

## Intérêt du dosage sanguin de la protéine D de surfactant (SP-D) lors d'inflammation des voies respiratoires profondes.

Par :

- E. Richard<sup>1</sup>, P.-H. Pite<sup>1</sup>, U. Christmann<sup>2</sup>, P. Lekeux<sup>3</sup>, S. Pronost<sup>1</sup>, G. Fortier<sup>1</sup>
- <sup>1</sup> Laboratoire Frank Duncombe, 1 route de Rosel, 14053 Caen cedex 4 / IFR 146, ICORE – Université de Caen Basse-Normandie.  
<sup>2</sup> CIRALE-ENVA, 14430 Goustranville.  
<sup>3</sup> Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Bât. 42 ; 20 Bvd de Colonster, 4000 Liège, Belgique

### Résumé

La protéine D de surfactant (SP-D), principalement synthétisée par les pneumocytes de type II est un composant important de l'immunité pulmonaire innée. L'objectif de cette étude était de comparer les concentrations sériques de SP-D chez des chevaux souffrant d'inflammation des voies respiratoire profondes (IAD) avec des chevaux contrôles. Des échantillons de sang ont été collectés sur 42 Trotteurs Français au repos et 60 minutes après un test d'effort standardisé sur tapis roulant. Sur base de la cytologie du lavage bronchoalvéolaire, 22 chevaux souffraient d'IAD et 20 chevaux ont été utilisés comme contrôles. Les concentrations sériques de SP-D chez les chevaux avec IAD étaient significativement augmentées par rapport à celles des chevaux contrôles. L'exercice n'a pas significativement influencé les concentrations sériques de SP-D. Ces résultats mettent en évidence que l'IAD est associé à une augmentation détectable, quoique modérée, des taux sanguins de SP-D. La concentration sérique en protéine D de surfactant pourrait représenter un biomarqueur sanguin potentiellement utile et facilement accessible lors d'inflammation des voies respiratoires chez le cheval.

**Mots clés :** cheval, protéine D de surfactant, biomarqueur, inflammation des voies respiratoires, exercice

### Summary

Surfactant protein D (SP-D), mainly synthesised by alveolar type II cells, is one important component of innate pulmonary immunity. The aim of the study was to compare serum SP-D concentrations in horses with and without inflammatory airway disease (IAD). Venous blood samples were collected from 42 Standardbred racehorses at rest and 60 min after performing a standardised treadmill exercise test. Based on bronchoalveolar lavage cytology, 22 horses were defined as IAD-affected and 20 classified as controls. Serum concentrations of SP-D in IAD-affected horses were significantly higher than those of control horses, both at rest and after exercise. Within each group of horses (IAD and control), no significant influence of exercise was found on serum SP-D levels. This is the first study determining serum SP-D concentrations in a noninfectious, naturally occurring form of lower airway inflammation in horses. The results highlight that IAD is associated with a detectable, though moderate, increase of circulating SP-D levels. Serum concentration of surfactant protein D could represent a potentially valuable and readily accessible blood biomarker of equine lower airway inflammation.

**Key-words:** horse, surfactant protein D, biomarker, inflammatory airway disease, exercise

## Introduction

L'inflammation des voies respiratoires profondes (IAD) a été définie comme une inflammation respiratoire non-infectieuse pouvant affecter les chevaux de tout âge, qui ne présentent généralement que des signes cliniques discrets au repos (Couëtil *et al.* 2007). Les critères d'inclusion pour l'IAD comprennent généralement de la contre-performance, une intolérance à l'exercice, ou de la toux avec ou sans excès de mucus trachéal. Les critères d'exclusion sont soit un effort respiratoire augmenté au repos, soit des signes systémiques d'infection. Le diagnostic définitif de ce syndrome est basé sur la cytologie du lavage bronchoalvéolaire (LBA), dans lequel une population hétérogène de cellules peut être observée. Le profil cytologique peut ainsi être caractérisé par une augmentation du nombre total de cellules nucléées, avec une neutrophilie modérée, une lymphocytose, ou alternativement par une augmentation des comptages de mastocytes ou de neutrophiles (Couëtil *et al.* 2007).

L'IAD a précédemment été incriminée chez des chevaux avec des troubles d'échange gazeux alvéolo-capillaires pendant l'exercice (Sánchez *et al.* 2005), avec altération de la fonction pulmonaire (Richard *et al.* 2009), et avec hyperréactivité bronchique (Hare and Viel 1998; Bedenice *et al.* 2008). À l'opposé, la possibilité d'une réaction inflammatoire des voies respiratoires profondes en réponse à l'exercice est toujours controversée (Clark *et al.* 1995; Couëtil et Denicola 1999). Les chevaux peuvent également être sujets à des troubles infectieux du système respiratoire. Les concentrations systémiques de certaines protéines, comme le sérum amyloïde A (SAA) ou la protéine D de surfactant (SP-D) ont précédemment été trouvées pertinentes pour l'identification des troubles cliniques chez des chevaux souffrant d'infection respiratoire profonde. En effet, les concentrations sériques en SAA étaient augmentées lors d'infection par le virus influenza équin (Hultén *et al.* 1999), de même que la SAA et la SP-D lors de pneumonie induite expérimentalement par une inoculation de *Streptococcus zooepidemicus* (Hobo *et al.* 2007).

La SP-D, majoritairement synthétisée par les pneumocytes de type II et les cellules épithéliales bronchiques non-ciliées comme les cellules de Clara, est un membre de la famille des collectines. Sa fonction principale est de participer à la défense pulmonaire innée en promouvant l'élimination des agents pathogènes (Wright 2005). La SP-D peut également être détectée dans la circulation sanguine périphérique, suite à un relargage à partir des tissus exprimant cette protéine (Sorensen *et al.* 2007). En médecine humaine, la SP-D sérique a été utilisée comme marqueur prédictif et pronostique pour plusieurs troubles inflammatoires pulmonaires (Hartl et Griese 2006). Lors d'études portant sur l'obstruction pulmonaire chronique (COPD) chez des patients humains, la SP-D sérique était plus sensible pour identifier les modifications résultant d'une thérapie médicamenteuse que les mesures de fonction pulmonaire (Lomas *et al.* 2009). À ce jour, les concentrations sériques en SP-D ont seulement été investiguées chez le cheval dans le cadre d'un modèle expérimental d'infection respiratoire bactérienne (Hobo *et al.* 2007).

L'objectif de cette étude était de déterminer si l'exercice ou l'inflammation des voies respiratoires profondes influençait les concentrations sériques en SP-D chez le cheval. À cet effet, l'étude était conçue pour (1) comparer les taux circulants en SP-D chez des chevaux atteints d'IAD et des contrôles, (2) évaluer au sein de chaque groupe les concentrations sériques en SP-D avant et après l'exercice, et (3) déterminer les corrélations entre les concentrations sériques en SP-D et la cytologie des liquides de lavage trachéal (LT) et bronchoalvéolaire (LBA).

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Chevaux

Quarante-deux Trotteurs Français ont été investigués dans cette étude. Les chevaux étaient âgés de  $4,5 \pm 1,8$  ans et incluaient 21 juments, 15 mâles et 6 hongres. Tous les chevaux étaient à l'entraînement au moment de l'investigation et étaient référés pour suivi clinique de routine ou évaluation pour contre-performance. Selon leurs propriétaires, aucun cheval n'a reçu de médication depuis au moins un mois et le dernier exercice soutenu remontait au moins à 5 jours avant le test d'effort sur tapis roulant. Avant toute procédure, chaque cheval a subi un examen clinique complet, incluant une auscultation respiratoire et une endoscopie des voies respiratoires supérieures.

### 1.2. Tests d'effort standardisé

Chaque cheval a effectué un test d'effort standardisé sur tapis roulant, selon la procédure décrite précédemment (Richard *et al.* 2010). Brièvement, 3 paliers de 2 minutes chacun ont été réalisés avec

une inclinaison du tapis de 4% et des vitesses respectives de 7,0, 9,0 et 11,0 m/s. Un palier supplémentaire pour l'endoscopie des voies respiratoires à l'effort était également effectué avec une pente de 6% et une vitesse initiale de 9,0 m/s augmentant de 0,5 m/s toutes les 30s jusqu'à fatigue.

### 1.3. Prises de sang et mesure de la SP-D sérique

Des échantillons de sang veineux étaient collectés à partir de la veine jugulaire le matin au repos de même que 60 minutes après l'exercice. Les échantillons étaient centrifugés (400 g, 10 min) et le sérum conservé congelé en attendant les analyses. La concentration en SP-D sérique a été déterminée selon les recommandations du fournisseur, à l'aide d'un kit ELISA disponible dans le commerce. Lors de mesures de SP-D à partir d'échantillons équinés, les coefficients de variation intra- et inter-essai étaient de 2,62 et 1,42%, respectivement.

### 1.4. Analyse cytologique des liquides respiratoires

Le LT et le LBA ont été effectués 60 minutes après l'exercice, les chevaux étant sédatisés avec de la romifidine (0,03 mg/kg). Le LT a été effectué à l'aide de l'endoscope, par instillation et aspiration de 30 ml de solution saline isotonique stérile à travers un cathéter stérile. Un aliquot a été placé dans un pot stérile pour analyse bactériologique. Le LBA a été réalisé avec un tube stérile (Bivona) de 300 cm de long et 9 mm de diamètre, avancé dans la trachée jusqu'à une bronche distale. Le ballonnet a ensuite été gonflé avec 5 ml d'air et un total de 250 ml de solution saline isotonique stérile (divisée en 3 bolus) a été séquentiellement instillé et aspiré. Les aliquots de LBA et de LT ont été maintenus à 4°C dans des tubes EDTA. Les échantillons ont été cyto-centrifugés (75 g, 10 min) et colorés au May Grünwald Giemsa. Le comptage différentiel a été réalisé à partir de 300 cellules en excluant les cellules épithéliales.

### 1.5. Définition des cas

À partir de l'examen cytologique du LBA, les chevaux avec au moins un des critères suivants étaient considérés comme atteints d'IAD : > 10% neutrophiles, > 2% mastocytes ou > 1% éosinophiles. Les chevaux avec de moindres pourcentages pour ces différentes cellules inflammatoires à la cytologie du LBA étaient utilisés comme contrôles (CTL).

### 1.6. Analyse des données

Les différents paramètres n'étant pas distribués selon une loi normale Gaussienne, le test non-paramétrique de Mann-Whitney a donc été utilisé pour les comparaisons des profils cytologiques et des concentrations en SP-D entre les groupes de chevaux. L'association entre les paramètres a été déterminée à l'aide du coefficient de corrélation de Spearman. Les données sont présentées sous le format 'médiane; 1<sup>er</sup>-3<sup>ème</sup> quartile', sauf indication contraire. Les valeurs de P < 0,05 étaient considérées significatives.

## 2. Résultats

Sur base de la cytologie du LBA, 22 chevaux ont été diagnostiqués avec IAD et 20 ont été classés comme CTL. L'âge n'était pas significativement différent entre les chevaux IAD (4,0; 3,3-6,0 ans) et les CTL (4,0; 3,0-5,3 ans). Aucun des chevaux n'a présenté de signe clinique de troubles respiratoire (toux, jetage nasal, ou bruit anormal à l'exercice), et notamment d'épisode aigu d'hémorragie pulmonaire induite par l'exercice (HPIE) sur base de l'endoscopie trachéale en post-effort et l'absence d'érythrocyte dans les liquides respiratoires. Aucune des évaluations bactériologiques des LT n'a révélé de comptage bactérien > 10<sup>5</sup> cfu/ml. Les chevaux avec IAD présentaient dans le LT et le LBA un taux de neutrophiles significativement supérieur et un taux de macrophages significativement inférieur aux chevaux CTL (Tableau 1). Différentes combinaisons de profils cytologiques anormaux étaient présentes dans le groupe IAD. Parmi les 15 chevaux avec neutrophilie dans le LBA, 7 n'avaient pas d'autre anomalie, 6 avaient également > 2% mastocytes et 2 avaient également > 1% éosinophiles. Parmi les 7 chevaux IAD avec < 10% neutrophiles, tous avaient > 2% mastocytes et 4 chevaux avaient également > 1% éosinophiles. Aucun des chevaux IAD présentait uniquement une augmentation du taux d'éosinophiles dans le LBA. Les concentrations sériques en SP-D mesurées au repos chez les chevaux IAD étaient significativement augmentées par rapport aux chevaux CTL (Figure I), de même que les valeurs obtenues 60 minutes après l'exercice (56,9; 48,0-87,1 ng/ml et 24,0; 19,9-35,8 ng/ml, respectivement). Au sein de chaque groupe de chevaux (IAD et CTL), aucun effet significatif du test sur tapis roulant n'a été observé sur les concentrations en SP-D dans le sérum; les valeurs en pré- et post-effort étant de plus significativement

corrélées ( $R = 0,975$ ;  $P < 0,001$ ). Au sein du groupe IAD, aucune corrélation significative n'a été observée entre les concentrations sériques de SP-D et les différents sous-types de cellules inflammatoires présentes dans les liquides respiratoires. Les concentrations en SP-D dans le sérum n'étaient pas significativement différentes entre les chevaux IAD avec neutrophilie et ceux avec des taux élevés en mastocytes ou éosinophiles ( $P = 0,597$ ).

Tableau 1 : Comptage différentiel [médiane (1<sup>er</sup>-3<sup>ème</sup> quartile)] dans le lavage trachéal (LT) et bronchoalvéolaire (LBA) chez des chevaux contrôles (CTL) et avec inflammation des voies respiratoires profondes (IAD).

Table 1: Median (1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> quartile) differential cell counts in tracheal wash (LT) and bronchoalveolar lavage fluid (LBA) of control horses (CTL) and horses with inflammatory airway disease (IAD).

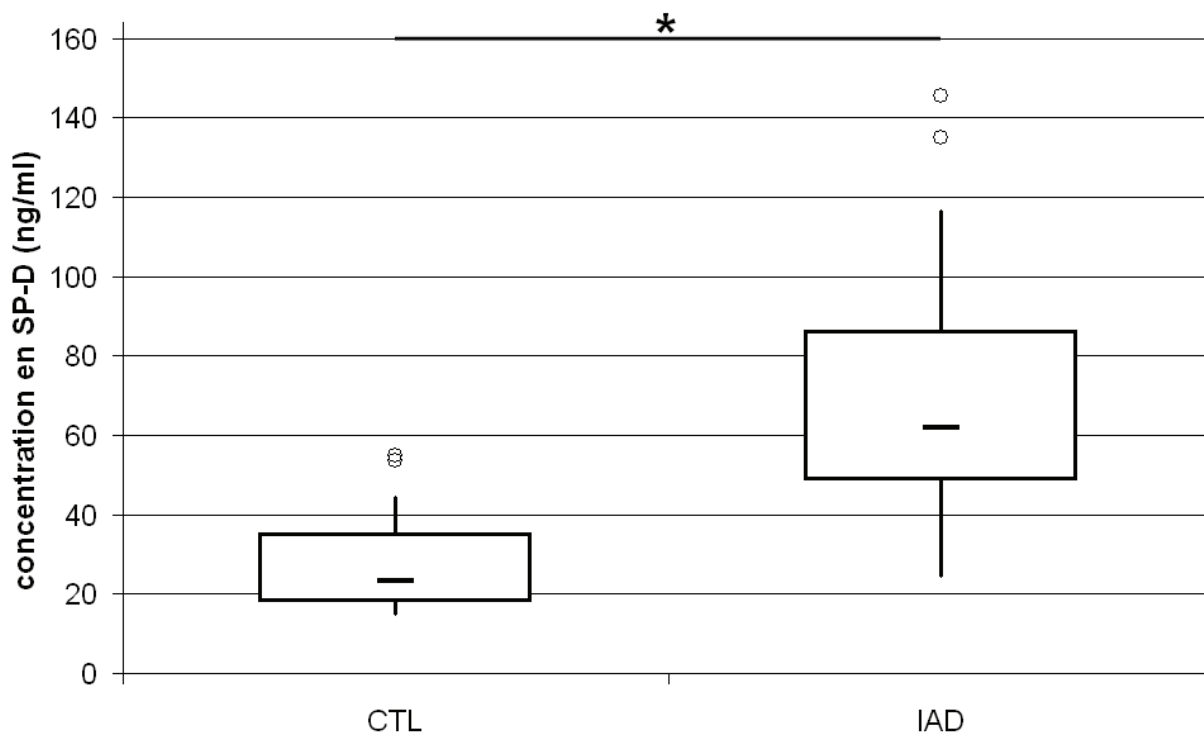
Type cellulaire dans le LBA	Comptage cellulaire LT (%)		Comptage cellulaire LBA (%)	
	CTL	IAD	CTL	IAD
Neutrophiles	8,5 (5,0-15,3)	22,0 (14,3-54,8) *	5,5 (3,8-7,0)	14,5 (8,0-18,0) *
Éosinophiles	0,0 (0,0-0,3)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,8)
Mastocytes	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	1,0 (0,0-1,0)	2,0 (1,0-3,0) *
Lymphocytes	7,5 (6,0-10,5)	7,0 (4,3-10,0)	19,0 (13,8-25,3)	20,0 (12,3-29,3)
Macrophages	81,0 (73,8-84,3)	60,5 (35,0-72,0) *	73,5 (64,0-79,5)	57,0 (51,5-66,3) *
Cellules géantes	1,0 (0,8-1,3)	1,0 (0,0-2,0)	1,0 (0,8-2,0)	1,0 (0,3-2,0)
Hémotrophages	0,0 (0,0-1,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-2,0)

\* Significativement différent du CTL correspondant ( $P < 0,05$ ).

\* Significantly different from corresponding CTL ( $P < 0,05$ ).

Figure I : Concentrations sériques en protéine D de surfactant (SP-D) au repos chez de chevaux contrôles (CTL) et avec inflammation des voies respiratoires profondes (IAD).

Figure I: Serum surfactant protein D (SP-D) concentrations at rest in control horses (CTL) and horses with inflammatory airway disease (IAD)



Lignes supérieure et inférieure = étendue; les boîtes sont bordées par le premier et le troisième quartiles et incluent la médiane (ligne dans chaque boîte); les valeurs extrêmes sont représentées par des cercles. \* Significativement différents l'un de l'autre ( $P < 0,05$ ).

Upper and lower lines = range; boxes are bordered by the first and the third quartiles and include median value (line located within each box); outliers are represented by open circles. \* Significantly different from each other ( $P < 0,05$ ).

### 3. Discussion

Il s'agit, à notre connaissance, de la première étude visant à déterminer les concentrations sériques en SP-D lors d'une forme non-infectieuse d'inflammation des voies respiratoires profondes chez le cheval. À ce jour, une étude seulement (Hobo *et al.* 2007) a précédemment mesuré les concentrations systémiques en SP-D chez le cheval ; ce marqueur ayant été investigué avec le SAA dans le cadre d'un modèle expérimental de pneumonie bactérienne. Dans cette étude, les concentrations en SP-D avaient significativement augmenté dans les 24h suivant l'inoculation endoscopique de *Streptococcus zooepidemicus* dans un lobe pulmonaire, avaient atteint les valeurs maximales dans les 2 jours, et étaient restées significativement élevées jusque 12 jours post-infection (Hobo *et al.* 2007).

Dans l'étude actuelle, l'augmentation des concentrations sériques en SP-D chez les chevaux IAD comparativement aux CTL suggère fortement l'occurrence de dommages alvéolaires lors d'inflammation des voies respiratoires profondes, en accord avec la littérature scientifique portant sur d'autres espèces de mammifères (Fujita *et al.* 2005; Sorensen *et al.* 2007). En effet, les taux circulants de SP-D reflètent principalement la perméabilité alvéolaire due à l'inflammation pulmonaire (Hartl et Griese, 2006). Il a ainsi été montré chez des patients humains que les concentrations sériques en SP-D étaient corrélées à la sévérité des troubles respiratoires (Kawasaki *et al.* 2011) de même qu'à leur issue clinique (Eisner *et al.* 2003). De plus, l'évaluation scintigraphique de la clairance alvéolaire chez des chevaux atteints d'obstruction récurrente des voies respiratoires, en crise ou en rémission, a précédemment révélé de façon très sensible la perméabilité augmentée et les dommages de l'épithélium alvéolaire résultant de l'inflammation pulmonaire (Votion *et al.* 1999). L'ampleur limitée des différences concernant les concentrations sériques en SP-D entre les groupes est à mettre en relation avec l'inflammation modérée des voies respiratoires des chevaux IAD dans cette étude (neutrophiles dans le LBA entre 4,0 et 24,0%). Aucune corrélation significative n'a par ailleurs été observée entre les concentrations sériques en SP-D et les profils cytologiques dans le LBA, ce qui pourrait être du à l'actuelle définition hétérogène du syndrome IAD, et notamment les combinaisons variables de cellules inflammatoires présentes chez les chevaux IAD. Dans une étude récente (Lavoie *et al.* 2011), les profils d'expression cytokiniques variaient significativement selon le type cellulaire (neutrophiles ou mastocytes) qui était augmenté dans le LBA, suggérant que différents processus pathophysiologiques seraient impliqués dans l'IAD. Ainsi, des proportions augmentées de neutrophiles dans le LBA, contrairement aux autres types cellulaires, étaient associées à des épisodes de toux chez les chevaux (Bedenice *et al.* 2008). Les répercussions sur l'intégrité alvéolaire, possiblement spécifiques, des différents profils inflammatoires caractérisant actuellement l'IAD, restent encore à déterminer.

Aucun effet de l'exercice n'a été démontré dans les 60 minutes suivant le test d'effort sur tapis roulant, quel que soit le groupe considéré, en accord avec de précédents résultats chez l'athlète humain lorsqu'investigé immédiatement et 60 minutes après un exercice standardisé (Hoegh *et al.* 2010). Il faut cependant prendre en considération que le moment de prélèvement en post-effort pourrait être trop précoce par rapport à la fin de l'exercice. En effet, en comparant avec différentes situations pathologiques, les concentrations sériques en SP-D augmentaient significativement dans les 4h suivant une inoculation pulmonaire de HCl chez le rat (Pan *et al.* 2002) et dans les 24h suivant une inoculation pulmonaire de *Streptococcus zooepidemicus* chez le cheval (Hobo *et al.* 2007). L'intérêt du dosage de la SP-D mérite d'être investigué chez les chevaux atteints d'infection respiratoire (virale par exemple), ainsi que lors de troubles non-infectieux plus sévères tel que l'obstruction récurrente des voies respiratoires. De même, aucun des chevaux de l'étude actuelle ne présentait d'épisode aigu d'HPIE. Le mécanisme pathophysiologique largement accepté pour l'HPIE étant une rupture de la membrane alvéolo-capillaire causée par une hypertension pulmonaire lors de l'exercice (West *et al.* 1993), l'influence probable de l'HPIE sur les concentrations sériques en SP-D chez les chevaux de sport et de course mérite d'être investiguée.

Les résultats de la présente étude mettent en évidence que l'IAD est associé à une augmentation détectable, quoique modérée, des taux circulants de SP-D. La concentration sérique en protéine D de surfactant pourrait représenter un biomarqueur sanguin potentiellement utile et facilement accessible concernant l'inflammation des voies respiratoires profondes chez le cheval.

### Remerciements

Les auteurs voudraient remercier le Conseil Général du Calvados, la Région Basse-Normandie, l'Institut Français du Cheval et de l'Équitation pour leur soutien financier ; ainsi que le Prix de Recherche 2010 de l'Association Vétérinaire Équine Française, qui a permis la réalisation de cette étude.

## Références

- Bedenice, D., Mazan, M.R. and Hoffman, A.M. 2008. Association between cough and cytology of bronchoalveolar lavage fluid and pulmonary function in horses diagnosed with inflammatory airway disease. *J. Vet. Intern. Med.* 22, 1022-1028.
- Clark, C.K., Lester, G.D., Vetro, T. and Rice, B. 1995. Bronchoalveolar lavage in horses: effect of exercise and repeated sampling on cytology. *Aust. Vet. J.* 72, 249-252.
- Couëtil, L.L. and Denicola, D.B. 1999. Blood gas, plasma lactate and bronchoalveolar lavage cytology analyses in racehorses with respiratory disease. *Equine Vet. J. Suppl.* 30, 77-82.
- Couëtil, L.L., Hoffman, A.M., Hodgson, J., Buechner-Maxwell, V., Viel, L., Wood, J.L. and Lavoie, J.P. 2007. Inflammatory airway disease of horses. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 356-361.
- Eisner, M.D., Parsons, P., Matthay, M.A., Ware, L. and Greene, K. 2003. Plasma surfactant protein levels and clinical outcomes in patients with acute lung injury. *Thorax* 58, 983-988.
- Fujita, M., Shannon, J.M., Ouchi, H., Voelker, D.R., Nakanishi, Y. and Mason, R.J. 2005. Serum surfactant protein D is increased in acute and chronic inflammation in mice. *Cytokine* 32, 25-33.
- Hare, J.E. and Viel, L. 1998. Pulmonary eosinophilia associated with increased airway responsiveness in young racing horses. *J. Vet. Intern. Med.* 12, 163-170.
- Hartl, D. and Griese, M. 2006. Surfactant protein D in human lung diseases. *Eur. J. Clin. Invest.* 36, 423-435.
- Hobo, S., Niwa, H. and Anzai, T. 2007. Evaluation of serum amyloid A and surfactant protein D in sera for identification of the clinical condition of horses with bacterial pneumonia. *J. Vet. Med. Sci.* 69, 827-830.
- Hoegh, S.V., Sorensen, G.L., Tornoe, I., Lottenburger, T., Ytting, H., Nielsen, H.J., Junker, P. and Holmskov, U. 2010. Long-term stability and circadian variation in circulating levels of surfactant protein D. *Immunobiology* 215, 314-320.
- Hultén, C., Sandgren, B., Skiodebrand, E., Klingenberg, B., Marhaug, G. and Forsberg, M. 1999. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection. *Acta Vet. Scand.* 40, 323-333.
- Kawasaki, Y., Endo, K., Suyama, K., Sato, M., Ito, M., Hashimoto, K. and Hosoya, M. 2011. Serum SP-D levels as a biomarker of lung injury in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatr. Pulmonol.* 46, 18-22.
- Lavoie, J.P., Cesarini, C., Lavoie-Lamoureux, A., Moran, K., Lutz, S., Picandet, V., Jean, D. and Marcoux, M. 2011. Bronchoalveolar lavage fluid cytology and cytokine messenger ribonucleic acid expression of racehorses with exercise intolerance and lower airway inflammation. *J. Vet. Intern. Med.* 25, 322-329.
- Lomas, D.A., Silverman, E.K., Edwards, L.D., Locantore, N.W., Miller, B.E., Horstman, D.H. and Tal-Singer, R. 2009. Serum surfactant protein D is steroid sensitive and associated with exacerbations of COPD. *Eur. Respir. J.* 34, 95-102.
- Pan, T., Nielsen, L.D., Allen, M.J., Shannon, K.M., Shannon, J.M., Selman, M. and Mason, R.J. 2002. Serum SP-D is a marker of lung injury in rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 282, L284-L283.
- Richard, E.A., Fortier, G.D., Denoix, J.M., Art, T., Lekeux, P.M. and Van Erck, E. 2009. Influence of subclinical inflammatory airway disease on equine respiratory function evaluated by impulse oscillometry. *Equine Vet. J.* 41, 384-389.
- Richard, E.A., Fortier, G.D., Pitel, P.H., Dupuis, M.C., Valette, J.P., Art, T., Denoix, J.M., Lekeux, P.M. and Van Erck, E. 2010. Sub-clinical diseases affecting performance in Standardbred trotters: Diagnostic methods and predictive parameters. *Vet. J.* 184, 282-289.
- Sánchez, A., Couëtil, L.L., Ward, M.P. and Clark, S.P. 2005. Effect of airway disease on blood gas exchange in racehorses. *J. Vet. Intern. Med.* 19, 87-92.
- Sorensen, G.L., Husby, S. and Holmskov, U. 2007. Surfactant protein A and surfactant protein D variation in pulmonary disease. *Immunobiology* 212, 381-416.
- Votion, D.M., Vandenput, S.N., Duvivier, D.H., Lambert, P., Van Erck, E., Art, T. and Lekeux, P.M. 1999. Alveolar clearance in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Vet. Res.* 60, 495-500.
- West, J.B., Mathieu-Costello, O., Jones, J.H., Birks, E.K., Logemann, R.B., Pascoe, J.R. and Tyler, W.S. 1993. Stress failure of pulmonary capillaries in racehorses with exercise-induced pulmonary hemorrhage. *J. Appl. Physiol.* 75, 1097-1109.
- Wright, J.R. 2005. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 58-68.