capacité à déclencher une cascade inflammatoire passant par l'activation d'inflammasomes (296), leur quantification chez les chevaux asthmatiques légers à modérés pourrait permettre de mieux caractériser les mécanismes à l'origine du remodelage, en plus de refléter une cible potentielle de traitement. D'autres caractéristiques des neutrophiles pourraient également être investiguées comme la proportion de neutrophiles de faible densité en circulation sanguine, étant elle-même associée à une plus grande production de NETs (140).

3.3.2 Comparaison avec des études précédentes

3.3.2.1 Lien avec les biomarqueurs sanguins

Plusieurs changements systémiques ont été soulevés lors de crise d'exacerbation d'asthme équin sévère, reflétant possiblement l'inflammation systémique liée à cette condition (101). L'expression de différents paramètres a donc été étudiée comme biomarqueurs de la maladie. L'étude de Gy *et coll.* (78), a permis de démontrer un sous-groupe de chevaux présentant une inflammation pulmonaire neutrophilique dont la concentration sanguine de SP-D était augmentée. De manière intéressante, la valeur seuil de SP-D systémique de >43 ng/mL proposée par Gy *et coll.*, distinguant les chevaux sains des asthmatiques légers modérés, est très près de la valeur de >48 ng/mL soulevée précédemment par un autre groupe de chercheurs (139). En reprenant la valeur de SP-D proposée par Gy *et coll.*, une distinction entre deux sous-groupes de chevaux asthmatiques légers à modérés se dégage dans l'étude actuelle (Figure 17). En effet, les chevaux asthmatiques légers à modérés aillant une concentration sanguine de SP-D supérieure à 43 ng/mL ont une surexpression de l'isoforme rapide presque significative par rapport aux autres chevaux asthmatiques, qui eux ont des valeurs d'insert(+) comparable aux chevaux sains. Le SP-D, étant associé aux dommages pulmonaires, pourrait alors refléter d'un point de vue systémique

des changements fonctionnels pulmonaires. Cette information révèle d'abord qu'une sous-population de chevaux se distingue parmi les chevaux asthmatiques légers à modérés suggérant différents phénotypes, et ensuite, qu'un lien entre le remodelage pulmonaire local et des répercussions systémiques peut être détecté même chez les chevaux asthmatiques légers à modérés.

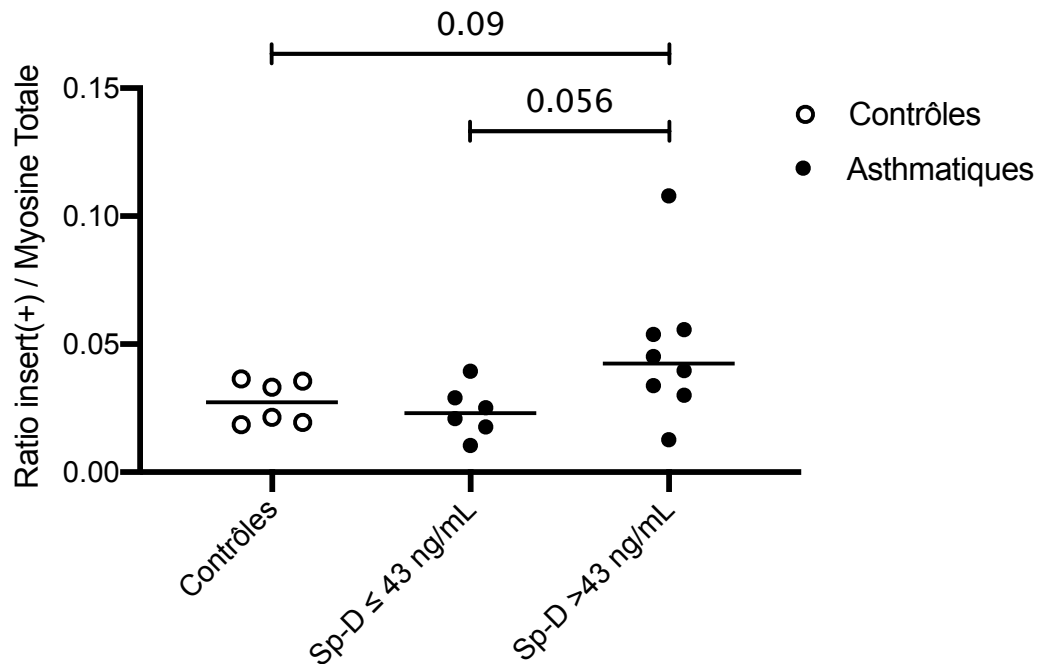


Figure 17. Comparaison des ratios de l'expression génique de l'isoforme insert(+) de la chaîne lourde de la myosine entre les chevaux contrôles et les chevaux asthmatiques légers à modérés présentant une concentration systémique de SP-D inférieure ou égale à 43 ng/mL ou supérieure à 43 ng/mL. Les valeurs de SP-D sérique ont été reprises de l'étude de Gy et coll. (78). Des tests T de Welch ont été effectués pour comparer les groupes.

3.3.2.2 Lien avec le remodelage des autres composantes tissulaires des bronches

Le remodelage du muscle lisse bronchique n'est pas un évènement survenant de façon isolée chez des chevaux atteints d'asthme équin. En effet, l'intégrité de plusieurs tissus pulmonaires est atteinte lors de la progression de la maladie (77, 187), et plusieurs de ces changements sont identifiables par l'étude de biopsies endobronchiques (142, 143). De plus, une association entre la déposition de matrice extracellulaire et l'augmentation de la masse de muscle lisse a été rapportée chez les chevaux asthmatiques sévères (144). Une modulation de la force maximale déployée par le muscle lisse pouvant être influencée directement par des altérations de la matrice extracellulaire (196, 297), et une infiltration inflammatoire étant liée à

l'hyperréactivité bronchique chez l'humain (288), une association entre la sévérité du remodelage du muscle lisse et des autres composantes tissulaires pourrait être attendue. Toutefois, en comparant les scores histomorphométriques évalués précédemment et les résultats d'expression de l'insert(+) obtenus dans l'étude actuelle sur les mêmes chevaux asthmatiques légers à modérés, aucune corrélation ne semble se dégager, bien que six des huit chevaux asthmatiques communs entre les deux études exprimant un score histomorphométrique supérieur à cinq, présentent également un ratio d'expression de l'insert(+) supérieur à 0.038 (Courbe de ROC >0.38 : sensibilité 56%, spécificité 100%)(Test exact de Fisher : $p = 0,58$)(Figure 18. A). Alors que des facteurs menant au remodelage des composantes structurales des voies respiratoires pourraient, parallèlement, engendrer une prolifération du muscle lisse, encore une fois, aucune association n'a été identifiée entre le score histomorphométrique de remodelage et les taux de prolifération du muscle lisse (Figure 18. B).

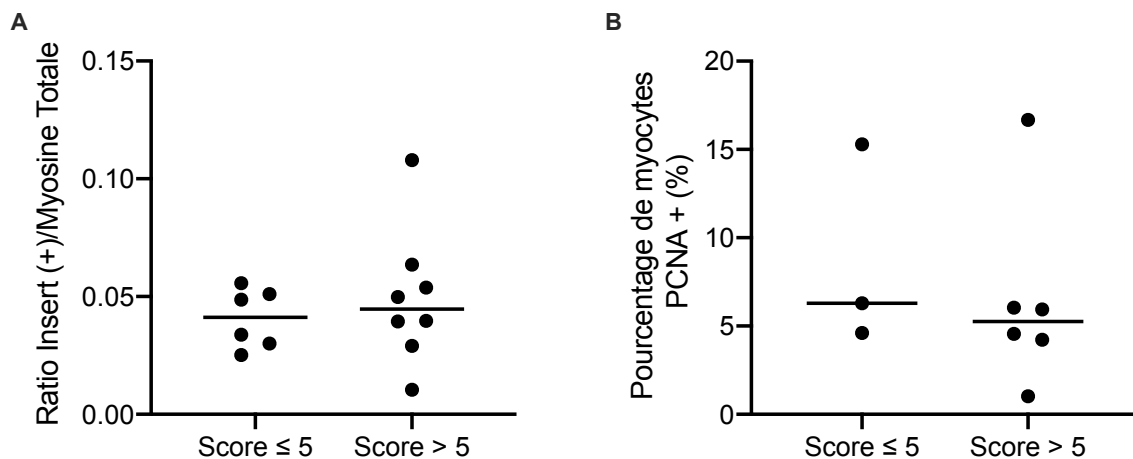


Figure 18. Comparaison du remodelage du muscle lisse bronchique au remodelage structurel des composantes pulmonaires mesuré par le score semi-quantitatif histomorphométrique des chevaux asthmatiques légers à modérés. A) Comparaison des ratio insert(+) sur la myosine totale entre les chevaux asthmatiques présentant un score histomorphométrique inférieur à 5 et supérieur à 5. B) Comparaison des taux de prolifération des cellules de muscle lisse bronchique entre les chevaux asthmatiques présentant un score histomorphométrique inférieur à 5 et supérieur à 5. Les valeurs des scores histomorphométriques ont été reprises de l'étude de Bessonnat et coll. (143).

3.3.3 Perspectives en lien avec le développement des formes sévères

La forme sévère de l'asthme équin étant incurable, sa prévention, en ciblant tôt dans le cours de la maladie les chevaux prédisposés, serait idéale. Alors qu'une prédisposition du développement de l'asthme équin sévère des chevaux démontrant certains signes cliniques

caractéristiques de l'asthme équin léger à modéré a été démontré (84), nos connaissances sur les éléments déterminants la progression de la maladie sont limitées. Bien qu'une susceptibilité génétique soit fortement suspectée (298), l'hétérogénéité des gènes identifiés pose problème pour une interprétation clinique visant à évaluer les risques de progression de la maladie (100). Le développement de biomarqueurs de la maladie s'avère donc crucial, et fait d'ailleurs partie des objectifs de recherche soulevés par le dernier consensus d'expert sur l'asthme équin (76). Cet objectif ne peut toutefois être atteint sans une meilleure compréhension de la pathophysiologie initiale de l'asthme menant à la forme sévère.

Bien que l'étude actuelle ne porte pas sur le développement de biomarqueurs systémiques, la cohorte de chevaux étudiée provient de la Banque de Tissus Respiratoire Équin (BTRE) sur lesquels d'autres études ont été réalisées sur les mêmes chevaux (78, 143). Ces chevaux précédemment caractérisés, diagnostiqués et étudiés représentent une opportunité unique de réaliser une étude longitudinale évaluant la progression de l'asthme équin. En plus de valider la prédisposition des chevaux asthmatiques légers à modérés qui jusqu'ici n'est que suspectée, le suivi de cette cohorte pourrait potentiellement permettre de déterminer si la présence de remodelage pulmonaire ou de marqueurs systémiques dans les formes légères s'avèrent des facteurs de risques pour le développement des formes sévères. Chez l'humain, l'hyperréactivité bronchique, clinique ou sous-clinique, pourrait mener au développement de l'asthme (276, 288). L'hypothèse que des changements pulmonaires pathologiques, contribuant à l'hyperréactivité bronchique et au développement de signes cliniques (287), puissent prédisposer au développement de la forme sévère de la maladie mériterait d'être investigués dans l'asthme équin.

Dans un autre ordre d'idée, considérant l'hétérogénéité de la maladie, particulièrement notable dans les formes légères de l'asthme (74), une étude incluant de plus larges cohortes de chevaux permettrait de valider la présence de différents sous-groupes de chevaux asthmatiques. Idéalement, un contrôle de l'environnement, permettant de limiter les écarts potentiels liés aux différentes conditions, incluant la stabulation et le type d'activité sportive, dans lesquelles les chevaux sont maintenus, serait réalisé.

4 Chapitre 4 - Conclusion

L'étude du remodelage du muscle lisse bronchique des chevaux asthmatiques légers à modérés a permis de déceler la présence d'une surexpression de l'isoforme rapide de la myosine sans détecter un taux de prolifération plus marqué des myocytes des voies respiratoires centrales. La présence de ce changement fonctionnel réversible est cohérente avec la nature transitoire des épisodes des formes légère et modérée de l'asthme équin. Contrairement à ce qui a été rapporté dans l'asthme équin sévère, les résultats actuels ne démontrent pas la présence de changements structuraux, tels qu'une augmentation de la masse de muscle lisse secondaire à une hypertrophie ou une hyperplasie, dans les formes légères de l'asthme équin, mais les limites des méthodes et des échantillons employés ne permettent pas d'exclure cette possibilité.

La surexpression de l'isoforme rapide de la myosine, plus marquée chez certains chevaux et associée à une plus haute concentration de SP-D sanguin, suggère la présence de différents endotypes de l'asthme équin. Cette possibilité devra toutefois être confirmée par la réalisation d'études incluant de plus amples cohortes de chevaux, et impliquant potentiellement une collaboration multicentrique.

Bien que les taux de prolifération des cellules du muscle lisse bronchique ne soient pas différents entre les chevaux asthmatiques et sains, la possible association entre le taux de prolifération et une neutrophilie pulmonaire supérieure à 5% suggère que le taux de renouvellement cellulaire est influencé par la présence d'inflammation, particulièrement l'inflammation neutrophilique. Ceci supporte la valeur seuil de normalité de la neutrophilie pulmonaire à moins de 5%, tel que proposé dans le dernier consensus d'experts sur l'asthme équin, et associe la présence d'une réaction pulmonaire à des valeurs supérieures à celle-ci.

Finalement, la présence d'une corrélation entre les taux d'expression de l'isoforme rapide de la myosine et du PCNA suggère que les deux phénotypes coexistent au sein du muscle lisse, et que, bien qu'il soit possible que différentes voies de signalisation influencent simultanément la spécialisation des cellules du muscle lisse vers les deux extrêmes des profils fonctionnels, soient les profils prolifératifs et contractiles, une influence mutuelle de ces phénotypes est également à considérer.

Bibliographie

1. Hotchkiss JW, Reid SWJ, Christley RM. A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: Risk factors for recurrent airway obstruction. *Equine Vet J.* 2007;39(4):301-8.
2. Ivester KM, Couetil LL, Moore GE. An observational study of environmental exposures, airway cytology, and performance in racing thoroughbreds. *J Vet Intern Med.* 2018;32(5):1754-62.
3. Lauzon AM, Martin JG. Airway hyperresponsiveness; smooth muscle as the principal actor. *F1000Res.* 2016;5.
4. Herszberg B, Ramos-Barbon D, Tamaoka M, Martin JG, Lavoie JP. Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118(2):382-8.
5. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Gelinias-Lymburner E, David F, Martin JG, Lavoie JP. Effect of antigenic exposure on airway smooth muscle remodeling in an equine model of chronic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45(1):181-7.
6. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Joubert P, Relave F, Setlakwe EL, Beauchamp G, et al. Corticosteroids and antigen avoidance decrease airway smooth muscle mass in an equine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;47(5):589-96.
7. Bullone M, Vargas A, Elce Y, Martin JG, Lavoie JP. Fluticasone/salmeterol reduces remodelling and neutrophilic inflammation in severe equine asthma. *Sci Rep.* 2017;7(1):8843.
8. Matusovsky OS, Kachmar L, Ijpma G, Bates G, Zitouni N, Benedetti A, et al. Peripheral Airway Smooth Muscle, but Not the Trachealis, Is Hypercontractile in an Equine Model of Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;54(5):718-27.
9. Boivin R, Vargas A, Lefebvre-Lavoie J, Lauzon AM, Lavoie JP. Inhaled corticosteroids modulate the (+)insert smooth muscle myosin heavy chain in the equine asthmatic airways. *Thorax.* 2014;69(12):1113-9.
10. Rovner AS, Freyzon Y, Trybus KM. An insert in the motor domain determines the functional properties of expressed smooth muscle myosin isoforms. *J Muscle Res Cell Motil.* 1997;18(1):103-10.

11. Lauzon AM, Tyska MJ, Rovner AS, Freyzo Y, Warshaw DM, Trybus KM. A 7-amino-acid insert in the heavy chain nucleotide binding loop alters the kinetics of smooth muscle myosin in the laser trap. *J Muscle Res Cell Motil.* 1998;19(8):825-37.
12. Leguillette R, Laviolette M, Bergeron C, Zitouni N, Kogut P, Solway J, et al. Myosin, transgelin, and myosin light chain kinase: expression and function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179(3):194-204.
13. Smith BL, Aguilera-Tejero E, Tyler WS, Jones JH, Hornof WJ, Pascoe JR. Endoscopic anatomy and map of the equine bronchial tree. *Equine Vet J.* 1994;26(4):283-90.
14. Robinson NE, Furlow PW. Anatomy of the respiratory system. *Equine respiratory medicine and surgery.* 2007:3-17.
15. Nunn JF. *Applied respiratory physiology.* 3rd ed. ed. London ;: Butterworths; 1987.
16. Mead J. Mechanical properties of lungs. *Physiol Rev.* 1961;41:281-330.
17. Robinson NE. How horses breathe: the respiratory muscles and the airways. *Equine respiratory medicine and surgery: Elsevier;* 2007. p. 19-31.
18. Macklem PT, Mead J. Resistance of central and peripheral airways measured by a retrograde catheter. *J Appl Physiol.* 1967;22(3):395-401.
19. Macklem PT. The physiology of small airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(5 Pt 2):S181-3.
20. Bates JH, Lauzon AM. Parenchymal tethering, airway wall stiffness, and the dynamics of bronchoconstriction. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985).* 2007;102(5):1912-20.
21. Bossé Y, Riesenfeld EP, Paré PD, Irvin CG. It's not all smooth muscle: non-smooth-muscle elements in control of resistance to airflow. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:437-62.
22. West JB. *Pulmonary pathophysiology : the essentials.* Baltimore: Williams & Wilkins; 1982.
23. Art T, Lekeux P, Gustin P, Desmecht D, Amory H, Paiva M. Inertance of the respiratory system in ponies. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985).* 1989;67(2):534-40.
24. Butler PJ, Woakes AJ, Smale K, Roberts CA, Hillidge CJ, Snow DH, et al. Respiratory and cardiovascular adjustments during exercise of increasing intensity and during recovery in thoroughbred racehorses. *J Exp Biol.* 1993;179:159-80.
25. Bayly W, Grant B, Breeze R, Kramer J. The effects of maximal exercise on acid-base balance and arterial blood gas tension in Thoroughbred horses. *Equine exercise physiology.* 1983;1:400-7.

26. Sánchez A, Couëtil LL, Ward MP, Clark SP. Effect of airway disease on blood gas exchange in racehorses. *J Vet Intern Med.* 2005;19(1):87-92.
27. Art T. Etude de la mécanique ventilatoire en tant que facteur limitant de la ventilation au cours de l'effort chez les équidés: Université de Liège, Belgique; 1991.
28. Art T, Serteyn D, Lekeux P. Effect of exercise on the partitioning of equine respiratory resistance. *Equine Vet J.* 1988;20(4):268-73.
29. Couëtil LL, Denicola DB. Blood gas, plasma lactate and bronchoalveolar lavage cytology analyses in racehorses with respiratory disease. *Equine Vet J Suppl.* 1999(30):77-82.
30. Dominelli PB, Sheel AW. Exercise-induced arterial hypoxemia; some answers, more questions. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2019;44(6):571-9.
31. Art T, Duvivier DH, Votion D, Anciaux N, Vandemput S, Bayly WM, et al. Does an acute COPD crisis modify the cardiorespiratory and ventilatory adjustments to exercise in horses? *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985).* 1998;84(3):845-52.
32. Ebina M, Yaegashi H, Takahashi T, Motomiya M, Tanemura M. Distribution of smooth muscles along the bronchial tree. A morphometric study of ordinary autopsy lungs. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141(5 Pt 1):1322-6.
33. Mead J. Point: airway smooth muscle is useful. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985).* 2007;102(4):1708-9; discussion 10.
34. Mitzner W. Airway smooth muscle: the appendix of the lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169(7):787-90.
35. Seow CY, Fredberg JJ. Historical perspective on airway smooth muscle: the saga of a frustrated cell. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985).* 2001;91(2):938-52.
36. Jesudason EC. Airway smooth muscle: an architect of the lung? *Thorax.* 2009;64(6):541-5.
37. Huxley AF. Muscle structure and theories of contraction. *Prog Biophys Biophys Chem.* 1957;7:255-318.
38. Chung KF. Airway smooth muscle in asthma and COPD: biology and pharmacology: John Wiley & Sons; 2008.
39. Gunst SJ, Tang DD. The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle. *Eur Respir J.* 2000;15(3):600.
40. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ.* 2003;27(1-4):201-6.

41. Babu GJ, Warshaw DM, Periasamy M. Smooth muscle myosin heavy chain isoforms and their role in muscle physiology. *Microsc Res Tech.* 2000;50(6):532-40.
42. Low R, Leguillette R, Lauzon AM. (+)Insert smooth muscle myosin heavy chain (SM-B): from single molecule to human. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(11):1862-74.
43. Morgan KG, Gangopadhyay SS. Invited review: cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985).* 2001;91(2):953-62.
44. Léguillette R, Lauzon AM. Molecular mechanics of smooth muscle contractile proteins in airway hyperresponsiveness and asthma. *Proc Am Thorac Soc.* 2008;5(1):40-6.
45. De La Cruz EM, Ostap EM. Relating biochemistry and function in the myosin superfamily. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16(1):61-7.
46. Lauzon AM, Trybus KM, Warshaw DM. Molecular mechanics of two smooth muscle heavy meromyosin constructs that differ by an insert in the motor domain. *Acta Physiol Scand.* 1998;164(4):357-61.
47. Dillon PF, Aksoy MO, Driska SP, Murphy RA. Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle. *Science.* 1981;211(4481):495-7.
48. Hai CM, Murphy RA. Cross-bridge phosphorylation and regulation of latch state in smooth muscle. *Am J Physiol.* 1988;254(1 Pt 1):C99-106.
49. Jiang H, Rao K, Halayko AJ, Kepron W, Stephens NL. Bronchial smooth muscle mechanics of a canine model of allergic airway hyperresponsiveness. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985).* 1992;72(1):39-45.
50. Jiang H, Rao K, Liu X, Halayko AJ, Liu G, Stephens NL. Early changes in airway smooth muscle hyperresponsiveness. *Can J Physiol Pharmacol.* 1994;72(11):1440-7.
51. Ma X, Cheng Z, Kong H, Wang Y, Unruh H, Stephens NL, et al. Changes in biophysical and biochemical properties of single bronchial smooth muscle cells from asthmatic subjects. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;283(6):L1181-9.
52. Fredberg JJ, Inouye DS, Mijailovich SM, Butler JP. Perturbed equilibrium of myosin binding in airway smooth muscle and its implications in bronchospasm. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159(3):959-67.
53. Karagiannis P, Babu GJ, Periasamy M, Brozovich FV. The smooth muscle myosin seven amino acid heavy chain insert's kinetic role in the crossbridge cycle for mouse bladder. *J Physiol.* 2003;547(Pt 2):463-73.

54. White S, Martin AF, Periasamy M. Identification of a novel smooth muscle myosin heavy chain cDNA: isoform diversity in the S1 head region. *Am J Physiol.* 1993;264(5 Pt 1):C1252-8.
55. Low RB, Mitchell J, Woodcock-Mitchell J, Rovner AS, White SL. Smooth-muscle myosin heavy-chain SM-B isoform expression in developing and adult rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;20(4):651-7.
56. Somlyo AP. Myosin isoforms in smooth muscle: how may they affect function and structure? *J Muscle Res Cell Motil.* 1993;14(6):557-63.
57. Kelley CA, Takahashi M, Yu JH, Adelstein RS. An insert of seven amino acids confers functional differences between smooth muscle myosins from the intestines and vasculature. *J Biol Chem.* 1993;268(17):12848-54.
58. Leguillotte R, Gil FR, Zitouni N, Lajoie-Kadoch S, Sobieszek A, Lauzon AM. (+)Insert smooth muscle myosin heavy chain (SM-B) isoform expression in human tissues. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;289(5):C1277-85.
59. DiSanto ME, Stein R, Chang S, Hypolite JA, Zheng Y, Zderic S, et al. Alteration in expression of myosin isoforms in detrusor smooth muscle following bladder outlet obstruction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;285(6):C1397-410.
60. Chitano P, Wang L, Murphy TM. Three paradigms of airway smooth muscle hyperresponsiveness in young guinea pigs. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007;85(7):715-26.
61. Pratusевич VR, Seow CY, Ford LE. Plasticity in canine airway smooth muscle. *J Gen Physiol.* 1995;105(1):73-94.
62. McParland BE, Macklem PT, Pare PD. Airway wall remodeling: friend or foe? *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985).* 2003;95(1):426-34.
63. Ford LE. Plasticity in airway smooth muscle: an update. *Can J Physiol Pharmacol.* 2005;83(10):841-50.
64. Gunst SJ, Wu MF. Selected contribution: plasticity of airway smooth muscle stiffness and extensibility: role of length-adaptive mechanisms. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985).* 2001;90(2):741-9.
65. Wang L, Paré PD, Seow CY. Effects of length oscillation on the subsequent force development in swine tracheal smooth muscle. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985).* 2000;88(6):2246-50.
66. Chin LY, Bossé Y, Pascoe C, Hackett TL, Seow CY, Paré PD. Mechanical properties of asthmatic airway smooth muscle. *Eur Respir J.* 2012;40(1):45-54.

67. Ijpma G, Kachmar L, Matusovsky OS, Bates JH, Benedetti A, Martin JG, et al. Human trachealis and main bronchi smooth muscle are normoresponsive in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191(8):884-93.
68. Skloot G, Togias A. Bronchodilation and bronchoprotection by deep inspiration and their relationship to bronchial hyperresponsiveness. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2003;24(1):55-72.
69. Hirota JA, Nguyen TT, Schaafsma D, Sharma P, Tran T. Airway smooth muscle in asthma: phenotype plasticity and function. *Pulm Pharmacol Ther*. 2009;22(5):370-8.
70. Hirst SJ. Airway smooth muscle cell culture: application to studies of airway wall remodelling and phenotype plasticity in asthma. *Eur Respir J*. 1996;9(4):808-20.
71. Wright DB, Trian T, Siddiqui S, Pascoe CD, Johnson JR, Dekkers BG, et al. Phenotype modulation of airway smooth muscle in asthma. *Pulm Pharmacol Ther*. 2013;26(1):42-9.
72. Jendzjowsky NG, Kelly MM. The Role of Airway Myofibroblasts in Asthma. *Chest*. 2019;156(6):1254-67.
73. Lavoie JP. Is the time primed for equine asthma? *Equine Veterinary Education*. 2015;27(5):225-6.
74. Bond S, Leguillette R, Richard EA, Couetil L, Lavoie JP, Martin JG, et al. Equine asthma: Integrative biologic relevance of a recently proposed nomenclature. *J Vet Intern Med*. 2018;32(6):2088-98.
75. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2021 [Available from: <https://ginasthma.org>].
76. Couetil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Leguillette R, Richard EA. Inflammatory Airway Disease of Horses--Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med*. 2016;30(2):503-15.
77. Bullone M, Lavoie JP. The equine asthma model of airway remodeling: from a veterinary to a human perspective. *Cell Tissue Res*. 2019.
78. Gy C, Leclere M, Vargas A, Grimes C, Lavoie JP. Investigation of blood biomarkers for the diagnosis of mild to moderate asthma in horses. *J Vet Intern Med*. 2019.
79. Mazan MR, Vin R, Hoffman AM. Radiographic scoring lacks predictive value in inflammatory airway disease. *Equine Vet J*. 2005;37(6):541-5.
80. Leguillette R, Tohver T, Bond SL, Nicol JA, McDonald KJ. Effect of Dexamethasone and Fluticasone on Airway Hyperresponsiveness in Horses With Inflammatory Airway Disease. *J Vet Intern Med*. 2017;31(4):1193-201.

81. Couetil L, Cardwell JM, Leguillette R, Mazan M, Richard E, Bienzle D, et al. Equine Asthma: Current Understanding and Future Directions. *Front Vet Sci.* 2020;7:450.
82. Wasko AJ, Barkema HW, Nicol J, Fernandez N, Logie N, Léguillette R. Evaluation of a risk-screening questionnaire to detect equine lung inflammation: results of a large field study. *Equine Vet J.* 2011;43(2):145-52.
83. Secombe CJ, Lester GD, Robertson ID, Cullimore AM. Retrospective survey of bronchoalveolar lavage fluid cytology in Western Australian horses presented for evaluation of the respiratory tract: effect of season on relative cell percentages. *Aust Vet J.* 2015;93(5):152-6.
84. Bosshard S, Gerber V. Evaluation of coughing and nasal discharge as early indicators for an increased risk to develop equine recurrent airway obstruction (RAO). *J Vet Intern Med.* 2014;28(2):618-23.
85. Viel L. Structural-functional correlations of the lung in horses with small airway disease [Dissertation]. Guelph, Ontario: University of Guelph. 1983.
86. Robinson NE, Chairperson W. International workshop on equine chronic airway disease Michigan State University 16–18 June 2000. *Equine Vet J.* 2001;33(1):5-19.
87. Robinson NE, Olszewski MA, Boehler D, Berney C, Hakala J, Matson C, et al. Relationship between clinical signs and lung function in horses with recurrent airway obstruction (heaves) during a bronchodilator trial. *Equine Vet J.* 2000;32(5):393-400.
88. Koterba AM, Kosch PC, Beech J, Whitlock T. Breathing strategy of the adult horse (*Equus caballus*) at rest. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md : 1985). 1988;64(1):337-46.
89. Gillespie J, Tyler W, Eberly V. Pulmonary ventilation and resistance in emphysematous and control horses. *J Appl Physiol.* 1966;21(2):416-22.
90. Robinson NE, Derksen FJ, Olszewski M, Berney C, Boehler D, Matson C, et al. Determinants of the maximal change in pleural pressure during tidal breathing in COPD-affected horses. *Vet J.* 1999;157(2):160-5.
91. Lotvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjermer L, Casale TB, Custovic A, et al. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(2):355-60.
92. Canonica GW, Ferrando M, Baiardini I, Puggioni F, Racca F, Passalacqua G, et al. Asthma: personalized and precision medicine. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2018;18(1):51-8.
93. Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *The Lancet.* 2008;372(9643):1107-19.

94. Lavoie JP, Maghni K, Desnoyers M, Taha R, Martin JG, Hamid QA. Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(8 Pt 1):1410-3.
95. Ainsworth DM, Grünig G, Matychak MB, Young J, Wagner B, Erb HN, et al. Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN-gamma and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003;96(1-2):83-91.
96. Debrue M, Hamilton E, Joubert P, Lajoie-Kadoch S, Lavoie JP. Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005;105(1-2):25-31.
97. Ainsworth DM, Wagner B, Franchini M, Grünig G, Erb HN, Tan JY. Time-dependent alterations in gene expression of interleukin-8 in the bronchial epithelium of horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res.* 2006;67(4):669-77.
98. Beekman L, Tohver T, Léguillette R. Comparison of cytokine mRNA expression in the bronchoalveolar lavage fluid of horses with inflammatory airway disease and bronchoalveolar lavage mastocytosis or neutrophilia using REST software analysis. *J Vet Intern Med.* 2012;26(1):153-61.
99. Richard EA, Depecker M, Defontis M, Leleu C, Fortier G, Pitel PH, et al. Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid from horses with neutrophilic inflammatory airway disease. *J Vet Intern Med.* 2014;28(6):1838-44.
100. Gerber V. Genetics of Equine Respiratory Disease. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2020;36(2):243-53.
101. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology.* 2011;16(7):1027-46.
102. Montgomery JB. Beyond steroids and bronchodilators - investigating additional therapies for horses with severe equine asthma. *Vet Rec.* 2019;185(5):140-2.
103. 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(4):261-7.
104. Vandenput S, Votion D, Duvivier DH, Van Erck E, Anciaux N, Art T, et al. Effect of a set stabled environmental control on pulmonary function and airway reactivity of COPD affected horses. *Vet J.* 1998;155(2):189-95.
105. Pirie RS. Recurrent airway obstruction: a review. *Equine Vet J.* 2014;46(3):276-88.

106. Pirie RS, Dixon PM, Collie DD, McGorum BC. Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses. *Equine Vet J*. 2001;33(3):311-8.
107. Pirie RS, Collie DD, 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(5):676-83.
108. Riihimäki M, Raine A, Elfman L, Pringle J. Markers of respiratory inflammation in horses in relation to seasonal changes in air quality in a conventional racing stable. *Can J Vet Res*. 2008;72(5):432-9.
109. Dauvillier J, Ter Woort F, van Erck-Westergren E. Fungi in respiratory samples of horses with inflammatory airway disease. *J Vet Intern Med*. 2019;33(2):968-75.
110. Ivester KM, Couetil LL, Zimmerman NJ. Investigating the link between particulate exposure and airway inflammation in the horse. *J Vet Intern Med*. 2014;28(6):1653-65.
111. Haahtela T. A biodiversity hypothesis. *Allergy*. 2019;74(8):1445-56.
112. Fillion-Bertrand G, Dickson RP, Boivin R, Lavoie JP, Huffnagle GB, Leclere M. Lung Microbiome Is Influenced by the Environment and Asthmatic Status in an Equine Model of Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2019;60(2):189-97.
113. Payette F, Charlebois A, Fairbrother JH, Beauchamp G, Leclere M. *Nicoletella semolina* in the airways of healthy horses and horses with severe asthma. *J Vet Intern Med*. 2021;35(3):1612-9.
114. Bond SL, Timsit E, Workentine M, Alexander T, Léguillette R. Upper and lower respiratory tract microbiota in horses: bacterial communities associated with health and mild asthma (inflammatory airway disease) and effects of dexamethasone. *BMC Microbiol*. 2017;17(1):184.
115. Manguin E, Pépin E, Boivin R, Leclere M. Tracheal microbial populations in horses with moderate asthma. *J Vet Intern Med*. 2020;34(2):986-95.
116. Derksen FJ, Robinson NE, Armstrong PJ, Stick JA, Slocombe RF. Airway reactivity in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 1985;58(2):598-604.
117. Klein HJ, Deegen E. Histamine inhalation provocation test: method to identify nonspecific airway reactivity in equids. *Am J Vet Res*. 1986;47(8):1796-800.
118. Couëtill LL, Rosenthal FS, Simpson CM. Forced expiration: a test for airflow obstruction in horses. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2000;88(5):1870-9.

119. Miskovic M, Couëtil LL, Thompson CA. Lung function and airway cytologic profiles in horses with recurrent airway obstruction maintained in low-dust environments. *J Vet Intern Med.* 2007;21(5):1060-6.
120. Hoffman A, Mazan MR. Programme of lung function testing horses suspected with small airway disease. *Equine Veterinary Education.* 1999;11(6):322-8.
121. Van Erck E, Votion D, Art T, Lekeux P. Qualitative and quantitative evaluation of equine respiratory mechanics by impulse oscillometry. *Equine Vet J.* 2006;38(1):52-8.
122. Richard EA, Fortier GD, Denoix JM, Art T, Lekeux PM, Van Erck E. Influence of subclinical inflammatory airway disease on equine respiratory function evaluated by impulse oscillometry. *Equine Vet J.* 2009;41(4):384-9.
123. Hoffman AM. Bronchoalveolar lavage: sampling technique and guidelines for cytologic preparation and interpretation. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2008;24(2):423-35, vii-viii.
124. VIEL L. Structural-functional correlations of the lung in the normal light horse. 1980: Dissertation (Magister Science)-University of Guelph, Guelph; 1980.
125. Leclere M, Desnoyers M, Beauchamp G, Lavoie JP. Comparison of four staining methods for detection of mast cells in equine bronchoalveolar lavage fluid. *J Vet Intern Med.* 2006;20(2):377-81.
126. McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE, Irving P. Comparison of cellular and molecular components of bronchoalveolar lavage fluid harvested from different segments of the equine lung. *Res Vet Sci.* 1993;55(1):57-9.
127. Tremblay GM, Ferland C, Lapointe JM, Vrins A, Lavoie JP, Cormier Y. Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses. *Equine Vet J.* 1993;25(3):194-7.
128. Jean D, Vrins A, Beauchamp G, Lavoie JP. Evaluation of variations in bronchoalveolar lavage fluid in horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res.* 2011;72(6):838-42.
129. Lapointe JM, Vrins A, Lavoie JP. Effects of centrifugation and specimen preparation technique on bronchoalveolar lavage analysis in horses. *Equine Vet J.* 1994;26(3):227-9.
130. Couetil LL, Hoffman AM, Hodgson J, Buechner-Maxwell V, Viel L, Wood JL, et al. Inflammatory airway disease of horses. *J Vet Intern Med.* 2007;21(2):356-61.
131. Christley RM, Hodgson DR, Rose RJ, Hodgson JL, Wood JL, Reid SW. Coughing in thoroughbred racehorses: risk factors and tracheal endoscopic and cytological findings. *Vet Rec.* 2001;148(4):99-104.

132. Holcombe SJ, Robinson NE, Derksen FJ, Bertold B, Genovese R, Miller R, et al. Effect of tracheal mucus and tracheal cytology on racing performance in Thoroughbred racehorses. *Equine Vet J.* 2006;38(4):300-4.
133. Bedenice D, Mazan MR, Hoffman AM. Association between cough and cytology of bronchoalveolar lavage fluid and pulmonary function in horses diagnosed with inflammatory airway disease. *J Vet Intern Med.* 2008;22(4):1022-8.
134. Bullone M, Joubert P, Gagne A, Lavoie JP, Helie P. Bronchoalveolar lavage fluid neutrophilia is associated with the severity of pulmonary lesions during equine asthma exacerbations. *Equine Vet J.* 2018;50(5):609-15.
135. Wood LG, Baines KJ, Fu J, Scott HA, Gibson PG. The neutrophilic inflammatory phenotype is associated with systemic inflammation in asthma. *Chest.* 2012;142(1):86-93.
136. Lavoie-Lamoureux A, Leclere M, Lemos K, Wagner B, Lavoie JP. Markers of systemic inflammation in horses with heaves. *J Vet Intern Med.* 2012;26(6):1419-26.
137. Bullone M, de Lagarde M, Vargas A, Lavoie JP. Serum Surfactant Protein D and Haptoglobin as Potential Biomarkers for Inflammatory Airway Disease in Horses. *J Vet Intern Med.* 2015;29(6):1707-11.
138. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP. Acute phase proteins in racehorses with inflammatory airway disease. *J Vet Intern Med.* 2015;29(3):940-5.
139. Richard EA, Pitel PH, Christmann U, Lekeux P, Fortier G, Pronost S. Serum concentration of surfactant protein D in horses with lower airway inflammation. *Equine Vet J.* 2012;44(3):277-81.
140. Herteman N, Vargas A, Lavoie JP. Characterization of Circulating Low-Density Neutrophils Intrinsic Properties in Healthy and Asthmatic Horses. *Sci Rep.* 2017;7(1):7743.
141. Davis KU, Sheats MK. The Role of Neutrophils in the Pathophysiology of Asthma in Humans and Horses. *Inflammation.* 2021;44(2):450-65.
142. Bullone M, Helie P, Joubert P, Lavoie JP. Development of a Semiquantitative Histological Score for the Diagnosis of Heaves Using Endobronchial Biopsy Specimens in Horses. *J Vet Intern Med.* 2016;30(5):1739-46.
143. Bessonnat A, Lavoie J-P. Évaluation du remodelage des voies respiratoires centrales de chevaux asthmatiques légers/modérés. [Montréal]: Université de Montréal; 2018.

144. Bullone M, Beauchamp G, Godbout M, Martin JG, Lavoie JP. Endobronchial Ultrasound Reliably Quantifies Airway Smooth Muscle Remodeling in an Equine Asthma Model. *PLoS One*. 2015;10(9):e0136284.
145. Doucet MY, Vrins AA, Ford-Hutchinson AW. Histamine inhalation challenge in normal horses and in horses with small airway disease. *Can J Vet Res*. 1991;55(3):285-93.
146. 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(2):256-62.
147. Vandemput S, Istasse L, Nicks B, Lekeux P. Airborne dust and aeroallergen concentrations in different sources of feed and bedding for horses. *Vet Q*. 1997;19(4):154-8.
148. 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(2):263-8.
149. Moore-Colyer MJ, 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(11):e114079.
150. Orard M, Hue E, Couroucé A, Bizon-Mercier C, Toquet MP, Moore-Colyer M, et al. The influence of hay steaming on clinical signs and airway immune response in severe asthmatic horses. *BMC Vet Res*. 2018;14(1):345.
151. Jochmans-Lemoine A, Picotte K, Beauchamp G, Vargas A, Lavoie JP. Effects of a propriety oiled mixed hay feeding system on lung function, neutrophilic airway inflammation and oxidative stress in severe asthmatic horses. *Equine Vet J*. 2020;52(4):564-71.
152. Woods PS, Robinson NE, Swanson MC, Reed CE, Broadstone RV, Derksen FJ. Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different management systems. *Equine Vet J*. 1993;25(3):208-13.
153. Thomson JR, McPherson EA. Effects of environmental control on pulmonary function of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. *Equine Vet J*. 1984;16(1):35-8.
154. Elfman L, Riihimäki M, Pringle J, Wålander R. Influence of horse stable environment on human airways. *J Occup Med Toxicol*. 2009;4:10.
155. Ivester KM, Smith K, Moore GE, Zimmerman NJ, Couetilt LL. Variability in particulate concentrations in a horse training barn over time. *Equine Vet J Suppl*. 2012(43):51-6.

156. Siegers EW, Anthonisse M, van Eerdenburg F, van den Broek J, Wouters IM, Westermann CM. Effect of ionization, bedding, and feeding on air quality in a horse stable. *J Vet Intern Med.* 2018;32(3):1234-40.
157. McGorum BC, Ellison J, Cullen RT. Total and respirable airborne dust endotoxin concentrations in three equine management systems. *Equine Vet J.* 1998;30(5):430-4.
158. Bullone M, Murcia RY, Lavoie JP. Environmental heat and airborne pollen concentration are associated with increased asthma severity in horses. *Equine Vet J.* 2016;48(4):479-84.
159. Crichlow EC, Yoshida K, Wallace K. Dust levels in a riding stable. *Equine Vet J.* 1980;12(4):185-8.
160. 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(5):432-8.
161. Mainguy-Seers S, Vargas A, Labrecque O, Bédard C, Hélie P, Lavoie JP. Randomised study of the immunomodulatory effects of azithromycin in severely asthmatic horses. *Vet Rec.* 2019;185(5):143.
162. Seahorn TL, Groves MG, Harrington KS, Beadle RE. Chronic obstructive pulmonary disease in horses in Louisiana. *J Am Vet Med Assoc.* 1996;208(2):248-51.
163. Mainguy-Seers S, Lavoie JP. Glucocorticoid treatment in horses with asthma: A narrative review. *J Vet Intern Med.* 2021.
164. Leclere M, Lefebvre-Lavoie J, Beauchamp G, Lavoie JP. Efficacy of oral prednisolone and dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction in the presence of continuous antigen exposure. *Equine Vet J.* 2010;42(4):316-21.
165. Lapointe JM, Lavoie JP, Vrins AA. Effects of triamcinolone acetonide on pulmonary function and bronchoalveolar lavage cytologic features in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res.* 1993;54(8):1310-6.
166. Rush BR, Raub ES, Rhoads WS, Flaminio MJ, Matson CJ, Hakala JE, et al. Pulmonary function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *Am J Vet Res.* 1998;59(8):1039-43.
167. Rush BR, Raub ES, Thomsen MM, Davis EG, Matson CJ, Hakala JE. Pulmonary function and adrenal gland suppression with incremental doses of aerosolized beclomethasone dipropionate in horses with recurrent airway obstruction. *J Am Vet Med Assoc.* 2000;217(3):359-64.

168. Lavoie JP, Bullone M, Rodrigues N, Germim P, Albrecht B, von Salis-Soglio M. Effect of different doses of inhaled ciclesonide on lung function, clinical signs related to airflow limitation and serum cortisol levels in horses with experimentally induced mild to severe airway obstruction. *Equine Vet J.* 2019;51(6):779-86.
169. Lavoie JP, Leclere M, Rodrigues N, Lemos KR, Bourzac C, Lefebvre-Lavoie J, et al. Efficacy of inhaled budesonide for the treatment of severe equine asthma. *Equine Vet J.* 2019;51(3):401-7.
170. Lakser OJ, Dowell ML, Hoyte FL, Chen B, Lavoie TL, Ferreira C, et al. Steroids augment relengthening of contracted airway smooth muscle: potential additional mechanism of benefit in asthma. *Eur Respir J.* 2008;32(5):1224-30.
171. Henrikson SL, Rush BR. Efficacy of salmeterol xinafoate in horses with recurrent airway obstruction. *J Am Vet Med Assoc.* 2001;218(12):1961-5.
172. Derksen FJ, Olszewski MA, Robinson NE, Berney C, Hakala JE, Matson CJ, et al. Aerosolized albuterol sulfate used as a bronchodilator in horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res.* 1999;60(6):689-93.
173. Arroyo MG, Couëtil LL, Nogradi N, Kamarudin MM, Ivester KM. Efficacy of Inhaled Levalbuterol Compared to Albuterol in Horses with Recurrent Airway Obstruction. *J Vet Intern Med.* 2016;30(4):1333-7.
174. Erichsen DF, Aviad AD, Schultz RH, Kennedy TJ. Clinical efficacy and safety of clenbuterol HCl when administered to effect in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Equine Vet J.* 1994;26(4):331-6.
175. Robinson NE, Derksen FJ, Berney C, Goossens L. The airway response of horses with recurrent airway obstruction (heaves) to aerosol administration of ipratropium bromide. *Equine Vet J.* 1993;25(4):299-303.
176. McKiernan BC, Koritz GD, Scott JS, Berney C, Robinson NE. Plasma theophylline concentration and lung function in ponies with recurrent obstructive lung disease. *Equine Vet J.* 1990;22(3):194-7.
177. Léguillette R, Désévaux C, Lavoie JP. Effects of pentoxifylline on pulmonary function and results of cytologic examination of bronchoalveolar lavage fluid in horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res.* 2002;63(3):459-63.
178. Williamson KK, Davis MS. Evidence-based respiratory medicine in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2007;23(2):215-27.

179. Hare JE, Viel L, O'Byrne PM, Conlon PD. Effect of sodium cromoglycate on light racehorses with elevated metachromatic cell numbers on bronchoalveolar lavage and reduced exercise tolerance. *J Vet Pharmacol Ther.* 1994;17(3):237-44.
180. Mainguy-Seers S, Picotte K, Lavoie JP. Efficacy of tamoxifen for the treatment of severe equine asthma. *J Vet Intern Med.* 2018;32(5):1748-53.
181. Husulak ML, Manning ST, Meachem MD, Burgess HJ, Epp TY, Montgomery JB. Does antimicrobial therapy improve outcomes in horses with severe equine asthma and a positive tracheal wash bacterial culture? *Can J Vet Res.* 2018;82(3):184-91.
182. Bullone M, Lavoie JP. Asthma "of horses and men"--how can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences? *Mol Immunol.* 2015;66(1):97-105.
183. Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax.* 2002;57(7):643-8.
184. Holgate ST, Polosa R. The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. *The Lancet.* 2006;368(9537):780-93.
185. Sheats MK, Davis KU, Poole JA. Comparative Review of Asthma in Farmers and Horses. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2019;19(11):50.
186. Bergeron C, Tulic MK, Hamid Q. Airway remodelling in asthma: from benchside to clinical practice. *Can Respir J.* 2010;17(4):e85-93.
187. Ferrari CR, Cooley J, Mujahid N, Costa LR, Wills RW, Johnson ME, et al. Horses With Pasture Asthma Have Airway Remodeling That Is Characteristic of Human Asthma. *Vet Pathol.* 2018;55(1):144-58.
188. Millares-Ramirez EM, Lavoie JP. Bronchial angiogenesis in horses with severe asthma and its response to corticosteroids. *J Vet Intern Med.* 2021.
189. Bara I, Ozier A, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *Eur Respir J.* 2010;36(5):1174-84.
190. Setlakwe EL, Lemos KR, Lavoie-Lamoureux A, Duguay JD, Lavoie JP. Airway collagen and elastic fiber content correlates with lung function in equine heaves. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014;307(3):L252-60.
191. Prakash YS. Emerging concepts in smooth muscle contributions to airway structure and function: implications for health and disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016;311(6):L1113-L40.

192. Banno A, Reddy AT, Lakshmi SP, Reddy RC. Bidirectional interaction of airway epithelial remodeling and inflammation in asthma. *Clin Sci (Lond)*. 2020;134(9):1063-79.
193. Prakash YS, Halayko AJ, Gosens R, Panettieri RA, Jr., Camoretti-Mercado B, Penn RB, et al. An Official American Thoracic Society Research Statement: Current Challenges Facing Research and Therapeutic Advances in Airway Remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195(2):e4-e19.
194. Dekkers BG, Maarsingh H, Meurs H, Gosens R. Airway structural components drive airway smooth muscle remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc*. 2009;6(8):683-92.
195. Ijpma G, Panariti A, Lauzon AM, Martin JG. Directional preference of airway smooth muscle mass increase in human asthmatic airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017;312(6):L845-L854.
196. Polio SR, Stasiak SE, Jamieson RR, Balestrini JL, Krishnan R, Parameswaran H. Extracellular matrix stiffness regulates human airway smooth muscle contraction by altering the cell-cell coupling. *Sci Rep*. 2019;9(1):9564.
197. Niimi A, Matsumoto H, Takemura M, Ueda T, Chin K, Mishima M. Relationship of airway wall thickness to airway sensitivity and airway reactivity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(8):983-8.
198. Bates JH, Martin JG. A theoretical study of the effect of airway smooth muscle orientation on bronchoconstriction. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 1990;69(3):995-1001.
199. Woolcock AJ, Peat JK. Epidemiology of bronchial hyperresponsiveness. *Clin Rev Allergy*. 1989;7(3):245-56.
200. King GG, Paré PD, Seow CY. The mechanics of exaggerated airway narrowing in asthma: the role of smooth muscle. *Respir Physiol*. 1999;118(1):1-13.
201. Anthracopoulos MB, Everard ML. Asthma: A Loss of Post-natal Homeostatic Control of Airways Smooth Muscle With Regression Toward a Pre-natal State. *Front Pediatr*. 2020;8:95.
202. Martin JG, Duguet A, Eidelman DH. The contribution of airway smooth muscle to airway narrowing and airway hyperresponsiveness in disease. *Eur Respir J*. 2000;16(2):349-54.
203. An SS, Bai TR, Bates JH, Black JL, Brown RH, Brusasco V, et al. Airway smooth muscle dynamics: a common pathway of airway obstruction in asthma. *Eur Respir J*. 2007;29(5):834-60.
204. Prakash YS. Airway smooth muscle in airway reactivity and remodeling: what have we learned? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;305(12):L912-33.

205. Lambert RK, Wiggs BR, Kuwano K, Hogg JC, Pare PD. Functional significance of increased airway smooth muscle in asthma and COPD. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md : 1985). 1993;74(6):2771-81.
206. Oliver MN, Fabry B, Marinkovic A, Mijailovich SM, Butler JP, Fredberg JJ. Airway hyperresponsiveness, remodeling, and smooth muscle mass: right answer, wrong reason? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;37(3):264-72.
207. Solway J, Fredberg JJ. Perhaps airway smooth muscle dysfunction contributes to asthmatic bronchial hyperresponsiveness after all. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;17(2):144-6.
208. Duguet A, Biyah K, Minshall E, Gomes R, Wang CG, Taoudi-Benchekroun M, et al. Bronchial responsiveness among inbred mouse strains. Role of airway smooth-muscle shortening velocity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(3 Pt 1):839-48.
209. Bullimore SR, Siddiqui S, Donovan GM, Martin JG, Sneyd J, Bates JH, et al. Could an increase in airway smooth muscle shortening velocity cause airway hyperresponsiveness? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011;300(1):L121-31.
210. Ijpma G, Matusovsky O, Lauzon AM. Accumulating evidence for increased velocity of airway smooth muscle shortening in asthmatic airway hyperresponsiveness. *J Allergy (Cairo)*. 2012;2012:156909.
211. Bonta PI, Chanez P, Annema JT, Shah PL, Niven R. Bronchial Thermoplasty in Severe Asthma: Best Practice Recommendations from an Expert Panel. *Respiration*. 2018;95(5):289-300.
212. Wahidi MM, Kraft M. Bronchial thermoplasty for severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(7):709-14.
213. Fish JE, Peterman VI, Cugell DW. Effect of deep inspiration on airway conductance in subjects with allergic rhinitis and allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1977;60(1):41-6.
214. Skloot G, Permutt S, Toghiani A. Airway hyperresponsiveness in asthma: a problem of limited smooth muscle relaxation with inspiration. *J Clin Invest*. 1995;96(5):2393-403.
215. Jensen A, Atileh H, Suki B, Ingenito EP, Lutchen KR. Selected contribution: airway caliber in healthy and asthmatic subjects: effects of bronchial challenge and deep inspirations. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md : 1985). 2001;91(1):506-15; discussion 4-5.
216. Salome CM, Thorpe CW, Diba C, Brown NJ, Berend N, King GG. Airway re-narrowing following deep inspiration in asthmatic and nonasthmatic subjects. *Eur Respir J*. 2003;22(1):62-8.

217. Jackson AC, Murphy MM, Rassulo J, Celli BR, Ingram RH, Jr. Deep breath reversal and exponential return of methacholine-induced obstruction in asthmatic and nonasthmatic subjects. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md : 1985). 2004;96(1):137-42.
218. Mijailovich SM, Butler JP, Fredberg JJ. Perturbed equilibria of myosin binding in airway smooth muscle: bond-length distributions, mechanics, and ATP metabolism. *Biophys J*. 2000;79(5):2667-81.
219. Mitchell RW, Ruhlmann E, Magnussen H, Leff AR, Rabe KF. Passive sensitization of human bronchi augments smooth muscle shortening velocity and capacity. *Am J Physiol*. 1994;267(2 Pt 1):L218-22.
220. Bramley AM, Thomson RJ, Roberts CR, Schellenberg RR. Hypothesis: excessive bronchoconstriction in asthma. *Eur Respir J*. 1994;7(2):337-41.
221. Ijpma G, Kachmar L, Panariti A, Matusovsky OS, Torgerson D, Benedetti A, et al. Intrapulmonary airway smooth muscle is hyperreactive with a distinct proteome in asthma. *Eur Respir J*. 2020;56(1).
222. Gil FR, Zitouni NB, Azoulay E, Maghni K, Lauzon AM. Smooth muscle myosin isoform expression and LC20 phosphorylation in innate rat airway hyperresponsiveness. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291(5):L932-40.
223. Labonté I, Hassan M, Risse PA, Tsuchiya K, Laviolette M, Lauzon AM, et al. The effects of repeated allergen challenge on airway smooth muscle structural and molecular remodeling in a rat model of allergic asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009;297(4):L698-705.
224. Issouf M, Vargas A, Boivin R, Lavoie JP. SRSF6 is upregulated in asthmatic horses and involved in the MYH11 SMB expression. *Physiol Rep*. 2018;6(20):e13896.
225. Siddiqui S, Novali M, Tsuchiya K, Hirota N, Geller BJ, McGovern TK, et al. The modulation of large airway smooth muscle phenotype and effects of epidermal growth factor receptor inhibition in the repeatedly allergen-challenged rat. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;304(12):L853-62.
226. Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(10):1360-8.
227. Woodruff PG, Dolganov GM, Ferrando RE, Donnelly S, Hays SR, Solberg OD, et al. Hyperplasia of smooth muscle in mild to moderate asthma without changes in cell size or gene expression. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(9):1001-6.

228. Pepe C, Foley S, Shannon J, Lemiere C, Olivenstein R, Ernst P, et al. Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116(3):544-9.
229. Hassan M, Jo T, Risse PA, Tolloczko B, Lemiere C, Olivenstein R, et al. Airway smooth muscle remodeling is a dynamic process in severe long-standing asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(5):1037-45 e3.
230. James AL, Bai TR, Mauad T, Abramson MJ, Dolhnikoff M, McKay KO, et al. Airway smooth muscle thickness in asthma is related to severity but not duration of asthma. *Eur Respir J.* 2009;34(5):1040-5.
231. James AL, Elliot JG, Jones RL, Carroll ML, Mauad T, Bai TR, et al. Airway smooth muscle hypertrophy and hyperplasia in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(10):1058-64.
232. Carroll N, Elliot J, Morton A, James A. The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1993;147(2):405-10.
233. Elliot JG, Jones RL, Abramson MJ, Green FH, Mauad T, McKay KO, et al. Distribution of airway smooth muscle remodelling in asthma: relation to airway inflammation. *Respirology.* 2015;20(1):66-72.
234. James AL, Noble PB, Drew SA, Mauad T, Bai TR, Abramson MJ, et al. Airway smooth muscle proliferation and inflammation in asthma. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985).* 2018;125(4):1090-6.
235. Brook BS, Peel SE, Hall IP, Politi AZ, Sneyd J, Bai Y, et al. A biomechanical model of agonist-initiated contraction in the asthmatic airway. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010;170(1):44-58.
236. Girodet PO, Allard B, Thumerel M, Begueret H, Dupin I, Ousova O, et al. Bronchial Smooth Muscle Remodeling in Nonsevere Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193(6):627-33.
237. Stewart A. More muscle in asthma, but where did it come from? *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(10):1035-7.
238. Gerthoffer WT, Schaafsma D, Sharma P, Ghavami S, Halayko AJ. Motility, survival, and proliferation. *Compr Physiol.* 2012;2(1):255-81.
239. Bentley JK, Hershenson MB. Airway smooth muscle growth in asthma: proliferation, hypertrophy, and migration. *Proc Am Thorac Soc.* 2008;5(1):89-96.
240. Hirst SJ, Martin JG, Bonacci JV, Chan V, Fixman ED, Hamid QA, et al. Proliferative aspects of airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(2 Suppl):S2-17.

241. Johnson PR, Roth M, Tamm M, Hughes M, Ge Q, King G, et al. Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(3):474-7.
242. Ramos-Barbón D, Fraga-Iriso R, Brienza NS, Montero-Martínez C, Vereza-Hernando H, Olivenstein R, et al. T Cells localize with proliferating smooth muscle alpha-actin+ cell compartments in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(3):317-24.
243. Ramos-Barbon D, Presley JF, Hamid QA, Fixman ED, Martin JG. Antigen-specific CD4+ T cells drive airway smooth muscle remodeling in experimental asthma. *J Clin Invest*. 2005;115(6):1580-9.
244. Prosperi E. Multiple roles of the proliferating cell nuclear antigen: DNA replication, repair and cell cycle control. In: Meijer L, Guidet S, Philippe M, editors. *Prog Cell Cycle Res*. Boston, MA: Springer US; 1997. p. 193-210.
245. Prosperi E. The fellowship of the rings: distinct pools of proliferating cell nuclear antigen trimer at work. *FASEB J*. 2006;20(7):833-7.
246. Ward JE, Harris T, Bamford T, Mast A, Pain MC, Robertson C, et al. Proliferation is not increased in airway myofibroblasts isolated from asthmatics. *Eur Respir J*. 2008;32(2):362-71.
247. Yap HM, Israf DA, Harith HH, Tham CL, Sulaiman MR. Crosstalk Between Signaling Pathways Involved in the Regulation of Airway Smooth Muscle Cell Hyperplasia. *Front Pharmacol*. 2019;10:1148.
248. Trian T, Benard G, Begueret H, Rossignol R, Girodet PO, Ghosh D, et al. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med*. 2007;204(13):3173-81.
249. Leclère M, Lavoie J-P, Martin JG. Remodelage du muscle lisse péribronchique dans l'inflammation respiratoire chronique. [Montréal]: Université de Montréal; 2011.
250. Gizycki MJ, Adelroth E, Rogers AV, O'Byrne PM, Jeffery PK. Myofibroblast involvement in the allergen-induced late response in mild atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;16(6):664-73.
251. Stewart AG. Emigration and immigration of mesenchymal cells: a multicultural airway wall. *Eur Respir J*. 2004;24(4):515-7.
252. Hirota N, Martin JG. Mechanisms of airway remodeling. *Chest*. 2013;144(3):1026-32.
253. Jones RL, Elliot JG, James AL. Estimating airway smooth muscle cell volume and number in airway sections. Sources of variability. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;50(2):246-52.

254. Chevigny M, Guerin-Montpetit K, Vargas A, Lefebvre-Lavoie J, Lavoie JP. Contribution of SRF, Elk-1, and myocardin to airway smooth muscle remodeling in heaves, an asthma-like disease of horses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;309(1):L37-45.
255. Svenningsen S, Kirby M, Starr D, Coxson HO, Paterson NA, McCormack DG, et al. What are ventilation defects in asthma? *Thorax*. 2014;69(1):63-71.
256. Hamid Q. Pathogenesis of small airways in asthma. *Respiration*. 2012;84(1):4-11.
257. Barton AK, Gehlen H. Pulmonary Remodeling in Equine Asthma: What Do We Know about Mediators of Inflammation in the Horse? *Mediators Inflamm*. 2016;2016:5693205.
258. Lavoie JP, Cesarini C, Lavoie-Lamoureux A, Moran K, Lutz S, Picandet V, et al. Bronchoalveolar lavage fluid cytology and cytokine messenger ribonucleic Acid expression of racehorses with exercise intolerance and lower airway inflammation. *J Vet Intern Med*. 2011;25(2):322-9.
259. Kaminska M, Foley S, Maghni K, Storness-Bliss C, Coxson H, Ghezzi H, et al. Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(1):45-51 e1-4.
260. Franchini M, Gill U, von Fellenberg R, Bracher VD. Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay. *Am J Vet Res*. 2000;61(11):1369-74.
261. Ramakrishnan RK, Al Heialy S, Hamid Q. Role of IL-17 in asthma pathogenesis and its implications for the clinic. *Expert Rev Respir Med*. 2019;13(11):1057-68.
262. Uberti B, Morán G. Role of neutrophils in equine asthma. *Anim Health Res Rev*. 2018;19(1):65-73.
263. Vargas A, Boivin R, Cano P, Murcia Y, Bazin I, Lavoie JP. Neutrophil extracellular traps are downregulated by glucocorticosteroids in lungs in an equine model of asthma. *Respir Res*. 2017;18(1):207.
264. Vargas A, Roux-Dalvai F, Droit A, Lavoie JP. Neutrophil-Derived Exosomes: A New Mechanism Contributing to Airway Smooth Muscle Remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;55(3):450-61.
265. Bradding P. Asthma: eosinophil disease, mast cell disease, or both? *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2008;4(2):1-7.
266. Gosens R, Grainge C. Bronchoconstriction and airway biology: potential impact and therapeutic opportunities. *Chest*. 2015;147(3):798-803.

267. Lan B, Mitchel JA, O'Sullivan MJ, Park CY, Kim JH, Cole WC, et al. Airway epithelial compression promotes airway smooth muscle proliferation and contraction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2018;315(5):L645-L52.
268. Grainge CL, Lau LC, Ward JA, Dulay V, Lahiff G, Wilson S, et al. Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma. *N Engl J Med*. 2011;364(21):2006-15.
269. Tschumperlin DJ, Shively JD, Kikuchi T, Drazen JM. Mechanical stress triggers selective release of fibrotic mediators from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28(2):142-9.
270. Bosse Y, Chin LY, Pare PD, Seow CY. Chronic activation in shortened airway smooth muscle: a synergistic combination underlying airway hyperresponsiveness? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;42(3):341-8.
271. Holgate ST, Roberts G, Arshad HS, Howarth PH, Davies DE. The role of the airway epithelium and its interaction with environmental factors in asthma pathogenesis. *Proc Am Thorac Soc*. 2009;6(8):655-9.
272. Hirota JA, Hackett TL, Inman MD, Knight DA. Modeling asthma in mice: what have we learned about the airway epithelium? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(4):431-8.
273. Hackett TL, Warner SM, Stefanowicz D, Shaheen F, Pechkovsky DV, Murray LA, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor-beta1. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(2):122-33.
274. Tillie-Leblond I, de Blic J, Jaubert F, Wallaert B, Scheinmann P, Gosset P. Airway remodeling is correlated with obstruction in children with severe asthma. *Allergy*. 2008;63(5):533-41.
275. O'Reilly R, Ullmann N, Irving S, Bossley CJ, Sonnappa S, Zhu J, et al. Increased airway smooth muscle in preschool wheezers who have asthma at school age. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(4):1024-32, 32.e1-16.
276. Palmer LJ, Rye PJ, Gibson NA, Burton PR, Landau LI, Lesouëf PN. Airway responsiveness in early infancy predicts asthma, lung function, and respiratory symptoms by school age. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(1):37-42.
277. Bartman CM, Matveyenko A, Prakash YS. It's about time: clocks in the developing lung. *J Clin Invest*. 2020;130(1):39-50.

278. Bullone M, Chevigny M, Allano M, Martin JG, Lavoie JP. Technical and physiological determinants of airway smooth muscle mass in endobronchial biopsy samples of asthmatic horses. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md : 1985). 2014;117(7):806-15.
279. Hoffman AM. Respiratory applications for the future: one perspective. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2001;17(2):335-49, viii.
280. Joo K, Povaszai A, Nyerges-Bohak Z, Szenci O, Kutasi O. Asthmatic Disease as an Underlying Cause of Dorsal Displacement of the Soft Palate in Horses. *J Equine Vet Sci.* 2021;96:103308.
281. Berkman ND, Sheridan SL, Donahue KE, Halpern DJ, Crotty K. Low health literacy and health outcomes: an updated systematic review. *Ann Intern Med.* 2011;155(2):97-107.
282. Gerber V, Schott li HC, Robinson NE. Owner assessment in judging the efficacy of airway disease treatment. *Equine Vet J.* 2011;43(2):153-8.
283. Orard M, Depecker M, Hue E, Pitel PH, 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.
284. Allano M, Labrecque O, Rodriguez Batista E, Beauchamp G, Bedard C, Lavoie JP, et al. Influence of short distance transportation on tracheal bacterial content and lower airway cytology in horses. *Vet J.* 2016;214:47-9.
285. Depecker M, Richard EA, Pitel PH, 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(1):150-6.
286. Hue E, Orard M, Toquet MP, Depecker M, Couroucé A, Pronost S, et al. Asymmetrical Pulmonary Cytokine Profiles Are Linked to Bronchoalveolar Lavage Fluid Cytology of Horses With Mild Airway Neutrophilia. *Front Vet Sci.* 2020;7:226.
287. Xu X, Rijcken B, Schouten JP, Weiss ST. Airways responsiveness and development and remission of chronic respiratory symptoms in adults. *The Lancet.* 1997;350(9089):1431-4.
288. Laprise C, Laviolette M, Boutet M, Boulet LP. Asymptomatic airway hyperresponsiveness: relationships with airway inflammation and remodelling. *Eur Respir J.* 1999;14(1):63-73.
289. Naryzhny SN. Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(23):3789-808.
290. Jeffery P, Holgate S, Wenzel S, Endobronchial Biopsy W. Methods for the assessment of endobronchial biopsies in clinical research: application to studies of pathogenesis and the effects of treatment. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(6 Pt 2):S1-17.

291. Relave F, David F, Leclere M, Alexander K, Bussieres G, Lavoie JP, et al. Evaluation of a thoroscopic technique using ligating loops to obtain large lung biopsies in standing healthy and heaves-affected horses. *Vet Surg.* 2008;37(3):232-40.
292. Boivin R, Lavoie J-P. Contribution des isoformes de la myosine à l'obstruction respiratoire dans le souffle chez le cheval. [Montréal]: Université de Montréal; 2013.
293. Woodruff PG, Innes AL. Quantitative morphology using bronchial biopsies. *European Respiratory Review.* 2006;15(101):157-61.
294. Monteseirín J. Neutrophils and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2009;19(5):340-54.
295. Holgate ST, Holloway J, Wilson S, Bucchieri F, Puddicombe S, Davies DE. Epithelial-mesenchymal communication in the pathogenesis of chronic asthma. *Proc Am Thorac Soc.* 2004;1(2):93-8.
296. Lachowicz-Scroggins ME, Dunican EM, Charbit AR, Raymond W, Looney MR, Peters MC, et al. Extracellular DNA, Neutrophil Extracellular Traps, and Inflammasome Activation in Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;199(9):1076-85.
297. Jamieson RR, Stasiak SE, Polio SR, Augspurg RD, McCormick CA, Ruberti JW, et al. Stiffening of the extracellular matrix is a sufficient condition for airway hyperreactivity. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985).* 2021;130(6):1635-45.
298. Laumen E, Doherr MG, Gerber V. Relationship of horse owner assessed respiratory signs index to characteristics of recurrent airway obstruction in two Warmblood families. *Equine Vet J.* 2010;42(2):142-8.

Annexe I

Protocole de comptage des noyaux PCNA

Ordinateurs :

Écran Intégré :

MacBook Air (13,3 pouces (1440 x 900)

Carte graphique Intel HD Graphics 6000 1536 Mo

Apple LED Cinema Display (Écran du laboratoire)

24 pouces (1920 x 1200)

Carte graphique Intel HD Graphics 6000 1536 Mo

Couleur : LED Cinema Display

Logiciel : ImageJ (Version 1.51 (100) Copyright © 2015)

Installations pour minimiser variations de luminosité :

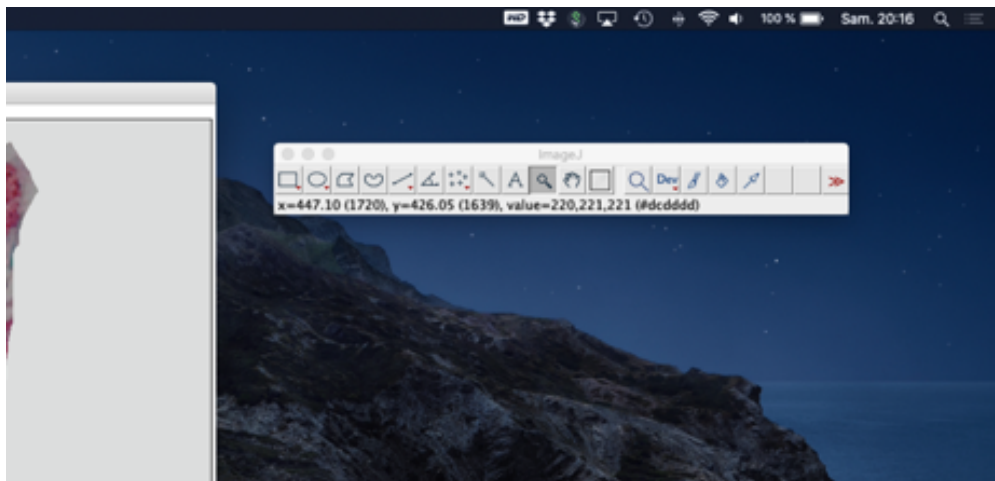
Pièce avec rideaux fermés

Toujours la même lampe allumée pour faire une lumière ambiante, située derrière l'écran pour ne pas créer de reflets

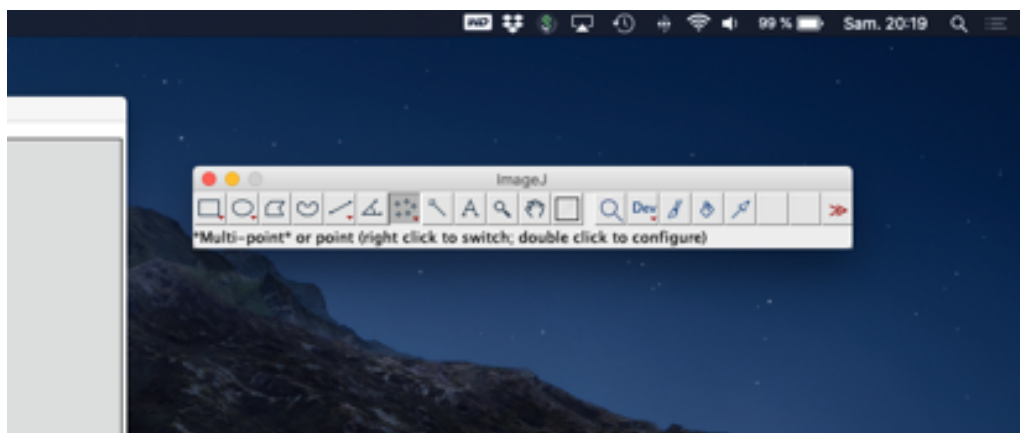
Sélectionner aire d'intérêt :

Apple LED Cinema Display (Écran du laboratoire)

1. Ouvrir la numérisation dont la région à analyser a déjà été délimitée (voir protocole *Mesure de l'aire d'une zone d'intérêt sur ImageJ*)
2. Sélectionner l'outil « Magnifying glass » et agrandir une région à analyser jusqu'à 100% en appuyant sur Shift + « + » (le comptage de tous les noyaux est fait à un grossissement de 100%)



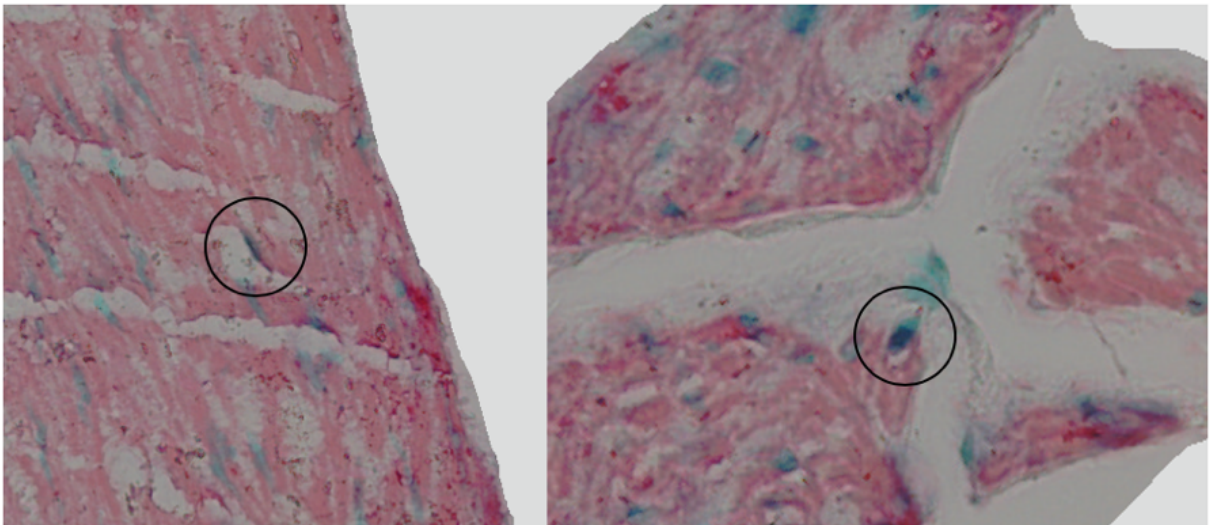
3. Sélectionner l'outil « *Multi-point* or point » afin de faire apparaître une croix sur chaque noyau positif
 - a. En double cliquant sur l'outil « *Multi-point* or point », s'assurer de désélectionner la case « Label points » afin de ne pas voir le nombre de croix qui ont été faites sur une même numérisation



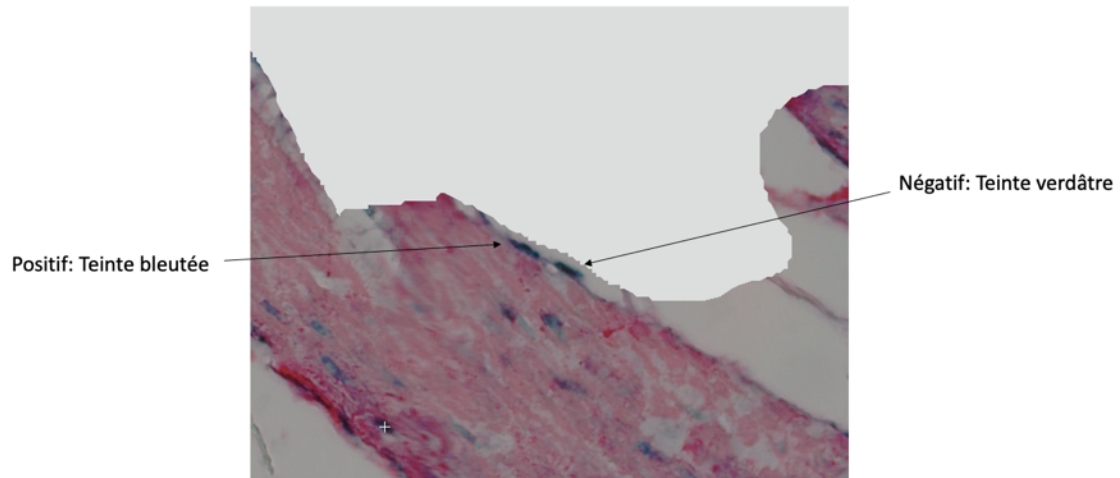
4. Analyser la lame en ne cliquant que sur les noyaux PCNA positifs correspondants aux critères suivants :
 - a. La teinte de bleu doit être proportionnellement plus foncée par rapport à l'intensité de la coloration du muscle lisse
 - b. La teinte doit être d'un bleu-marine et non seulement vert foncé

- c. Si une portion du noyau plus foncée s'explique par superposition avec un myocyte, le noyau est considéré négatif
- d. Si le noyau est trop petit pour répondre à c., mais correspond à a. et b., le noyau est considéré positif
- e. S'il s'agit d'une biopsie dont le marquage au PCNA est plutôt faible : s'il y a une teinte qui tend vers le bleu royal, même si elle n'est pas très intense, le noyau est considéré positif
- f. Si le noyau est bleu ciel, il est considéré négatif, car il s'agit fort probablement d'un noyau qui n'est pas tout à fait au focus par rapport aux autres
- g. Dans une région violacée, le noyau doit être d'un bleu-royal/ bleu-marin franc, pratiquement noir
- h. Si le noyau est noir, mais avec une teinte plutôt verdâtre, le noyau est considéré négatif
- i. Si, dans une région rouge plus opaque, le noyau est noir ou gris-brun, le noyau est ignoré

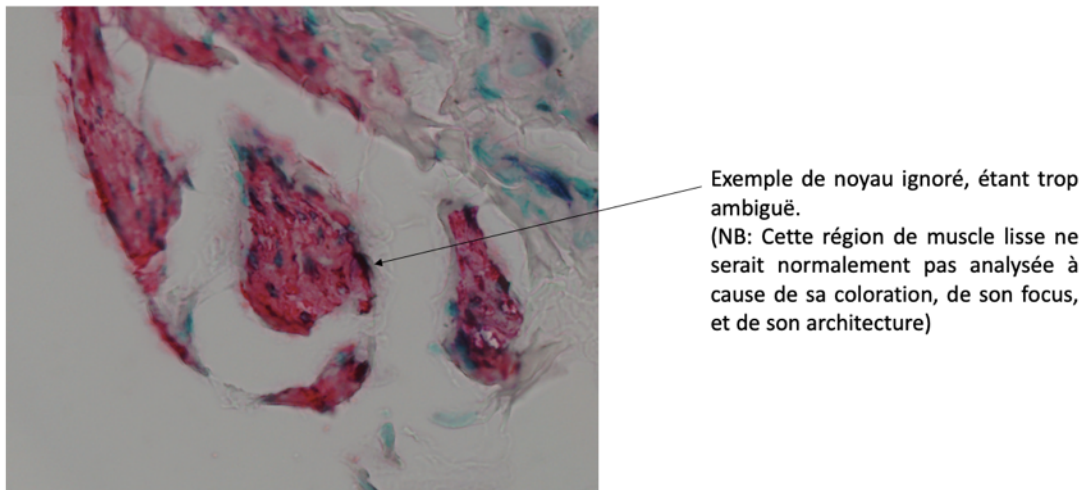
Exemple de noyaux négatifs illustrant le critère c.



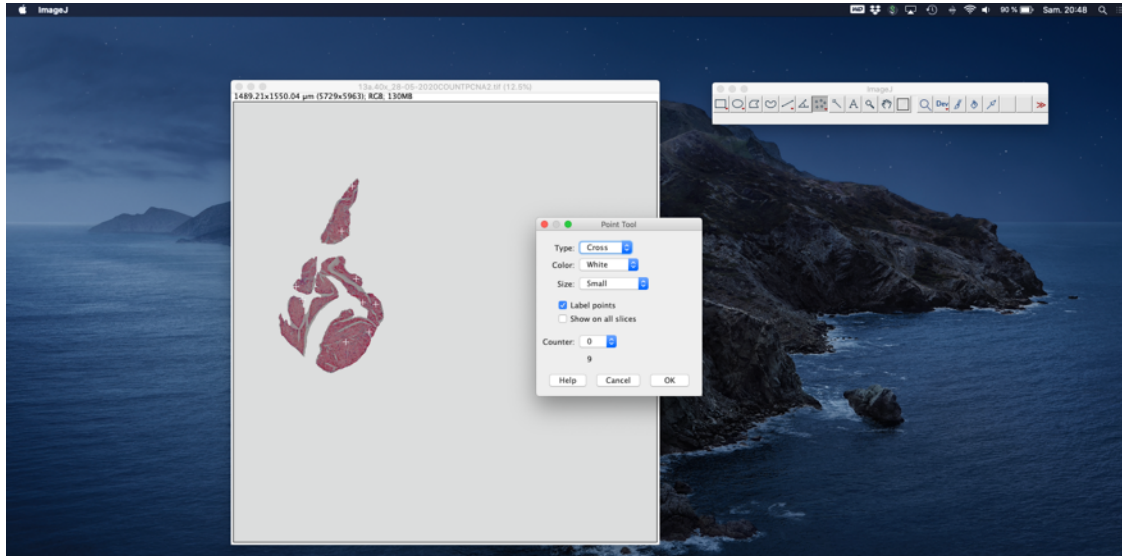
Autres noyaux pour illustrer le critère b.



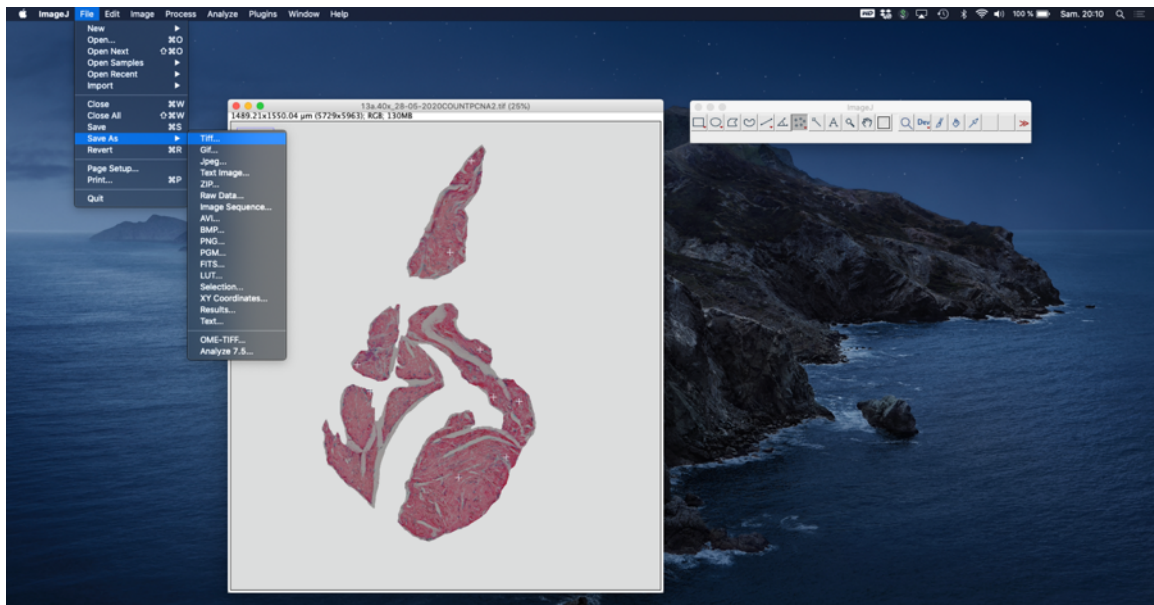
Exemple de noyau ne correspondant pas au critère i.



5. Une fois toute la numérisation analysée, prendre en note le nombre de croix en double cliquant sur l'outil « *Multi-point* or point » et l'inscrire dans un document Excel



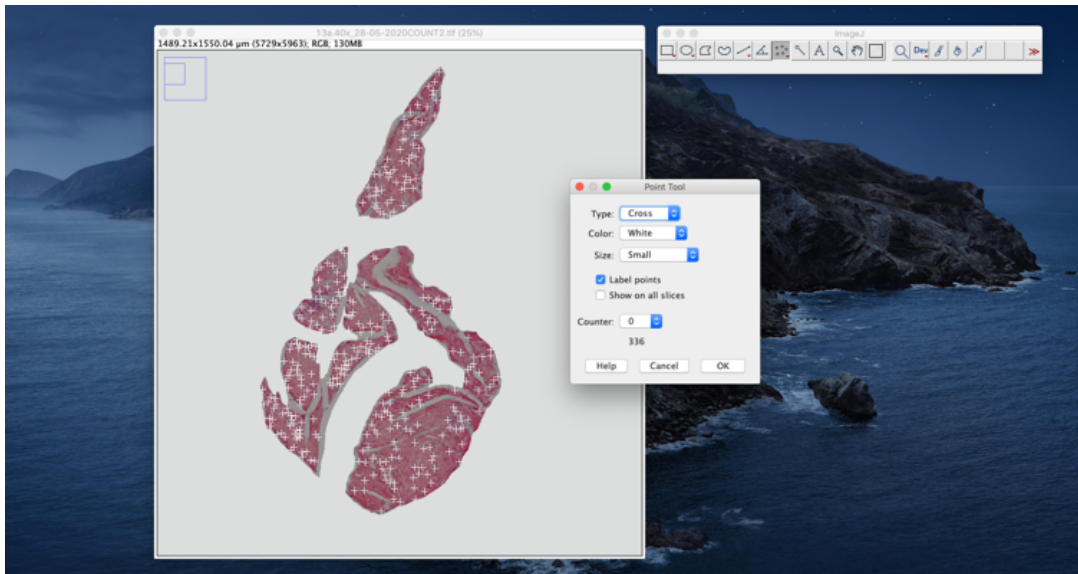
6. Enregistrer l'image dans le menu « File », « Save As » « Tiff... »



7. À partir de l'image précédemment enregistrer avec les croix sur tous les noyaux PCNA positifs, compter tous les autres noyaux à l'aide de l'outil « *Multi-point* or point ». Critères pour les noyaux négatifs :

- a. La taille du noyau n'importe pas; dès qu'une portion du noyau est visible, il est compté (il s'agit peut-être seulement d'une portion de noyau visible à cause de la coupe ou du focus)

- b. Les contours du noyau doivent être délimités en majorité, une tache vaguement de couleur méthyl green ne compte pas comme un noyau
 - c. Les noyaux qui semblent coupés en deux ne sont comptés qu'une seule fois si le muscle lisse adjacent semble aussi présenter un artefact de coupe
8. Une fois toute la numérisation analysée, prendre en note le nombre de croix en double cliquant sur l'outil « *Multi-point* or point » et l'inscrire dans un document Excel



9. Enregistrer l'image dans le menu « File », « Save As » « Tiff... »

