

Les tests de bronchoprovocation à la métacholine dans le diagnostic de l'hyperréactivité bronchique chez le cheval asymptomatique

Par :

- T. Fripiat, L. Frelstedt, J.C. Bustin, F. Farnir, P. Lekeux et T. Art
- Centre de Médecine Sportive du Cheval, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Bd de Colonster, 20 B42, 4000 Liège, Belgique

Résumé

L'examen clinique et les examens spéciaux du système respiratoire actuellement disponibles pour le vétérinaire sont parfois peu caractéristiques chez les chevaux souffrant d'inflammation subclinique des voies aériennes, ainsi que ceux en rémission clinique d'obstruction récurrente des voies aériennes. L'objectif de cette étude était de déterminer si le test de bronchoprovocation à la métacholine –utilisé quotidiennement dans le diagnostic de l'asthme asymptomatique humain– est fiable et répétable pour le diagnostic d'une hyperréactivité bronchique non spécifique chez le cheval.

Le test, réalisé sur 8 chevaux (6 chevaux avec historique de pousse et 2 contrôles), présente une faisabilité et une répétabilité satisfaisantes. L'exposition aux poussières a augmenté la bronchoréactivité sans modifier de manière significative les paramètres cliniques ou ceux de l'inflammation.

Dans le futur, le test de bronchoprovocation pourrait donc trouver sa place en clinique, pour la détection de chevaux asymptomatiques qui seraient susceptibles de développer des bronchospasmes en conditions environnementales moins favorables.

Mots clés : Métacholine, hyperréactivité bronchique, inflammation des voies respiratoires, cheval.

Summary

The clinical examination and the ancillary tests at the disposal from the veterinarian may be poor diagnostics in horses suffering from subclinical inflammatory airway disease or in clinical remission of recurrent airway obstruction (RAO). The objective of this study was to determine whether the methacholine bronchoprovocation test –which is daily used for diagnosis of asymptomatic human asthma– may be used as an applicable and repeatable method for the diagnosis of an increased susceptibility to bronchospasm in horses.

The test, realised on 8 horses (6 with RAO history and 2 controls) presents a good feasibility and significant repeatability. Dust exposure increased the bronchoreactivity, while it did not affect other clinical and functional parameters or inflammatory markers.

In the future, the bronchoprovocation test could therefore find its place in clinical practice for the detection of asymptomatic horses which are susceptible to develop bronchospasm in poor environmental conditions.

Key-words: Methacholine, pulmonary hyperresponsiveness, airway inflammation, horse.

Introduction

Les affections respiratoires représentent, après les affections locomotrices, la deuxième cause de mise au repos, voire de retraite, chez les chevaux de sport. Il s'agit principalement, chez ces athlètes, de problèmes de type inflammatoire chronique non septique (non causé par un agent infectieux pathogène), parmi lesquels la maladie obstructive récurrente (encore appelée pousse ou RAO pour *Recurrent Airway Obstruction*) et la maladie inflammatoire des voies respiratoires (ou IAD pour *Inflammatory Airway Disease*) sont les plus fréquemment rencontrées. La RAO apparaît en général chez des chevaux âgés de plus de 5 ans, cette prévalence augmentant avec l'âge. Elle est le résultat d'une hypersensibilité pulmonaire aux antigènes inhalés, présents dans la poussière organique du foin, d'une inflammation et d'une bronchoconstriction. Contrairement à la RAO, l'IAD touche des chevaux de tout âge (même très jeunes) et n'induit pas de difficulté respiratoire au repos.

La seule observation des signes cliniques ne permet pas de diagnostiquer avec certitude un cas de RAO ou d'IAD. Un recours aux examens complémentaires est donc nécessaire pour poser un diagnostic. Parmi ces examens, on retrouve l'endoscopie des voies respiratoires (avec réalisation d'un lavage broncho-alvéolaire), l'imagerie médicale (radiographie, échographie et scintigraphie pulmonaires), les tests fonctionnels (analyse des gaz sanguins artériels, mesure de la résistance respiratoire et réponse aux bronchodilatateurs) ou la biopsie pulmonaire. Si certains de ces tests sont utiles en cas de crise de RAO ou lors de forme clinique d'IAD, aucun test fiable n'existe pour le diagnostic de la pousse chez un cheval en rémission clinique complète (*e.g.* après une longue période passée au pré) ou pour un cheval suspect d'IAD ne présentant que de l'intolérance à l'effort.

En pneumologie humaine, les tests de bronchoprovocation sont utilisés quotidiennement pour le diagnostic de l'asthme, notamment chez le patient asymptomatique (Crapo *et al.*, 2000). Le principe est d'induire un bronchospasme par l'inhalation de métacholine (molécule provoquant la constriction des muscles lisses bronchiaux) à concentrations progressivement croissantes. Plus l'individu est hyperréactif, moins la concentration devra être importante pour induire un bronchospasme.

L'objectif de cette étude était de déterminer d'une part dans quelle mesure les tests de bronchoprovocation pourraient représenter une méthode aisément applicable et répétable pour le diagnostic d'une hyperréactivité bronchique chez le cheval, et ce dans le respect du confort et du bien-être de ce dernier, et d'autre part si les variations de l'hyperréactivité bronchique chez ces chevaux étaient en relation avec certains marqueurs de l'inflammation.

1. Matériel et méthodes

1.1. Chevaux

Six chevaux avec un historique de RAO (deux hongres et quatre juments, âgés de 19 ± 4 ans) et deux chevaux contrôles (un hongre et une jument, âgés de 12 ± 7 ans) ont été utilisés dans cette étude. Les chevaux RAO étaient en rémission clinique au début de l'étude. Le protocole a été approuvé par la Commission d'Éthique de l'utilisation des animaux à l'Université de Liège (numéro de dossier 1085).

1.2. Méthodes

1.2.1. Tests de fonction pulmonaire (TFP)

Les TFP ont été réalisés grâce à l'oscillométrie à impulsions, ou IOS (pour *Impulse Oscillometry System*) (van Erck *et al.*, 2003). Le dispositif est composé d'un haut-parleur produisant des signaux de pression multi-fréquentiels imposés au système respiratoire *via* un tube flexible connecté à un masque hermétique placé au niveau des naseaux. Un pneumotachographe permet de mesurer les signaux-réponse de l'appareil respiratoire et, après analyse, d'obtenir des paramètres de résistance respiratoires à 3, 5 et 10 Hz. Pour cette étude, seules les valeurs de résistance à 3 Hz ont été relevées.

1.2.2. Test de bronchoprovocation à la métacholine

Un TFP était dans un premier temps réalisé, permettant d'obtenir la valeur de résistance respiratoire de base. Une valeur seuil de réactivité bronchique était calculée ensuite en considérant 150% de la valeur de cette résistance de base. Le principe du test était de réaliser des nébulisations de métacholine à concentrations croissantes (0 – 0,1 – 0,3 – 1 – 3 – 9 – 15 mg/ml) pendant 2 minutes 30 chacune (correspondant à 1 ml inhalé) grâce à un nébuliseur pneumatique. Un délai de 2 minutes 30 supplémentaires était accordé au cheval avant de réaliser un TFP et ce afin d'obtenir les valeurs de

résistance après chaque nébulisation. Le test était arrêté lorsque la valeur de résistance à 3 Hz dépassait le seuil (150% de la résistance initiale) ou lorsque le cheval présentait de la dyspnée ou de la toux.

La dose de métacholine induisant l'augmentation de 50% de la résistance de base était calculée en interpolant les valeurs de résistance et de métacholine sur base des résultats obtenus avant et après le dépassement du seuil.

1.2.3. Endoscopie des voies respiratoires, lavage broncho-alvéolaire (LBA) et mesure des marqueurs de l'inflammation

L'endoscopie et le LBA étaient réalisés sous tranquillisation (romifidine et butorphanol) grâce à un vidéoendoscope de 2,6 m de long et 9 mm de diamètre. L'endoscopie a permis d'établir un score de sécrétions présentes dans la trachée (Gerber *et al.*, 2004). Le LBA a été réalisé en avançant l'extrémité de l'endoscope jusqu'à être bloquée dans une bronche du poumon droit, puis 100 ml de sérum physiologique stérile préchauffé à 37°C étaient instillés via le canal opérateur et récupérés doucement pour constituer le premier échantillon. Deux seringues de 60 ml supplémentaires étaient ensuite instillées et récupérées une à une pour constituer le deuxième échantillon.

Sur le premier échantillon, les concentrations d'interleukine-1 β (IL1- β), d'interleukine-8 (IL-8), du *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) et d'interféron γ (IFN- γ) ont été mesurées par tests ELISA homologues équins. Le reste du premier échantillon mélangé au second a été utilisé pour réaliser une cytologie pulmonaire ainsi que la mesure de l'expression génique des cellules inflammatoires. La cytologie était réalisée en étalant 150 μ l sur une lame de microscope qui a été lue, après coloration au May-Grünwald Giemsa, sur 200 cellules en double aveugle par deux vétérinaires expérimentés. L'expression génique a été mesurée, après extraction de l'ARN au Trizol, sur cinq gènes de référence (SDHA, HPRT, RPL32, GAPDH et TFRC) et 4 gènes d'intérêt (IL-1 β , IL-8, IFN- γ et TNF- α) par RT-qPCR sur SYBR[®] Green.

1.2.4. Protocole expérimental

Deux protocoles ont été réalisés :

- **Répétabilité** : 5 chevaux (3 RAO en rémission clinique et 2 contrôles) ont subi deux tests de bronchoprovocation à 24 heures d'intervalle.
- **Modulation de l'hyperréactivité bronchique lors d'exposition aux poussières** : les 8 chevaux ont été utilisés pour ce protocole. Ils ont subi une série de tests avant et après un challenge environnement (environnement chargé en poussières d'écurie, dont le but est de provoquer la réaction inflammatoire du système respiratoire) : examen général approfondi, test de fonction pulmonaire, test de bronchoprovocation, endoscopie des voies respiratoires et LBA.

1.2.5. Analyses statistiques

Pour la répétabilité et les variations induites par le challenge environnemental, les variations entre mesures successives étaient détectées par ANOVA II. Le seuil de significativité était fixé à $p \leq 0,05$. Les variations d'expression génique étaient traitées et statistiquement analysées grâce au logiciel qbase^{PLUS}.

2. Résultats

2.1. Faisabilité et répétabilité

Les tests réalisés ont été parfaitement tolérés par les chevaux. Au cours des tests de provocation, aucun bronchodilatateur n'a dû être administré pour lutter contre un bronchospasme ou une dyspnée trop intense. L'analyse statistique a montré que les différences entre les résultats des tests obtenus à 24 heures d'intervalle étaient non significatives ($p=0,1642$) : le test témoigne donc d'une répétabilité satisfaisante. Les différences entre chevaux sont, elles, significatives ($p = 0,0004$), ce qui témoigne notamment de la puissance du modèle pour détecter des différences.

2.2. Modulation de l'hyperréactivité bronchique lors d'exposition aux poussières

L'exposition durant 7 jours aux poussières de l'écurie n'a eu aucun effet détectable sur les paramètres de l'examen général ni sur les résultats du test de fonction pulmonaire de base. Une augmentation non significative a été observée pour la neutrophilie pulmonaire ainsi que pour le score de mucus trachéal. Le nombre de cellules dans le LBA n'était pas significativement modifié. En revanche, l'exposition aux poussières a modifié significativement l'hyperréactivité bronchique (estimée par une diminution de la concentration de métacholine nécessaire pour atteindre le bronchospasme) chez les chevaux poussifs ($p=0,05$). Il a pu être en outre observé que les concentrations de métacholine nécessaires étaient

inférieures chez les chevaux RAO que chez les contrôles (non significatif), constatation observée avant comme après l'exposition aux poussières.

2.3. Relation entre hyperréactivité bronchique et inflammation pulmonaire

Il ressort de l'analyse des variations de l'expression génique des 4 gènes d'intérêt étudiés ou du dosage des cytokines dans le liquide de LBA qu'aucun facteur n'a varié significativement au seuil 5%.

Bien que certains marqueurs de l'inflammation respiratoire évoluent dans la même direction après la semaine passée au contact des poussières de l'écurie, aucune corrélation n'a pu être montrée entre un des marqueurs et la concentration de métacholine nécessaire à l'obtention du bronchospasme.

3. Discussion

Le diagnostic des inflammations des voies respiratoires basses n'est pas toujours aisé, particulièrement lorsque le cheval est asymptomatique et les résultats peu convaincants aux examens complémentaires actuellement disponibles. Dans ce contexte, le test de bronchoprovocation à la métacholine a été étudié afin de mettre en évidence des susceptibilités accrues au bronchospasme chez des chevaux asymptomatiques en mesurant leur réactivité bronchique.

Le protocole sélectionné pour la réalisation des tests de bronchoprovocation sur nos chevaux a été choisi en gardant à l'esprit la simplicité du test pour les opérateurs et le respect du bien-être et du confort du cheval : des concentrations de métacholine avec un incrément de 3 fois la dose précédente, une valeur seuil de résistance de 150% de la valeur de base pour la mesure de la bronchoréactivité, l'oscillométrie à impulsions comme test de fonction pulmonaire et enfin la métacholine comme agoniste.

Les chevaux ont bien toléré les nébulisations de métacholine. En outre, les tests de bronchoprovocation ont montré une bonne répétabilité. Les différences entre mesures intra-individus étaient non significatives et celles entre mesures inter-individus l'étaient.

Le challenge environnemental imposé aux chevaux était volontairement léger. En effet, si un cheval était en crise au moment des tests de bronchoprovocation, il eut été impossible et dangereux de mesurer sa bronchoréactivité, celui-ci étant déjà en crise clinique. Le choix d'un challenge environnemental allégé est probablement à l'origine de l'absence de modifications au niveau de l'état général, des paramètres fonctionnels ou des marqueurs de l'inflammation. Cependant, l'hyperréactivité bronchique mesurée était, elle, modifiée après ce challenge environnemental. Chez les chevaux poussifs en rémission, nous avons observé qu'il existe une hyperréactivité bronchique plus forte que chez les chevaux contrôles, mais la différence entre les deux groupes était non significative. En revanche, après une semaine en écurie, les bronchoréactivités des deux groupes différaient significativement. Si le test de bronchoprovocation devait faire partie du panel d'examens à la disposition du clinicien, il faudrait que ce dernier prenne en compte ce facteur.

L'absence de modifications de la concentration des cytokines étudiées suggère que celles-ci n'interviendraient pas directement dans l'apparition de l'hyperréactivité bronchique, observations également rapportées chez l'homme.

En gardant à l'esprit le nombre limité de chevaux étudiés, les résultats obtenus suggèrent que le test d'hyperréactivité bronchique réalisé avant et après un challenge environnemental léger peut donc être proposé pour la détection d'individus asymptomatiques, susceptibles de développer des bronchospasmes lors de conditions environnementales moins favorables, par exemple lors d'un examen d'achat d'un cheval suspecté poussifs. D'autres études devraient être poursuivies sur une population plus importante de chevaux ainsi que sur des chevaux souffrant d'IAD.

Références

Crapo, R.O., Casaburi, R., Coates, A.L., Enright, P.L., Hankinson, J.L., Irvin, C.G., MacIntyre, N.R., McKay, R.T., Wanger, J.S., Anderson, S.D., Cockcroft, D.W., Fish, J.E., Sterk, P.J. 2000. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161, 309-329.

Gerber, V., Straub, R., Marti, E., Hauptman, J., Herholz, C., King, M., Imhof, A., Tahon, L., Robinson, N.E. 2004. Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Veterinary Journal* 36, 576-582.

Van Erck, E., Votion, D.M., Kirschvink, N., Art, T., Lekeux, P. 2003. Use of the impulse oscillometry system for testing pulmonary function during methacholine bronchoprovocation in horses. *American Journal of Veterinary Research* 64, 1414-1420