

## Suivi de l'évolution de la réponse immunitaire innée pulmonaire de huit chevaux Trotteurs Français à l'entraînement

Par :

- I. Waldschmidt <sup>1-5</sup>, T. Art <sup>2-5</sup>, F. Audigié <sup>1-5</sup>, F. Bureau <sup>3-5</sup>, F. Farnir <sup>2</sup>, L. Frellstedt <sup>2-5</sup>, E. Richard <sup>4-5</sup>, M-C. Dupuis-Tricaud<sup>1-5</sup>
- <sup>1</sup>CIRALE-Médecine Sportive, RD 675, 14430 Goustranville, France
- <sup>2</sup>Centre de Médecine Sportive, Faculté de Médecine Vétérinaire, Bat.42, Bd de Colonster, 4000 Liège, Belgique
- <sup>3</sup>ULg GIGA, 1 av. de l'hôpital, 4000 Liège, Belgique
- <sup>4</sup>Laboratoire Frank Duncombe, 1 rte de Rosel, 14000 Caen, France
- <sup>5</sup>Fondation Hippolia, 14000 Caen, France

### Résumé

Les affections respiratoires sont la seconde cause d'intolérance à l'effort chez le cheval athlète. Celles-ci pourraient être liées à un dysfonctionnement de l'immunité non spécifique (INS) pulmonaire. L'objectif de cette étude est d'identifier les modifications de l'INS induites par l'effort et l'entraînement. Huit Trotteurs Français ont été entraînés pendant quatre mois. Des lavages broncho-alvéolaires (LBA) ont été réalisés au repos et 24h après un effort standardisé jusqu'à fatigue sur tapis roulant, avant et après l'entraînement. Les macrophages alvéolaires (MA) ont été isolés et stimulés par des substances agissant sur des récepteurs de l'immunité appelés TLR (Toll-Like récepteurs), mimant une attaque virale ou bactérienne. La réponse des cellules a été évaluée en mesurant la production des cytokines IFN $\beta$  et TNF $\alpha$  par ELISA. Les résultats montrent une diminution de la sécrétion de TNF $\alpha$  et IFN $\beta$  après l'entraînement, persistant après plusieurs semaines de repos. Peu de différences sont constatées après un effort ponctuel. Cette étude montre que l'entraînement entraîne une baisse de la production de cytokines par les MA en réponse à divers stimulants, expliquant en partie la susceptibilité des chevaux athlètes aux affections respiratoires.

**Mots clés : immunité innée, cytokines, effort, TLR, entraînement.**

### Summary

Higher sensibility to respiratory diseases has been observed in athletic horses, suggesting an impairment of innate immunity. Alveolar macrophages (AMs) are, via toll-like receptors (TLRs), major actors of innate immunity in the lung. The aim of this study was to evaluate cytokines production by AMs stimulated with TLR ligands in horses before and after training at rest and post-exercise. Eight standardbred horses were progressively trained during four months. Bronchoalveolar lavages (BALs) were performed at rest and 24 hours after a treadmill exercise up to fatigue in trained and untrained horses. AMs isolated from BALs were stimulated by TLR ligands to mimic bacterial and viral exposure. ELISA kits were used to quantify their response through IFN $\beta$  and TNF $\alpha$  production. Results show a decrease of TNF $\alpha$  and IFN $\beta$  production by AMs of horses after training whereas few modifications could be revealed after a strenuous exercise. TLRs stimulations were effective in all conditions but cytokines release was significantly lower in trained horses. This study showed that training leads to a decrease of cytokines production by AMs after specific stimulation, which could partly explain the susceptibility of athletic horses to respiratory affections.

**Key-words: innate immunity, cytokines, exercise, TLR, training.**

## Introduction

Les affections respiratoires sont la cause principale d'intolérance à l'effort chez le cheval athlète après les problèmes musculo-squelettiques. Cette susceptibilité du système respiratoire pourrait être liée à un dysfonctionnement de l'immunité non spécifique (INS, 1ère ligne de défense de l'organisme). Chez l'homme, il a été montré qu'un exercice intense, en particulier une compétition, pouvait affaiblir les mécanismes de défenses des voies respiratoires. Chez le cheval, les études scientifiques s'intéressant aux effets de l'exercice sur l'INS portent principalement sur le compartiment sanguin tandis que les modifications de l'immunité dans le compartiment pulmonaire sont relativement peu explorées.

D'un point de vue moléculaire, certains récepteurs de l'immunité jouent un rôle essentiel dans la défense de l'organisme face aux agressions externes. Il s'agit des récepteurs Toll-like (TLR) présents à la surface ou dans le cytoplasme des cellules immunitaires. Ils sont capables de reconnaître des parties de bactéries ou de virus, et d'induire la production de cytokines nécessaire à l'élimination du pathogène. Il existe 12 types de TLR reconnaissant différents types d'agression et qui peuvent utiliser deux voies de signalisation différentes :

- MyD88 utilisée par tous les TLR (excepté TLR3) induit la production de cytokines inflammatoires (comme TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) et de molécules impliquées dans la régulation de l'inflammation.
- TRIF utilisée par les TLR 3 et 4, induit la production de cytokines inflammatoires et d'interférons de type I (IFN $\alpha$  et IFN $\beta$ ).

La production de cytokines induite par l'activation des TLR permet le recrutement de cellules immunitaires spécifiques sur le site de l'agression et une élimination efficace de l'agent pathogène. On comprend ainsi mieux qu'une réponse inadaptée de ces TLR, soit de façon excessive, soit de façon insuffisante puisse engendrer diverses affections.

L'objectif de cette étude était d'identifier les modifications de l'INS pulmonaire induites par l'effort et l'entraînement permettant d'expliquer la fréquence élevée des affections respiratoires chez les chevaux athlètes.

## 1. Matériel et Méthode

### 1.1. Les chevaux

Huit chevaux Trotteurs Français ( $3,5 \pm 0,5$  ans,  $441,8 \pm 32,1$  kg) ont été sélectionnés sur la base d'un examen clinique complet et d'examen complémentaires (endoscopie des voies respiratoires, prélèvements respiratoires et sanguins, examen locomoteur). Ils ont été hébergés 3 mois en paddock, au repos, durant lesquels ils ont été vermifugés et vaccinés puis au box/prairie pendant l'entraînement. Ils recevaient de l'enrubané (de façon à limiter les risques allergiques) et un aliment concentré pendant l'entraînement.

### 1.2. Protocole d'entraînement et bilans sportifs

Les chevaux ont été soumis à un entraînement progressif sur piste pendant 4 mois comprenant :

- 8 semaines de pré-entraînement : travail de fond 3x/sem. avec augmentation progressive de l'intensité du travail.
- 7 semaines de travail intensif : introduction du travail de vitesse en fractionné (1x/sem. puis 2x/sem. en conservant 2 séances de fond/sem.).

Le programme d'entraînement a été suivi à l'aide de cardiofréquencemètres et de capteurs de vitesse et les chevaux ont été contrôlés grâce à un suivi clinique journalier. Des tests d'effort sur piste et sur tapis roulant étaient régulièrement effectués afin de suivre leur progression. Ils ont ensuite subi une période de désentraînement de 14 semaines pendant laquelle ils étaient au repos en pâture.

- Des bilans sportifs ont été réalisés sur chaque cheval avant, pendant et à la fin de la période d'entraînement et de désentraînement. Ils comprenaient un examen clinique approfondi au repos et après effort, un bilan sanguin, des prélèvements respiratoires et un test d'effort. Le test d'effort réalisé sur tapis roulant à grande vitesse correspondait à un test standardisé pour les trotteurs (3 paliers à successivement 7, 9 et 11 m/s avec une pente de 4%) complété par un 4<sup>ème</sup> palier jusqu'à fatigue avec suivi de la fréquence cardiaque et des lactates sanguins.

### 1.3. Prélèvements respiratoires et culture cellulaire

Des lavages broncho-alvéolaires (LBA) ont été réalisés sur cheval sédaté sous contrôle endoscopique en alternant poumon droit et gauche :

- au repos avant, pendant et après la période d'entraînement et désentraînement.

- 24h après effort standardisé sur tapis roulant à grande vitesse (TRGV) avant et après l'entraînement.

Les cellules pulmonaires ont été isolées du LBA par centrifugations successives puis placées en milieu de culture à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> en incubateur. Les macrophages alvéolaires (cellules de l'immunité innée) ont été isolés des autres cellules pulmonaires par adhésion avec une pureté entre 70 et 85%.

#### **1.4. Stimulation des macrophages alvéolaires et mesure de leur réponse**

Trois ligands ont été choisis pour stimuler les TLR des macrophages alvéolaires en culture, de façon à mimer différents pathogènes. Il s'agit de :

- FSL-1 (10 ng/mL), ligand des TLR2/6 (mimant des mycoplasmes),
- Poly(I:C) (1 µg/mL), ligand des TLR3 (mimant des virus),
- LPS (100 ng/mL), ligand des TLR4 (mimant des bactéries).

Une étude préliminaire au laboratoire a permis de définir les doses de ligand à utiliser ainsi que le temps d'incubation idéal pour une stimulation optimale des TLR.

La réponse des cellules a été évaluée en mesurant la production de 2 cytokines d'intérêt IFN $\beta$  (voie TRIF) et TNF $\alpha$  (voie MyD88) dans le surnageant des cellules 6h après stimulation, à l'aide de kits ELISA spécifiques équins. La production de cytokines a également été évaluée sur des cellules non stimulées (niveau basal). L'effet de l'entraînement a été étudié en comparant les résultats obtenus chez les chevaux au cours des différents stades d'entraînement. L'effet de l'effort ponctuel a également été évalué sur les chevaux soumis au test d'effort avant et après entraînement.

## **2. Résultats**

### **2.1. Effets de l'effort et de l'entraînement sur la production basale de TNF $\alpha$ et IFN $\beta$**

Un effort intensif jusqu'à fatigue n'a pas d'effet significatif sur la production d'IFN $\beta$  ou de TNF $\alpha$  par les macrophages alvéolaires non stimulés, que ce soit sur chevaux non entraînés ou entraînés. En revanche, on observe une chute significative de la production de TNF $\alpha$  ( $p=0,0002$ ) et d'IFN $\beta$  ( $p=0,0002$ ) en réponse à l'entraînement, diminution qui persiste même après 14 semaines de désentraînement ( $p=0,0007$  et  $0,0003$  respectivement).

### **2.2. Effets de l'effort et de l'entraînement sur la production de TNF $\alpha$ et IFN $\beta$ stimulée par les ligands de TLR**

L'effort intensif n'a pas d'effet significatif sur la production de TNF $\alpha$  et IFN $\beta$  par les macrophages alvéolaires stimulés par le Poly(I:C) et le FSL-1, que ce soit sur chevaux non entraînés ou entraînés. On observe une augmentation légère de la production d'IFN $\beta$  ( $p=0,0174$ ) par les macrophages alvéolaires stimulés au LPS en réponse à l'exercice intense, uniquement sur des chevaux déjà entraînés.

La production d'IFN $\beta$  induite par le Poly(I:C) est diminuée par l'entraînement ( $p=0,0009$ ) par rapport à des chevaux non entraînés et ne ré-augmente pas malgré les 14 semaines de désentraînement ( $p=0,0006$ ).

La sécrétion de TNF $\alpha$  est diminuée pour une stimulation avec du Poly(I:C) ( $p=0,0030$ ) ou du FSL-1 ( $p=0,0005$ ) en réponse à l'entraînement. L'entraînement ne modifie pas la production de TNF $\alpha$  en réponse au LPS de façon significative ( $p=0,7555$ ).

Contrairement à l'IFN $\beta$ , après une période de désentraînement, la production de TNF $\alpha$  en réponse au Poly(I:C) n'est plus différente de celle des cellules des chevaux non entraînés ( $p=0,3694$ ). Pour la stimulation au FSL-1, on observe une augmentation de la sécrétion de TNF $\alpha$  pendant la période de désentraînement par rapport aux chevaux entraînés mais qui reste toujours inférieure à celle des chevaux non entraînés ( $p=0,0172$ ).

## **Discussion**

L'objectif de cette étude était de mettre en évidence les modifications de l'immunité innée pulmonaire induites par l'effort et l'entraînement, de façon à mieux comprendre la fréquence élevée d'affections respiratoires chez le cheval athlète.

Les résultats de ce travail ont permis de montrer que l'entraînement aurait un effet dépresseur sur la production basale des cytokines TNF $\alpha$  et d'IFN $\beta$  par les macrophages pulmonaires du cheval. De même, ces cellules stimulées par des mimétiques de pathogènes répondent de façon moins intense après une

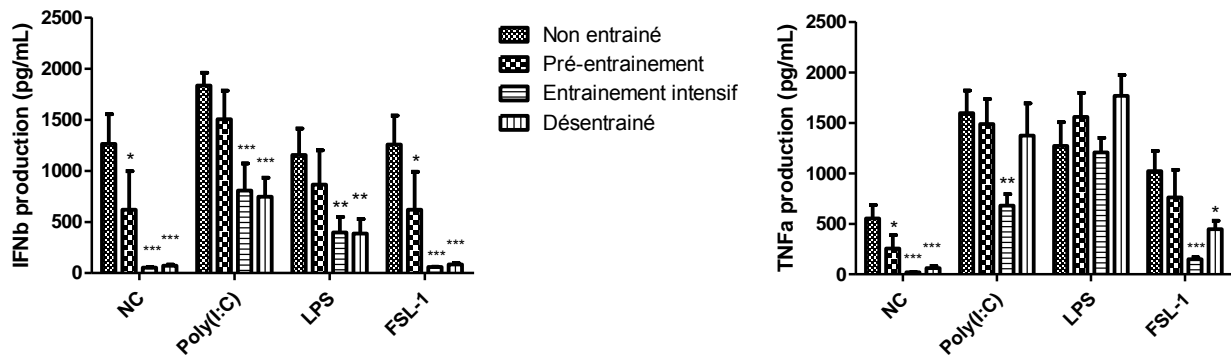
période d'entraînement, en particulier face à une agression virale (mimée *ex vivo* par le Poly(I:C)). Cet effet dépresseur est durable et persiste même après une période de repos strict de plusieurs semaines. Cette observation pourrait expliquer en partie la plus grande sensibilité des chevaux athlètes aux affections respiratoires, notamment celles ayant une composante virale.

En revanche, dans nos conditions, l'effort intensif jusqu'à fatigue n'a pas eu d'impact majeur sur la réponse immunitaire innée basale, contrairement à celui observé en réponse à l'entraînement. On retrouve des résultats différents publiés chez l'homme (Gleeson, 2007) où l'on observe une dépression temporaire des fonctions immunitaires entre 3 et 24h post-exercice (open-window). Chez le cheval, des études antérieures ont montré que l'exercice intensif ne modifiait pas l'expression basale de diverses cytokines dans les cellules pulmonaires ou sanguines (Ainsworth, 2003) mais que les réponses anti-virale ou anti-bactérienne des cellules totales du LBA pouvaient être partiellement diminuées 24h post-exercice (Mignot *et al.*, 2012).

Il serait intéressant de compléter ces résultats par des travaux similaires sur d'autres races et d'autres types d'entraînements (endurance, saut d'obstacles, concours complet, etc) de façon à déterminer l'impact d'entraînements variés sur l'immunité pulmonaire des chevaux.

A la vue des résultats de cette étude, il semble essentiel de porter une attention particulière aux chevaux soumis à un entraînement intensif, de par leur plus grande sensibilité aux pathogènes durant cette période. Le développement de molécules stimulatrices de l'immunité pourrait avoir un réel intérêt dans la gestion de ces chevaux au moment où l'entraînement est le plus soutenu.

Figure I : Effet de l'entraînement sur la production d'IFN $\beta$  et TNF $\alpha$  par les macrophages alvéolaires.  
Figure II: Effect of training on IFN $\beta$  and TNF $\alpha$  production by equine alveolar macrophages.



(\* , \*\* , \*\*\*) indiquent une différence significative ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  respectivement) entre les stades d'entraînement et le statut "non entraîné".

## Remerciements

Ce travail a été co-financé par l'Institut Français du Cheval et de l'Équitation, le Conseil Régional de Basse-Normandie, le Fond Unique Interministériel, le Fond Européen de Développement Régional. L'auteur remercie Julien De Curraize pour l'entraînement des chevaux, Thibault Fripiat pour son aide ainsi que toutes les équipes du CIRALE, du CEMESPO et du GIGA(ULg), du Laboratoire Frank Duncombe et de l'ANSES. Ce projet est mené en partenariat avec les entreprises Pfizer et Telemaq.

## Références

- Ainsworth, D.M., 2003. The effect of strenuous exercise on mRNA concentrations of interleukin-12, interferon-gamma and interleukin-4 in equine pulmonary and peripheral blood mononuclear cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 91, 61-71.
- Gleeson, M., 2007. Immune function in sport and exercise. *Journal of Applied Physiology* 103, 693-699.
- Mignot, C.C., Pirottin, D., Farnir, F., de Moffarts, B., Molitor, C., Lekeux, P., Art, T., 2012. Effect of strenuous exercise and *ex vivo* TLR3 and TLR4 stimulation on inflammatory gene expression in equine pulmonary leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 147, 127-135.