

## Influence du poumon prélevé sur le diagnostic cytologique des affections des voies respiratoires profondes chez les chevaux Trotteurs Français à l'entraînement

Par :

- Marianne Depecker<sup>1</sup>, Eric Richard<sup>2</sup>, Pierre-Hugues Pitel<sup>2</sup>, Guillaume Fortier<sup>2</sup>, Claire Leleu<sup>3</sup>, Anne Couroucé-Malblanc<sup>1</sup>
- <sup>1</sup>LUNAM Université, ONIRIS, UPSP 5304 Laboratoire de Physiopathologie Animale et de Pharmacologie Fonctionnelle, Atlanpôle - La Chantrerie, BP40706, 44307 Nantes
- <sup>2</sup>Laboratoire Frank Duncombe, 1 route de Rosel, 14053 Caen cedex 4
- <sup>3</sup>EQUI-TEST, La Lande, 53 290 Grez en Bouère

### Résumé

L'objectif de l'étude est de déterminer si le poumon prélevé influence significativement le profil cytologique du lavage broncho-alvéolaire (LBA) dans le diagnostic de la maladie inflammatoire des voies respiratoires profondes (MIVRP ou IAD) et de l'hémorragie pulmonaire induite par l'exercice (HPIE). 138 Trotteurs Français ont été inclus dans l'étude, réalisée au cours des meetings d'été de 2011 et 2012. Les LBA ont été réalisés par vidéo-endoscopie dans les poumons droit et gauche et comparés entre eux. Des différences significatives ont été mises en évidence dans le nombre total de cellules et les pourcentages cellulaires entre le poumon droit et gauche, et une corrélation modérée entre les deux poumons a été mise en évidence dans le diagnostic de l'IAD et de l'HPIE. Le LBA réalisé à l'aveugle (méthode classique) d'un seul poumon peut ainsi entraîner la présence de faux négatifs et sous-diagnostiquer certaines affections responsables d'intolérance à l'effort chez les chevaux de course. Ces résultats, jamais démontrés auparavant, laissent supposer que le prélèvement des deux poumons (par endoscopie ou guidage endoscopique) s'avère nécessaire dans le diagnostic de certitude de l'IAD et de l'HPIE.

**Mots clés : Lavage broncho-alvéolaire, Maladie Inflammatoire des Voies Respiratoires Profondes, Hémorragie Pulmonaire Induite par l'Exercice, Trotteur Français**

### Summary

The objective of the study was to determine whether the lung being sampled would significantly influence bronchoalveolar lavage (BAL) fluid cytological profiles and subsequent diagnosis of inflammatory airway disease (IAD) and exercise-induced pulmonary hemorrhage (EIPH) in horses. 138 Standardbred racehorses were included in this prospective observational study, realized during summer meetings of 2011 and 2012. BAL was performed using videoendoscopy in both right and left lungs, and comparison was made between cytological analysis of the pooled samples collected from both lungs. Total and differential cell counts were significantly different among lungs, and a moderate correlation was found between right and left lung when diagnosing IAD or EIPH. As the lung being sampled significantly influenced whether a diagnosis of IAD or EIPH was made, BAL should be performed in both lungs to ensure accurate diagnosis of lower airway disease in horses.

**Key-words: Bronchoalveolar lavage, Inflammatory Airway Disease, Exercise-Induced Pulmonary Hemorrhage, French Trotter, Standardbred**

## Introduction

Les maladies des voies respiratoires profondes telles que l'hémorragie pulmonaire induite par l'exercice (HPIE) et la maladie inflammatoire des voies respiratoires profondes (MIVRP ou IAD) sont des causes fréquentes de contre performance chez les chevaux de course. Le lavage broncho-alvéolaire (LBA) est considéré comme l'outil diagnostique le plus approprié dans l'évaluation de ces affections. Les recommandations établies par le Workshop International sur les Maladies Respiratoires Chroniques des Equidés en 2000 (Robinson, 2001) suggèrent l'instillation de 250 à 500 ml de liquide physiologique en 1 à 3 bolus pour obtenir une composition cellulaire représentative du poumon prélevé. Plusieurs études ont démontré l'intérêt de regrouper les échantillons de liquide prélevés en un seul « pool » soumis à analyse, ou d'utiliser les dernières seringues récupérées, afin d'obtenir le plus grand nombre de cellules possibles. Peu d'études ont cependant été réalisées sur la comparaison de la cytologie du LBA entre les deux poumons. Celles menées à ce jour ont conclu qu'un seul prélèvement était représentatif de l'ensemble de l'aire pulmonaire (Sweeney *et al.*, 1992; Mc Gorum, 1993; Jean *et al.*, 2011). Cependant, aucune étude n'a été réalisée chez des chevaux Trotteurs à l'entraînement, ni sur de grands effectifs de chevaux.

L'objectif de l'étude est de déterminer si le poumon prélevé influence le diagnostic des atteintes respiratoires profondes chez les chevaux Trotteurs Français à l'entraînement.

## 1. Matériel et méthodes

Cent trente-huit chevaux Trotteurs Français (58 juments, 76 hongres et 4 mâles) âgés de 3 à 9 ans (moyenne  $4,7 \pm 1,6$  ans) et provenant de 11 écuries différentes ont été inclus dans cette étude prospective. Soixante-quatre chevaux ont été prélevés durant le meeting d'été de 2011, et 74 durant celui de 2012. Tous les chevaux inclus étaient en entraînement actif et avaient participé à une course depuis moins d'un mois, et/ou devaient participer à une course dans les 15 jours à venir.

Après un examen clinique et un bilan sanguin complet à jeun, le lavage broncho-alvéolaire a été réalisé sur chaque cheval sous contrôle vidéo-endoscopique (gastroscope de 3,20 m de long), à l'aide d'un tord-nez. La tranquillisation n'a été employée que dans un nombre limité de cas, et sur des chevaux ne participant pas à une course dans les 10 jours suivant le prélèvement. Deux cent cinquante ml de solution saline isotonique ont été instillés dans chaque poumon (ordre choisi de façon aléatoire), en 2 bolus de 125 ml avec une aspiration après chaque bolus. Les prélèvements récupérés pour chaque poumon ont été mélangés et un échantillon envoyé au laboratoire sous 24h dans un tube EDTA pour analyse cytologique. Après cytocentrifugation et coloration MGG, un comptage cellulaire total et différentiel sur 300 cellules a été réalisé. Le nombre de chaque type cellulaire est exprimé en pourcentage du nombre de cellules totales. Les cellules épithéliales ne sont pas incluses dans le comptage différentiel.

## 2. Définition des cas

### 2.1. Inflammation des voies respiratoires profondes (IAD)

Les critères d'inclusion de l'IAD théoriquement décrits sont un taux de neutrophiles strictement supérieur à 5%, et/ou un taux d'éosinophiles strictement supérieur à 0,1%, et/ou un taux de mastocytes strictement supérieur à 2% (Robinson, 2003). Une classification moins restrictive a également été appliquée dans cette étude, avec une limite de neutrophiles  $>10\%$ , d'éosinophiles  $\geq 5\%$ , et de mastocytes  $\geq 5\%$  pour considérer les chevaux comme souffrant d'IAD (Richard *et al.*, 2010; Beekman *et al.*, 2011).

### 2.2. Hémorragie pulmonaire induite par l'exercice (HPIE)

Les chevaux présentant un taux d'hémosidérophages/macrophages totaux supérieur à 20% dans le LBA ont été considérés comme souffrant d'HPIE (Richard *et al.*, 2010).

### 2.3. Contrôles

Les chevaux ne remplissant pas les critères d'inclusion cytologiques énoncés ci-dessus ont été considérés comme contrôles.

### 3. Analyses statistiques

La normalité de distribution des données a été évaluée à l'aide d'un test de Shapiro-Wilk W. Les différentes variables n'étant pas distribuées normalement, les résultats sont représentés en 'médiane ; 1<sup>er</sup>-3<sup>ème</sup> quartile'. Les données ont ensuite été normalisées (log 10) et un test de Student a été utilisé pour comparer les poumons droit et gauche. Les associations entre les pourcentages cellulaires de chaque poumon ont été évaluées à l'aide du coefficient de corrélation de Pearson et d'une analyse de régression linéaire. Les mesures d'agrément pour les variables numériques et catégoriques (chevaux contrôles, IAD ou HPIE) ont été évaluées à l'aide du coefficient de corrélation intraclass (ICC) et du coefficient kappa de Cohen ( $\kappa$ ), respectivement. Ces deux coefficients indiquent une grande répétabilité des résultats entre les deux poumons pour les populations cellulaires si la valeur est proche de 1. Un intervalle de confiance de 95% a été appliqué pour chaque score d'agrément. Tous les résultats ont été considérés significatifs si  $p < 0,05$ .

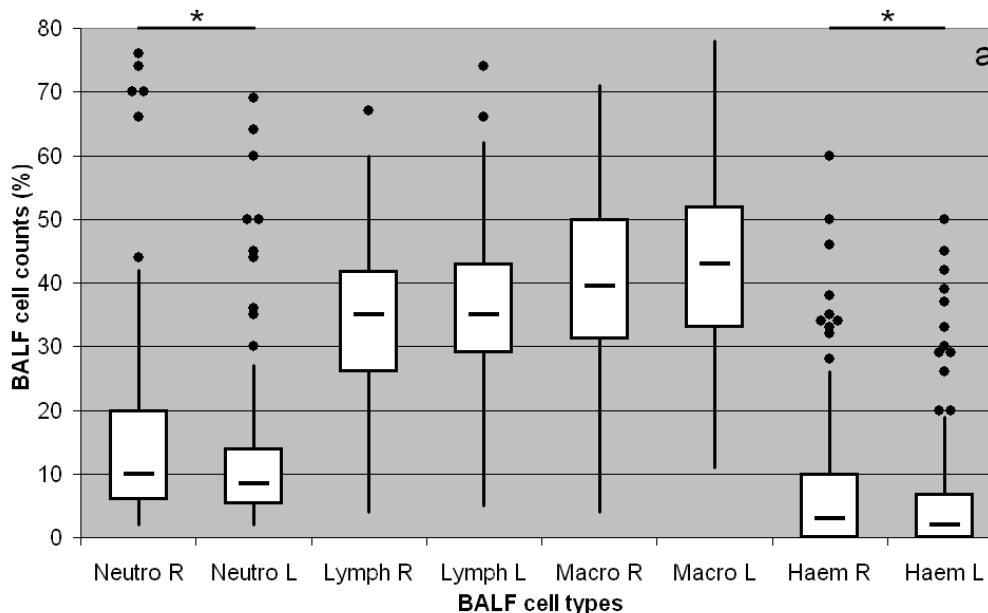
## 4. Résultats

### 4.1. Pourcentages cellulaires

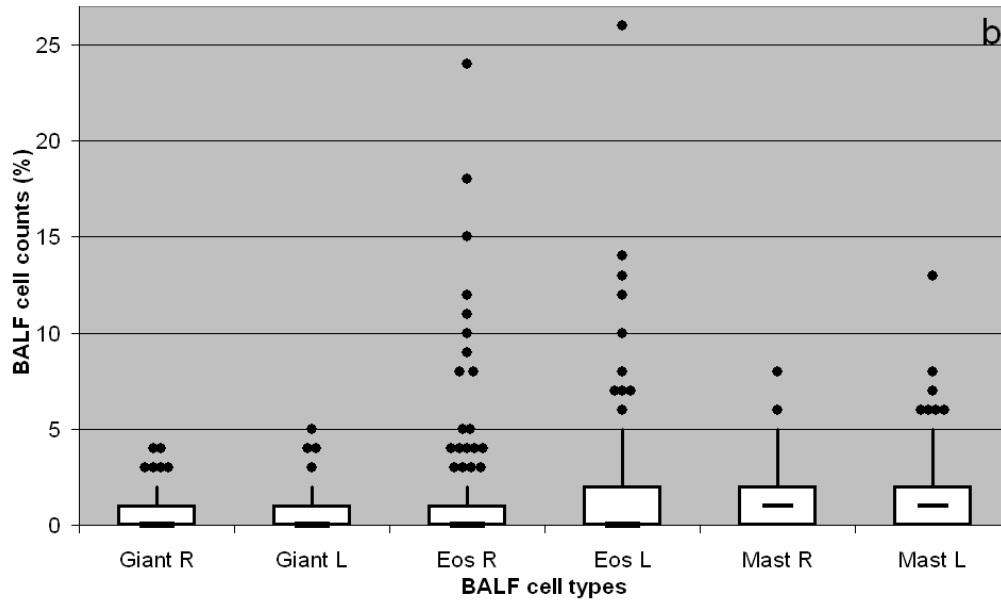
Les tests réalisés ont mis en évidence des différences significatives entre les poumons droit et gauche : les pourcentages de neutrophiles et d'hémosidérophages étaient supérieurs dans le poumon droit comparé au poumon gauche (Figure I). De même, le ratio hémosidérophages/macrophages totaux était supérieur dans le poumon droit (médiane : 7,0% ; 1<sup>er</sup> quartile : 0,0 – 3<sup>ème</sup> quartile : 24,25%) comparé au poumon gauche (4,0 ; 0-17%).

Figure I (a) et (b): Comptage cellulaire différentiel (médiane; 1<sup>er</sup>-3<sup>ème</sup> quartile) du LBA de chaque poumon exprimé en pourcentages du nombre total de cellules nucléées (n=138). \* Différence significative pour les pourcentages cellulaires à  $p < 0,001$ .

Figure I (a) and (b): Differential BAL cell count (median; 1<sup>st</sup> - 3<sup>rd</sup> quartile) from both lungs expressed as percentages of total nucleated cells (n=138).



R= right; L= left; Neutro= neutrophils; Macro= macrophages; Lymph= lymphocytes; Mast= Mast cells; Eos= eosinophils; Haem= haemosiderophages; Giant= Giant cells (macrophage lineage) \* Significant difference at  $P < 0,001$



La mesure du coefficient de corrélation intraclass (ICC) a révélé un agrément modéré entre les poumons droit et gauche pour le pourcentage de neutrophiles, et un agrément faible pour les pourcentages de mastocytes, d'éosinophiles et pour le ratio hémossidérocytes/macrophages (tableau 1).

Tableau 1 : Coefficient de corrélation intraclass (ICC) des pourcentages de cellules inflammatoires basé sur l'évaluation cytologique du liquide de lavage bronchoalvéolaire à partir des poumons droit et gauche (n=138).  
 Table 1: Intraclass correlation coefficient (ICC) of inflammatory cell percentages based on cytological evaluation of bronchoalveolar lavage fluid from left and right lungs in 138 horses.

Type cellulaire	ICC	Intervalle de confiance 95%
Neutrophiles	0,75	0,67 – 0,82
Mastocytes	0,55	0,43 – 0,66
Eosinophiles	0,40	0,26 – 0,54
Hémossidérocytes/ Macrophages totaux	0,56	0,44 – 0,67

## 4.2. Profils cytologiques

### 4.2.1. Diagnostic de l'IAD

Soixante-dix-huit chevaux (56,5%) ont rempli les critères d'inclusion de l'IAD avec la nouvelle définition, dont 52 (37,7%) dans les deux poumons, et 26 (18,8%) dans un seul poumon. Soixante chevaux (43,5%) ont été considérés comme contrôles. Le coefficient de corrélation  $\kappa$  (0,62; CI 0,49 – 0,75) a révélé un agrément modéré entre les poumons droit et gauche pour le diagnostic de la maladie inflammatoire pulmonaire.

L'utilisation de la définition originale et plus restrictive de l'IAD a conduit à un agrément plus faible ( $\kappa = 0,30$ ; CI 0,09 – 0,50), avec 129 chevaux (93,5%) classifiés comme souffrant d'IAD (103 dans les 2 poumons, 26 dans un seul poumon), et seulement 9 chevaux (6,5%) considérés comme contrôles.

#### 4.2.2. Diagnostic de l'HPiE

Quarante-quatre chevaux (31,9%) ont rempli les critères diagnostiques cytologiques de l'HPiE dans un poumon au moins, dont 19 (13,8%) dans les 2 poumons, 17 (39,5%) dans le poumon droit uniquement et 8 (5,8%) dans le poumon gauche uniquement. Le coefficient  $\kappa$  (0,49; CI 0,32 – 0,66) a révélé un agrément modéré entre les poumons droit et gauche pour le diagnostic de l'hémorragie pulmonaire.

### 5. Discussion

Il s'agit de la première étude prospective réalisant des lavages bronchoalvéolaires dans les 2 poumons sur des chevaux Trotteurs de course.

Le LBA est souvent considéré comme une méthode invasive, empêchant son utilisation en routine ou limitant sa réalisation à de faibles populations de chevaux. Cependant, pour des raisons de dopage aucune anesthésie locale n'a été utilisée dans l'étude, et seuls quelques chevaux ont été tranquilisés. Aucune difficulté de réalisation n'a été constatée sur l'ensemble des chevaux prélevés, indiquant que le LBA est une technique diagnostique fiable et sûre sur les chevaux Trotteurs de course.

A notre connaissance, aucune étude précédente n'a mis en évidence de différence significative entre les poumons droit et gauche pour le pourcentage de neutrophiles, d'hémosidérophages, ou pour le ratio hémosidérophages/macrophages. Cette différence est probablement due au nombre plus élevé de chevaux prélevés dans cette étude.

Ces résultats peuvent influencer le diagnostic des atteintes pulmonaires chez le cheval : bien qu'un lavage broncho-alvéolaire soit représentatif de l'ensemble du poumon prélevé, un poumon prélevé n'est pas représentatif de l'autre poumon sur le même cheval. Un profil cytologique anormal obtenu à partir d'un seul poumon est suffisant pour le diagnostic d'une maladie inflammatoire ou hémorragique, mais un résultat dans les valeurs usuelles ne permet pas d'exclure une atteinte dans l'autre poumon. Il apparaît donc indiqué que les deux poumons soient systématiquement prélevés lors de la réalisation d'un LBA. A défaut, il est préférable de ne prélever que le poumon droit plutôt que le gauche, et d'utiliser des seuils de détection moins restrictifs que ceux précédemment décrits pour la maladie inflammatoire pulmonaire, afin de limiter le nombre de faux négatifs obtenus à partir d'un seul prélèvement.

### 6. Conclusion

Le lavage bronchoalvéolaire réalisé dans un poumon n'est pas représentatif de l'autre poumon sur le même cheval. Ainsi, les deux poumons devraient être prélevés pour une meilleure évaluation de la composition cellulaire pulmonaire et pour un diagnostic précis d'atteinte des voies respiratoires profondes. Le risque de considérer incorrectement un cheval comme étant « sain » augmente avec l'utilisation de seuils restreints pour les populations cellulaires étudiées, et lorsque le lavage est uniquement réalisé dans le poumon gauche.

### Remerciements

Les auteurs souhaitent remercier l'IFCE et la SECF pour leur soutien financier, ainsi que les entraîneurs et vétérinaires traitants pour leur collaboration dans cette étude.

### Références

Beekman, L., Tohver, T., Dardari, R., Leguillette, R. 2011. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bronchoalveolar lavage cells from horses with inflammatory airway disease. *BMC Molecular Biology* 12, 5.

Jean, D., Vrins, A., Beauchamp, G., *et al.* 2011. Evaluation of variations in bronchoalveolar lavage fluid in horses with recurrent airway obstruction. *American Journal of Veterinary Research* 72, 838-842.

McGorum, B.C., Dixon, P.M., Halliwell, R.E., *et al.* 1993. Comparison of cellular and molecular components of bronchoalveolar lavage fluid harvested from different segments of the equine lung. *Research in Veterinary Science* 55, 57-59.

Newton, J.R., Wood, J.L. 2002. Evidence of an association between inflammatory airway disease and EIPH in young Thoroughbreds during training. *Equine Veterinary Journal Supplement* 34, 417-424.

Richard, E.A., Fortier, G.D., Pitel, P.H., *et al.* 2010. Sub-clinical diseases affecting performance in Standardbred trotters: diagnostic methods and predictive parameters. *Veterinary Journal* 184, 282-289.

Robinson, N.E. 2001. International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University 16-18 June 2000. *Equine Veterinary Journal* 33, 5-19.

Robinson, N.E. 2003. Inflammatory airway disease: defining the syndrome. Conclusions of the Havemeyer Workshop. *Equine Veterinary Education* 15, 61-63.

Sweeney, C.R., Rossier, Y., Ziemer, E.L., *et al.* 1992. Effects of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses. *American Journal of Veterinary Research* 53, 1376-1379.