

2m11.2971.11

Université de Montréal

Comparaison de l'expression des cytokines pulmonaires chez des chevaux normaux et atteints de « souffle »

par
Marie-Eve Cordeau

Département de Sciences Cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option Sciences cliniques

Décembre 2001

© Marie-Eve Cordeau, 2001



SF
607
U54
2002
V. 013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Comparaison de l'expression des cytokines pulmonaires chez des chevaux normaux et atteints de « souffle »

présenté par :
Marie-Eve Cordeau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Daniel Jean : président-rapporteur

Jean-Pierre Lavoie : directeur de recherche

Amer Silim : membre du jury

RÉSUMÉ

Le « souffle » chez le cheval, est une affection partageant de nombreuses similarités avec l'asthme chez l'humain, afin d'évaluer le rôle des cytokines de type Th1 et Th2 dans l'inflammation pulmonaire chronique, nous avons étudié la fonction pulmonaire, la cellularité broncho-alvéolaire et l'expression de l'ARNm de l'interleukine (IL)-4, de l'IL-5 et de l'interferon (IFN)- γ , de chevaux atteints de « souffle » (n=6) et de chevaux normaux (n=6), avant et suivant 24 heures et 9 jours d'exposition continue à du foin poussiéreux. À 24 heures, les chevaux atteints de « souffle » montrent une augmentation significative de leur résistance pulmonaire (RL), du nombre de neutrophiles du liquide du lavage broncho-alvéolaire et du nombre de lymphocytes exprimant l'ARNm pour l'IL-4 et l'IL-5. Les expressions d'ARNm pour l'IL-4 et l'IL-5 étaient encore plus fortes à 9 jours, ce qui était associé à une réduction du nombre de cellules positives exprimant l'IFN- γ . Chez les chevaux normaux, une neutrophilie du liquide du LBA et une expression diminuée de l'IFN- γ à 24 heures, furent les seuls changements significatifs, suite à l'exposition au foin poussiéreux. Ces résultats suggèrent que les cytokines de type Th2 contribuent au dysfonctionnement des voies respiratoires et à l'inflammation présente dans les maladies pulmonaires allergiques chroniques.

Mots-clés : Lymphocytes; Th2; cytokines; « souffle »; inflammation; ARNm;
Hybridation *in situ*

ABSTRACT

Helper T lymphocytes (Th2)-type cytokines have been implicated in asthma but their contribution to chronic pulmonary inflammation is poorly understood due to the lack of an appropriate animal model. Heaves is a naturally occurring disease of horses that shares many similarities with chronic asthma. To investigate the role of Th1 and Th2 cytokines in chronic pulmonary inflammation, we studied the pulmonary mechanics, bronchoalveolar lavage (BAL) cell cytology, and cytokine mRNA expression of interleukin (IL)-4, IL-5 and interferon (IFN)- γ of horses with heaves (n=6) and control (n=6) before and after 24 hours and 9 days of continuous natural inhalation challenge. Starting at 24 hours, horses with heaves had a significant increase in pulmonary resistance (R_L), BAL neutrophils, and the number of lymphocyte expressing mRNA for IL-4 and IL-5. The mRNA expression of IL-4 and IL-5 were further increased at 9 days, at which time the number of cells positive for IFN- γ mRNA was also decreased. In control horses BAL neutrophilia and decreased expression of IFN- γ at 24 hours were the only significant findings. These results suggest that Th2-type cytokines contribute to airway dysfunction and inflammation during chronic allergic lung diseases and that heaves in horses is a suitable model to study the immunological events occurring in the lung under chronic inflammatory conditions.

Keywords: Lymphocytes; Th2; cytokines; "heaves"; inflammation; mRNA; *In Situ* Hybridization

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT.....	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES.....	x
REMERCIEMENTS.....	xiii
 INTRODUCTION.....	 1
 CHAPITRE 1:	
 RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	 2
 <i>A) "SOUFFLE"</i>	
HISTORIQUE.....	2
VOCABULAIRE.....	2
INCIDENCE.....	3
PAYS.....	3
ÂGE.....	3
ÉTIOLOGIE.....	4
SPORES DE MOISSURES ET ACTINOMYCÈTES.....	4
HYPERSENSIBILITÉ (type 1, 3 ou 4 ?).....	4
TESTS UTILISÉS.....	6
TESTS CUTANÉS.....	6
TESTS SÉROLOGIQUES.....	7
TESTS DE 3-MÉTHYLINDOLE.....	8
HYPERSENSIBILITÉ RESPIRATOIRES.....	9
BACTÉRIES.....	10
SUSCEPTIBILITÉ GÉNÉTIQUE.....	10
RÉVERSIBILITÉ.....	10
SIGNES CLINIQUES.....	11
PATHOLOGIE.....	12
LÉSIONS MACROSCOPIQUES.....	12
LÉSIONS MICROSCOPIQUES.....	12
TRAITEMENT.....	14
ENVIRONNEMENT FAVORABLE.....	14
MÉDICAMENTS.....	14
<i>B) PHYSIOLOGIE RESPIRATOIRE.....</i>	<i>15</i>
OBSTRUCTION DES VOIES RESPIRATOIRES.....	15
ÉCHANGES GAZEUX.....	17
VOLUMES PULMONAIRES.....	17
CIRCULATION PULMONAIRE.....	18
MODÈLE QUANTITATIF : ÉQUATION.....	18

<i>C) IMMUNOLOGIE: PARTICULARITÉS DE L'ESPÈCE</i>	20
CELLULES INFLAMMATOIRES	20
ANTICORPS.....	22
MESURES DE L'INFLAMMATION PULMONAIRE	23
<i>D) BIOLOGIE MOLÉCULAIRE TH1 ET TH2</i>	27
POPULATIONS ET CLASSES DE LYMPHOCYTES.....	27
PROFILS Th0 et Th3	28
PROFILS Th1 et Th2	28
HISTORIQUE.....	28
CYTOKINES CARACTÉRISTIQUES ET INTERRÉGULATION	29
FONCTIONS IMMUNITAIRES ET IMMUNOPATHOLOGIES	30
FACTEURS DE DIFFÉRENTIATION DES Th0.....	32
ENVIRONNEMENT DE CYTOKINES	32
FORME ET CONCENTRATION DE L'ANTIGÈNE	33
COMPLEXE TCR-Ag-MHC.....	33
TYPE D'APC	33
COSTIMULATION.....	33
RÉGULATION GÉNÉTIQUE ET STABILITÉ DES PROFILS.....	34
MÉTHODES D'ÉVALUATION DES PROFILS	35
HYBRIDATION IN SITU	35
MÉTHODE DU RT-PCR	38
ASTHME HUMAIN: PROFIL TH2.....	38
PROBLÉMATIQUE DU "SOUFFLE".....	39

CHAPITRE 2:

MÉTHODOLOGIE	40
ANIMAUX	40
PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.....	41
TESTS DE FONCTIONS PULMONAIRES.....	41
LAVAGES BRONCHO-ALVÉOLAIRES.....	42
ÉVALUATION CLINIQUE.....	43
HYBRIDATION IN SITU.....	43
ANALYSES STATISTIQUES	45

CHAPITRE 3:
MANUSCRIT SOUMIS POUR PUBLICATION À L'AMERICAN JOURNAL
OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY

Abstract	47
Introduction	48
Material and Methods	50
Animals	50
Pulmonary functions tests	51
Broncho-alveolar lavage	51
Cytologic preparation for <i>in situ</i> hybridization	52
Experimental protocols	53
Statistical analysis	53
Results	53
Discussion	54
Acknowledgments	60
References	61
Abbreviations	67
CHAPITRE 4:	
DISCUSSION	77
CONCLUSION	85
BIBLIOGRAPHIE	86

LISTE DES TABLEAUX**Tableau I** (page 9)

Résumé des divers tests utilisés (cutanés, sérologiques et broncho-alvéolaires), par différents auteurs, pour évaluer la présence d'hypersensibilité aux allergies dans le « souffle » équin.

Tableau II (page 34)

Caractéristiques des profils cellulaires Th1 et Th2 des lymphocytes T pulmonaires.

Table I (page 77)

Total cells count and differential cell cytology in BAL cells of horses with heaves (n=6) and control horses (n=6), at baseline and after 24 hours and 9 days of dusty hay exposure

LISTE DES FIGURES

Figure 1 (p.71)

Change in the values of pulmonary resistance (R_L ; A) from baseline to 24 hours and 9 days of dusty hay exposure for horses with heaves (n=6) and control horses (n=6).

* Significantly ($p<0.05$) different between groups.

Figure 2 (p.72)

Change in the values of pulmonary elastance (E_L ; B) from baseline to 24 hours and 9 days of dusty hay exposure for horses with heaves (n=6) and control horses (n=6). *

Significantly ($p<0.05$) different between groups.

Figure 3 (p.73)

Percentages of neutrophils in BAL fluid at baseline and at 24 hours and 9 days of dusty hay exposure in horses with heaves (n=6) and in control horses (n=6). *

Significantly ($p<0.05$) different from baseline values. † Significantly ($p<0.05$) different between groups.

Figure 4 (p.74)

Number of lymphocytes per hundred expressing mRNA for IL-4, in BAL cells of horses with heaves (n=6) and control horses (n=6), when heaves susceptible horses were in clinical remission (baseline) and after 24 hours and 9 days of continuous dusty hay exposure. * Significantly ($p<0.05$) different between groups.

Figure 5 a. (p.75)

Number of lymphocytes per hundred expressing mRNA for IL-5 in BAL cells of horses with heaves (n=6) and control horses (n=6), when heaves susceptible horses were in clinical remission (baseline) and after 24 hours and 9 days of continuous dusty hay exposure. * Significantly ($p<0.05$) different between groups.

Figure 5 b. (p.76)

Number of lymphocytes per hundred expressing mRNA for IFN- γ in BAL cells of horses with heaves (n=6) and control horses (n=6), when heaves susceptible horses were in clinical remission (baseline) and after 24 hours and 9 days of continuous dusty hay exposure. * Significantly ($p<0.05$) different between groups.

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire à l'ARN
Ag :	Antigène
APC :	Cellule Présentatrice d'Antigène; Antigen Presenting Cell
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
CD :	Clé de différenciation; cluster of differentiation
Cdyn :	Compliance dynamique; dynamic compliance
COLD :	Maladie chronique obstructive du poumon; Chronic Obstructive Lung Disease
MPOC:	Maladie pulmonaire obstructive chronique
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
DIG :	Digoxygénine
DTH :	Réponse d'hypersensibilité retardée; Delayed type hypersensitivity
EL :	Élastance pulmonaire
f :	Fréquence respiratoire; Respiratory frequency
FRC :	Capacité Fonctionnelle Résiduelle; Fonctionnal residual capacity
GM-CSF :	Facteur stimulant des granulocytes et des macrophages; granulocytes-macrophages colony stimulating factor
HIS :	Hybridation <i>in situ</i> ; <i>in situ</i> hybridization
HLA :	Antigène des allèles MHC des leukocytes humains; Human leukocytes Antigen MHC allèles
IL :	Interleukine
Ig :	Immunoglobuline
LBA :	Lavage broncho-alvéolaire

LT :	Lavage trachéal
3MI :	3-Méthylindole
MHC :	Complexe majeur d'histocompatibilité; major histocompatibility complex
NK :	Natural Killer Cells : Cellules « Natural Killer »
PaO ₂ :	Pression artérielle en oxygène dans le sang artériel
PBS :	Phosphate buffer saline ; Solution tampon de saline
PL :	Pression pleurale
PLL :	Poly-L-Lysine
Δ Ppl :	Variation maximale de pression pleurale lors d'un cycle respiratoire
RL :	Résistance pulmonaire; pulmonary resistance
RPM :	Rotation par minute ; Rotation per minute
RT-PCR :	Amplification en chaîne par polymérase; Polymerase chain reaction following reverse transcription
SAD :	Maladie des petites voies respiratoires ;Small Airway Disease
STAT :	Signaux de la transduction et de l'activation de la transcription des protéines ; Signal transduction and activation of transcription proteins
TCR :	Récepteur des cellules « T »; T cell receptor
TE :	Temps d'expiration; Expiratory time
TGF :	Facteur transformant de croissance; Transforming growth factor
Th :	T « helper »
TI :	Temps d'inspiration; Inspiratory time
TNF :	Facteur nécrosant tumoral; tumor necrosis factor
TTA :	Aspirations transthoraciques

\dot{V} :	Débit d'air; flow rate
\dot{V}_E :	Volume minute expiratoire; minute ventilation
V/Q :	Ration de Ventilation / Perfusion
V_T :	Volume courant; Tidal volume
W :	Travail respiratoire; Work of breathing

REMERCIEMENTS

J'aimerais consacrer quelques lignes aux personnes qui m'ont beaucoup aidée et soutenue durant ces années, et sans qui la réalisation de ce travail aurait été impossible :

- Dr. Jean-Pierre Lavoie, mon directeur de mémoire, qui a toujours cru en moi et qui m'a donné une chance inestimable de faire ma maîtrise en médecine vétérinaire. Par sa grande disponibilité et son écoute attentive, il a toujours su me guider dans mon travail et m'encourager à persévérer. Finalement, par son professionnalisme et sa grande rigueur à la tâche, il m'a inculqué le sens de la discipline et le dépassement de soi : deux qualités essentielles à posséder dans le monde exigeant de la recherche!
- Philippe, mon ancien collègue de travail en maîtrise et ami, qui m'a endurée de longues semaines intensives à la ferme et dans le laboratoire!
- Ma Famille : mes parents et ma sœur à qui je voue une grande admiration. Ils m'ont toujours supportée, tout au long de mes études.
- Les animaliers de la ferme Frontenac : Jacques Breault et Robert Pinsonneault pour leur aide sur les expérimentations sur les chevaux.
- Un merci particulier à Francine B., Isabelle D., Alexandre B., Véronique P., Renaud L., et tous les autres que j'oublie et qui m'ont aidée au laboratoire et à la ferme.
- Et bien sûr, tous les chevaux de la ferme Frontenac pour leur patience, dévouement et collaboration!

À mes parents.

INTRODUCTION

Le « souffle » chez le cheval est une affection caractérisée par l'obstruction et l'inflammation des voies respiratoires inférieures. Elle se manifeste lorsqu'il y a domestication des chevaux, lorsque les chevaux sont gardés en écurie et donc exposés à du foin poussiéreux contenant des spores de moisissures et d'actinomycètes. L'incidence de cette maladie est plus marquée dans l'hémisphère Nord, lieu de climats rigoureux, que dans les régions aux climats chauds et secs, et cette maladie touche davantage les chevaux âgés de plus de 8 ans. Finalement, cette maladie est généralement réversible, c'est-à-dire que les signes cliniques disparaissent habituellement lorsque les chevaux sont maintenus au pâturage (Robinson *et al.* 1996).

Chez des chevaux atteints de « souffle », la fonction pulmonaire et la réactivité respiratoire sont affectées, contrairement aux chevaux normaux. De plus, le « souffle » chez le cheval semble correspondre à une réaction d'hypersensibilité de type I aux moisissures présentes dans le foin, et pourrait donc résulter d'une réponse immunitaire à dominance Th2.

Cette étude temporelle de la comparaison de l'expression de l'ARN messager pour l'IL-4, l'IL-5 et l'IFN- γ des lymphocytes pulmonaires, après une exposition antigénique continue, chez des chevaux normaux et atteints de « souffle », a révélé, par la technique de l'hybridation *in situ*, un profil à dominance Th2 chez les chevaux atteints de « souffle ». Cette présente étude suggère donc que le « souffle » chez le cheval, est de nature allergique.

RECENSION DE LA LITTÉRATURE

HISTORIQUE

Dès les années 333 avant Jésus-Christ, Aristote fut le premier à décrire une affection affectant les chevaux et qui était fort probablement l'affection que nous appelons aujourd'hui : le « souffle » (Lekeux 1996). Puis, tout au long des siècles suivants, cette affection devint et demeure encore aujourd'hui très fréquente chez les chevaux (Lekeux 1996; Stommer 1887). Ce n'est que vers la fin des années 1800, que « *Gresswell et Gresswell* » identifièrent le « souffle » comme étant une affection de nature inflammatoire; ils écrivèrent: « ...est une maladie nerveuse, inflammatoire, caractérisée par une respiration difficile et spasmodique, l'inspiration étant facilement exécutée, contrairement à l'expiration, qui est prolongée et marquée de deux phases apparentes. » cité par Derksen (Derksen 1993). Les caractéristiques et les causes exactes de cette réponse inflammatoire pulmonaire demeuraient donc inconnues à l'époque (Derksen 1993).

VOCABULAIRE

Les 25 dernières années furent marquées par l'apparition de nouveaux termes : maladie pulmonaire obstructive chronique, emphysème, emphysème alvéolaire chronique, « souffle », COLD (Chronic Obstructive Lung Disease), bronchite chronique, bronchiolite chronique, SAD (Small Airway Disease) et obstruction récurrente des voies respiratoires (Cook 1976 ; McPherson and Thomson 1983 ; Derksen 1985a ; Breeze 1979). De plus, ces noms appartiennent à quatre grandes catégories de descriptions : la description clinique, anatomique, fonctionnelle et étiologique. Par exemple, le terme : « souffle » est très utilisé pour les descriptions cliniques, quant aux termes : emphysème et COPD, ils relèvent respectivement de descriptions anatomique et fonctionnelle. L'emphysème pulmonaire n'étant pas une caractéristique commune de l'affection, l'usage de ce terme devrait être découragé. Il a récemment été recommandé d'uniformiser l'utilisation des termes décrivant cette affection. Les termes anglais « recurrent airway obstruction » et « heaves » ont été

recommandés. En français, « le souffle » (la pousse) ou obstruction récurrente des voies respiratoires devraient être privilégiées (Robinson 2000).

INCIDENCE

PAYS

Le « souffle » représente probablement la maladie la plus commune chez les chevaux adultes de l'Europe du Nord et du Royaume Uni, et représente donc un impact majeur sur leur santé et bien-être (McPherson et al. 1983; Mair 1996; P. Lekeux 1996). L'incidence du « souffle » varie en fonction des conditions climatiques. En effet, elle connaît une incidence élevée dans l'hémisphère Nord, lieu de climats tempérés et humides et où le foin ne sèche que partiellement pendant la saison estivale. Cette rigueur climatique oblige donc l'hébergement prolongé des chevaux en écurie, pendant la saison hivernale. À l'opposé, la maladie s'avère rare dans les régions aux climats chauds et secs, la Californie et l'Australie par exemple, où les chevaux peuvent être gardés la plupart du temps au pâturage (Cook 1976; Robinson et al. 1996).

ÂGE

Le « souffle » chez le cheval est une affection dont l'incidence est généralement reliée à l'âge. Elle ne se manifeste que très rarement chez les chevaux âgés de moins de 5 ans, pour être beaucoup plus fréquente (40 à 60%) chez ceux âgés de plus de huit ans (Robinson 2000).

ÉTIOLOGIE

SPORES DE MOISSURES ET ACTINOMYCÈTES

Le « souffle » a longtemps été représenté comme une maladie de domestication des chevaux (McGorum *et al.* 1993a). Cependant, l'étiopathogénie exacte de cette affection demeure mal connue et est sans doute multifactorielle. En effet, la diète, des infections antécédentes, une réaction allergique et des prédispositions génétiques sont les principales causes ayant été avancées jusqu'à ce jour, afin de mieux expliquer cette maladie (Breeze 1979; McGorum *et al.* 1993a). Cependant, une alimentation quotidienne en foin de pauvre qualité, est reconnue depuis des siècles, comme étant un agent provocateur de la maladie, au moins chez une portion de la population équine (Tesarowski 1996). En effet, le foin moisi contient un bon nombre de spores de champignons, moisissures et actinomycètes potentiellement allergènes (Tesarowski 1996) incluant : *Faenia rectivirgula* (autrefois nommé *Micropolyspora faeni*), *Thermoactinomyces vulgaris* et *Aspergillus fumigatus* (Vandenput *et al.* 1997). De plus, ces spores possèdent un diamètre aérodynamique leur permettant d'être inhalées profondément dans le système respiratoire des chevaux (Robinson *et al.* 1996) : 1.91 µm pour *M. faeni*, 3.1 µm pour *A. fumigatus* et 0.58 µm pour *T. vulgaris* (Woods *et al.* 1993). De plus, *A. fumigatus*, *M. faeni* et *T. vulgaris* semblent jouer un rôle dans l'étiologie du « souffle » chez le cheval (McGorum *et al.* 1993a)

HYPERSENSIBILITÉ (type 1, 3 ou 4?)

Bon nombre de mécanismes existent par lesquels les spores de champignons peuvent induire des maladies respiratoires. La majorité de ces mécanismes relèvent de l'allergie. Une hypersensibilité de type I implique la dégranulation des mastocytes, sensibilisés par les immunoglobulines de type E (IgE) et se manifeste à l'intérieur de 30 minutes; elle peut être détectée par des tests cutanés intradermiques. L'asthme allergique chez l'humain est causé par ce mécanisme. Une hypersensibilité de type III est caractérisée cette fois, par la déposition de complexes immuns impliquant

principalement des anticorps de type IgG et est décelée environ 4 heures après le test cutané. Chez l'humain, la maladie du « poumon du fermier » est l'exemple le plus représentatif d'une maladie pulmonaire fonctionnant par ce mécanisme (Halliwell *et al.* 1979) Finalement, il a été suggéré qu'une hypersensibilité de type IV (ou à « médiation cellulaire »), pouvait être responsable de certaines maladies pulmonaires, telles le « souffle », affichant des résultats positifs de tests cutanés dans les 72 heures suivant l'exposition à l'antigène (Halliwell *et al.* 1979). En effet, puisque les signes cliniques du « souffle » se développent plusieurs heures après l'exposition à la poussière et qu'on y voit une inflammation neutrophilique des voies respiratoires, ainsi que des bronchospasmes et une sécrétion de mucus, cette affection fait également penser à une réaction d'hypersensibilité de type IV (Robinson *et al.* 1996).

Plusieurs considèrent que le « souffle » représente une réponse allergique de type 1 à l'inhalation (et non l'ingestion) (Clarke 1993) d'antigènes en suspension dans l'air, lesquels étant contenus dans le foin moisi et poussiéreux (Halliwell *et al.* 1979; McPherson 1979). C'est pour cette raison, entre autres, que le « souffle » chez le cheval est souvent comparé à l'asthme chez l'humain (Snapper 1986). Néanmoins, l'importance des phénomènes allergiques demeure encore indéterminée dans l'étiopathogénie du « souffle » équin (Halliwell *et al.* 1979; Robinson 2000). Les chevaux atteints de « souffle » montrent une réponse d'hypersensibilité pendant les crises causées par l'obstruction respiratoire, cette dernière étant induite par l'environnement de l'écurie, riche en foin moisi et poussiéreux. À l'inverse, chez des chevaux sains, la fonction pulmonaire et la réactivité respiratoire ne sont pas du tout affectées par ces conditions (Vandenput *et al.* 1998). En effet, des chevaux normaux ont été soumis à des expositions naturelles de : *M. faeni*, et *A. fumigatus* sans développer aucune pathologie pulmonaire (Derksen 1987).

De plus, une toxicité au 3-méthylindole fut mentionnée (Beech 1989; Beech 1991). Le « souffle » semble résulter davantage d'une réponse d'hypersensibilité de type 1 ou 3 (Tesarowski 1996) à ces antigènes spécifiques, plutôt que d'une réponse

d'hypersensibilité de type IV à la poussière et aux irritants de l'étable (McPherson 1979; Derksen 1987; McGorum *et al.* 1993a)

TESTS UTILISÉS

TESTS CUTANÉS

Des tests cutanés furent utilisés, afin de vérifier l'hypothèse qu'une réaction d'hypersensibilité de type I était impliquée dans l'affection du « souffle » équin (McPherson 1979; Evans 1992; Watson *et al.* 1997). Ainsi, les principaux tests cutanés ayant été utilisés sont : le test cutané intradermique (injection intradermique des antigènes à divers endroits du cheval) et le test « Prausnitz-Kustner » (injection intradermique du sérum d'un cheval atteint de « souffle », chez un cheval sain, suivi, 48 heures après, de l'injection de l'antigène spécifique, au même site) (Evans 1992; McPherson 1979; Beech, 1981) purent différencier significativement deux groupes de chevaux (atteints de « souffle » et normaux), à l'aide de ces tests, et par la suite, leur conférèrent une utilité diagnostique valable. Cependant, les chevaux atteints de « souffle » démontraient un mélange de réponses d'hypersensibilité de type 1 et 3 (McPherson 1979; Beech 1981). Quant à Eyre, Evans et McGorum (Eyre 1972; Evans 1992; McGorum *et al.* 1993), ces derniers furent incapables de voir des différences significatives entre les deux groupes de chevaux et donc, déconseillèrent un diagnostic du « souffle » basé uniquement sur de tels tests (Eyre 1972; Beech 1981; Evans 1992; Watson *et al.* 1997; McGorum *et al.* 1993c). De façon générale, les résultats obtenus à la suite de ces tests cutanés démontrèrent que tous les chevaux (normaux et atteints de « souffle ») possèdent des réactions cutanées positives aux allergènes environnementaux, mais que le groupe de chevaux atteints de « souffle », montrent un nombre supérieur de ces mêmes réactions (Watson *et al.* 1997)

TESTS SÉROLOGIQUES

Une deuxième série de tests furent utilisés, à savoir les tests sérologiques. Les mesures des concentrations locales et systémiques d'anticorps chez les chevaux atteints de « souffle », ont démontré une tendance à une production locale d'anticorps, supérieure à celle des chevaux normaux (Halliwell 1993). De plus, l'hypothèse d'une hypersensibilité de type 3 comme cause au « souffle » fut investiguée en étudiant les concentrations sériques de précipitants aux antigènes : *Micropolysporum faeni* et *Aspergillus fumigatus*, contenues dans l'air (Lawson 1979; Madelin 1991). Toutefois, ces auteurs affirmèrent constater une différence entre deux groupes de chevaux (atteints de « souffle » et normaux), malgré parfois la présence d'anticorps précipitants dans le groupe des chevaux sains (Lawson *et al.* 1979). Trois autres auteurs ne purent conclure à la signification de ces mêmes tests (Madelin *et al.* 1991; Halliwell, 1993; Chabchoub, 1993). En effet, le premier observa la présence d'anticorps dans le sérum des chevaux normaux (Madelin 1991). Quant au second, celui-ci ne détecta aucune quantité significative d'anticorps (IgE et IgA) dans le sérum des chevaux atteints (Halliwell 1993); résultats similaires à ceux de (Schmallenbach *et al.* 1998), avec l'allergène I/a recombinant (r) – *Aspergillus fumigatus* (Schmallenbach, Rahman *et al.* 1998). Le dernier auteur témoigna de la présence d'anticorps dans les deux groupes de chevaux (Chabchoub 1993).

En conclusion, ces études démontrèrent une association entre la présence d'anticorps précipitants sériques à ces antigènes et un environnement faiblement ventilé dans l'écurie, et non nécessairement à l'affection du « souffle » (Madelin 1991).

Troisièmement, à cause du manque de réactifs commerciaux disponibles et spécifiques aux IgE équins, et limitant ainsi le nombre d'études disponibles sur la quantification de cet anticorps, des auteurs observèrent une quantité supérieure d'anticorps précipitants (IgA et IgE) à *M. faeni* et *A. fumigatus* dans le liquide du lavage broncho-alvéolaire des chevaux atteints du « souffle » (Eder *et al.* 2000). Cette observation suggère donc une nature allergique à la maladie (Halliwell 1993). Puis, après l'analyse des anticorps présents dans le liquide du LBA chez des chevaux

ayant subi des expositions à *M. faeni*, ces auteurs ne constatèrent aucune différence significative entre les deux groupes de chevaux, ce qui les amena par la suite, à douter de l'importance de ce test dans le diagnostic du « souffle » (McGorum *et al.* 1993).

TESTS DE 3-MÉTHYLINDOLE

Finalement, des doses orales de 3-méthylindole (3MI) furent administrées à des chevaux et poneys, puis permirent à Turk *et al.* d'observer sur ces mêmes animaux, des bronchioles affichant des changements pathologiques semblables à ceux observés dans les cas du « souffle » (Turk *et al.* 1983). Cependant, aucune étude rapporte des cas où l'apparition naturelle de l'affection du « souffle » fut observée chez des chevaux, suite à l'ingestion de 3MI (Vandeput *et al.* 1998J). Il n'y a donc pas de preuve à ce jour que cette substance puisse jouer un rôle majeur dans la maladie.

Bref, à la lumière de toutes ces expériences, on ne peut encore conclure quant à la nature exacte du « souffle » chez le cheval. En effet, s'agit-il d'une réaction de nature allergique spécifique (type 1) (Lawson 1979; McPherson 1979; Beech 1981; Halliwell 1993) ou plutôt d'une réaction de nature inflammatoire non-spécifique (McGorum *et al.* 1993d)? La majorité des études suggèrent une nature allergique au « souffle », mais ne permettent pas de le confirmer.

Tableau I : Résumé des divers tests utilisés (cutanés, sérologiques et broncho-alvéolaires), par différents auteurs, dans l'étiologie du « souffle » équin.

<i>Tests d'hypersensibilité :</i>	<i>Concluant :</i>	<i>Non-Concluant :</i>
Tests cutanés	McPherson, 1979 Beech, 1981	Eyre, 1972 Evans, 1992 McGorum, 1993
Sérologie	Lawson, 1979	Halliwell, 1993 Chabchoub, 1993 Madelin, 1991
Liquide bronchoalvéolaire	Halliwell, 1993	McGorum, 1993

HYPERSENSIBILITÉ RESPIRATOIRE

Regardons maintenant les manifestations mêmes de l'hypersensibilité respiratoire. Premièrement, on soupçonne la structure locale des voies respiratoires ou l'environnement, d'en être les causes (Robinson *et al.* 1996). De plus, cette réaction se développe dans les 24 heures suivant l'exposition à l'antigène, et persiste jusqu'à 72 heures suivant cette exposition (d'une durée d'environ 7 heures) (Fairbairn 1993). On remarque également que cette hypersensibilité est accompagnée d'une invasion neutrophilique pulmonaire, mais le rôle de ces dernières cellules, dans l'affection du « souffle » équin, nécessite encore de plus amples recherches (Robinson *et al.* 1996)

L'épaississement de la paroi des voies respiratoires, contribue sans doute, à accentuer cette réponse d'hypersensibilité. Donc, une faible concentration d'irritants dans l'environnement du cheval, n'affectera pas ou peu (Beech 1991) ce dernier s'il est normal ou atteint de « souffle » en rémission, mais causera par contre, un rétrécissement important de ses voies respiratoires, si ce dernier est atteint de « souffle » en phase inflammatoire aiguë (Robinson *et al.* 1996). Même si la réactivité bronchique des chevaux atteints de « souffle » au pâturage est similaire à celle des chevaux normaux, ces chevaux atteints de « souffle » restent davantage

susceptibles à développer de la bronchoconstriction, lorsqu'ils sont en contact avec les irritants de l'air (Vandenput *et al.* 1998).

BACTÉRIES

Il est maintenant reconnu que les chevaux atteints de « souffle » démontrent quelquefois des micro-organismes dans leurs sécrétions trachéales, tels *Pseudomonas* ou *Acinetobacter* (Dixon 1992). Cependant, à la fin de l'exposition aux allergènes, ces bactéries disparaissent en même temps que l'inflammation pulmonaire, ainsi que les sécrétions trachéales excessives. Ceci indique donc que ces bactéries ne jouent pas de rôle primaire dans l'étiologie du « souffle » chez le cheval (Dixon 1992).

SUSCEPTIBILITÉ GÉNÉTIQUE

Une base génétique au « souffle » a été proposée, lorsque l'auteur observa que l'incidence du « souffle » chez la progéniture de deux chevaux atteints, était supérieure à celle retrouvée chez deux parents sains (Marti 1991).

RÉVERSIBILITÉ

Pendant les crises aiguës d'obstruction des voies respiratoires, les chevaux atteints de « souffle » montrent une hypersensibilité non-spécifique des voies respiratoires (Derksen 1985a; Armstrong *et al.* 1986), laquelle est réversible (Thomson and McPherson 1984; Derksen 1985a; Armstrong *et al.* 1986; Fairbairn 1993; Vandenput *et al.* 1998). La sensibilité des voies respiratoires des chevaux normaux n'est pas affectée par un environnement poussiéreux (Derksen 1985a; Armstrong *et al.* 1986; Fairbairn 1993)

SIGNES CLINIQUES

Le « souffle » équin correspond à un stade avancé de la maladie et il doit y avoir des périodes de signes sévères (Robinson 2000). De plus, les symptômes varient suivant la sévérité de l'affection. Effectivement, les chevaux en phase aiguë de la maladie, peuvent montrer une toux chronique et une intolérance à l'effort. En phase d'exacerbation clinique, les chevaux atteints de « souffle » révèlent généralement de la toux, des bruits respiratoires devenant de plus en plus forts, une respiration bruyante en deuxième phase d'expiration et un effort expiratoire abdominal caractéristique, nommé « souffle » (Robinson *et al.* 1996).

Chez les chevaux normaux, la fréquence respiratoire au repos se situe environ entre huit et douze respirations par minute et celle-ci est si superficielle, qu'il est parfois difficile de la compter en ne regardant que le mouvement des flancs. À l'opposé, chez un cheval atteint de « souffle », la respiration se caractérise par une augmentation de sa fréquence et de son intensité. De plus, on remarque une respiration abdominale forcée, résultant du mouvement des flancs qui devient biphasique. Le second mouvement expiratoire est causé par une contraction visible des muscles abdominaux. Dans les cas les plus sévères de « souffle », les naseaux se dilatent à l'inspiration, ainsi que l'anus, à l'expiration. Un autre signe clinique de l'affection, pourrait être l'écoulement nasal qui est intermittent et bilatéral (Cook 1976).

PATHOLOGIE

LÉSIONS MACROSCOPIQUES

Il faut savoir tout d'abord, que les descriptions pathologiques existantes du souffle, sont généralement faites sur des chevaux moyennement à sévèrement affectés, puisque les chevaux étant moins gravement atteints, ne sont que rarement nécropsiés. Macroscopiquement, le poumon peut apparaître normal ou être de taille légèrement augmentée affichant alors une couleur rose anormalement très pâle (Beech 1991). Parfois, les poumons présentent à leur surface, l'emprunte des côtes (McPherson and Thomson 1983). On peut également retrouver du mucus et des sécrétions dans la lumière des voies respiratoires et dans les alvéoles adjacentes (Beech 1991). Une hypertrophie des muscles respiratoires secondaires, ainsi que du ventricule droit, ont aussi été rapportées (Beech 1991).

LÉSIONS MICROSCOPIQUES

La bronchiolite constitue un changement histopathologique majeur, lors du « souffle » équin. Les principales lésions microscopiques sont : une hyperplasie épithéliale bronchique, une métaplasie des cellules à goblets et des infiltrations périfonchiales de cellules mononucléées, principalement des lymphocytes, accompagnées d'accumulations intraluminales de neutrophiles (Robinson *et al.* 1996; Kaup 1990). Par contre, on ne retrouve que peu d'éosinophiles (Breeze 1979; Robinson *et al.* 1996). De plus, dans les cas sévères de « souffle », on peut remarquer des structures folliculaires lymphoïdes. Des plasmocytes sont présentes à ces sites, mais les lymphocytes T CD4+ prédominent (Winder *et al.* 1988). Une dominance de la population de lymphocytes T CD4+ affichant un profil Th2, fut impliquée dans le développement de l'asthme chez l'humain, et un mécanisme similaire est avancé pour expliquer le « souffle » chez le cheval. On observe également un nombre décroissant de cellules épithéliales bronchiques, non-ciliées (Clara), des exudats intraluminaux composés de mucus et de leukocytes

polymorphonucléés, une fibrose péribronchique, et finalement, une fibrose et de l'emphysème alvéolaires (Watson *et al.* 1997; Robinson *et al.* 1996)

Les changements structuraux associés au « souffle », incluent des altérations des cellules de Clara, telles qu'un nombre décroissant de granules, ainsi qu'une augmentation du réticulum endoblastique lisse (Gillespie *et al.* 1967; Kaup *et al.* 1990). De plus, on compte également des changements structuraux alvéolaires, comme : l'augmentation des pores de Kohn's et des altérations dégénératives des cellules épithéliales alvéolaires de type II (Watson *et al.* 1997). De la fibrose alvéolaire peut être présente à divers degrés, ainsi que le remplacement des cellules de type I nécrosées par des cellules épithéliales alvéolaires de type 2 (Dixon 1986).

Ces données suggèrent que les sites majeurs lésionnels, chez les chevaux atteints de « souffle », se situent sur les voies respiratoires les plus éloignées (petites voies) et conséquemment, que les changements observés dans la trachée et les bronches, sont d'importance mineure (Kaup *et al.* 1990). Finalement, on note un épaississement de la paroi des petites voies respiratoires et une hyperplasie des muscles lisses (Robinson *et al.* 1996).

Dans de nombreuses études, la description histologique des infiltrations de cellules péribronchiques, mononucléées, fut souvent associée à l'évidence clinique du « souffle ». Cependant, dans d'autres études cliniques et histologiques de chevaux normaux, ces mêmes infiltrations de cellules furent trouvées (Mair *et al.* 1987; Winder *et al.* 1988; Wisner *et al.* 1993).

Ces descriptions lésionnelles des chevaux atteints de « souffle », indiquent que l'inflammation des voies respiratoires est un problème central, et qu'une obstruction de ces mêmes voies entraînant des échanges gazeux altérés, composent les observations cliniques majeures (Robinson *et al.* 1996).

TRAITEMENT

ENVIRONNEMENT FAVORABLE

Il a été clairement démontré, que lorsque le cheval mange, la concentration de particules de poussière en suspension dans l'air, est la plus grande autour de ses naseaux. Malheureusement, la ventilation ne permet aucunement de réduire cette concentration localisée de poussière. C'est donc pour cette raison, que l'élimination de poussière à la source, représente le seul moyen valable (Vandenput *et al.* 1997) au traitement du problème. Pour ce faire, éliminer complètement le foin et ainsi exclure les aéroallergènes et irritants de l'environnement de l'écurie, s'avère même plus important que de changer le type de litière, par exemple (Thomson *et al.* 1984; Vandenput *et al.* 1998). La meilleure option serait d'adopter les aliments en cubes ou l'ensilage de foin, comme fourrage de substitution, combiné à une litière de copeaux de bois ou de paille (Vandenput *et al.* 1998).

Cependant, l'approche idéale du contrôle de l'environnement du cheval permettant de maintenir l'animal en rémission, demeure de garder ce dernier au pâturage (Vandenput *et al.* 1998) aussi longtemps que les conditions le permettent.

MÉDICAMENTS

Lorsqu'un contrôle adéquat de poussière dans l'environnement n'est pas possible, les corticostéroïdes représentent les drogues les plus efficaces au traitement du « souffle » chez le cheval (Robinson 2000). Ces médicaments, avec les broncho-dilatateurs, semblent traiter partiellement ou complètement ce syndrome (Vandenput *et al.* 1998). En effet, pendant des crises aiguës d'obstruction des voies respiratoires chez des chevaux, suivant une exposition en allergènes, les broncho-dilatateurs agissent de façon à diminuer la résistance pulmonaire, à augmenter la compliance dynamique et à diminuer le changement maximal de pression pleurale durant la respiration courante (ΔP_{pl}) (Pearson *et al.* 1989).

PHYSIOLOGIE RESPIRATOIRE

Les tests de fonctions pulmonaires servent à mesurer la mécanique respiratoire à l'aide de paramètres tels que: la pression intra-pleurale, le débit d'air et le volume courant, chez un animal conscient. Ainsi, de ces mesures, naîtront des variables qui permettront l'évaluation quantitative des changements dans l'élasticité du poumon et la résistance de la portion non-élastique des voies respiratoires. Ces variations sont: ΔP_{plmax} , C_{dyn} , R_L ainsi que W (Robinson *et al.* 1999).

OBSTRUCTION DES VOIES RESPIRATOIRES

La variation maximale de la pression pleurale (ΔP_{plmax}) durant un cycle respiratoire, représente une mesure de l'effort respiratoire et sert de test conventionnel pour décrire la fonction respiratoire chez le cheval (Littlejohn *et al.* 1980). De plus, chez les chevaux atteints de « souffle », on assume qu'un changement du ΔP_{plmax} , indique un changement du calibre (circonférence) des voies respiratoires, altérant ainsi la résistance du débit d'air. Ce changement de pression représente donc une augmentation de la sévérité de l'obstruction respiratoire. Le ΔP_{plmax} est déterminé non seulement par la résistance au passage de l'air dans les voies respiratoires (R_L), mais également par le volume courant (V_T),

la vitesse du débit d'air \dot{V} ainsi que l'élastance du poumon (E_L) (Robinson *et al.* 1999).

Chez les chevaux atteints de « souffle », on note une augmentation de leur volume minute expiratoire, au fur et à mesure d'une augmentation de l'obstruction de leurs voies respiratoires, causée par une augmentation de la fréquence. En effet, respirer le même volume d'air (V_T) en moins de temps, requiert une augmentation du débit respiratoire, en dépit de voies respiratoires obstruées. Pour ce faire, le cheval modifie sa stratégie respiratoire (Robinson *et al.* 1996). Chez les chevaux normaux au repos, l'inspiration et l'expiration sont toutes les deux biphasiques (Robinson *et al.* 1996). À l'opposé, les chevaux atteints de « souffle », même en rémission, ne

présentent pas cette respiration biphasique, caractéristique des chevaux normaux, mais présentent plutôt un débit d'air constant à l'inspiration et à l'expiration (Gillespie *et al.* 1966; Muylle *et al.* 1973; Petsche *et al.* 1994). Ce phénomène s'explique par l'augmentation remarquée de la fréquence respiratoire des chevaux atteints (Sasse 1971). De plus, les chevaux atteints de « souffle » montrent de forts débits d'air à la fin de l'inspiration et au début de l'expiration, afin d'augmenter leur débit respiratoire, en dépit de voies respiratoires obstruées. Finalement, le faible débit d'air, ainsi que l'augmentation drastique de la résistance en fin d'expiration (Gillespie *et al.* 1966; Petsche *et al.* 1994), reflète la compression dynamique des voies respiratoires des chevaux atteints de « souffle » (Sasse 1971).

Conséquemment, l'augmentation du ΔP_{plmax} survenant chez les chevaux âgés atteints de « souffle », relève non seulement d'un rétrécissement du diamètre des voies respiratoires, mais aussi d'une modification de la stratégie respiratoire (Robinson *et al.* 1999).

On représente également la magnitude de l'obstruction des voies respiratoires des chevaux atteints de « souffle », par leurs mesures de résistance (R_L) et d'élastance (E_L), ces derniers étant des déterminants importants, avec le changement du débit respiratoire, du ΔP_{plmax} . La résistance est obtenue en divisant la pression d'air existante entre les alvéoles et la bouche, par le débit respiratoire (Robinson 1999). Les chevaux atteints de « souffle » en rémission, montrent des valeurs de résistance et de compliance ($C_{dvn} = 1 / E$) identiques à celles chez des sujets normaux. La compliance représente en effet le changement de volume, par unité de changement de pression (Robinson, 1999). Cependant, lorsque ces chevaux atteints de « souffle », mais en rémission, retournent dans un environnement défavorable et riche en poussière, leur résistance augmente et leur compliance diminue, parallèlement à la réapparition de l'obstruction des voies respiratoires. Toutefois, il est clair que le ΔP_{plmax} ne peut pas, à lui seul, représenter une mesure du degré d'obstruction des voies respiratoires, puisqu'il ne tient pas compte du débit d'air généré (Robinson *et al.* 1999). Finalement, cette obstruction caractéristique des

voies respiratoires des chevaux atteints de « souffle », résulte de bronchospasmes, d'accumulations de mucus, ainsi que de changements structuraux de la paroi de ces mêmes voies, causés par l'inflammation (Robinson *et al.* 1996).

L'obstruction diffuse des voies respiratoires des chevaux atteints de « souffle », résulte en une distribution anormale de la ventilation (Muylle *et al.* 1973).

ÉCHANGES GAZEUX

On remarque une hypoxémie ($PaO_2 < 80\text{mm Hg}$) augmentant avec la sévérité de la maladie chez les chevaux atteints de « souffle ». Cette hypoxémie pourrait résulter du déséquilibre du ratio ventilation/perfusion (V/Q), résultant de l'obstruction diffuse des voies respiratoires et / ou de la détérioration de la diffusion, causée par une perte de capillaires pulmonaires dans la région de l'emphysème (Gillepsie *et al.* 1967). De plus, les chevaux atteints de « souffle » ont des valeurs de ratios (V/Q) supérieurs à ceux des chevaux normaux et on peut corrélérer la magnitude de ces rapports (V/Q), avec les signes cliniques et la sévérité de la maladie (Robinson *et al.* 1996).

VOLUMES PULMONAIRES

En mesurant le volume pulmonaire en fin d'expiration, aussi appelé la capacité fonctionnelle résiduelle (FRC), par la méthode pléthysmographique, une augmentation de ce volume fut constatée chez des chevaux atteints de « souffle » (Leith 1971). En effet, la méthode pléthysmographique sert à mesurer le volume gazeux total dans le poumon, incluant celui enfermé dans les voies respiratoires, ne pouvant communiquer avec le reste de l'arbre respiratoire (Leith, 1971). Ce phénomène s'explique par la fermeture rapide des voies respiratoires durant l'expiration, menant ainsi à l'emprisonnement de gaz dans la portion distale à l'obstruction. Donc, alors que la capacité fonctionnelle résiduelle (FRC) est augmentée chez les chevaux atteints de « souffle », et que le volume courant (V_T) demeure constant, le volume en fin d'inspiration augmentera chez ces mêmes chevaux (Robinson *et al.* 1996).

CIRCULATION PULMONAIRE

Une augmentation de la pression pulmonaire artérielle, a été démontrée chez des chevaux atteints de « souffle », et l'ampleur de cette hypertension augmente avec la sévérité de la maladie (Nyman 1991). De plus, en raison d'un rythme cardiaque identique entre des chevaux normaux et atteints de « souffle », cette augmentation de pression s'explique par l'augmentation de la résistance vasculaire (Nyman 1991), causée entre autres, par la vasoconstriction hypoxique des artères pulmonaires (Dixon 1978).

MODÈLE QUANTITATIF : ÉQUATION

Il existe différentes méthodes, permettant de mesurer ou de quantifier la fonction pulmonaire chez les chevaux. Une de celles-ci, fréquemment utilisée, consiste à placer un masque facial auquel est relié un pneumotachographe chauffé, mesurant le débit d'air. L'intégration électronique du signal du débit fournira la mesure du volume courant. La mesure de la pression pleurale est obtenue à l'aide d'un transducteur de pression, mesurant la différence entre la pression oesophagienne (mesurée par un ballon oesophagien) (Derksen *et al.* 1996) et celle du masque. Les signaux de pression sont enregistrés et la position du cathéter est modifiée si nécessaire, afin de permettre l'obtention d'un changement maximal de P_L , durant chaque cycle et afin de minimiser les artéfacts cardiaques. Ensuite, les signaux du transducteur se trouvent amplifiés, passent à travers un convertisseur « digital / analogue », et finalement, sont dirigés vers un ordinateur équipé d'un logiciel d'analyse et de compilation de données. Le programme permet donc d'obtenir les

valeurs du : volume courant (V_T), du volume minute (\dot{V}_E), de la fréquence respiratoire (f), des temps d'inspiration et d'expiration (T_I et T_E) et du changement maximal de pression pleurale, à chaque respiration. Les valeurs de la résistance et de l'élastance pulmonaires sont finalement obtenues, en appliquant aux données,

l'équation de régression multiple, représentant le modèle de simple compartimentation du poumon :

$$P_L = (E_L \times V_T) + (R_L \times \dot{V}) + K$$

Le coefficient de détermination de l'équation est calculé à chaque respiration (Lapointe *et al.* 1993; Lavoie *et al.* 1996; Ammann *et al.* 1998).

IMMUNOLOGIE : PARTICULARITÉS DE L'ESPÈCE

CELLULES INFLAMMATOIRES

Il est maintenant bien reconnu qu'exposer des chevaux atteints de « souffle » à un environnement de foin poussiéreux, déclenche chez ces derniers, de l'inflammation des voies respiratoires. Lorsque ces chevaux sont en rémission, les cellules présentes dans le liquide du lavage broncho-alvéolaire (LBA) sont identiques à celles des chevaux normaux, c'est-à-dire, principalement des macrophages (36% à 74%) et des lymphocytes (20% à 50%). Ces macrophages pulmonaires représentent d'importantes cellules effectrices, c'est-à-dire sécrétrices et capables de phagocytose. Les macrophages sécrètent, entre autres : des prostaglandines, des nucléotides cycliques, des collagénases, et de l'élastase. Les macrophages agissent en interaction avec les lymphocytes, mais aussi avec plusieurs autres cellules du système respiratoire (Derksen *et al.* 1985b; McGorum *et al.* 1993a).

Neutrophiles

On note un pourcentage élevé de neutrophiles, obtenus par lavage broncho-alvéolaire (> 15%) et dans les sécrétions respiratoires des chevaux atteints de « souffle »; pourcentage semblant souvent augmenter avec la sévérité des signes cliniques (Robinson *et al.* 1996) citant (Nuytten *et al.* 1983; Winder *et al.* 1990; Traub-Dargatz *et al.* 1992). Cependant, les chevaux normaux, de même que ceux atteints de « souffle » en rémission, ne montrent que très peu de neutrophiles dans le liquide du lavage broncho-alvéolaire (< 5%).

Lymphocytes

Il semble probable que chez les chevaux atteints de « souffle », l'inhalation d'antigènes conduit à une réponse immunitaire spécifique, dans laquelle les cellules résidentes (macrophages et lymphocytes) produisent des cytokines, provoquant le recrutement des neutrophiles dans les poumons. On sait que les lymphocytes T

CD4⁺ sont considérés très importants dans le développement de l'asthme allergique chronique chez l'humain, une maladie ayant de nombreuses similitudes avec le « souffle » équin, de par leurs mécanismes de maturation, activation et recrutement éosinophilique pulmonaires, ainsi que par la production d'IgE (Corrigan *et al.* 1992; Robinson *et al.* 1996; Ying *et al.* 1995; Girard *et al.* 1997; Romagnani 2000; Busse *et al.* 2001).

De plus, chez les chevaux atteints de « souffle », la majorité des lymphocytes seraient des lymphocytes T dont la moitié serait des lymphocytes T helper (CD4⁺) et l'autre moitié, des CD8⁺ (Gibson *et al.* 1989; McGorum *et al.* 1993; Watson *et al.* 1997; Kleiber *et al.* 1999). Ces lymphocytes T CD4⁺, obtenus par LBA, seraient impliqués dans la pathogénie du « souffle », mais le rôle des lymphocytes dans le « souffle » équin, n'a pas encore été déterminé (McGorum *et al.* 1993b). En effet, peu d'attention a été consacrée aux rôles des lymphocytes T dans cette condition. Les lymphocytes T représentent pourtant des sources majeures de cytokines pro-inflammatoires pouvant être responsables de plusieurs aspects immunopathologiques associés au « souffle ». Comme ces cellules occupent un rôle central dans la régulation des mécanismes immunitaires humoraux et cellulaires, elles pourraient déterminer la nature de la réponse immunitaire d'un cheval, après que celui-ci ait été exposé à des antigènes (McGorum *et al.* 1993b).

Chez des chevaux normaux, les lymphocytes constituent environ 35 % des cellules obtenues par lavage broncho-alvéolaire (Winder *et al.* 1991). De plus, une augmentation du pourcentage des cellules CD5⁺CD8⁻ (probablement CD4⁺), obtenues par lavage broncho-alvéolaire de chevaux atteints de « souffle », suite à une exposition à la poussière, a été observée (McGorum *et al.* 1993b). On constata même un nombre supérieur de lymphocytes CD4⁺ dans le liquide du lavage bronchoalvéolaire chez des chevaux sévèrement atteints de « souffle », comparativement à des chevaux sains (Kleiber *et al.* 1999). Ces cellules pourraient contrôler la maturation, l'activation et l'infiltration des neutrophiles dans la maladie

du « souffle », de la même façon que pour les éosinophiles, dans l'asthme (Robinson *et al.* 1996; Lavoie *et al.* 2001).

Mastocytes

On les retrouve en concentration variant de 1% à 12% dans le liquide du lavage broncho-alvéolaire des chevaux normaux. De plus, une augmentation de leur nombre peut indiquer diverses maladies pulmonaires inflammatoires ou une réactivité des voies respiratoires. Récemment, on a suggéré que l'augmentation de la dégranulation des mastocytes pulmonaires après une exposition expérimentale d'antigènes (*Aspergillus fumigatus*), pouvait contribuer à la pathogénie du « souffle » chez le cheval. En effet, l'histamine, constituant important des granules des mastocytes, cause de la bronchoconstriction chez les chevaux (Hare *et al.* 1999).

Éosinophiles

Ces cellules constituent moins de 1% de la population cellulaire du liquide du lavage broncho-alvéolaire, chez des chevaux normaux et ne sont pas considérés comme des cellules impliquées dans la pathogénie du « souffle » (Bain 1997)

ANTICORPS

La muqueuse des voies respiratoires des chevaux, contient des immunoglobulines libres, ainsi que des lymphocytes B produisant des IgG, IgA et IgM. Les lymphocytes B produisant des IgA prédominent dans les voies respiratoires supérieures, tandis que ceux produisant les IgG, prédominent dans les voies respiratoires inférieures. De plus, on retrouve de grandes quantités d'IgA et d'IgM sur la surface de l'épithélium, tandis que les IgG se situent davantage dans le tissu connectif de la « lamina propria ». Les immunoglobulines de type IgA représentent une composante majeure d'une immunité mucosale, et conséquemment, leur concentration est beaucoup plus élevée dans les sécrétions bronchiales que dans le sérum (Mair *et al.* 1988; Janeway 1999).

Un rôle dans la pathogénie du « souffle » est accordé aux lymphocytes B, ces cellules produisant des anticorps (Gerger 1973; Halliwell *et al.* 1979; Wilkie 1982; McPherson *et al.* 1983). Les poumons des chevaux atteints de « souffle » contiennent un nombre supérieur de lymphocytes périvasculaires et périfonchiaux produisant des IgA et des IgG et que les chevaux sévèrement atteints, montrent des quantités supérieures d'IgA et d'IgG libres intraépithéliaux et d'IgE dans le liquide du lavage bronchoalvéolaire (Mair *et al.* 1988; Winder *et al.* 1988; McGorum *et al.* 1993b).

MESURES DE L'INFLAMMATION PULMONAIRE

Les intérêts grandissants portant sur l'effet des infections et de l'environnement sur la muqueuse respiratoire des chevaux, ont mené au développement de techniques diagnostiques. Des techniques comme les lavages transtrachéaux ou bronchoalvéolaires, furent empruntées à la médecine humaine (Buechner-Maxwell 1996). D'autres outils incluent : la radiographie, l'échographie, la bronchoscopie, la biopsie transthoracique des poumons et la biopsie pulmonaire et bronchique (Maxwell 1996; Moore 1996).

Lavage trachéal (LT)

Le lavage trachéal est une technique qui consiste à introduire un liquide physiologique stérile dans la trachée et puis de récupérer ce liquide, à des fins diagnostiques. Les écouvillons transtrachéaux sont fréquemment utilisés, afin d'obtenir des échantillons stériles, destinés aux cultures bactériennes (Buechner-Maxwell 1996). L'évaluation cytologique du liquide obtenu, par aspirations ou lavages transtrachéaux, a aussi été utilisée, afin d'estimer la réponse inflammatoire des voies respiratoires envers les allergènes et les débris contenus dans l'environnement (Mair 1987).

Une élévation du nombre de neutrophiles, dans les sécrétions trachéales, fut démontrée chez des chevaux atteints de « souffle », comparativement à des chevaux normaux. Cependant, une augmentation du nombre de cellules totales ainsi que des neutrophiles, fut aussi observée dans les écouvillons transtrachéaux, des chevaux atteints de pneumonies bronchiques et interstitielles. Ces résultats indiquent que cette technique ne peut servir à identifier, à elle seule, le « souffle » chez le cheval (Mair 1987). Finalement, la composition cellulaire des écouvillons transtrachéaux, ne donnent pas toujours des résultats semblables à ceux obtenus par l'analyse histopathologique du même poumon (Lavoie *et al.* 2001; Viel 1983) et il y a une faible corrélation entre les comptages différentiels cellulaires de neutrophiles, lymphocytes et macrophages, entre des échantillons des liquides provenant des LBA et des TTA (Derksen *et al.* 1989). Pour un prélèvement trachéal, il est difficile de déterminer la part cellulaire des différentes parties des voies respiratoires profondes (Fogarty 1990).

Lavage broncho-alvéolaire (LBA)

Le lavage broncho-alvéolaire a été adapté pour la toute première fois, par Viel en 1980, dans l'espèce équine. Son utilisation fut vite répandue, tant pour le monde de la recherche, que les études cliniques (Lapointe 1994).

Le lavage broncho-alvéolaire est une technique d'exploration bronchopulmonaire qui fait partie d'un ensemble d'examen complémentaires effectués, afin de reconnaître un problème pulmonaire obstructif chronique. Peu traumatisante et à effets secondaires presque nuls, l'avantage de cette méthode est qu'elle permet aussi d'observer l'appareil respiratoire supérieur et profond et de noter d'éventuelles anomalies (Bendali-Ahcene 1995). De plus, l'observation des changements structuraux et cellulaires des sécrétions respiratoires possible par la technique du LBA, a permis l'accroissement des connaissances portant sur le développement des maladies des voies respiratoires inférieures chez les chevaux (Derksen *et al.* 1985b; Tremblay *et al.* 1993).

Pour sa part, le LBA consiste à introduire un liquide physiologique stérile à l'aide d'un cathéter ou d'un endoscope introduit au niveau des petites bronches. Puis, il s'agit ensuite de récupérer ce liquide ainsi que tous les éléments cellulaires et non cellulaires contenus dans la partie de l'arbre respiratoire échantillonnée pour des fins diagnostiques (cytologie, biochimie et immunologie) (Lapointe *et al.* 1993).

Grâce à cette technique, il devient possible d'observer la libération de médiateurs inflammatoires dans l'environnement local, de décrire la réponse cellulaire inflammatoire suite à une exposition antigénique et enfin, de caractériser les médiateurs inflammatoires impliqués tels que les cytokines (Shaver *et al.* 1997; Franchini 1998). Finalement, le LBA permet seulement de récupérer ce qui se trouve à l'intérieur de l'arbre respiratoire et ce, dans un endroit focal du poumon (McGorum *et al.* 1993; McKane *et al.* 1993).

Le LBA fournit davantage d'informations chez les animaux atteints de maladies bronchiolaires et alvéolaires, contrairement au lavage trachéal, qui lui est plus représentatif des maladies affectant l'ensemble des voies respiratoires supérieures. Les cellules provenant d'un LBA correspondent davantage à celles trouvées lors de l'évaluation histopathologique, que lors d'un lavage trachéal (Moore 1996). En effet, comme il a été prouvé que le lavage broncho-alvéolaire permettait une quantification plus spécifique de l'inflammation des voies respiratoires inférieures, que celle faite par un lavage trachéal (Derksen *et al.* 1989), le lavage broncho-alvéolaire est donc beaucoup utilisé dans l'évaluation des maladies des voies respiratoires inférieures, particulièrement le « souffle » équin (Lapointe 1994)

Des études récentes ont démontré par ailleurs, que l'analyse du liquide du LBA des chevaux atteints d'une pneumonie ou d'une pleurésie, ne s'était pas montrée, chez 50% des animaux évalués (Rossier *et al.* 1991), caractéristique de la maladie. Ces résultats suggèrent que les analyses cytologiques des liquides du LBA ou du TTA ne fournissent pas toujours des informations complètes et exactes de la

physiopathologie des maladies des voies respiratoires inférieures chez les chevaux. Des méthodes additionnelles de mesure seraient parfois souhaitables (Buechner-Maxwell 1996).

Biopsies

Les évaluations des biopsies épithéliales respiratoires chez les humains et les animaux, servent, d'une façon fiable, à observer la morphologie interne et les changements fonctionnels qui y sont associés, suite par exemple , à une exposition aux polluants dans l'air, aux allergènes ou aux infections virales (Buechner-Maxwell 1996).

L'évaluation des tissus s'avère particulièrement intéressante pour analyser des changements chroniques de la morphologie épithéliale, tels : une hyperplasie des cellules de Goblet, des dommages mucociliaires ou une fibrose tissulaire. Cependant, la radiographie, la bronchoscopie, les examens cytologiques et microbiologiques des aspirations bronchiales et les thoracocentèses associées à l'examen du liquide pleural, représentent des méthodes efficaces, devant être pratiquées en premier lieu (Raphel *et al.* 1981).

L'examen histologique des biopsies pulmonaires des chevaux atteints de « souffle », s'avère donc utile dans les études cliniques du « souffle » chez le cheval (Viel 1983; Watson *et al.* 1997).

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE (Th1 et Th2)

Les cellules myéloïdes donnent naissance aux leukocytes, érythrocytes et mégakaryocytes ou plaquettes. De plus, les leukocytes myéloïdes comprennent : les basophiles, les éosinophiles et les neutrophiles. On appelle aussi ces leukocytes myéloïdes : leukocytes polymorphonucléés (Tizard, 2001).

Tous les éléments cellulaires sanguins (érythrocytes, plaquettes et leukocytes), originent d'un même précurseur, les cellules pluripotentes hématopoïétiques, se trouvant dans la moelle osseuse. De ces cellules souches, deux autres groupes de cellules spécialisées apparaissent, soient : les cellules lymphoïdes et myéloïdes (Tizard, 2001).

Pour leur part, les cellules lymphoïdes donnent naissance à trois populations de lymphocytes, soient : B, T et NK (ces dernières provenant de la même lignée cellulaire que les cellules T). Ce sont les cellules T qui composent la population majoritaire de lymphocytes sanguins, à environ 80%. Les lymphocytes B et NK ne sont présents qu'à de petites concentrations (Janeway 1999).

POPULATIONS ET CLASSES DE LYMPHOCYTES

Il existe deux classes de lymphocytes T : une classe dont le récepteur se compose des chaînes $\alpha\beta$ et une autre dont les chaînes sont $\delta\gamma$. De plus, on subdivise les lymphocytes T $\alpha\beta$ en deux groupes, soient : les lymphocytes T CD8+ et TCD4+ (CD8 et CD4 étant respectivement des corécepteurs des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité I et II). À ce sujet, il a été démontré que l'expression des molécules MHC II sur les lymphocytes T de cheval, augmente avec l'âge (Lunn, Holmes et al. 1993). Enfin, on compte deux sortes de lymphocytes TCD8+ : les cellules cytotoxiques (Tc) et supresseurs (Ts), tandis que les lymphocytes TCD4+ ne comprennent que les cellules T « helper » (Th) (Janeway 1999).

PROFILS Th0 et Th3

Les lymphocytes T « helper » se divisent en deux principaux profils, sur la base de leur sécrétion de cytokines, à savoir : les Th1 et les Th2 . Cependant, on retrouve l'existence d'autres profils, chez l'humain et la souris, soient : les Th0 et Th3 (Janeway 1999). Les Th0 représentent des cellules capables de produire à la fois, des cytokines propres aux deux profils (Th1 et Th2), entre autres : IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 et IL-10 (O'Garra 1998). Cependant, il existe une confusion dans la littérature, quant à leur rôle, à savoir si ces cellules sont les précurseurs des Th1 et Th2 ou si elles représentent une population distincte (Kamogawa 1993).

Les lymphocytes TCD4⁺ de type Th3, dont la principale cytokine produite est le TGF- β , agissent principalement comme inhibiteurs des profils Th1 et Th2 (Groux *et al.* 1997).

PROFILS Th1 et Th2

HISTORIQUE

C'est en 1986 que (Mosmann, 1986) identifia pour la première fois, deux clones de cellules chez la souris, selon leurs cytokines sécrétées et leurs fonctions immunologiques distinctes, soient : les Th1 et Th2 (Mosmann 1986; Romagnani 1995). Depuis ce temps, des profils similaires furent identifiés chez l'humain et le chat et bon nombre d'évidences portent à croire à l'existence de ces mêmes profils chez d'autres espèces domestiques, telles : canines, porcines, bovines, ovines et équines (Swiderski 1998). Cependant, les profils découverts chez ces dernières espèces ne correspondent pas parfaitement à ceux des modèles murins. En effet, au lieu de parler d'un « profil unique Th1 ou Th2 », on voit l'expression de profils mixtes, et on préférera parler d'un « profil à dominance Th1 ou Th2 » (Abbas *et al.* 1996; Constant *et al.* 1997; Sukura *et al.* 1998; Swiderski 1998).

Finalement, beaucoup d'efforts ont été déployés à ce jour, sans malheureusement grand succès, afin de trouver des antigènes de surface sur les cellules TCD4⁺ Th1 et Th2, dans l'espoir d'y diriger des anticorps monoclonaux, pour ainsi être en mesure de différencier ces deux clones (Openshaw *et al.* 1995). Le profil de cytokines sécrétées demeure encore la seule façon de caractériser les deux profils de lymphocytes (Constant *et al.* 1997).

CYTOKINES CARACTÉRISTIQUES ET INTERRÉGULATION

Un profil Th1 se caractérise par la production de TNF- β , INF- γ et IL-2, tandis qu'un profil Th2 se différencie par sa production d'IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, IL-9 et IL-13. Cependant, les cytokines suivantes : IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-13, GM-CSF et TNF- α se retrouvent dans les deux profils, avec toutefois une concentration plus forte dans le profil Th1 pour l'IL-2 et TNF- α , et dans le profil Th2 pour : IL-3, IL-6, IL-10, GM-CSF et IL-13 (Constant *et al.* 1997).

Plusieurs découvertes majeures apparurent durant les douze années de recherche immunologique suivant la découverte initiale et la description des clones de cellules Th1 et Th2 (Swiderski 1998). La première découverte a permis d'identifier que la capacité fonctionnelle de ces cellules est déterminée par leur profil de cytokines, ces dernières servant à la fois de facteurs de croissance autocrines pour les cellules naïves T « helper » et d'inhibiteurs de croissance et d'activité du profil opposé (Abbas *et al.* 1996). Donc, en présence de stimulation antigénique chronique, le résultat sera une polarisation progressive vers le profil ayant été initié (Swiderski 1998). Par exemple, pour le profil Th1, l'INF- γ , en plus d'agir de façon autocrine sur les cellules Th1 ira directement inhiber la prolifération des cellules Th2, et stimulera les macrophages à sécréter de l'IL-12, qui en retour, ira stimuler le profil Th1. Quant au profil Th2, l'IL-4 par exemple, agira directement de façon autocrine sur son profil et inhibera, avec l'IL-10, les activités des cellules Th1 (Prete 1994; Kelso 1995; Romagnani 1995; Abbas *et al.* 1996; O'Garra 1998; Pearlman 1999). Puis, on découvrit que le phénotype exprimé des cellules T « helper », dépend des

caractéristiques diverses de l'antigène et de la composition génétique de l'hôte (Swiderski 1998).

FONCTIONS IMMUNITAIRES ET IMMUNOPATHOLOGIES

Les activités immunologiques des cytokines de type Th1, favorisent l'immunité à médiation cellulaire. En effet, l'IFN- γ stimule l'activité des macrophages à travers divers mécanismes, tels l'expression d'antigènes MHC II nécessaires à leur reconnaissance par les cellules T. De plus, l'IFN- γ stimule la production des isotopes d'IgG, ces derniers se liant aux récepteurs Fc γ de grande affinité, sur les phagocytes, rendant ceux-ci efficaces pour l'opsonisation et la phagocytose des agents pathogènes. Également, l'IFN- γ et l'IL-2 augmentent les mécanismes immunitaires cytotoxiques, en stimulant directement les fonctions des lymphocytes NK et TCD8+. Quant au TNF- β et à l'IFN- γ , ceux-ci recrutent et activent les leukocytes inflammatoires. Conséquemment, les réponses de type Th1 servent à éliminer les pathogènes intracellulaires. Finalement, ces mêmes réponses médient les réactions d'hypersensibilité retardée, type 4, les rejets d'organes et les réactions d'auto-immunité et sont donc souvent associées à l'inflammation et à la destruction tissulaire (Mosmann *et al.* 1989; D'Ambrosio *et al.* 2000; Abbas *et al.* 1996).

Cependant, certains critent à une simplification excessive des fonctions effectrices des cellules T en ces deux types d'immunités, et que les réponses Th1 relèvent d'une réaction d'hypersensibilité retardée (DTH), et que les Th2 relèvent d'une immunité humorale (Swiderski 1998).

Les cytokines de type Th2 supportent plutôt des mécanismes « phagocytose-indépendants » et sont associées à l'immunité antiparasitaire et aux phénomènes allergiques. L'IL-4 (et / ou IL-13) stimule la production d'IgE, pendant que l'IL-5 constitue le principal facteur d'activation éosinophilique. Les IgE ainsi que les défenses médiées par les éosinophiles, se sont avérées importantes dans la défense contre certains parasites. Il est maintenant clair que les cytokines de type Th2 aident

à la production d'anticorps par les lymphocytes B et qu'elles stimulent la production d'IgM et les isotypes IgG, en grande concentration. De plus, un profil Th2 assurera une défense contre les organismes extracellulaires. En effet, un profil Th2 stimulera les lymphocytes B à produire des IgE (via IL-4), qui conduira à la dégranulation des mastocytes, ainsi qu'au recrutement et à l'activation des éosinophiles (IL-5). En effet, les IgE se lient aux mastocytes et aux basophiles, et lors d'interaction avec les antigènes, ces IgE stimulent la libération de multiples médiateurs contenus dans ces cellules, de réactions allergiques. L'histamine, un des médiateurs majeurs relâchés par ces cellules, semble jouer un rôle fondamental dans la modulation des réactions immunitaires locales, avec l'aide de ses récepteurs d'histamine, présents sur les lymphocytes, les neutrophiles, les mastocytes et les basophiles. Tous ces mécanismes sont donc essentiels à la défense contre certains parasites extracellulaires. De plus, un profil Th2 inhibera l'inflammation aiguë et chronique, incluant les réactions d'hypersensibilité retardée. Cette dernière affirmation lève la possibilité que les lymphocytes Th2 agissent en tant que régulateurs, plutôt qu'effecteurs des réponses immunitaires (Croft *et al.* 1995). Finalement, l'immunopathologie la plus souvent associée à une réponse Th2 excessive est l'allergie (Abbas *et al.* 1996; D'Ambrosio *et al.* 2000).

Il est important de mentionner qu'au début de leur développement, les profils Th1 et Th2 sont réversibles, mais qu'à force de multiples stimulations répétées, ces réponses tendent à rester polarisées dans une direction, c'est-à-dire à devenir irréversibles (Abbas *et al.* 1996).

FACTEURS DE DIFFÉRENTIATION DES Th0

ENVIRONNEMENT DE CYTOKINES

Avant d'afficher un profil Th1 ou Th2, les Th0, considérés comme les précurseurs de ces profils, par la majorité des auteurs, devront passer par un stade de différenciation, ce dernier étant influencé principalement par les cytokines présentes dans le milieu. En effet, l'IL-12, principalement produit par les macrophages, est le facteur dominant pour la différenciation des Th0 en Th1. De plus, les cellules naïves CD4, ainsi que les Th1 possèdent des récepteurs d'IL-12, contrairement aux cellules Th2 dont l'expression de ces mêmes récepteurs se trouve inhibée par l'IL-4. Également, l'IFN- γ est un facteur secondaire de la différenciation des Th0 vers un profil Th1. Finalement, on montre deux cofacteurs à l'IL-12, dans la différenciation d'un profil Th1, à savoir : IL-1 α et « Interferon Gamma Inducing Factor » (Hsieh *et al.* 1993; Scott 1993; Schmitt *et al.* 1994; Jacobson *et al.* 1995; Szabo *et al.* 1995; Kaplan *et al.* 1996).

L'IL-4 représente le facteur principal de différenciation des cellules Th0 en Th2. De plus, on pense maintenant qu'une minime quantité d'IL-4 serait produite par les cellules Th0 elles-mêmes, quoique la majeure partie d'IL-4 produite vienne des lymphocytes, des cellules NK de type 1.1, des basophiles, des éosinophiles et des mastocytes (Swain *et al.* 1990; Swain *et al.* 1991; Abehsira-Amar *et al.* 1992).

Quatre autres facteurs principaux affectent la différenciation des Th0, tels que : le type et la dose de l'antigène, la force entre le peptide et le complexe MHC-TCR, le type d'APC (Cellule Présentatrice d'Antigène) et le phénomène de costimulation.

FORME ET CONCENTRATION DE L'ANTIGÈNE

Lorsque l'antigène est sous forme de particules, et présent à petite dose, il stimulera une réponse Th1. Cependant, s'il est présent à forte concentration, ce dernier stimulera plutôt une réponse Th2. Cependant, lorsqu'on aura un antigène soluble et à forte concentration, la réponse sera Th1, contrairement à une réponse Th2, stimulé cette fois par un antigène soluble, mais à faible concentration (Constant *et al.* 1995).

COMPLEXE TCR-Ag-MHC

Un deuxième facteur important de différenciation des cellules Th0, est la force du complexe « peptide-MHC II - TCR ». En effet, une forte affinité entre le peptide et le complexe MHCII - TCR favorisera une réponse Th1, tandis qu'une faible affinité, au contraire, stimulera une réponse Th2 (Constant *et al.* 1997).

TYPE D'APC

Le type d'APC influencerait également la différenciation des Th0 vers un ou l'autre des profils. Par leur grande production d'IL-12, les macrophages et les cellules dendritiques favoriseraient une réponse Th1, tandis que les lymphocytes B stimuleraient une réponse Th2 (O'Garra 1998; Bottomly 1999).

COSTIMULATION

Le dernier facteur majeur de différenciation des cellules Th0, réside dans la costimulation. Premièrement, le CD28 et le CD152 représentent respectivement des récepteurs sur les lymphocytes T normaux et activés, pour les molécules CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2), ces dernières étant présentes sur les APC. La majorité des auteurs suggèrent que la présence du CD28 influencerait un profil Th2, tandis que le profil Th1 serait plutôt choisi par défaut. Quant au rôle du CD152, récepteur inhibiteur des molécules B7 dans la différenciation des cellules Th0, demeure

controversé. La majorité des auteurs démontrent également que le B7.1 favoriserait une réponse Th1, tandis que le B7.2 stimulerait davantage une réponse Th2 (Kuchroo *et al.* 1995; Reiner *et al.* 1995; Webb *et al.* 1995).

Enfin, d'autres facteurs peuvent jouer un rôle dans la différenciation des cellules Th0, tels : la présence ou l'absence du CD4 sur les cellules T, la présence de plusieurs chimiokines et de leurs récepteurs, la présence de plusieurs facteurs de transcription de cytokines (Stat 6, Stat 1, Stat 4), ainsi que certaines hormones (Romagnani 1995; Kaplan *et al.* 1996; Lederer *et al.* 1996; Brown *et al.* 1997; Sallusto *et al.* 1998; Sallusto *et al.* 1998).

RÉGULATION GÉNÉTIQUE ET STABILITÉ DES PROFILS

Finalement, quelques évidences suggéreraient une susceptibilité génétique à la différenciation des Th0 en Th1 ou Th2. En effet, l'allergie semble être une condition influencée par des loci génétiques, se situant sur les chromosomes 5q et 11q humains. De plus, dans la majorité des cas d'auto-immunité chez l'humain, on soupçonne une responsabilité génétique des « Human Leukocytes Antigen MHC allèles » (HLA) (Abbas *et al.* 1996).

Tableau II : Caractéristiques des profils cellulaires Th1 et Th2 des lymphocytes T pulmonaires.

Th1	Th2
IFN- γ ; IL-2	IL-4; IL-5
Macrophages ; TCD8+	IgE
Immunité à médiation cellulaire	Immunité humorale
Défense contre organismes intracellulaires	Défense contre organismes extracellulaires
Maladies autoimmunitaires	Conditions allergiques

MÉTHODES D'ÉVALUATION DES PROFILS

HYBRIDATION IN SITU

La détection des cellules rares contenant des séquences spécifiques d'acide nucléique, se faisait ardue, à cause du faible nombre de copies de séquences spécifiques, de la variation de la spécificité des séquences, ainsi que de l'incapacité à isoler ces cellules de populations hétérogènes. Le besoin d'identifier quels types de cellules contiennent une séquence spécifique d'acide nucléique dans les échantillons tissulaires, a donné naissance aux techniques d'hybridation *in situ*, lesquelles représentent des homologues histochimiques des analyses « Northern et Southern blot », en biologie moléculaire. (Hamid *et al.* 1991)

Tout d'abord, l'hybridation *in situ* est la localisation cellulaire de séquences d'acides nucléiques spécifiques (ADN ou ARN), en utilisant un brin complémentaire identifié. En effet, ces techniques quantitatives nous permettent de détecter des séquences spécifiques d'acide nucléique, présentes dans des chromosomes préservés morphologiquement, des cellules ou des sections tissulaires. De plus, en combinaison avec la technique d'immunocytochimie, l'hybridation *in situ* devient capable de définir l'information microscopique de l'activité des gènes, au niveau de l'ADN, de l'ARNm et des protéines.

Trois grandes étapes constituent la technique d'hybridation *in situ* : l'étape de l'hybridation, c'est-à-dire, du contact de la sonde avec les cellules, l'étape des lavages pour éliminer les hybridations non spécifiques et finalement, l'étape d'autoradiographie, pour mettre en évidence les hybridations spécifiques.

Plusieurs types de sondes sont disponibles pour détecter l'ARNm, tels : le brin simple ou double d'ADN, les oligonucléotides et les sondes complémentaires

d'ARN. L'utilisation de sondes d'ARN comporte plusieurs avantages sur d'autres types de sondes : la possibilité de synthétiser des sondes de tailles constantes et ne comportant pas de séquences de vecteurs, la grande stabilité et affinité thermiques des hybrides ARN-ARN et finalement, la capacité de l'Rnase de supprimer les sondes non hybridées au stade des lavages. Tout ceci favorise donc une grande sensibilité et spécificité des sondes complémentaires d'ARN. Ce n'est qu'en 1984 qu'on décrit une technique d'hybridation *in situ* utilisant des sondes anti-sens d'ARN, générées à partir de vecteurs de plasmide spécifiques. Le fragment d'ADN complémentaire inséré dans l'orientation inverse d'un promoteur bactériophage. Ainsi, avec la présence d'une ARN polymérase spécifique, le fragment d'ARN complémentaire anti-sens peut être synthétisé et utilisé pour générer des hybridations (ARNc-ARNm) dans chaque cellule (Cox *et al.* 1984).

La technique d'hybridation *in situ* a été introduite pour la première fois, il y a une vingtaine d'années, par (John *et al.* 1969). À cette époque, seuls les radioisotopes étaient utilisés pour marquer les acides nucléiques, et l'autoradiographie était le seul moyen utilisé pour détecter les séquences hybridées.

Au cours des années suivantes, le clonage moléculaire des acides nucléiques, ainsi que les techniques de marquage, furent perfectionnés. Maintenant, la détection *in situ* radioactive d'un faible nombre de molécules d'ARNm dans chaque cellule, devient possible (Singer *et al.* 1986). De plus, on utilise également des oligonucléotides synthétisés chimiquement et marqués radioactivement, pour la détection *in situ* de l'ARNm (Singer *et al.* 1986).

Cependant, malgré la grande sensibilité et la vaste étendue des techniques d'hybridation *in situ*, leurs utilisations se limitent davantage à la recherche expérimentale. Les problèmes associés avec les sondes radioactives, leurs temps de vie limités et les mesures de sécurité à prendre, font de l'hybridation *in situ*, une technique limitée au travail de laboratoire.

Tout récemment, la modification des sondes d'acide nucléique, par un marquage stable non radioactif, enlève bien des obstacles à l'application et à l'accessibilité de la technique d'hybridation *in situ*. Il existe donc des méthodes alternatives non radioactives d'hybridation *in situ*, incorporant l'utilisation d'anticorps avec les systèmes de détection, augmentant ainsi la flexibilité de la technique.

On distingue deux types de méthodes d'hybridation non radioactives : les procédures directes et indirectes. De façon générale, dans les méthodes directes, la molécule de détection est liée directement à la sonde d'acide nucléique, et donc, les hybridations peuvent être immédiatement visualisées au microscope.

Quant aux méthodes indirectes, on couple aux sondes, mais de façon enzymatique cette fois, la molécule de détection, ce qui rend les hybridations détectables par affinité cytochimique. De plus, la molécule de détection se doit d'être disponible pour les anticorps. Les exemples les plus célèbres de cette méthode sont : le système biotine-streptavidine et le système digoxigénine. Dans le dernier système, on peut en effet déterminer l'expression de l'ARNm au niveau unicellulaire, en marquant chimiquement à la sonde d'acide nucléique désirée, la molécule de digoxigénine, pour ensuite diriger des anticorps couplés à la phosphatase alcaline, contre cette molécule.

Cependant, les techniques d'hybridation *in situ* possèdent leurs limites et connaissent une efficacité réduite à évaluer un bas niveau d'expression d'acide nucléique. De rares séquences d'acide nucléique peuvent donc être détectées *in vitro*, en utilisant les techniques quantitatives de RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) (Swiderski 1999).

MÉTHODE DU RT-PCR

La quantification de l'ARNm de cytokines utilisant la méthode du RT couplée à celle du PCR, est devenue une pierre angulaire dans l'étude de la régulation de cytokines (Swiderski 1999). En effet, il s'agit d'une procédure quantitative et rapide pour l'amplification *in vitro* d'un segment spécifique d'ADN dans laquelle une réaction en chaîne se produit et où les produits d'un cycle d'amplification servent de substrats au cycle suivant (Swiderski 1999).

ASTHME HUMAIN PROFIL Th2

Si les lymphocytes T interviennent dans les phénomènes d'inflammation pulmonaire, ce sont précisément les lymphocytes produisant de l'IL-4 et l'IL-5, c'est-à-dire les lymphocytes Th2 (Platts-Mills 1992). De plus les lymphocytes T CD4+, présents dans les voies respiratoires des sujets asthmatiques, expriment un éventail de cytokines, incluant : IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 et GM-CSF, indiquant que ces lymphocytes appartiennent au type Th2 (Chung *et al.* 1999) citant (Broide *et al.* 1991; Hamid *et al.* 1991). En effet, chez des sujets asthmatiques, l'ARN messager codant pour l'IL-5 fut détectée par HIS, dans les biopsies de muqueuses bronchiques, ainsi que dans les lymphocytes T des lavages broncho-alvéolaires (Hamid *et al.* 1991; Robinson *et al.* 1992; Corrigan 1993). Une autre étude montre une augmentation du nombre de lymphocytes T, exprimant l'ARNm d'IL-4 et d'IL-5, dans les cellules recueillies par lavage broncho-alvéolaire de patients asthmatiques, suivant une exposition d'allergènes (Robinson *et al.* 1993). Par contre, la production d'IFN- γ (profil Th1) des lymphocytes TCD4+ des patients asthmatiques se trouve diminuée, et ce, parallèlement à l'augmentation de la sévérité de la maladie (Koning *et al.* 1997; Leonard *et al.* 1997). L'IFN- γ possède donc un effet modulateur des réponses de nature allergique (Chung *et al.* 1999). Ces nombreuses évidences suggèrent un mécanisme d'expression des gènes des cytokines du profil Th2 dans l'asthme allergique chez l'humain (Robinson *et al.* 1992).

PROBLÉMATIQUE DU « SOUFFLE »

Un obstacle actuel majeur à l'identification de la nature exacte du « souffle », réside dans l'absence d'anticorps anti-IgE et anti IL-5, IL-4 et IFN- γ équins, disponibles commercialement. En effet, des tests diagnostiques aux réponses dépendantes d'IgE, requièrent des produits anti-IgE, de même que des IgE purifiées. L'inexistence actuelle de ces molécules est due à la très faible concentration d'IgE présente dans le sérum des mammifères. Il s'avère aussi très difficile de purifier des IgE suivant les méthodes traditionnelles de purification de protéines. De plus, chez l'humain et la souris, ces techniques furent facilitées par la présence de cellules plasmacytomes sécrétant des IgE. Par contre, ces néoplasmes sont rares ou inexistantes, dans l'espèce équine, ce qui rend les procédures de purification des IgE quasi impossibles (Navarro *et al.* 1995).

MÉTHODOLOGIE

ANIMAUX

Douze chevaux adultes, dont 10 femelles et 2 mâles de races variées furent utilisés pour l'étude. Tous les chevaux furent maintenus au pâturage pendant une période de 6 mois et nourris avec des suppléments de grains, lorsque nécessaire. De plus, de la totalité des chevaux, la moitié était affectée de « souffle », et l'autre moitié représentait le groupe « contrôle », c'est-à-dire exempts de maladies respiratoires, sur la base d'examens cliniques complets, de résultats de tests de fonctions pulmonaires et de tests cytologiques obtenus sur des lavages broncho-alvéolaires. De plus, un examen physique, biochimique et sanguin complet, ainsi qu'une endoscopie des voies respiratoires supérieures furent réalisés antérieurement à l'étude, sur tous les chevaux, afin d'exclure toutes conditions médicales concomitantes. Finalement, l'ensemble des chevaux furent vaccinés et vermifugés régulièrement, avant et durant toute la durée de l'expérimentation. Il est également important de mentionner que les chevaux furent préalablement acclimatés aux manipulations dans le travail, ainsi qu'au port du masque facial.

Les chevaux étaient inclus dans le groupe des chevaux atteints du « souffle », sous la base de deux critères principaux : une pression transpulmonaire (ΔP_L) > 15 cm d' H_2O / L / seconde et afficher un pourcentage minimum de 15 % de neutrophiles dans le liquide du lavage broncho-alvéolaire, lorsqu'exposés à du foin poussiéreux. Les chevaux étaient considérés normaux, lorsque ces derniers ne montraient pas d'antécédent de maladies respiratoires ou ne montraient pas de signe clinique de la maladie, suite à une exposition prolongée au foin. L'âge et le poids moyen des chevaux sains et affectés de « souffle » étaient respectivement : 9.2 ± 2.7 ans et 516 ± 27.4 kg pour le groupe contrôle, et 15.7 ± 3.1 ans et 449.5 ± 16.8 kg pour le groupe atteint de « souffle ». Aucun cheval atteint de « souffle » ne fut traité (corticostéroïdes, bronchodilatateurs et autres), dans les 6 mois précédents l'étude.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Tous les animaux furent logés dans la même écurie, tout au long du projet. Les chevaux étaient nourris deux fois par jour, avec du foin sec et des grains, et reposaient sur de la litière de paille. Afin d'assurer une exposition constante de poussière aux chevaux, du foin moisi était secoué dans l'environnement de l'écurie, et ce, deux fois par jour, pendant toute la durée du projet. Finalement, des tests de fonctions pulmonaires ainsi que des lavages bronchoalvéolaires furent réalisés sur chaque cheval, et ce, à trois temps différents : T=0 (avant que le cheval entre pour la première fois à l'écurie), T=24 (après 24 heures d'exposition à la poussière), et T=9 (après 9 jours d'exposition à la poussière). Finalement, toutes les lames furent analysées par la méthode d'hybridation *in situ*.

TESTS DE FONCTIONS PULMONAIRES

Le débit d'air était calculé, suite à des mesures obtenues à l'aide d'un pneumotachographe chauffé et d'un transducteur de pression différentielle, relié à un masque placé sur les naseaux du cheval. Ainsi, l'intégration électronique du signal du débit, permettait d'obtenir la mesure du volume courant (V_T). Pour chaque expérimentation, le système était calibré en faisant rentrer des quantités d'air connues (0 à 10 l/s) dans le pneumotachographe, à l'aide d'une soufflerie et d'un manomètre (débitmètre).

La pression transpulmonaire (P_L) était obtenue à l'aide d'un transducteur de pression différentielle, puis en soustrayant la pression oesophagienne de celle du masque. La pression oesophagienne était mesurée à l'aide d'un ballon attaché hermétiquement au bout d'un cathéter de polyéthylène (ID, 4.8 mm; OD, 7.9 mm) placé au tiers de l'œsophage et distendue de 5 ml d'air. La distance entre les naseaux du cheval et le tiers de l'œsophage était approximée visuellement et marquée sur le cathéter oesophagien. Le tracé de la pression était visualisé sur un moniteur et la position du cathéter pouvait être modifiée si nécessaire, afin de permettre des changements

maximaux de P_L durant un cycle respiratoire, ainsi que d'éliminer les artéfacts cardiaques. La longueur insérée du tube était mémorisée pour chaque cheval, et conséquemment, la même longueur était utilisée pour des expériences subséquentes. Le transducteur de pression était calibré à l'aide d'un manomètre d'eau. Les signaux des transducteurs étaient amplifiés et passaient à travers un convertisseur digital - analogue, puis étaient acheminés à un ordinateur équipé d'un logiciel d'acquisition et d'analyse de données (Anadat/Labdat, RHT-Infodat, Montreal, Quebec, Canada). Ce programme permettait d'obtenir les valeurs du volume courant (V_T), de la minute de ventilation expiratoire (V_E), de la fréquence respiratoire (f), des temps inspiratoires et expiratoires (T_I et T_E) ainsi que des changements de pression transpulmonaire ΔP_L pour chaque respiration. Les valeurs de résistance pulmonaire (R_L) et d'élastance (E_L) furent obtenues en appliquant l'équation de régression multiple aux données, du modèle de compartiment simple du poumon :

$$P_L = (E_L \times V) + (R_L \times \dot{V}) + K$$

Où V est le volume, \dot{V} est le débit d'air et K est la pression transpulmonaire en fin d'expiration. Le coefficient de détermination de l'équation fut calculé pour chaque respiration. Les signaux étaient échantillonnés à une fréquence de 120 Hz pour 90 secondes, et seules les respirations valables furent retenues pour analyse.

LAVAGES BRONCHO-ALVÉOLAIRES

Pendant la durée des lavages broncho-alvéolaires, les chevaux étaient sous sédation : xylazine (0.6 to 1.0 mg/kg, IV) et butorphanol (20 to 30 μ g/kg, IV). Un endoscope flexible en fibre optique, d'une longueur de 180 cm, passe à travers les naseaux du cheval et se dirige dans le poumon droit où il s'arrête dans une bronche de même diamètre. Entre 50 et 100 ml de lidocaïne diluée (0.5%) (Astra Pharma Inc, Mississauga, Ontario, Canada) furent utilisés pour désensibiliser la muqueuse bronchiale, de la carina jusqu'au site de positionnement de l'endoscope. De multiples petits volumes de lidocaïne furent injectés à différents endroits et donc, seule une petite quantité de liquide alla dans la portion du poumon qui était lavé.

Deux bolus de 250 ml de solution de saline isotonique stérile et préchauffée étaient introduits dans la bronche et immédiatement aspirés par l'endoscope, en utilisant une pompe pour la succion et des pressions négatives de l'ordre de 50 à 100 mm de Hg. Le liquide du lavage broncho-alvéolaire était immédiatement collecté dans des récipients de verres à silicone et placés sur glace, jusqu'à une éventuelle utilisation dans un maximum de 30 minutes.

ÉVALUATION CLINIQUE

Une évaluation subjective de l'effort respiratoire était effectuée à chaque jour, et basée sur un système de points : 40 points pour la dilatation des naseaux, 20 points pour la dilatation de l'anus et 40 points pour le mouvement des muscles abdominaux, totalisant 100 points pour chaque cheval (100 = respiration laborieuse et 0 = cliniquement normal).

HYBRIDATION *IN SITU*

Un total de 10 lames par cheval, pour chaque temps (T=0, 24 et 9) fut utilisées. Sur cette série de 10 lames, 3 lames étaient consacrées à l'expression de l'ARNm pour l'IL-4, trois autres, pour l'ARNm de l'IL-5 et enfin, trois autres, pour l'IFN- γ . Ce qui nous donnait 1 lame de plus pour les imprévus.

Après avoir collecté le liquide du lavage broncho-alvéolaire et l'avoir mis sur glace, il s'agissait d'extraire une concentration de 0.5 à 1 million de cellules par ml. Donc, après avoir obtenu la concentration cellulaire recherchée, 50 à 100 μ l de solution étaient déposés sur des lames préalablement traitées au poly-L-lysine. Les lames étaient ensuite centrifugées (microcentrifugeuse, Anachemia Science, Toronto, Canada) à 1000 RPM, pendant 2 minutes, puis séchées à l'air ambiant pendant 15 minutes. Les lames étaient ensuite incubées dans de la paraformaldéhyde à 4%, pour une période de 30 minutes. Puis, deux lavages de 5 minutes chacun étaient effectués dans une solution de PBS libre d'ARNase. Les lames étaient ensuite

incubées à 37 degrés celsius, toute la nuit. Finalement, les lames étaient conservées à -80 degrés celsius, jusqu'à leur utilisation.

L'hybridation *in situ* a été effectuée comme relaté antérieurement (Ying *et al.* 1995) en utilisant des sondes anti-sens d'ARN, préparées à partir d'ADNc codant pour l'IL-4, l'IL-5 (pEQUIL4 et pEQUIL5zeo offertes par le Dr Horohov, Baton Rouge, Louisiana State University, LA, États-Unis) et l'IFN- γ équins (offerte par le Dr. Antzac, Cornell University). Ces sondes anti-sens d'ARN furent couplées à la molécule de digoxygénine (DIG), en y incorporant du DIG-1 déoxyuridine triphosphate, utilisant les promoteurs T3 et T7 et une trousse commerciale de DIG RNA (Boehringer Mannheim, Toronto, Canada), après quoi les sondes furent hydrolysées à une longueur de 300 bp, par la phosphatase alcaline. Pour l'hybridation, les cellules étaient incubées à 40 degrés celsius pendant la nuit, avec les sondes marquées d'ARN (10 μ l / lame). Les lames étaient ensuite lavées, afin de réduire le plus possible les bruits de fond, et incubées par la suite, à la température ambiante, pendant 4 heures, avec des anticorps « anti DIG » marqués à la phosphatase alcaline (Boehringer Mannheim, Toronto, Canada). Lorsque la réaction fut complétée, les lames étaient ensuite colorées à l'haématoxyline et au carbonate de lithium. Le signal d'hybridation pouvait être visualisé le jour suivant. Les hybridations entre l'ARNm des cytokines et l'ARNm complémentaire des sondes, étaient localisées dans les cellules, par des grains denses de couleur argentée. Puisqu'il n'était pas possible de compter individuellement les grains dans chaque cellule, la quantification des cellules exprimant l'ARNm des cytokines recherchées, se fit en comptant le pourcentage de lymphocytes positifs, c'est-à-dire le nombre de lymphocytes contenant les grains argentés, sur 100 lymphocytes au total. Conséquemment, la méthode utilisée ici, était une méthode semi-quantitative, c'est-à-dire nous procurant un estimé de la proportion de cellules transcrivant les gènes des cytokines dans l'échantillon, et non le nombre de copies d'ARNm par cellule.

ANALYSES STATISTIQUES

Les différences entre les groupes de chevaux, quant au nombre de cellules exprimant de l'ARNm pour l'IL-4, IL-5 et l'IFN- γ , ainsi que les différences dans les valeurs de pression pleurale (Pl), de résistance (Rl) et de pourcentages de neutrophiles à chaque temps, étaient évaluées par des tests de Mann-Whitney. Les différences de toutes ces valeurs, furent ensuite évaluées à l'intérieur de chaque groupe de chevaux, par des tests de somme de rang positif de Wilcoxon. Une valeur de probabilité de $p < 0.05$ était considérée comme un résultat significatif pour tous les tests utilisés.

**ARTICLE SOUMIS À L'AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL
AND MOLECULAR BIOLOGY**

**Analysis of temporal expression of IL-4, IL-5 and IFN- γ messenger RNA in
pulmonary lymphocytes after natural antigen challenge in an animal model of
chronic asthma.**

Marie-Eve Cordeau Bsc, Philippe Joubert DMV, Qutayba A, Hamid MD PhD,
and Jean-Pierre Lavoie DMV

*Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Quebec,
Canada and Meakins-Christie Laboratories, McGill University, Montreal, Quebec,
Canada.*

Address for correspondence : Dr. Jean-Pierre Lavoie
Faculté de Médecine Vétérinaire
Département de Sciences Cliniques
3200 Sicotte, St-Hyacinthe, CP 5000
Quebec, Canada, J2S 7C6
Tel: (450) 778-8100
Fax: (450) 778-8102
E-mail: jean-pierre.lavoie@umontreal.ca

Short title: Th1 and Th2 cytokines in chronic lung inflammation

Abstract

Helper T lymphocytes (Th2)-type cytokines have been implicated in asthma but their contribution to chronic pulmonary inflammation is poorly understood due to the lack of an appropriate animal model. Heaves is a naturally occurring disease of horses that shares many similarities with chronic asthma. To investigate the role of Th1 and Th2 cytokines in chronic pulmonary inflammation, we studied the pulmonary mechanics, bronchoalveolar lavage (BAL) cell cytology, and cytokine mRNA expression of interleukin (IL)-4, IL-5 and interferon (IFN)- γ of horses with heaves (n=6) and control (n=6) before and after 24 hours and 9 days of continuous natural inhalation challenge. Starting at 24 hours, horses with heaves had a significant increase in pulmonary resistance (R_L), BAL neutrophils, and the number of lymphocyte expressing mRNA for IL-4 and IL-5. The mRNA expression of IL-4 and IL-5 were further increased at 9 days, at which time the number of cells positive for IFN- γ mRNA was also decreased. IL-4, IL-5 and IFN- γ were correlated in with the percentage of BAL neutrophils and R_L following inhalation challenge. In control horses BAL neutrophilia and decreased expression of IFN- γ at 24 hours were the only significant findings. These results suggest that Th2-type cytokines contribute to airway dysfunction and inflammation during chronic allergic lung diseases and that heaves in horses is a suitable model to study the immunological events occurring in the lung under chronic inflammatory conditions.

Introduction

Asthma is characterized by intermittent airway obstruction, chronic bronchial inflammation and airway hyperresponsiveness. It is now recognized that T cells, particularly the CD4⁺T cells, play a key role in coordinating the asthmatic late phase response. The underlying mechanisms by which T cells initiate and propagate the inflammatory response include the elaboration of cytokines, chemokines, and the direct interaction with other pulmonary leukocytes.(Lee *et al.* 2001). The Th2-type cytokines, such as IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13, appear to be fundamental for asthmatic inflammatory response in asthma (Robinson *et al.* 1992 ; Humbert *et al.*1997;Ying *et al.* 1995) and may account, directly or indirectly, for all hallmarks of asthmatic inflammation, including airway remodeling (Romagnani, 2000). The possible roles of Th2 cytokines in acute inflammation have been extensively studied in rodent models where it has been shown that they are necessary for the development of the late asthmatic response. In contrast to human asthma, spontaneous bronchoconstriction and persistent bronchial obstruction lasting days to months does not occur in the current animal models of asthma (Bice *et al.* 2000) which has limited our understanding of the immunological mechanisms implicated in following chronic antigenic exposure (Fernandes *et al.* 2001).

Heaves is a disease of horses that shares many features of human asthma, including lower airway inflammation, reversible airflow obstruction and bronchial hyperreactivity (Robinson *et al.* 2001). Affected animals exhibit clinical signs similar to those of asthmatics, including cough, exercise intolerance, wheezes and, in severe cases, labored breathing. Clinical remission of heaves affected horses can be induced by removal of the offending antigens from the environment of susceptible horses. Heaves develops over a period of years and therefore offers a unique model to study the respiratory system under chronic inflammatory conditions.

We had previously shown that horses with heaves express a predominant Th2-type cytokine profile after months of natural antigenic stimulation (Lavoie et al. 2001). We now seek to study the temporal mRNA expression of the Th1-type cytokine IFN- γ and Th2-type cytokines IL-4 and IL-5 following acute and chronic antigenic exposure and investigate how they relate to the development of the airway inflammation and obstruction.

Materials and methods

All experimental procedures were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council for Animal Care and were approved by the Animal Care Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal.

Animals

Twelve adult horses, ten mares and two geldings of mixed breed, were used for this study. Means (\pm sem) of age and body weight of heaves affected horses and control horses were 15.7 ± 3.1 years and 449.5 ± 16.8 kg and 9.2 ± 2.7 years and 516.0 ± 27.4 kg respectively. Six horses were diagnosed as affected by heaves and six horses were considered free of respiratory disease (controls) on the basis of history, complete clinical exam, and historical results of pulmonary function and bronchoalveolar lavage (BAL) cell cytology. A complete physical examination, upper airway endoscopy, complete blood count and biochemistry profile were performed prior to the study to exclude the presence of concomitant medical conditions. Horses were vaccinated and dewormed regularly and conditioned to stand in a stock wearing a face mask.

To be included in the heaves group, horses had to have a minimal transpulmonary pressure change of 15 cm of H₂O and a percentage of neutrophils above 15% in their BAL fluid cytology. No treatments, other than anthelmintic and vaccination, were administered to the horses in the six months prior to the study.

All the horses were pastured for > 3 months and supplemented with grain when needed, prior to the study. The animals were then stabled in the same barn for the duration of the experiment. Once stabled, horses were fed with dry timothy hay and sweet feed twice a day and bedded on straw. Moldy hay was also shaken in front of the horses heads twice daily. This management remained the same throughout the period of the study.

Pulmonary function tests

Respiratory mechanics measurements were performed as previously described. (Jean *et al.* 1999) In brief, flow rate was obtained by using a heated pneumotachograph and associated differential pressure transducer fitted into a mask that was placed over the horse's nose. For each trial, the system was calibrated by forcing known air flows (0-10 l/s) through the pneumotachograph using a blower-rotameter. Transpulmonary pressure was obtained using a differential pressure transducer and subtracting the esophageal pressure from the mask pressure. The esophageal pressure was measured with a balloon, sealed over the end of a polyethylene catheter placed in the distal third of the esophagus. The pressure transducer was calibrated using a water manometer. The signals from the transducers were amplified and passed through a digital/analogue converter to a computer equipped with data acquisition and analysis software (RHT-Infodat, Montreal, Quebec, Canada). The signals were sampled at a frequency of 120 Hz for 90 s and all valid breaths were used for analysis. Values of pulmonary resistance (R_L) and elastance (E_L) were obtained by applying the multiple regression equation for the single compartment model of the lung to the data:

$$P_L = (E_L \times V) + (R_L \times \dot{V}) + K$$

Where V is the volume, \dot{V} is the airflow, and K is the transpulmonary end-expiratory pressure. The coefficient of determination for the fit of the equation to the data was calculated for each breath.

Bronchoalveolar lavage

Bronchoalveolar lavages were performed in horses as previously described (Tremblay *et al.* 1993). Horses were sedated with xylazine (0.6 to 1.0 mg/kg, IV, Bayers, Toronto, Ontario, Canada) and butorphanol (20 to 30 μ g/kg, IV; Ayers, Montreal, Quebec, Canada). A fiber-optic flexible endoscope was passed through the nares and directed down into the right lung until its tip was wedged in the wall of

a bronchus. Dilute (0.5%) lidocaine (Astra Pharma Inc, Mississauga, Ontario, Canada) was used to anaesthetize the bronchial mucosa from the carina to the wedge site. Two boluses of 250 ml of prewarmed sterile isotonic saline solution were rapidly instilled in the bronchus and then immediately aspirated, via the endoscope's biopsy channel, using a suction pump and vacuum pressure ranging from 50 to 100 mm of Hg. The BAL fluid was collected in siliconized glass vessels and kept on ice until further analysis, which was carried out within 30 minutes of sample collection.

Cytologic preparations for *in situ* hybridization

To detect IL-4, IL-5 and IFN- γ mRNA, the technique of *in situ* hybridization (ISH), using digoxigenin-labeled cRNA probes, was used as previously described (Hamid *et al.* 1991). Cytospin slides were prepared from BAL fluid on poly-L-lysine-coated glass slides, fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min, and washed with PBS prior to processing. The slides were then baked overnight at 37°C and stored at -80° C until assayed. *In situ* hybridization was performed using antisense riboprobes prepared from cDNAs coding for equine IL-4, IL-5 (pEQUIL4 and pEQUIL5zeo were kindly provided by Dr Horohov, Baton Rouge, Louisiana State University, LA, USA), and IFN- γ mRNA (kindly provided by Dr Antczak, Cornell University, Ithaca, NY, USA). Antisense RNA probes were labeled with digoxigenin (DIG) by incorporating DIG-1 deoxyuridine triphosphate, using T3 and T7 promoters, and a DIG RNA labeling kit (Boehringer Mannheim, Toronto, Canada) after which they were hydrolyzed to a length of 300 bp by alkaline phosphatase (Ying *et al.* 1995) For hybridization, the cells were incubated overnight at 40°C with labeled RNA probes. The slides were then washed and incubated 4 hours at room temperature with alkaline phosphatase-labeled anti-DIG Ab (Boehringer-Mannheim, Toronto, Canada) When the reaction was complete, slides were counterstained with haematoxylin and lithium carbonate. Slides were coded of positive lymphocytes using 40 magnification with an eyepiece graticule.

Experimental protocols

Pulmonary function tests and BAL were performed on each horse when they were pastured for a period > 3 months (baseline) to induce clinical remission, and again at 24 hours and 9 days after stabling and exposure to moldy hay, as described above.

Pulmonary function test and BAL were performed on each horse during clinical remission (baseline) and then again at 24 h and 9 d after stabling and exposure to moldy hay, as described above.

Statistical analysis

Differences between groups were determined at each time period using Mann-Whitney U test. Differences within groups were compared to baseline using Wilcoxon Signed Rank Test. Correlations between R_L , neutrophil percentages in BAL, and the number of cells expressing positive hybridization signals for cytokine mRNA were made using the Spearman's rank correlations test. Differences were considered significant when P values were less than 0.05. Data are expressed as means \pm 1 standard error (SEM).

Results

Heaves susceptible horses were in clinical remission at baseline as indicated by the lack of significant differences between groups in R_L and E_L values (Figures 1) and in BAL cell parameters (Table II). Inhalation challenge resulted in airway obstruction in heaves susceptible horses which was associated with clinical signs such as cough, increased respiratory effort (data not shown), and the significant increase in E_L at 24 h and R_L and E_L at 9 days, when compared to baseline (Figure 1). In contrast, there was no evidence of altered lung function in control horses when stabled and exposed to mouldy hay. A pulmonary neutrophilia developed in horses from both groups after continued inhalation challenge (Figure 2), although it was severely pronounced

($p < 0.05$) in heaves affected horses after both 24 hours and 9 days of natural challenge.

The expression of mRNA for IL-4, IL-5 and IFN- γ were similar in horses from both groups at baseline (Figure 3). After 24 h of antigen exposure, heaves-affected horses had increased number of lymphocytes expressing IL-4 and IL-5 mRNA compared to baseline. The expression of IL-4 and IL-5 were further increased at 9 days compared to 24h values. By contrast, no significant differences was observed in the control group in the number of lymphocytes expressing mRNA for IL-4 and IL-5 at any time period. The number of cells with positive expression for IFN- γ mRNA was insignificantly decreased at 24 h ($p = 0.07$) but reached significance ($p = 0.03$) after 9 days of natural challenge in heaves susceptible horses (Figures 3c). The mRNA expression of IFN- γ in the control group, was significantly decreased at 24 h but returned to baseline values at 9 days.

There was a positive correlation between R_L and the number of cells expressing mRNA for IL-4 ($r = 0.706$, $p = 0.019$) and IL-5 ($r = 0.689$, $p = 0.022$) at 24 hours, and IL-4 ($r = 0.748$, $p = 0.013$) and IL-5 ($r = 0.715$, $p = 0.018$) at 9 days. Also at 9 days, R_L was negatively correlated with IFN- γ ($r = -0.923$, $p = 0.002$). The percentage of neutrophils in BAL was positively correlated with IL-4 ($r = 0.717$, $p = 0.017$), IL-5 ($r = 0.614$, $p = 0.042$) and negatively correlated with IFN- γ ($r = -0.797$, $p = 0.008$).

Discussion

Pulmonary cells of human asthmatics have an increased expression of Th2-type cytokines (Robinson *et al.* 1992; Ying *et al.* 1995) and cumulative evidences support their role in chronic airway inflammation in asthma. Heaves mimics the chronic inflammatory pulmonary response seen in asthmatic patients and was used in the present study to examine the temporal expression and regulation of the Th2-type response following chronic antigenic stimulation (Coleman, 1999; Fernandes *et al.* 2001). We have previously shown that clinical cases of heaves, similarly to human

asthmatics, present a predominant pulmonary Th2-type cytokine response (Lavoie *et al.* 2001). In the present study, we confirmed and extended these findings and shown that the kinetics, as well as the profile of mRNA for cytokines, are distinct in heaves susceptible horses compared to controls. Also, the Th2 bias increased over time indicating that the study of the Th2 response using a model of acute antigen challenge, may underestimate the cytokine response seen in chronic asthmatics. Th2-type cytokine mRNA expression and the development of airway obstruction in susceptible animals were concurrent events (positively correlated) supporting the concept that Th2-type cytokines contribute to airway dysfunction during allergic lung diseases.

To study the contribution of Th1 and Th2 cytokines in asthma, a number of animal models of acute allergen challenges have been developed. However, the loss of inflammatory responses in rodents following chronic antigenic exposure has limited our current understanding of the immunological events linked to chronic asthmatic response (Fernandes *et al.* 2001). In the present study, horses that were continuously maintained in an antigen rich environment for 9 days developed clinical signs of lower airway diseases, airway obstruction, and increases in the number of BAL lymphocytes expressing mRNA for IL-4 and IL-5 and a decrease in IFN- γ . These findings are reminiscent of the clinical features and the Th2 response seen in chronic asthmatics subjects (Robinson *et al.* 1992; Ying *et al.* 1995).

Despite years of previous antigenic stimulation, there was no evidence of a polarized Th2-type response in heaves susceptible horses when they were in clinical remission. The rapid increase in the number of cells expressing Th2-type cytokines mRNA following antigenic stimulation in the present study, has also been observed in atopic asthmatics 24 hours after an inhalation challenge (Prieto *et al.* 2001) and may be explained by several mechanisms. One possible explanation may be that allergen challenge triggers the upregulation of the transcription of cytokine genes in resident BAL lymphocytes already committed to a Th2 response. Although *in situ* hybridization is a sensitive technique, the number of copies for IL-4 and IL-5 mRNA

in committed cells may have been below detection levels in a some BAL lymphocytes at baseline. Alternatively, committed Th2-type lymphocytes present in blood or lung tissue may have preferentially reached the airway lumen following antigenic exposure. Finally, T cells that infiltrates the airway early, following allergen challenge, may be attracted non-specifically and then acquire a Th2-type phenotype as a result of their antigen specificity and the influence of the microenvironment. Additional studies would be required to determine the tissue origin of cells expressing Th2-type cytokine mRNA following challenge.

The concept that inflammation in asthma arises from an imbalance between Th1 and Th2 cells has also focused the attention on Th1-type cytokine IFN- γ (Busse *et al.* 2001). In mouse, interferon- γ inhibits the differentiation of naive Th cells to Th2 cells and the synthesis of IgE, while a lack of IFN- γ induce a Th2-type cytokine pathway and promote allergic inflammation (Romagnani, 2000). However, the study of human asthmatics indicate that the role of IFN- γ in asthma may be more complex than suggested by these hypothesis and remain a subject of debate. Some studies have found that the level of IFN- γ are decreased in asthmatics (Krug *et al.* 2001; Kuo *et al.* 2001; Virchow *et al.* 1995) or that asthmatics have a decreased Th1/Th2 ratio (Bentley *et al.* 1993; Kuo *et al.* 2001) supporting a Th2 bias. Conversely, others have found either no changes (Robinson *et al.* 1992; Robinson *et al.* 1993; Ying *et al.* 1995; Prieto *et al.* 2001) or even increases (Krug *et al.* 1996; Cembrzynska-Nowak *et al.* 1993) in the levels of IFN- γ in asthmatics. However, there are considerable differences between studies in the method of antigen exposure, time of sampling and tissue evaluated and means of measuring cytokines. In the present study, the expression of IFN- γ mRNA by lymphocytes varied according to the health status of the horses (heaves vs controls) and time (before and duration of exposure), which may explain some of the inconsistencies in the results between the studies of IFN- γ in human asthmatics noted above. For instance, there were no significant changes in the number of cells expressing IFN- γ mRNA in BAL of heaves affected horses following acute (24 hours) allergen challenge compared to those of baseline. These results would argue against the contribution of IFN- γ in

heaves. However, when all three time periods are considered, the number of cells expressing mRNA for IFN- γ decreased over time after allergen challenge in heaves affected horses. This, combined with the increased number of cells expressing IL-4 and IL-5 mRNA, would support the concept that allergic lung disease may be the result of a bias Th2-type response.

Chronic inflammation plays a central role in asthma and variations of the airway phenotype may be the results of remodeling-induced structural changes in the airway (Elias, 2000; Amin *et al.* 2000). In the past few years, it has been recognized that neutrophils are recruited and activated in the lungs of asthmatics and they may be important effector cells leading to airway obstruction, inflammation, and remodeling (Wenzel *et al.* 1999; Gibson *et al.* 2001). The finding that heaves and severe asthma share many structural changes, such as epithelial detachment and regeneration, goblet cell hyperplasia, and hyperplasia of the bronchial smooth muscles, further supports a role of neutrophils in airway remodeling (Molet *et al.* 2001; Kaup *et al.* 1990; Robinson *et al.* 2001). Neutrophils may cause lung injury by the release of numerous toxins including reactive oxygen species, proteases, lipids mediators, microbicidal products, nitric oxide, and the synthesis and secretion of new proteins, including cytokines (Monteseirin *et al.* 1996; Sampson, 2000). While the role of IL-5 on eosinophil chemotaxis and activation is well described, there is also evidence that Th2 type cytokines are implicated in the modulation of the neutrophilic inflammatory response. Injection of IL-4 into human subjects causes a neutrophilia (Gilleece *et al.* 1992) and accelerates the maturation of myelocytes to become neutrophils (Bober *et al.* 1995). Functional IL-4 receptors are present on human neutrophils and their activation leads to cytoskeletal rearrangements, novo protein synthesis, and inhibition of neutrophil apoptosis (Girard *et al.* 1997). IL-4 also stimulates neutrophil phagocytic response (Bober *et al.* 1995), enhances neutrophil-mediated bactericidal activity, induces lysozyme release, and enhances respiratory burst (Boey *et al.* 1989). In the present study the number of BAL cells expressing Th2-type cytokines were positively correlated with neutrophils after 24 hours and 9 days of stabling further supporting the possibility that these cytokines

are implicated in the chemotaxis and possibly activation of neutrophils in inflammatory lung disease.

In the present study, a pulmonary neutrophilia developed in horses from both groups after hay challenge. However it was more pronounced in heaves affected horses, suggesting that stimuli other than the Th2-type cytokines may have contributed to the migration of neutrophils into the airway lumen. Endotoxins from Gram-negative bacteria are common air contaminants and potent inducers of lung inflammation and airway neutrophilia (Thorn, 2001) and could have contributed to these findings. In a recent study, inhalation of endotoxins in concentrations similar to that found in moldy hay, induced a dose dependent airway neutrophilia which was of a greater magnitude in horses with heaves than in healthy controls (Pirie *et al.* 2001). There is also evidence that human asthmatics are more sensitive to endotoxins than healthy control subjects (Michel *et al.* 1996). It has been proposed that atopy may enhance the sensitivity to inhaled endotoxins in asthmatic subjects through CD14-mediated activation of airway macrophages and granulocytes and the subsequent release of Th2-type cytokines (Alexis *et al.* 2001). Support for this hypothesis is that asthmatics have higher levels of constitutive sCD14, the principal receptor responsible for endotoxin-induced inflammation, than controls (Alexis *et al.* 2001). Additionally, CD14 expression on pulmonary macrophages of asthmatics were positively correlated with IL-13, a Th2-type cytokine with similar features to IL-4 (Virchow *et al.* 1998).

Heaves is a disease of horses that shares many features of human asthma, including lower airway inflammation, reversible airflow obstruction and bronchial hyperreactivity. In the present study, we reported an increased expression of the Th2-type cytokines following acute (24 hours) allergen challenge in heaves susceptible horses but not in controls and an increased expression of the Th-2 type cytokine combined with a reduced number of cells expressing mRNA for IFN- γ at 9 days. The number of cells expressing IL-4 and IL-5 mRNA were also positively correlated with pulmonary resistance, while there was a negative correlation with IFN- γ supporting the concept of a dominating Th2 response in asthmatic

inflammation. These findings suggest that heaves in horses is a suitable model to study the inflammatory and immunological events occurring in the lung under chronic inflammatory conditions. The size and temperament of horses allows the sequential measurements of lung parameters, which could be used to study the kinetics of cytokine response in relation to lung inflammation and dysfunction.

Acknowledgments

This study was supported by the Fonds du Centenaire of the Université de Montréal and the Groupe de Recherche en Médecine Équine du Québec (GREMEQ).

References

Alexis N, Eldridge M, Reed W, Bromberg P, and Peden DB. CD14-dependent airway neutrophil response to inhaled LPS: role of atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:31-5.

Amin K, Ludviksdottir D, Janson C, Nettelbladt O, Bjornsson E, Roomans GM, Boman G, Seveus L, and Venge P. Inflammation and structural changes in the airways of patients with atopic and nonatopic asthma. BHR Group. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2295-301.

Bentley AM, Meng Q, Robinson DS, Hamid Q, Kay AB, and Durham SR. Increases in activated T lymphocytes, eosinophils, and cytokine mRNA expression for interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in bronchial biopsies after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;8:35-42.

Bice DE, Seagrave J, and Green FH. Animal models of asthma: potential usefulness for studying health effects of inhaled particles. *Inhal Toxicol* 2000;12:829-62.

Fernandes DJ, Xu KF, and Stewart AG. Anti-remodelling drugs for the treatment of asthma: requirement for animal models of airway wall remodelling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001;28:619-29.

Bober LA, Waters TA, Pugliese-Sivo CC, Sullivan LM, Narula SK, and Grace MJ. IL-4 induces neutrophilic maturation of HL-60 cells and activation of human peripheral blood neutrophils. *Clin Exp Immunol* 1995;99:129-36.

Boey H, Rosenbaum R, Castracane J, and Borish L. Interleukin-4 is a neutrophil activator. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:978-84.

Busse WW, and Lemanske RF, Jr. Asthma. *N Engl J Med* 2001;344:350-62.

Cembrzynska-Nowak M, Szklarz E, Inglot AD, and Teodorczyk-Injeyan JA. Elevated release of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by bronchoalveolar leukocytes from patients with bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:291-5.

Elias JA. Airway remodeling in asthma. Unanswered questions. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:S168-71.

Coleman RA. Current animal models are not predictive for clinical asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 1999;12:87-9.

Elias JA. Airway remodeling in asthma. Unanswered questions. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: S168-71.

Fernandes DJ, Xu KF, and Steward AG. Anti-remodelling drugs for the treatment of asthma: requirement for animal models of airway wall remodelling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28: 619-29.

Gibson PG, Simpson JL, and Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* 2001;119:1329-36.

Gilleece MH, Scarffe JH, Ghosh A, Heyworth CM, Bonnem E, Testa N, Stern P, and Dexter TM. Recombinant human interleukin 4 (IL-4) given as daily subcutaneous injections--a phase I dose toxicity trial. *Br J Cancer* 1992;66:204-10.

Girard D, Paquin R, and Beaulieu AD. Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem J* 1997;325:147-53.

Hamid Q, Azzawi M, Ying S, Moqbel R, Wardlaw AJ, Corrigan CJ, Bradley B, Durham SR, Collins JV, Jeffery PK, et al. Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. *J Clin Invest* 1991;87:1541-6.

Humbert M, Corrigan CJ, Kimmitt P, Till SJ, Kay AB, and Durham SR. Relationship between IL-4 and IL-5 mRNA expression and disease severity in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:704-8.

Humbert M, Durham SR, Kimmitt P, Powell N, Assoufi B, Pfister R, Menz G, Kay AB, and Corrigan CJ. Elevated expression of messenger ribonucleic acid encoding IL-13 in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:657-65.

Jean D, Vrins A, and Lavoie JP. Monthly, daily, and circadian variations of measurements of pulmonary mechanics in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res* 1999;60:1341-1346.

Kaup F-J, Drommer W, Damsch S, and Deegen E. Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) 2: pathological changes of the terminal airways and the alveolar region. *Eq Vet J* 1990;22:349-355.

Krug N, Erpenbeck VJ, Balke K, Petschallies J, Tschernig T, Hohlfeld JM, and Fabel H. Cytokine profile of bronchoalveolar lavage-derived CD4(+), CD8(+), and gammadelta T cells in people with asthma after segmental allergen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:125-31.

Krug N, Madden J, Redington AE, Lackie P, Djukanovic R, Schauer U, Holgate ST, Frew AJ, and Howarth PH. T-cell cytokine profile evaluated at the single cell level in BAL and blood in allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;14:319-26.

Kuo ML, Huang JL, Yeh KW, Li PS, and Hsieh KH. Evaluation of Th1/Th2 ratio and cytokine production profile during acute exacerbation and convalescence in asthmatic children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;86:272-6.

Lavoie JP, Maghni K, Desnoyers M, Taha R, Martin JG, and Hamid QA. Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1410-1403.

Lee NA, Gelfand EW, and Lee JJ. Pulmonary T cells and eosinophils: coconspirators or independent triggers of allergic respiratory pathology? *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:945-57.

Michel O, Kips J, Duchateau J, Vertongen F, Robert L, Collet H, Pauwels R, and Sergysels R. Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1641-6.

Molet S, and Hamid Q. 2001. Role of airway remodeling in severe asthma. In S. J. S. a. D. Y. Leung, editor. *Severe Asthma*, 2nd edition. Marcel Dekker, Inc., New York. 89-124.

Monteseirin J, Camacho MJ, Gutierrez D, Llamas E, Guardia P, Bonilla I, Sanchez-Monteseirin H, and Conde J. Neutrophils and allergy. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1996;24:193-200.

Pirie RS, Dixon PM, Collie DD, and McGorum BC. Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses. *Equine Vet J* 2001;33:311-8.

Prieto J, Van Der Ploeg I, Roquet A, Gigliotti D, Dahlen B, Eklund A, and Grunewald J. Cytokine mRNA expression in patients with mild allergic asthma following low dose or cumulative dose allergen provocation. *Clin Exp Allergy* 2001;31:791-800.

Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, and Kay AB. Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992;326:298-394.

Robinson DS, Ying S, Bentley AM, Meng Q, North J, Durham SR, Kay AB, and Hamid Q. Relationships among numbers of bronchoalveolar lavage cells expressing messenger ribonucleic acid for cytokines, asthma symptoms, and airway methacholine responsiveness in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:

Robinson NE. International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University 16-18 June 2000. *Equine Vet J* 2001;33:5-19.

Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;85:9-18.

Sampson AP. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin Exp Allergy* 2000;30 Suppl 1:22-7.

Thorn J. The inflammatory response in humans after inhalation of bacterial endotoxin: a review. *Inflamm Res* 2001;50:254-61.

Tremblay GM, Ferland C, Lapointe J-M, Vrins A, Lavoie JP, and Cormier Y. Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses. *Eq. Vet J.* 1993;25:194-197.

Virchow JC, Jr., Julius P, Matthys H, Kroegel C, and Luttmann W. CD14 expression and soluble CD14 after segmental allergen provocation in atopic asthma. *Eur Respir J* 1998;11:317-23.

Virchow JC, Jr., Walker C, Hafner D, Kortsik C, Werner P, Matthys H, and Kroegel C. T cells and cytokines in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:960-8.

Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, and Chu HW. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1001-1008.

Ying S, Durham SR, Corrigan CJ, Hamid Q, and Kay AB. Phenotype of cells expressing mRNA for TH2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and TH1-type (interleukin 2 and interferon gamma) cytokines in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatic and normal control subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:477-487.

Abbreviations

BAL :	Broncho-alveolar lavage
CD :	Cluster of differentiation
Cdyn :	Dynamic compliance
DIG :	Digoxigenin
DNA :	Desoxyribonucleique acid
EL :	Pulmonary elastance
f :	Respiratory frequency
FCR :	Fonctionnal residual capacity
ISH :	<i>In Situ</i> hybridization
RNA :	Ribonucleique acid
mRNA :	Messenger ribonucleique acid
PBS :	Phosphate buffer saline
PL :	Pulmonary pressure
PLL :	Poly-L-Lysine
RL :	Pulmonary resistance
\dot{V}^- :	Flow rate
\dot{V}_E :	Minute ventilation
V _T :	Tidal volume
W :	Work of breathing

Figures legends

Figure 1. Change in the values of pulmonary resistance (R_L ; A) from baseline to 24 hours and 9 days of dusty hay exposure for horses with heaves (n=6) and control horses (n=6). * Significantly ($p<0.05$) different between groups.

Figure 2. Change in the values of pulmonary elastance (E_L ; B) from baseline to 24 hours and 9 days of dusty hay exposure for horses with heaves (n=6) and control horses (n=6). * Significantly ($p<0.05$) different between groups.

Figure 3. Percentages of neutrophils in BAL fluid at baseline and at 24 hours and 9 days of dusty hay exposure in horses with heaves (n=6) and in control horses (n=6). * Significantly ($p<0.05$) different from baseline values. † Significantly ($p<0.05$) different between groups.

Figure 4. Number of lymphocytes per hundred expressing mRNA for IL-4, in BAL cells of horses with heaves (n=6) and control horses (n=6), when heaves susceptible horses were in clinical remission (baseline) and after 24 hours and 9 days of continuous dusty hay exposure. * Significantly ($p<0.05$) different between groups.

Figure 5 a. Number of lymphocytes per hundred expressing mRNA for IL-5 in BAL cells of horses with heaves (n=6) and control horses (n=6), when heaves susceptible horses were in clinical remission (baseline) and after 24 hours and 9 days of continuous dusty hay exposure. * Significantly ($p<0.05$) different between groups.

Figure 5 b. Number of lymphocytes per hundred expressing mRNA for IFN- γ in BAL cells of horses with heaves (n=6) and control horses (n=6), when heaves susceptible horses were in clinical remission (baseline) and after 24 hours and 9 days of continuous dusty hay exposure. * Significantly ($p<0.05$) different between groups.

Table legends

Table I. Total cells count and differential cell cytology in BAL cells of horses with heaves (n=6) and control horses (n=6), at baseline and after 24 hours and 9 days of dusty hay exposure.

Figure 1. Change in the values of pulmonary resistance (R_L ; A) and pulmonary elastance (E_L ; B) from baseline to 24 hours and 9 days of dusty hay exposure for horses with heaves ($n=6$) and control horses ($n=6$). * Significantly ($p<0.05$) different between groups.

1

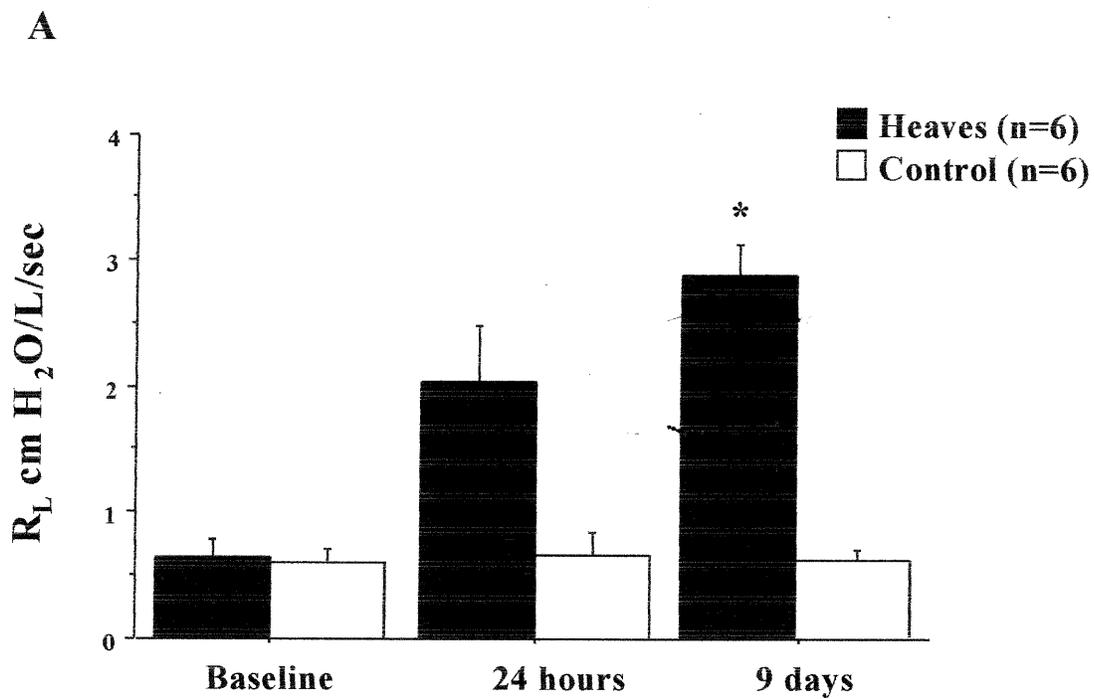


Figure 2. Change in the values of pulmonary resistance (R_L ; A) and pulmonary elastance (E_L ; B) from baseline to 24 hours and 9 days of dusty hay exposure for horses with heaves (n=6) and control horses (n=6). * Significantly ($p < 0.05$) different between groups.

1

B

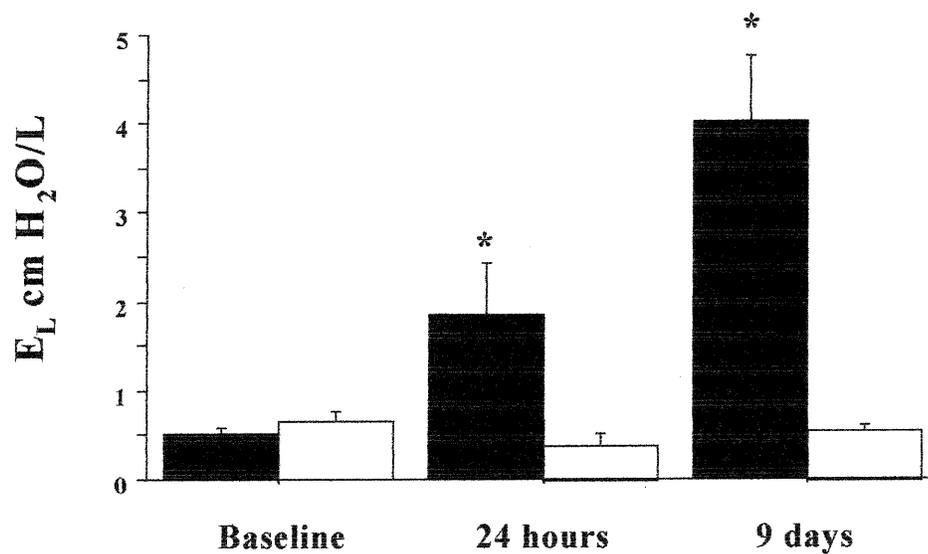


Figure 3. Percentages of neutrophils in BAL fluid at baseline and at 24 hours and 9 days of dusty hay exposure in horses with heaves (n=6) and in control horses (n=6). * Significantly ($p < 0.05$) different from baseline values. † Significantly ($p < 0.05$) different between groups.

2

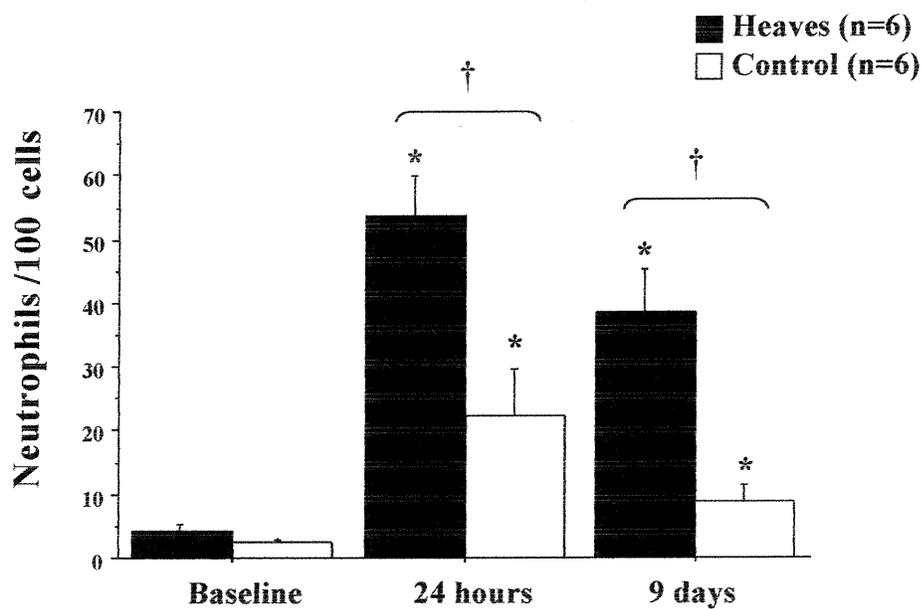


Figure 4. Number of lymphocytes per hundred expressing mRNA for IL-4 (A), IL-5 (B) and IFN- γ (C) in BAL cells of horses with heaves (n=6) and control horses (n=6), when heaves susceptible horses were in clinical remission (baseline) and after 24 hours and 9 days of continuous dusty hay exposure. * Significantly (p<0.05) different between groups.

3

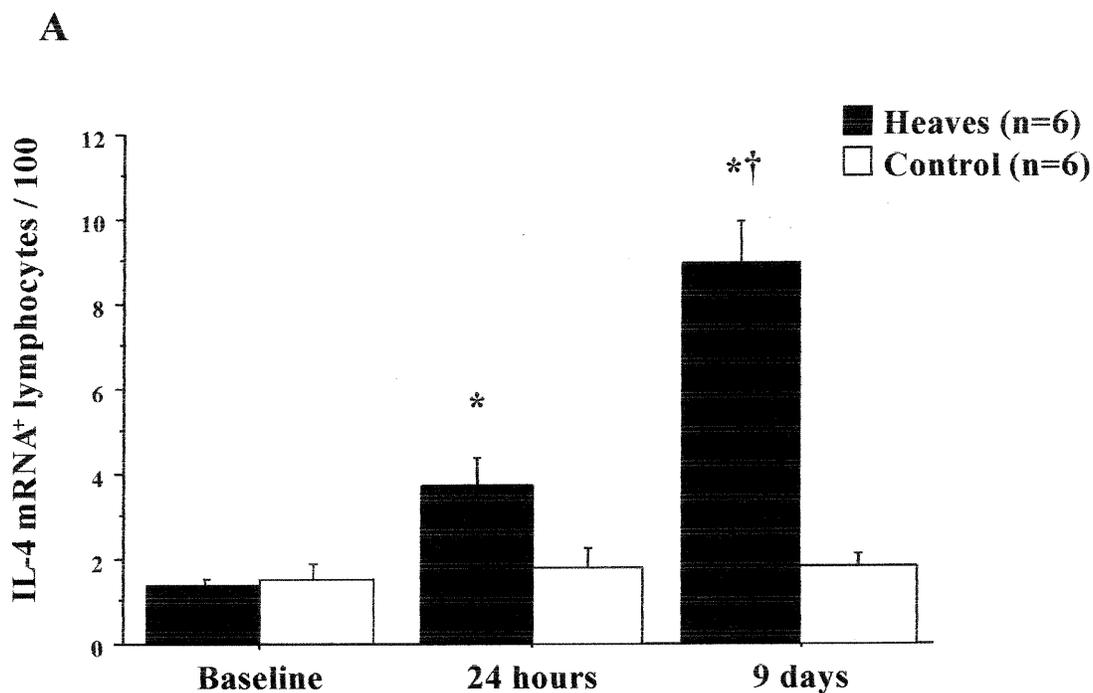


Figure 5 a. Number of lymphocytes per hundred expressing mRNA for IL-4 (A), IL-5 (B) and IFN- γ (C) in BAL cells of horses with heaves (n=6) and control horses (n=6), when heaves susceptible horses were in clinical remission (baseline) and after 24 hours and 9 days of continuous dusty hay exposure. * Significantly ($p < 0.05$) different between groups.

3

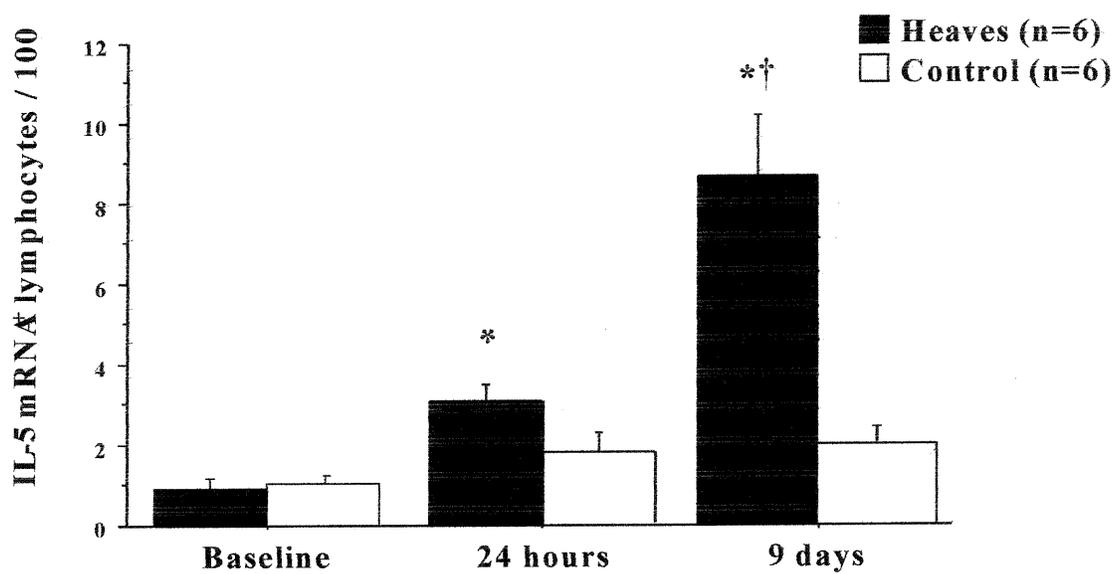
B

Figure 5 b. Number of lymphocytes per hundred expressing mRNA for IL-4 (A), IL-5 (B) and IFN- γ (C) in BAL cells of horses with heaves (n=6) and control horses (n=6), when heaves susceptible horses were in clinical remission (baseline) and after 24 hours and 9 days of continuous dusty hay exposure. * Significantly (p<0.05) different between groups.

3

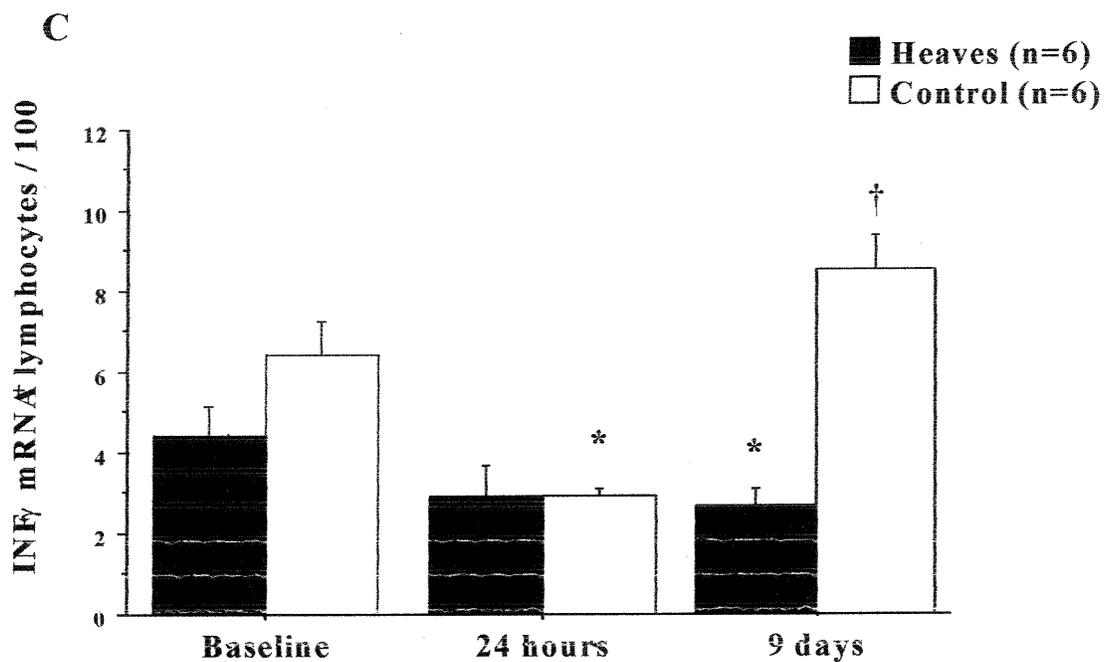


Table I. Total cells count and differential cell cytology in BAL cells of horses with heaves (n=6) and control horses (n=6), at baseline and after 24 hours and 9 days of dusty hay exposure.

		<i>Baseline</i>	24 hrs	9 days
Heaves :				
Recovery	(ml)	177,5±29,71	182,5±17,21	148,2±18,15
Total cells	(x10 ⁶)	31.2±8.64	63.8±13.41	40.8±10.44
Neutrophiles	(%)	4.2±1.28	53.7±5.99	38.4±6.69
Lymphocytes	(%)	33.0±5.78	22.7±5.98	23.8±3.08
Macrophages	(%)	62.3±5.64	22.8±4.41	36.2±7.46
Eosinophiles	(%)	0.5±0.22	0.5±0.34	1.0±0.52
Mast cells	(%)	0	0	1.0±0.42
Controls				
Recovery	(ml)	205,0±27,17	243,3±25,48	235,8±28,71
Total cells	(x10 ⁶)	38.3±4.72	73.7±12.56	84.7±13.10
Neutrophiles	(%)	2.3±0.57	22.3±7.35	9.2±2.99
Lymphocytes	(%)	40.0±2.35	23.6±0.41	23.8±3.08
Macrophages	(%)	56.8±2.77	52.8±7.73	63.5±6.33
Eosinophiles	(%)	0.3±0.33	0.6±0.27	0.5±0.34
Mast cells	(%)	1.0±0.38	1.0±0.40	1.0±0.54

DISCUSSION

Les résultats de cette étude démontrent que les chevaux atteints de « souffle » affichent un profil à prédominance Th2 de cytokines des lymphocytes T pulmonaires, comparativement aux chevaux normaux, suivant une stimulation antigénique continue. De plus, l'étude a confirmé que l'expression de l'ARNm pour l'IL-4, l'IL-5 et l'IFN- γ des lymphocytes T pulmonaires des chevaux, varie dans le temps. En effet, cette présente étude démontre que des chevaux atteints de « souffle » et maintenus dans un environnement riche en antigènes pendant 9 jours, développent des signes cliniques caractéristiques de maladies des voies respiratoires inférieures et d'une augmentation du nombre de lymphocytes pulmonaires du liquide du lavage bronchoalvéolaire, exprimant l'ARNm pour l'IL-4 et l'IL-5, accompagnée d'une diminution du nombre de lymphocytes pulmonaires positifs pour l'IFN- γ .

Ces résultats suggèrent donc que les cellules inflammatoires pulmonaires des chevaux atteints de « souffle » adoptent un profil de cytokines à dominance Th2 et ceci est en accord avec l'hypothèse que le « souffle » chez le cheval serait une affection de nature allergique (Lavoie *et al.* 2001) et partagerait de nombreuses similarités avec l'asthme chez l'humain (Lowell 1964 ; Robinson *et al.* 1996).

Les cellules de type Th1 et Th2 représentent deux formes polarisées de cellules CD4+ « T helper », médiatrices de réponses immunitaires spécifiques (Romagnani 2000). Les activités immunologiques des cytokines de type Th1, favorise l'immunité à médiation cellulaire et protège ainsi l'organisme contre les infections causées par des bactéries intracellulaires et certains virus. Conséquemment, les réponses de type Th1 servent à éliminer les pathogènes intracellulaires (O'Garra 1998).

Par contre, une réponse immunitaire à dominance Th2, favorise une immunité humorale et est essentielle à la défense contre les infestations parasitaires, tels certains nématodes gastrointestinaux et contre des parasites extracellulaires. Les

cytokines de type Th2 sont donc responsables d'une immunité dirigée contre des pathogènes extracellulaires et sont associées aux conditions allergiques (Abbas *et al.* 1996). Sachant donc qu'une infection parasitaire favorise une réponse immunitaire à dominance Th2, les chevaux de notre étude ont tous été vermifugés régulièrement et maintenus dans un même environnement, afin de prévenir l'effet de facteurs environnementaux sur les résultats.

Dans la présente étude, les niveaux d'expression d'ARN messenger pour l'IL-4, l'IL-5 et l'IFN- γ à T=0, se sont avérés identiques pour les deux groupes de chevaux gardés au pâturage. Aucune évidence n'a donc pu être soulevée, en faveur d'une réponse polarisée de type Th2 chez les chevaux atteints de « souffle », lorsque ceux-ci étaient en période de rémission clinique.

La composition cellulaire du liquide du lavage broncho-alvéolaire (moins de 5% de neutrophiles), ainsi que les valeurs de EL et de RL, sont semblables pour les deux groupes de chevaux, après avoir été gardés au pâturage pendant 6 mois. Ces résultats confirment donc l'état de rémission clinique des chevaux atteints de « souffle » dans la présente étude.

Suivant une exposition continue à du foin poussiéreux, on a pu remarquer une modification de l'obstruction des voies respiratoires chez les chevaux atteints de « souffle », par une augmentation de leurs valeurs de résistance (RL) et d'élastance (EL) pulmonaires à 24 heures, jusqu'à une augmentation encore plus marquée de ces valeurs, à 9 jours. Une augmentation significative du pourcentage de neutrophiles fut également observée, à T=24 et se maintenant jusqu'à T=9, pour les chevaux atteints de « souffle ». Ces résultats vont en accord avec ceux de la littérature stipulant que lorsque des chevaux atteints de « souffle » sont exposés à du foin poussiéreux, leurs valeurs de résistance (RL) et d'élastance (EL) pulmonaires augmentent (Tesarowski 1996), ainsi que le pourcentage de neutrophiles du liquide broncho-alvéolaire (Bain 1997). En revanche, aucune différence dans les valeurs de fonctions pulmonaires n'a pu être décelée chez les chevaux normaux, tout au long de

l'expérimentation, et ceci confirme le fait que chez les chevaux sains gardés en écurie pour une période de 9 jours, les valeurs de fonctions pulmonaires et de réactivité respiratoire restent inafectées (Derksen 1985a).

Le souffle chez le cheval est un syndrome dont l'incidence est reliée à l'âge, et généralement, elle ne se manifeste que très rarement chez les chevaux âgés de moins de 5 ans, pour être beaucoup plus fréquente chez ceux âgés de huit ans et plus (Cook 1976; Bracher *et al.* 1991). Étant donné que les moyennes d'âges obtenues pour le groupe de chevaux normaux et celui de chevaux atteints de « souffle » sont respectivement de 9 et 15 ans, on peut croire que l'effet de l'âge sur les résultats, s'est avéré faible.

Il a été démontré que le « souffle » chez le cheval, ainsi que l'asthme chez l'humain, présentent toutes deux une réponse immunitaire à dominance Th2 des lymphocytes pulmonaires (Lavoie *et al.* 2001). De plus, tandis que l'inflammation des voies respiratoires, accompagnée d'une éosinophilie est maintenant universellement acceptée et reconnue comme une caractéristique fondamentale de l'asthme humain (Gibson 2001), le « souffle » équin est plutôt caractérisé par un recrutement neutrophilique dans les sécrétions respiratoires, suivant une stimulation antigénique (Fairbairn 1993).

Dans cette étude, l'augmentation du nombre de lymphocytes pulmonaires, exprimant de l'ARN messager pour l'IL-4 et l'IL-5, coïncide avec l'augmentation du nombre des neutrophiles pulmonaires, suivant 24 heures à 9 jours d'exposition à la poussière, chez les chevaux atteints de « souffle ». Ceci mène à la possibilité que ces cytokines soient impliquées dans le recrutement et l'activation des neutrophiles, lors de maladies pulmonaires inflammatoires. En effet, on a démontré l'existence de récepteurs fonctionnels d'IL-4 (IL-4R) sur les neutrophiles humains et dont leurs activations mènent à la synthèse *de novo* protéines et à l'inhibition de l'apoptose des neutrophiles (Girard *et al.* 1997). L'IL-4 stimule également la réponse phagocytaire des neutrophiles (Bober *et al.* 1995), augmente l'activité bactéricide des neutrophiles

et induit la relâche des lysozymes (Boey *et al.* 1989). Ceci suggère l'existence de récepteurs d'IL-4 semblables sur les neutrophiles pulmonaires, retrouvés dans le liquide du LBA de chevaux atteints de « souffle », et des mécanismes identiques pourraient être impliqués dans la physiopathologie du « souffle » équin.

Dans cette étude, une neutrophilie pulmonaire s'est développée chez les deux groupes de chevaux, suite à une exposition continue au foin poussiéreux. Même si cette neutrophilie pulmonaire fut davantage marquée chez les chevaux atteints de « souffle », la neutrophilie des chevaux normaux, semble représenter un phénomène transitoire, non associé à une altération de la fonction pulmonaire. Ainsi, ces résultats suggèrent deux hypothèses : il existe plusieurs mécanismes pouvant être responsables d'une neutrophilie pulmonaire et que le « souffle » chez le cheval, entraîne un dysfonctionnement de la régulation des neutrophiles pulmonaires.

En effet, des mécanismes autres que ceux régis par des cytokines de type Th2, peuvent avoir contribué à la migration des neutrophiles dans les voies respiratoires. Une inflammation non spécifique des voies respiratoires, induite par l'inhalation d'endotoxines présentes dans le foin moisi, par exemple, pourrait être avancée (Pirie *et al.* 2001). Dans une étude récente, l'inhalation d'endotoxines à des concentrations similaires à celles retrouvées dans le foin moisi et poussiéreux, a induit une neutrophilie pulmonaire plus marquée chez les chevaux atteints de « souffle », que chez les chevaux normaux (Pirie *et al.* 2001).

Deuxièmement, le « souffle » équin pourrait entraîner une dysfonction de la régulation des neutrophiles pulmonaires. En effet, il existe peut-être un mécanisme de régulation à la baisse pour les neutrophiles pulmonaires chez les chevaux normaux, qui deviendrait « défectueux » ou inhibé par un processus immunologique quelconque, chez les chevaux atteints de « souffle ».

Cette étude portant sur la comparaison du profil de cytokines des lymphocytes pulmonaires, chez des chevaux normaux et atteints de « souffle », a permis de

trouver la dominance d'un profil cellulaire Th2, chez les chevaux atteints de « souffle », suivant une exposition antigénique. De plus, des corrélations positives ont été notées, entre l'augmentation de l'expression des cytokines de type Th2 et la dysfonction pulmonaire, chez des chevaux atteints de « souffle ».

Des corrélations significatives ont pu être observées entre l'augmentation progressive d'expression d'IL-4 et d'IL-5, dans le temps, avec une détérioration de la fonction clinique, c'est-à-dire, le développement de l'obstruction des voies respiratoires, chez les chevaux atteints de « souffle », suivant une exposition à la poussière. Ces corrélations supportent donc le concept que les cytokines de type Th2 contribuent au dysfonctionnement des voies respiratoires, durant les maladies allergiques pulmonaires. Ceci suggère une relation de « cause à effet », chez les chevaux atteints de « souffle », entre l'expression de l'IL-4 et de l'IL-5 dans le liquide du LBA, et la détérioration de la fonction clinique. Mais comment les cytokines de type Th2 peuvent affecter la fonction respiratoire ? Voici une question à laquelle cette étude ne permet pas de répondre, et c'est pourquoi d'autres études devraient être envisagées sur le sujet.

Ces résultats confirment donc l'importance de cette étude dans l'avancement de la compréhension de la pathogénèse de ce syndrome et cette étude se joint donc aux autres, dans l'avancement de la recherche pour d'éventuelles thérapies.

La manipulation des cytokines des réponses immunitaires est une source potentielle d'une éventuelle thérapie clinique équine. Même si pour l'instant, les manipulations de cytokines sur les chevaux restent théoriques ou au mieux, se situent au stade expérimental, certaines interventions basées sur les profils cellulaires Th1 et Th2 sont actuellement à l'essai clinique, en médecine humaine (Finkelman 1997).

Les lymphocytes CD4⁺ de type Th2 représentent la population prédominante s'infiltrant dans les voies respiratoires des patients asthmatiques. L'asthme et toutes les maladies allergiques sont donc dominées par des réponses immunitaires de type

Th2, où les lymphocytes Th2 augmentent dans les voies respiratoires des patients, après une stimulation antigénique. Bref, les cellules Th2 orchestrent l'ensemble de la réponse inflammatoire, caractéristique de l'asthme (Robinson *et al.* 1992).

De nombreuses études effectuées sur des souris, ont démontré qu'une fois la réponse immunitaire Th2 bien établie dans l'organisme, celle-ci devient stable et résistante aux changements. De plus, des études réalisées sur l'humain et la souris cette fois, suggèrent qu'en stimulant la réponse Th1, avant ou au début du développement de la réponse Th2, le développement de l'asthme serait aboli (Coffman 1999). Ce traitement pourrait donc être utilisé dans un esprit de prévention chez des chevaux « susceptibles » au syndrome du « souffle », mais serait difficilement envisageable pour des chevaux atteints de « souffle », où une réponse Th2 serait bien installée.

Les nouvelles stratégies au traitement de l'asthme cherchent donc à réduire l'inflammation causée par la réponse Th2 et donc, par des inhibiteurs spécifiques de l'activité des lymphocytes Th2. Les thérapies peuvent agir de trois façons, soit en redirigeant la réponse immunitaire vers un profil Th1, soit en inhibant la fonction des cellules Th2, et ce, en réduisant ou en neutralisant leur production de cytokines, ou finalement, en inhibant les effets des lymphocytes Th2, par les cellules Th1 et l'IFN- γ (Cohn 2000).

C'est par la production d'IL-4 et d'IL-13 que les lymphocytes Th2 sont de puissants activateurs de la production d'anticorps par les lymphocytes B. Le récepteur soluble et recombinant d'IL-4 (sIL-4R), est une nouvelle approche au traitement de l'asthme, qui bloque l'action des cytokines de type Th2. Ce récepteur recombinant peut s'inhaler et une fois absorbé, se lie à l'IL-4 et donc, l'IL-4 ne peut plus interagir avec son récepteur (IL-4R) à la surface cellulaire. L'activité de l'IL-4 se trouve donc annulée (Cohn 2000). Cette avenue comporterait un grand intérêt pour le traitement du « souffle » équin, en bloquant l'activité d'une cytokine importante à la contribution de la réponse Th2 dominante du syndrome du « souffle » équin.

L'IL-5 est un important facteur de la différenciation et de la maturation des éosinophiles. Plusieurs études animales relatent que l'inhibition de l'IL-5 par des anticorps neutralisants, a permis de réduire l'accumulation d'éosinophiles. Cependant, la réduction de l'éosinophilie n'a pas toujours mené à une réduction de la réponse d'hypersensibilité des voies respiratoires, caractéristique de l'asthme. Il reste donc incertain que réduire l'activité de l'IL-5 et du même coup l'accumulation d'éosinophiles, fera disparaître les symptômes de l'asthme. La même technique devra donc être expérimentée sur des humains, afin d'éliminer cette controverse (Cohn 2000). Cependant, l'IL-5 est responsable de l'accumulation éosinophilique de l'asthme, mais son rôle demeure incertain dans le syndrome du « souffle » équin, dans laquelle une neutrophilie pulmonaire est plutôt observée. L'étude de l'implication de l'IL-5 dans l'asthme équin, serait donc une priorité de recherche.

Deux dernières thérapies se basent sur la stimulation de cytokines de type Th1 : l'immunothérapie allergénique et la vaccination. La technique de l'immunothérapie se présente sous forme d'une injection cutanée d'allergènes purifiés, et réduit l'inflammation en diminuant le nombre de mastocytes et d'éosinophiles, ainsi que la production d'histamine. Ces effets sont associés à une augmentation de la production et de l'expression génétique d'IFN- γ , parfois accompagnés également d'une diminution de la production d'IL-4 et d'IL-5. On ignore le mécanisme exact de cette technique, mais celle-ci connaît du succès pour guérir certaines formes d'allergies. Malheureusement, aucun résultat satisfaisant n'a pu être remarqué dans le cas de l'asthme et on craint qu'une augmentation de l'activité des cellules Th1 par l'immunothérapie, comporte le risque potentiel d'augmenter aussi l'inflammation (Cohn 2000).

Finalement, la vaccination servant à induire une réponse Th1 dans le poumon, pourrait représenter une solution alternative à l'immunothérapie, comme traitement à l'asthme. Cette procédure consiste principalement à induire dans le poumon, un ensemble de cytokines appartenant au profil cellulaire Th1, afin de diriger les réponses immunitaires vers ce profil. Des études faites à l'aide de modèles murins,

ont trouvé une inhibition de l'inflammation suite à une vaccination immunomodulatrice faite après le développement de réponses immunitaires Th2. De plus, les CpG oligodinuéotides, sont des séquences synthétiques d'ADN bactérien stimulant les lymphocytes et les macrophages à produire des cytokines de type Th1, c'est-à-dire l'IL-12 et l'IFN- γ (Cohn 2000)

Une variante de cette technique consiste à administrer de l'interleukine-12 (IL-12), afin que la population de lymphocytes T « helper » des voies respiratoires, adoptent le profil Th1. Cette approche inhiberait donc l'hypersensibilité des voies respiratoires et l'éosinophilie causées par des sources allergéniques (Fahy 2000). Cependant, les résultats ne sont pas concluants et ne permettent pas encore de démontrer une corrélation linéaire entre l'accumulation éosinophilique et la réponse d'hypersensibilité respiratoire (Lee 2001). Il demeure également incertain que ces agents conféreront une suppression des réponses immunitaires Th2 à long terme.

CONCLUSION

Cette étude confirme donc l'apparition d'une réponse immunitaire à dominance Th2, chez les chevaux atteints de « souffle », comparativement aux chevaux normaux, suite à une exposition continue à du foin poussiéreux. De plus, l'expression des cytokines de type Th2 varient dans le temps et les profils cellulaires semblent se modifier en fonction de l'environnement. Des investigations futures devraient être entreprises sur le rôle de chaque cytokine appartenant au profil Th2, et impliquée dans la physiopathologie du « souffle » chez le cheval. Ainsi, une meilleure compréhension de l'implication exacte de ces cytokines, permettrait le développement de nouvelles thérapies.

BIBLIOGRAPHIE

Abbas, A. K., K. M. Murphy *et al.* (1996) "Functional diversity of helper T lymphocytes" Nature **383**(6603): 787-793.

Abehsira-Amar, O., M. Gibert *et al.* (1992) "IL-4 plays a dominant role in the differential development of Th0 into Th1 and Th2 cells" J Immunology **148**(12): 3820-3829.

Amdur (1958) "Mechanics of respiration in unanesthetized guinea pigs" Am J Physiol **192**: 364-368.

Ammann, V. J., A. A. Vrins *et al.* (1998) "Effects of inhaled beclomethasone dipropionate on respiratory function in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD)" Equine Vet J **30**(2): 152-157.

Armstrong, P. J., F. J. Derksen *et al.* (1986). "Airway responses to aerosolized methacholine and citric acid in ponies with recurrent airway obstruction (heaves)" Am Rev Respir Dis **133**(3): 357-361.

Bain, F. T. (1997) "Cytology of the respiratory tract" Vet Clin North Am Equine Pract **13**(3): 477-486.

Beech, J. (1981) "Intradermal skin testing in horses with chronic obstructive pulmonary disease" California Vet. **1**: 10-13.

Beech, J. (1989) "Diagnosing chronic obstructive pulmonary disease" Vet Med **84**: 614-619.

Beech, J. (1991) "Chronic obstructive pulmonary disease" Vet Clin North Am Equine Pract 7(1): 79-91.

Bendali-Ahcene (1995) "Analyse cytologique et cytofluorimétrique du lavage bronchoalvéolaire (LBA) des chevaux souffrant de bronchopneumopathies chroniques obstructives (BCPO)" Revue de Méd Vét 146(5): 349-356.

Bober, L., T. Waters *et al.* (1995). "IL-4 induces neutrophilic maturation of HL-60 cells and activation of human peripheral blood neutrophils" Clin Exp Immunol 99: 129-136.

Boey, H., R. Rosenbaum *et al.* (1989) "Interleukin-4 is a neutrophil activator" J Allergy Clin Immunol 83(5): 978-984.

Bottomly, K. (1999) "T cells and dendritic cells get intimate" Science 283(5405): 1124-1125.

Bracher, V., R. von Fellenberg *et al.* (1991) "An investigation of the incidence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in random populations of Swiss horses" Equine Vet J 23(2): 136-141.

Breeze, R. G. (1979) "Heaves. The problem of disease definition" Vet Clin North Am Large Anim Pract 1(1): 219-230.

Broide, D. H. and G. S. Firestein (1991) "Endobronchial allergen challenge in asthma. Demonstration of cellular source of granulocyte macrophage colony-stimulating factor by in situ hybridization" J Clin Invest 88(3): 1048-1053.

Brown, D. R., N. H. Moskowitz *et al.* (1997) "A role for CD4 in peripheral T cell differentiation" J Exp Med 186(1): 101-107.

Buechner-Maxwell, V. A. (1996) "Relationship of equine housing to large airway inflammation" J Equine Vet Sci **16**(11): 502-506.

Busse, W. and R. Lemanske (2001) "Asthma" N Engl J Med **344**(5): 350-360.

Chabchoub (1993) "Recherche des anticorps précipitants dirigés contre *Micropolyspora faeni*, *Aspergillus fumigatus* et des extraits totaux de foin moisi dans le sérum de chevaux atteints d'affections bronchopulmonaires chroniques en Tunisie" Revue de Méd Vét **144**(1): 49-55.

Chung, K. F. and P. J. Barnes (1999) "Cytokines in asthma" Thorax **54**(9): 825-857.

Clarke (1993) "Stable dust-threshold limiting values, exposures variables and host risk factors" Equine Vet J **25**(3): 172-174.

Coffman, R. L. (1999) "The stability and reversibility of Th1 and Th2 population" Curr Top Microbiol Immunol **238**: 1-12.

Cohn (2000) "T-helper type 2 cell-directed therapy for asthma" Pharmacol Ther **88**: 187-196.

Constant, S., C. Pfeiffer *et al.* (1995) "Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells" J Exp Med **182**(5): 1591-1596.

Constant, S. L. and K. Bottomly (1997) "Induction of Th1 et Th2 CD4+ T cell responses: The Alternative Approaches" Annu Rev Immunol **15**: 297-322.

Cook, W. R. (1976) "Chronic bronchitis and alveolar emphysema in the horse" Vet Rec **99**(23): 448-451.

Corrigan, C. (1993) "CD4 T-Lymphocyte activation in asthma is accompanied by increased serum concentrations of Interleukin-5" Annu Rev in Respir Dis **147**: 540-547.

Corrigan, C. J. and A. B. Kay (1992) "T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma" Immunol Today **13**(12): 501-507.

Cox, K., D. DeLeon *et al.* (1984) "Detection of mRNAs in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes" Dev. Biol. **101**: 485-502.

Croft, M. and S. L. Swain (1995) "Recently activated naive CD4 T cells can help resting B cells, and can produce sufficient autocrine IL-4 to drive differentiation to secretion of T helper 2-type cytokines" J Immunol **154**(9): 4269-4282.

D'Ambrosio, D., A. Iellem *et al.* (2000) "Localization of Th-cell subsets in inflammation: differential thresholds for extravasation of Th1 and Th2 cells" Immunol Today **21**(4): 183-186.

Derksen, F. J. (1985a) "Airway reactivity in ponies with recurrent airway obstruction (heaves)" Journal of Applied Physiology **58**: 598-604.

Derksen, F. J. (1987) "*Micropolyspora faeni* causes airway inflammation but not hyperresponsiveness in sensitized ponies" J Appl Physiol **62**: 1398-1404.

Derksen, F. J. (1988) "Aerosolized *Micropolyspora faeni* antigen as a cause of pulmonary dysfunction in ponies with recurrent airway obstruction (heaves)" Am J Vet Res **49**: 933-938.

Derksen, F. J. (1993) "Chronic obstructive pulmonary disease (heaves) as an inflammatory condition" Equine Vet J **25**(4): 257-258.

Derksen, F. J., C. M. Brown *et al.* (1989) "Comparison of transtracheal aspirate and bronchoalveolar lavage cytology in 50 horses with chronic lung disease" Equine Vet J **21**(1): 23-26.

Derksen, F. J., M. Olszewski *et al.* (1996) "Use of a hand-held, metered-dose aerosol delivery device to administer pirbuterol acetate to horses with 'heaves'" Equine Vet J **28**(4): 306-310.

Derksen, F. J., J. S. Scott *et al.* (1985b) "Bronchoalveolar lavage in ponies with recurrent airway obstruction (heaves)" Am Rev Respir Dis **132**(5): 1066-1070.

Dixon, P. M. (1978) "Pulmonary artery pressures in normal horses and in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease" Equine Vet J **10**(3): 195-198.

Dixon, P. M. (1986) "Chronic obstructive pulmonary disease: Defining the syndrome" Vet Rec: 224-226.

Dixon, P. M. (1992) "Respiratory mucociliary clearance in the horse in health and disease, and its pharmaceutical modification" Vet Rec **131**(11): 229-235.

Eder, C., R. Crameri *et al.* (2000) "Allergen-specific IgE levels against crude mould and storage mite extracts and recombinant mould allergens in sera from horses affected with chronic bronchitis" Vet Immunol Immunopathol **73**(3-4): 241-253.

Evans (1992) "Intradermal testing of horses with chronic obstructive pulmonary disease and recurrent urticaria" Am J Vet Res **53**(2): 201-208.

Eyre, P. (1972) "Equine pulmonary emphysema: a bronchopulmonary mould allergy" Vet Rec **91**(6): 134-140.

Fahy, V. (2000) "Targeting cytokines in asthma therapy: round one" The Lancet **356**: 2114-2115.

Fairbairn (1993) "Duration of antigen-induced hyperresponsiveness in horses with allergic respiratory disease and possible links with early airway obstruction" J Vet Pharmacol Ther **16**: 469-476.

Fairbairn (1993) "Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure" Clin Exp Allergy **23**: 821-828.

Finkelman (1997) "Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes" Annu Rev Immunol **15**: 505-533.

Fogarty (1990) "Evaluation of a bronchoalveolar lavage technique" Equine Vet J **22**(3): 174-176.

Franchini, M., U. Gilli *et al.* (1998) "The role of neutrophil chemotactic cytokines in the pathogenesis of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD)" Vet Immunol Immunopathol **66**(1): 53-65.

Gerger, H. (1973) "Chronic pulmonary disease in the horse" Equine Vet J **5**(1): 26-33.

Gibson, P. G. (2001) "Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma" Chest **119**(5): 1329-1335.

Gibson, P. G., B. W. Robinson *et al.* (1989) "The role of bronchoalveolar lavage in the assessment of diffuse lung diseases" Aust N Z J Med **19**(3): 281-291.

Gillespie, J. R. and W. S. Tyler (1967) "Capillary and cellular changes in alveolar walls of emphysematous horse lungs. A quantitative electron microscope study" Am Rev Respir Dis **95**(3): 484-490.

Gillespie, J. R. and W. S. Tyler (1967) "Quantitative electron microscopy of the interalveolar septa of the horse lung" Am Rev Respir Dis **95**(3): 477-483.

Gillespie, J. R., W. S. Tyler *et al.* (1966) "Pulmonary ventilation and resistance in emphysematous and control horses" J Appl Physiol **21**(2): 416-422.

Girard, D., R. Paquin *et al.* (1997) "Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis" Biochem **325**: 147-153.

Groux, H., A. O'Garra *et al.* (1997) "A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis" Nature **389**(6652): 737-742.

Halliwell, R. E. (1993) "Local and systemic antibody production in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease" Vet Immunol Immunopathol **38**: 201-215.

Halliwell, R. E., J. B. Fleischman *et al.* (1979) "The role of allergy in chronic pulmonary disease of horses" J Am Vet Med Assoc **174**(3): 277-281.

Hamid, Q., M. Azzawi *et al.* (1991) "Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma" J Clin Invest **87**(5): 1541-1546.

Hare, J. E., L. Viel *et al.* (1999) "In vitro allergen-induced degranulation of pulmonary mast cells from horses with recurrent airway obstruction (heaves)" Am J Vet Res **60**(7): 841-847.

Holgate, S. T., D. E. Davies *et al.* (2000) "Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma" J Allergy Clin Immunol **105**(2 Pt 1): 193-204.

Hsieh, C. S., S. E. Macatonia *et al.* (1993) "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria- induced macrophages" Science **260**(5107): 547-549.

Jacobson, N. G., S. J. Szabo *et al.* (1995). "Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4" J Exp Med **181**(5): 1755-1762.

Janeway (1999) ImmunoBiol (The Immune System in Health and Disease).

Kamogawa, Y. (1993) "The relationship of IL-4 and IFN-gamma producing T cells studied by lineage ablation of IL-4 producing cells" Cell **75**: 985-995.

Kaplan, M. H., U. Schindler *et al.* (1996) "Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells" Immunity **4**(3): 313-319.

Kaplan, M. H., Y. L. Sun *et al.* (1996) "Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4- deficient mice" Nature **382**(6587): 174-177.

Kaup (1990) "Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) II: Pathomorphological changes of the terminal airways and the alveolar region" Equine Vet J **22**: 349-355.

Kaup, F. J., W. Drommer *et al.* (1990) "Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). I: Alterations of the larger conducting airways" Equine Vet J **22**(5): 343-348.

Kelso, A. (1995) "Th1 and Th2 subsets: paradigms lost ?" Immunol Today **16**(8): 374-379.

Kleiber, C., G. Grunig *et al.* (1999) "Phenotypic analysis of bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in horses with chronic pulmonary disease" Zentralbl Veterinarmed [A] **46**(3): 177-184.

Koning, H., H. J. Neijens *et al.* (1997) "T cell subsets and cytokines in allergic and non-allergic children. I. Analysis of IL-4, IFN-gamma and IL-13 mRNA expression and protein production" Cytokine **9**(6): 416-426.

Koterba, A. M., P. C. Kosch *et al.* (1988) "Breathing strategy of the adult horse (*Equus caballus*) at rest" J Appl Physiol **64**(1): 337-346.

Kuchroo, V. K., M. P. Das *et al.* (1995) "B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy" Cell **80**(5): 707-718.

Lapointe, J. M. (1994). "Effects of centrifugation and specimen preparation technique on bronchoalveolar lavage analysis in horses" Equine Vet J **26**(3): 227-229.

Lapointe, J. M., J. P. Lavoie *et al.* (1993) "Effects of triamcinolone acetonide on pulmonary function and bronchoalveolar lavage cytologic features in horses with chronic obstructive pulmonary disease" Am J Vet Res **54**(8): 1310-1316.

Lavoie, J. P., K. Maghni *et al.* (2001) "neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile" Am J Respir Crit Care Med **164**: 1410-1413.

Lavoie, J. P., S. T. Phan *et al.* (1996) "Effects of a combination of detomidine and butorphanol on respiratory function in horses with or without chronic obstructive pulmonary disease" Am J Vet Res **57**(5): 705-709.

Lawson (1979) "The presence of precipitating antibodies in the sera of horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD)" Equine Vet J **11**(3): 172-176.

Lederer, J. A., V. L. Perez *et al.* (1996). "Cytokine transcriptional events during helper T cell subset differentiation" J Exp Med **184**(2): 397-406.

Lee A. (2001) "Pulmonary T cells and eosinophils: coconspirators or independent triggers of allergic respiratory pathology ?" J Allergy Clin Immunol **107**(6): 945-954.

Leith (1971) "Respiratory mechanics of normal horses and one with chronic obstructive lung disease" Federation Proceedings **30**: 556.

Leonard, C., V. Tormey *et al.* (1997) "Allergen-induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity" Am J Respir Cell Mol Biol **17**(3): 368-375.

Littlejohn, A. and F. Bowles (1980). "Studies on the physiopathology of chronic obstructive pulmonary disease in the horse. III. The intrathoracic pressure" Onderstepoort J Vet Res **47**(4): 193-196.

Lowell (1964) "Observations on heaves: an asthma-like syndrome in the horse" J Allergy **35**: 322-330.

Lunn, D. P., M. A. Holmes *et al.* (1993) "Equine T-lymphocyte MHC II expression: variation with age and subset" Vet Immunol Immunopathol **35**(3-4): 225-238.

Madelin (1991) "Prevalence of serum precipitating antibodies in horses to fungal and thermophilic actinomycete antigens: effects of environmental challenge" Equine Vet J **23**(4): 247-252.

Mair, T. S. (1987) "Value of tracheal aspirates in the diagnosis of chronic pulmonary diseases in the horse" Equine Vet J **19**(5): 463-465.

Mair, T. S. (1996) "Obstructive pulmonary disease in 18 horses at summer pasture" Vet Rec **138**(4): 89-91.

Mair, T. S., E. H. Batten *et al.* (1987) "The histological features of the immune system of the equine respiratory tract" J Comp Pathol **97**(5): 575-586.

Mair, T. S., C. R. Stokes *et al.* (1988) "Immunohistochemical study of the local humoral immune system of the equine respiratory mucosa" Res Vet Sci **45**(2): 160-165.

Mair, T. S., C. R. Stokes *et al.* (1988) "Increased local IgA production in chronic obstructive pulmonary disease" Equine Vet J **20**(3): 214-216.

Marti (1991) "The genetic basis of equine allergic diseases 1. Chronic hypersensitivity bronchitis" Equine Vet J **23**: 457-460.

McGorum, B. C. and P. M. Dixon (1993) "Evaluation of local endobronchial antigen challenges in the investigation of equine chronic obstructive pulmonary disease" Equine Vet J **25**(4): 269-272.

McGorum, B. C., P. M. Dixon *et al.* (1993a) "Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens [see comments]" Equine Vet J **25**(4): 261-267.

McGorum, B. C., P. M. Dixon *et al.* (1993b) "Phenotypic analysis of peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in control and chronic obstructive pulmonary disease affected horses, before and after 'natural (hay and straw) challenges'" Vet Immunol Immunopathol **36**(3): 207-222.

McGorum, B. C., P. M. Dixon *et al.* (1993c) "Evaluation of intradermal mould antigen testing in the diagnosis of equine chronic obstructive pulmonary disease" Equine Vet J **25**(4): 273-275.

McGorum, B. C., P. M. Dixon *et al.* (1993d) "Quantification of histamine in plasma and pulmonary fluids from horses with chronic obstructive pulmonary disease, before and after 'natural (hay and straw) challenges'" Vet Immunol Immunopathol **36**(3): 223-237.

McGorum, B. C., P. M. Dixon *et al.* (1993) "Comparison of cellular and molecular components of bronchoalveolar lavage fluid harvested from different segments of the equine lung" Res Vet Sci **55**(1): 57-59.

McKane, S. A., P. J. Canfield *et al.* (1993) "Equine bronchoalveolar lavage cytology: survey of thoroughbred racehorses in training" Aust Vet J **70**(11): 401-404.

McPherson (1979) "Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in horses: aetiological studies: responses to intradermal and inhalation antigenic challenge" Equine Vet J **11**: 159-166.

McPherson, E. A. and J. R. Thomson (1983) "Chronic obstructive pulmonary disease in the horse. 1: Nature of the disease" Equine Vet J **15**(3): 203-206.

Moore, B. R. (1996) "Lower respiratory tract disease" Vet Clin North Am Equine Pract **12**(3): 457-472.

Mosmann, T. R. (1986) "Two types of murine helper T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins" J Immunol **136**: 2348-2357.

Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989) "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties" Annu Rev Immunol **7**: 145-173.

Muyllé, E. and W. Oyaert (1973) "Lung function tests in obstructive pulmonary disease in horses" Equine Vet J **5**(1): 37-44.

Navarro, P., D. P. Barbis *et al.* (1995) "The complete cDNA and deduced amino acid sequence of equine IgE" Mol Immunol **32**(1): 1-8.

Nuytten, J., E. Muyllé *et al.* (1983) "Cytology, bacteriology and phagocytic capacity of tracheo-bronchial aspirates in healthy horses and horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD)" Zentralbl Veterinarmed [A] **30**(2): 114-120.

Nyman (1991) "Pulmonary gas exchange correlated to clinical signs and lung pathology in horses with chronic bronchiolitis" Equine Vet J **23**: 253-260.

O'Garra, A. (1998) "Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T Helper cell subsets" Immunity **8**: 275-283.

Openshaw, P., E. E. Murphy *et al.* (1995) "Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations" J Exp Med **182**(5): 1357-1367.

P.Lekeux (1996) "control of chronic obstructive pulmonary disease in the horse" Br Vet J **152**: 365-366.

Pearlman, D. S. (1999) "Pathophysiology of the inflammatory response" J Allergy Clin Immunol **104**(1 de 4): s123-s127.

Pearson, E. G. and T. W. Riebold (1989) "Comparison of bronchodilators in alleviating clinical signs in horses with chronic obstructive pulmonary disease" J Am Vet Med Assoc **194**(9): 1287-1291.

Persson (1991) "Lung Biopsy Pathology and Exercise Tolerance in Horses with Chronic Bronchiolitis" Equine Exercise Physiol **3**: 457-464.

Petsche, V. M., F. J. Derksen *et al.* (1994) "Tidal breathing flow-volume loops in horses with recurrent airway obstruction (heaves)" Am J Vet Res **55**(7): 885-891.

Pirie, R. S., P. M. Dixon *et al.* (2001) "Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses" Equine Vet J **33**(3): 311-318.

Platts-Mills, T. A. (1992) "Mechanisms of bronchial reactivity: the role of immunoglobulin E" Am Rev Respir Dis **145**(2 Pt 2): S44-S47.

Prete, G. D. (1994) "Human Th1 and Th2 Cells: Functional Properties, Mechanisms of Regulation, and Role in Disease" Laboratory Investigation **70**(3): 299-304.

Raphel, C. F. and D. E. Gunson (1981) "Percutaneous lung biopsy in the horse" Cornell Vet **71**(4): 439-448.

Reiner, S. L. and R. A. Seder (1995) "T helper cell differentiation in immune response" Curr Opin Immunol **7**(3): 360-366.

Robinson, D., Q. Hamid *et al.* (1993) "Activation of CD4+ T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar

lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma" J Allergy Clin Immunol **92**(2): 313-324.

Robinson, D. S., Q. Hamid *et al.* (1992) "Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma" N Engl J Med **326**(5): 298-304.

Robinson, N. E., F. J. Derksen *et al.* (1999) "Determinants of the maximal change in pleural pressure during tidal breathing in COPD-affected horses" Vet J **157**(2): 160-165.

Robinson NE. International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University 16-18 June 2000. Equine Vet J 2001;33:5-19.

Robinson, N. E., F. J. Derksen *et al.* (1996) "The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses" Br Vet J **152**(3): 283-306.

Rogers (1988) "Provocation-neutralization of cough and wheezing in a horse" Clin Ecol **5**(4): 185-187.

Romagnani, S. (1995) "Biology of Human Th1 and Th2 Cells" J Clin Immunol **15**(3): 121-129.

Romagnani, S. (2000) "T-cell subsets (Th1 versus Th2)" Ann Allergy, Asthma Immunol **85**: 9-16.

Rossier, Y., C. R. Sweeney *et al.* (1991) "Bronchoalveolar lavage fluid cytologic findings in horses with pneumonia or pleuropneumonia" J Am Vet Med Assoc **198**(6): 1001-1004.

Sallusto, F., A. Lanzavecchia *et al.* (1998) "Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses" Immunol Today **19**(12): 568-574.

Sallusto, F., D. Lenig *et al.* (1998) "Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes" J Exp Med **187**(6): 875-883.

Sasse, H. H. (1971) "Some pulmonary function tests in horses. An aid to early diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease (heaves) in horses" Ph.D. Thesis; University of Utrecht.

Schmallenbach, K. H., I. Rahman *et al.* (1998) "Studies on pulmonary and systemic *Aspergillus fumigatus*-specific IgE and IgG antibodies in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease (COPD)" Vet Immunol Immunopathol **66**(3-4): 245-256.

Schmitt, E., P. Hoehn *et al.* (1994) "Differential effects of interleukin-12 on the development of naive mouse CD4+ T cells" Eur J Immunol **24**(2): 343-347.

Scott, P. (1993) "IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity" Science **260**(5107): 496-497.

Shaver, J. R., J. G. Zangrilli *et al.* (1997) "Kinetics of the development and recovery of the lung from IgE-mediated inflammation: dissociation of pulmonary eosinophilia, lung injury, and eosinophil-active cytokines" Am J Respir Crit Care Med **155**(2): 442-448.

Singer, R., J. Lawrence *et al.* (1986) "Optimization of in situ hybridization using isotopic and nonisotopic methods" BioTechniques **4**: 230-250.

Snapper (1986) "Large animal models of asthma" Am Rev Respir Dis **133**:351-352

Stommer (1887) Dsche.Z.Thiermed.Lpz **13**: 93.

Sukura, A., J. Higgins *et al.* (1998) "Compartmentalization of Th1/Th2 cytokine responses to experimental *Yersinia pseudotuberculosis* infection in cats" Vet Immunol Immunopathol **65**(2-4): 139-150.

Swain, S. L., G. Huston *et al.* (1991) "Transforming growth factor-beta and IL-4 cause helper T cell precursors to develop into distinct effector helper cells that differ in lymphokine secretion pattern and cell surface phenotype" J Immunol **147**(9): 2991-3000.

Swain, S. L., A. D. Weinberg *et al.* (1990) "IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors" J Immunol **145**(11): 3796-3806.

Swiderski (1998) "Type 1 and type 2 cytokine responses in horses." Proc.16th ACVIM FORUM: 189-191.

Swiderski (1999) "Quantitative measurement of equine cytokine mRNA expression by polymerase chain reaction using target-specific standard curves" J Immunol Methods **222**: 155-169.

Szabo, S. J., N. G. Jacobson *et al.* (1995) "Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling" Immunity **2**(6): 665-675.

Tesarowski (1996) "Pulmonary function measurements during repeated environmental challenge of horses with recurrent airway obstruction (heaves)" Am J Vet Res **57**: 1214-1219.

Thomson, J. R. and E. A. McPherson (1984) "Effects of environmental control on pulmonary function of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease" Equine Vet J **16**(1): 35-38.

Tizard I.R. (2001) Vet Immunol; 5ième édition; 507 pp.

Traub-Dargatz, J. L., A. O. McKinnon *et al.* (1992) "Evaluation of clinical signs of disease, bronchoalveolar and tracheal wash analysis, and arterial blood gas tensions in 13 horses with chronic obstructive pulmonary disease treated with prednisone, methyl sulfonmethane, and clenbuterol hydrochloride" Am J Vet Res **53**(10): 1908-1916.

Tremblay, G. M., C. Ferland *et al.* (1993) "Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses" Equine Vet J **25**(3): 194-197.

Turk, M. A., R. G. Breeze *et al.* (1983) "Pathologic changes in 3-methylindole-induced equine bronchiolitis" Am J Pathol **110**(2): 209-218.

Vandenput, S., D. H. Duvivier *et al.* (1998) "Environmental control to maintain stabled COPD horses in clinical remission: effects on pulmonary function" Equine Vet J **30**(2): 93-96.

Vandenput, S., L. Istasse *et al.* (1997) "Airborne dust and aeroallergen concentrations in different sources of feed and bedding for horses" Vet Q **19**(4): 154-158.

Vandenput, S., D. Votion *et al.* (1998) "Effect of a set stabled environmental control on pulmonary function and airway reactivity of COPD affected horses" Vet J **155**(2): 189-195.

Viel, L. (1983) "Structural-functional correlations of the lung in horses with small airway disease. Ph.D. Thèse" University of Guelph.

Viel, L. (1997) "small airway disease as a vanguard for chronic obstructive pulmonary disease" Vet Clin North Am: Equine Prac **13**(3): 549-559.

Watson, J. L., J. L. Stott *et al.* (1997) "Phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease and in normal controls" Vet Pathol **34**(2): 108-116.

Webb, L. M. and M. Feldmann (1995) "Critical role of CD28/B7 costimulation in the development of human Th2 cytokine-producing cells" Blood **86**(9): 3479-3486.

Wilkie, B. N. (1982) "Allergic respiratory disease" Adv Vet Sci Comp Med **26**: 233-266.

Winder, N. C., G. Grunig *et al.* (1991) "Comparison of bronchoalveolar lavage and respiratory secretion cytology in horses with histologically diagnosed pulmonary disease" Schweiz Arch Tierheilkd **133**(3): 123-130.

Winder, N. C. and R. von Fellenberg (1988) "Chronic small airway disease in the horse: immunohistochemical evaluation of lungs with mild, moderate and severe lesions" Vet Rec **122**(8): 181-183.

Winder, N. C. and R. von Fellenberg (1990) "Mast cells in normal and pathological specimens of the equine lung" Zentralbl Veterinarmed [A] **37**(9): 641-650.

Wisner, E. R., T. R. O'Brien *et al.* (1993) "Radiographic and microscopic correlation of diffuse interstitial and bronchointerstitial pulmonary patterns in the caudodorsal lung of adult thoroughbred horses in race training" Equine Vet J **25**(4): 293-298.

Woods, P. S., N. E. Robinson *et al.* (1993) "Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different management systems" Equine Vet J **25**(3): 208-213.

Ying, S., S. Durham *et al.* (1995) "Phenotype of cells expressing mRNA for TH2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and Th1-type (interleukin 2 and interferon

gamma) cytokines in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatic and normal control subjects" Am J Respir Cell Mol Biol **12**: 477-487.