



LES HARAS NATIONAUX

5213
27^{ème} journée d'étude

7 mars 2001

MÉCANISMES DE LA PERSISTANCE DE L'INFLAMMATION CHEZ LES CHEVAUX POUSSIFS EN RÉMISSION

Par :

F. Bureau, L. Fiévez, N. Kirschvink, C. Sandersen, R. Turlej, P. Lekeux
Centre de médecine sportive équine
Faculté de médecine vétérinaire, Université de Liège
Bât. B42, Sart Tilman, B-4000 Liège
Belgique

Résumé

Cette étude a démontré pour la première fois que certaines pathologies inflammatoires chroniques pouvaient être dues à la présence de boucles auto-activatrices, empêchant la résolution de l'inflammation habituellement observée lors de la disparition de l'agent étiologique.

La persistance de l'activité du facteur NF- κ B, le facteur transcriptionnel le plus impliqué dans l'expression des gènes inflammatoires, dans les cellules bronchiques des chevaux souffrant de pousse est la conséquence 1) de la présence de granulocytes vivants dans les échantillons provenant de ces chevaux et 2) d'un déséquilibre entre la production de l'inhibiteur de NF- κ B, I κ B- β (mécanisme inhibiteur de NF- κ B), et l'amplitude des boucles auto-activatrices dépendantes de l'IL-1 β et du TNF- α (mécanisme activateur de NF- κ B), ce déséquilibre se faisant en faveur du mécanisme activateur de NF- κ B.

Il en résulte que la suppression de l'agent étiologique (comme les spores d'actinomycètes présentes dans les fourrages) est un objectif important mais pas toujours suffisant pour maîtriser l'inflammation et les dysfonctions qui résultent d'une crise de pousse chez le cheval.

Mots-clés : *cheva - pousse - inflammation - NF- κ B - granulocytes*

Summary

This study has shown for the first time that some recurrent inflammatory disorders could be due to auto-activating loops, impeding the resolution of inflammation usually observed when the etiological agent disappears.

The persistence of the activity of NF- κ B, the most potent transcriptional factor involved in inflammatory gene expression, in bronchial cells of heaves-affected horses is the result of 1) the presence of alive granulocytes in the samples collected in these horses and 2) an imbalance between the production of I κ B- β , an inhibitor of NF- κ B (inhibiting mechanism of NF- κ B), and the amplitude of auto-activating loops related to IL-1 β and TNF- α (activating mechanism of NF- κ B), this imbalance being in favor of the activating mechanism of NF- κ B.

Therefore the eviction of the etiological agent (as spores of actinomycetes in hay) is an important objective but is not always enough to control airway inflammation and dysfunction in heavey horses.

Key-words : *horse - heaves - inflammation - NF- κ B - granulocytes*

OBJECTIF

La pousse équine est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes, liée à une réponse d'hypersensibilité dirigée contre des spores de champignons qui poussent dans le foin moisi. L'inflammation associée à l'hypersensibilité observée dans la pousse résulte d'une expression exagérée des gènes inflammatoires par les cellules présentes dans les poumons, à savoir les cellules du site, telles que les cellules épithéliales, et les cellules immunes, telles que les macrophages, les neutrophiles, et les lymphocytes. Par conséquent, notre étude avait pour but d'identifier les mécanismes responsables de l'expression inappropriée des gènes inflammatoires dans les poumons de chevaux poussifs.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Des cellules bronchiques et du liquide de lavage bronchoalvéolaire (LLBA) ont été récoltées chez six chevaux sains et six chevaux poussifs (pendant la crise et trois semaines plus tard), dans le but de :

- 1) mesurer le niveau d'activité du facteur transcriptionnel NF- κ B dans les cellules bronchiques et sa corrélation avec les dysfonctions pulmonaires, NF- κ B étant le facteur transcriptionnel le plus impliqué dans l'expression des gènes inflammatoires ;
- 2) élucider les mécanismes menant à l'activité exagérée de NF- κ B dans les cellules pulmonaires du cheval poussif ;
- 3) mesurer la cinétique de l'apoptose ou mort cellulaire programmée, des granulocytes récoltés *in situ*, l'hypothèse testée étant qu'une augmentation de la durée de vie des cellules inflammatoires au site de l'inflammation pouvait, au même titre qu'une activité exagérée de NF- κ B, être impliquée dans la persistance de l'inflammation bronchique chez le cheval atteint de pousse.

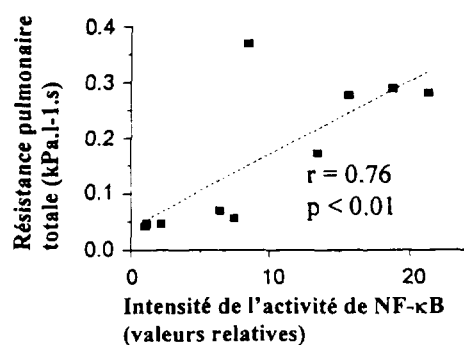
Les techniques de biologie moléculaire et cellulaire utilisées dans cette étude étaient principalement le retard sur gel, le western blot, et la mesure de l'apoptose au moyen du double marquage à l'annexine V couplée à la fluorescéine et à l'iodure de propidium.

RÉSULTATS

- 1) NF- κ B est fortement activé dans les cellules épithéliales bronchiques et dans les cellules du LBA recueillies chez les chevaux poussifs en crise, comparées aux cellules provenant de chevaux sains. Trois semaines après l'éviction de l'antigène, c'est-à-dire après avoir mis les chevaux en pâture, l'activité NF- κ B dans les cellules bronchiques et les cellules du LBA se maintient à des niveaux faible, modéré ou élevé, et est fortement corrélée à la dysfonction pulmonaire résiduelle (*Figure 1*). Ces résultats montrent qu'il existe une relation entre l'intensité de l'activité NF- κ B et la sévérité de la maladie et que la cinétique de l'activité de NF- κ B est fortement liée à l'évolution de la maladie. De plus, il peut être suggéré, à la lumière de ces résultats, que NF- κ B pourrait être une cible thérapeutique de la pousse.

Figure 1

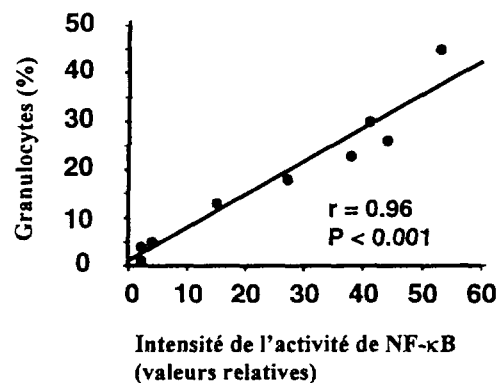
Relation entre l'activité de NF- κ B dans les cellules bronchiales obtenues par lavage et la fonction pulmonaire chez les chevaux sains et poussifs



- 2) Habituellement, les complexes NF- κ B présents dans les cellules eucaryotes sont principalement des hétérodimères formés de deux sous-unités, l'une appelée p65, l'autre p50. Les complexes NF- κ B actifs présents dans les cellules pulmonaires des chevaux poussifs sont principalement des homodimères p65 plutôt que les complexes classiques p65-p50. La transcription de certains gènes, tels que ceux codant pour le facteur d'adhésion ICAM-1 et l'interleukine-8 (IL-8), dépend de sites d'ADN atypiques qui lient préférentiellement les homodimères p65, suggérant 1) que les homodimères p65 sont les principaux transactivateurs de ces gènes et 2) que ces gènes sont particulièrement exprimés chez le cheval poussif. Cette hypothèse est, de plus, supportée par le fait que l'expression d'ICAM-1 est corrélée à l'activité des homodimères p65 mesurée dans les cellules épithéliales bronchiques provenant de chevaux sains ou poussifs. De plus, puisque les homodimères p65 induisent l'IL-8 (c'est-à-dire le plus puissant attracteur de neutrophiles) et pas les autres chimio-attracteurs tels que l'éotaxine (c'est-à-dire un chimio-attracteur des éosinophiles qui est sous le contrôle des hétérodimères p65-p50), la présence des homodimères p65 dans les poumons des chevaux pourrait expliquer pourquoi l'inflammation observée chez le cheval poussif est surtout neutrophilique.
- 3) Comme décrit précédemment, l'activité de NF- κ B peut persister d'une manière aberrante dans les poumons des chevaux poussifs soustraits à l'antigène depuis au moins 3 semaines. Nos études dévolues à l'élucidation des mécanismes par lesquels l'activité de NF- κ B est maintenue dans les voies respiratoires des chevaux poussifs ont montré que l'activité NF- κ B observée dans les bronches est étroitement corrélée au pourcentage de neutrophiles présents dans les voies respiratoires (*Figure 2*) et disparaît seulement après la mort des granulocytes. Cela suggère que l'activité NF- κ B est maintenue dans les voies respiratoires sous l'action des cellules inflammatoires, ce qui souligne l'importance des neutrophiles dans la pousse.

Figure 2

Relation entre l'activité de NF- κ B et le pourcentage de granulocytes présents dans les voies respiratoires des chevaux sains et poussifs



- 4) Une question intéressante concernait la maintenance de l'activité NF- κ B dans les bronches de chevaux poussifs avant la mort des neutrophiles. Les neutrophiles activés génèrent de grandes quantités d'IL-1 β et de TNF- α (tumor necrosis factor- α). L'IL-1 β et le TNF- α activent NF- κ B, qui à son tour induit l'expression de ces cytokines pro-inflammatoires, initiant ainsi des boucles auto-activatrices. Par conséquent, le postulat que ces boucles auto-activatrices pourraient être impliquées dans l'activité NF- κ B persistante et dépendante des granulocytes fut émis. L'addition d'anticorps neutralisants dirigés contre l'IL-1 β et le TNF- α au milieu de culture utilisé pour conserver les cellules épithéliales bronchiques des chevaux poussifs a eu comme conséquence la suppression de l'activité NF- κ B dans ces cellules, confirmant notre hypothèse.
- 5) Dans la plupart des cellules, NF- κ B induit de nombreuses protéines inflammatoires, ainsi que son inhibiteur le plus fréquent, I κ B- α , assurant ainsi une réponse transitoire après une stimulation. D'une manière surprenante, I κ B- β , dont l'expression n'est pas modulée par NF- κ B, contrairement à I κ B- α , est le plus abondant des inhibiteurs de NF- κ B mis en évidence dans les cellules épithéliales bronchiques

équines. La quantité d'I κ B- β est faible dans les cellules épithéliales recueillies dans les bronches de chevaux poussifs, comparés aux chevaux sains, mais augmente d'une manière très importante après l'addition d'anticorps neutralisants dirigés contre l'IL-1 β et le TNF- α au milieu de culture utilisé pour conserver ces cellules, indiquant qu'un déséquilibre entre la dégradation d'I κ B- β induite par l'IL-1 β et le TNF- α , et de faibles niveaux de synthèse d'I κ B- β est probablement le mécanisme empêchant la désactivation de NF- κ B dans les voies aériennes des chevaux poussifs avant la mort des granulocytes.

- 6) Comme vu précédemment, la mort des neutrophiles détermine la résolution de l'inflammation pulmonaire chez le cheval poussif. Par conséquent, nous avons étudié la cinétique de la mort des neutrophiles issus des chevaux malades comparés aux chevaux sains. L'apoptose des neutrophiles pulmonaires est retardée chez le cheval poussif (*Figure 3*), mais ce retard peut être aboli par l'utilisation d'anticorps dirigés contre le récepteur au GM-CSF (*Figure 4*), indiquant que cette cytokine est responsable de la survie augmentée des neutrophiles provenant de chevaux poussifs. Parce que le GM-CSF est connu pour induire l'activité du facteur transcriptionnel STAT-5, nous avons étudié l'activité de STAT5 dans les neutrophiles isolés de chevaux sains et poussifs. L'activité de STAT-5 était beaucoup plus importante dans les granulocytes de chevaux malades, indiquant que ce facteur transcriptionnel pourrait être impliqué dans la survie augmentée des cellules inflammatoires présentes dans les poumons de chevaux poussifs. Le retard de l'apoptose des neutrophiles issus de chevaux malades pourrait être une des causes de la persistance de l'inflammation caractérisant la pousse.

Figure 3

Cinétique de l'apoptose des granulocytes obtenus à partir du sang de chevaux sains (■) et poussifs (▲) et du LBA de chevaux poussifs (●). * = significativement différent des valeurs obtenues à partir des granulocytes sanguins des chevaux malades

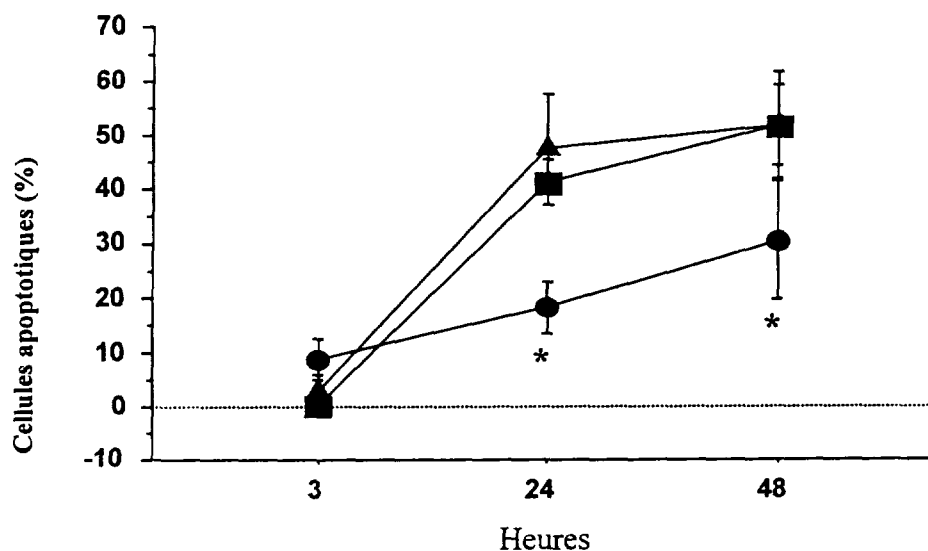
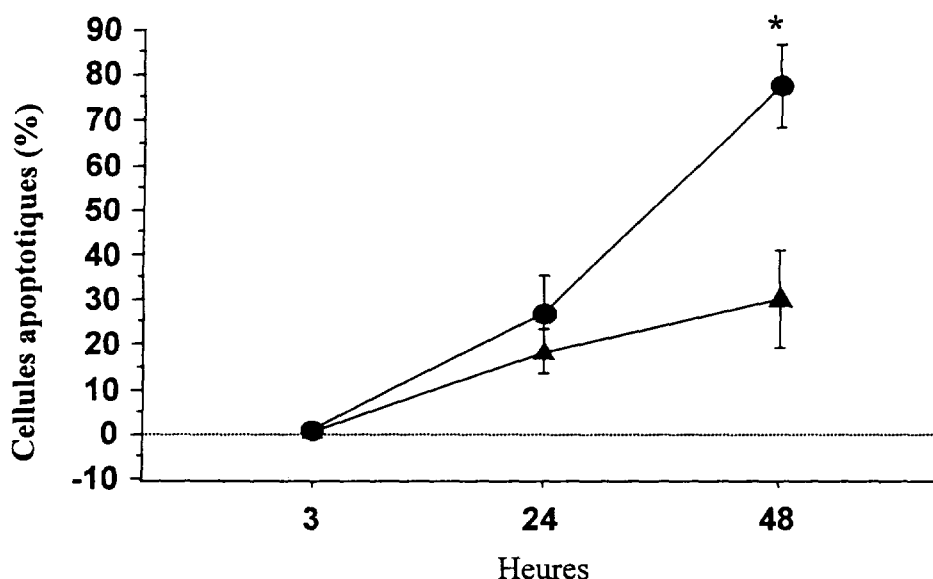


Figure 4

Cinétique de l'apoptose des granulocytes du LBA de chevaux poussifs. Les cellules ont été cultivées en présence (●) ou en absence (▲) de 5µg/ml d'anticorps anti-récepteur au GM-CSF. * = significativement différent des valeurs obtenues à partir des granulocytes non traités



CONCLUSION

- La dysfonction respiratoire caractéristique de la pousse chez le cheval est liée à la cinétique de l'activité de NF- κ B dans les cellules bronchiques, ce qui suggère que NF- κ B pourrait être une cible privilégiée dans le traitement de la pousse. De plus, les homodimères p65 pourraient transactiver, dans les cellules bronchiques, un groupe de gènes, tel que celui codant pour ICAM-1, caractéristique de l'inflammation respiratoire chronique.
- La persistance de l'activité NF- κ B dans les cellules bronchiques des chevaux souffrant de pousse est la conséquence 1) de la présence de granulocytes vivants dans les échantillons provenant de ces chevaux et 2) d'un déséquilibre entre la production d'I κ B- β (mécanisme inhibiteur de NF- κ B) et l'amplitude des boucles auto-activatrices dépendantes de l'IL-1 β et du TNF- α (mécanisme activateur de NF- κ B), ce déséquilibre se faisant en faveur du mécanisme activateur de NF- κ B.
- La mort granulocytaire est favorable à la désactivation de NF- κ B dans la plupart des cellules du poumon, et donc à l'arrêt de l'inflammation pulmonaire. Dans ce contexte, le délai de l'apoptose démontré dans la population granulocytaire du lavage bronchoalvéolaire des chevaux poussifs semble être un rouage prépondérant dans les mécanismes menant à la chronicité de l'inflammation pulmonaire. Cette étude indique également que le GM-CSF et STAT5 sont impliqués dans ce retard de l'apoptose.

INCIDENCES PRATIQUES

Cette étude a démontré pour la première fois que certaines pathologies inflammatoires chroniques pouvaient être dues à la présence de boucles auto-activatrices, empêchant la résolution de l'inflammation habituellement observée lors de la disparition de l'agent étiologique.

Il en résulte que la suppression de l'agent étiologique (comme les spores d'actinomyètes présentes dans les fourrages) est un objectif important mais non suffisant pour maîtriser l'inflammation et les dysfonctions qui résultent d'une crise de pousse chez le cheval.

Vu que la pousse est la pathologie inflammatoire chronique la plus fréquemment observée chez les chevaux adultes et qu'elle en perturbe les performances, l'utilisation des résultats de cette étude à des fins thérapeutiques devrait avoir un impact économique sur la filière équine.