



Université de Caen Basse-Normandie

Ecole doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement

Thèse de doctorat

présentée et soutenue le : 23/10/2013

par

Ingrid WALDSCHMIDT

pour obtenir le

Doctorat de l'Université de Caen Basse-Normandie

Spécialité : *Physiologie, Biologie des organismes*

préparée dans le cadre d'une cotutelle internationale de thèse

entre l'Université de Caen Basse-Normandie et l'Université de Liège

Effet de l'effort, l'entraînement et l'inflammation sur l'immunité innée des voies respiratoires profondes chez le Trotteur Français

Directeurs de thèse : Audigié Fabrice (Université de Caen)

et Art Tatiana (Université de Liège)

Jury

Cadoré Jean-Luc, Professeur des Universités, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (rapporteur)

Kirschvink Nathalie, Professeur des Universités, Université de Namur (rapporteur)

Vabret Astrid, Professeur des Universités, Université de Caen

Pirottin Dimitri, chercheur, Université de Liège

Dupuis-Tricaud Marie-Capucine, chercheur, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Audigié Fabrice, Professeur des Universités, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (directeur de thèse)

Art Tatiana, Professeur des Universités, Université de Liège (directeur de thèse)

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais remercier mes encadrants de thèse, Fabrice Audigié, pour avoir accepté d'encadrer administrativement cette thèse, et plus particulièrement Tania Art pour son accueil, son encadrement scientifique, ses conseils pertinents et sa bonne humeur permanente ! Merci à tous les membres du jury, pour avoir accepté mon invitation.

A Marie-Capucine Dupuis-Tricaud, pour son accueil chaleureux à mon arrivée en Normandie, son aide précieuse et sa disponibilité tout au long du projet de recherche ainsi que pour tous les agréables moments partagés au CIRALE ou sur la plage de Cabourg !

Aux membres du CIRALE : au Pr Jean-Marie Denoix, pour m'avoir accueilli, à l'équipe de Médecine Sportive : Julien (pour tes fameuses « julienades » et l'entraînement non sans difficulté des chevaux expé), puis Elodie (à nos critiques sans fin du climat normand !), Thibault, Dagmar, à l'équipe de pathologie locomotrice : Sandrine, Virginie, Lélia (vous vous souviendrez longtemps des péripéties de nos chevaux !) et toute l'équipe technique : Aurélie, Marie-Mélisande, Florence, Marie, Manu, Alain, Quentin.

A l'équipe du CEMESPO : Linda, Irène, Sophie pour nos moments de galères expérimentales partagés, bonne chance pour la suite, ça arrive plus vite qu'on ne le pense ! A l'équipe technique : Raja, Ilham, pour votre efficacité et votre bonne humeur, Jean-Clément, pour les grignotages autour de la brouette à granulés, aux anciennes du CEMESPO : Eve, Audrey, Clémence et Céline pour nos balades équestres dans les bois du Sart ! Et enfin au Pr Pierre Lekeux qui dirige toute cette joyeuse troupe. C'était toujours un plaisir de venir travailler à Liège.

A l'équipe d'immunologie du GIGA et plus particulièrement Dimitri, pour son encadrement technique et sa disponibilité, Fabrice et Christophe pour leurs conseils avisés, ainsi que tous les autres membres, pour les sympathiques moments partagés à Durbuy.

A l'équipe du laboratoire Frank Duncombe : Guillaume, Pierre-Hugues, Stéphane, Eric, Albertine, Loïc, Sophie, Christine, Erika, etc, pour votre accueil au sein de votre service et nos réflexions scientifiques entre la Normandie et Liège.

A l'équipe de l'ANSES pour leur accueil toujours chaleureux.

Aux membres de la fondation HIPPOLIA, pour leur investissement dans la recherche équine.

Aux vétérinaires et propriétaires qui ont participé à la partie sur les chevaux de terrain.

Aux co-financeurs qui ont permis l'aboutissement de ce projet : l'Institut Français du Cheval et de l'Equitation et la Région Basse-Normandie.

Aux chevaux qui ont eu la patience de subir les prélèvements tout au long du protocole, à leurs péripéties quasi hebdomadaires. A Rita, Rosie, Une, Ulga, Véra, Voyou, Vaillant, Vigilance, Udar et plus particulièrement Unika !

Enfin, le principal, merci à ma famille et amis, Vincent, pour m'avoir supportée durant ces rudes années normandes, mon tonton, mon grand-père et surtout ma maman pour m'avoir toujours poussée plus haut.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	1
LISTE DES TABLEAUX.....	4
LISTE DES ABREVIATIONS	5
RESUME	8
SUMMARY	10
INTRODUCTION GENERALE.....	12
REVUE DE LITTERATURE.....	14
1 AFFECTIONS RESPIRATOIRES PROFONDES DU JEUNE CHEVAL ATHLETE ET IMMUNITE INNEE :	15
1.1 Infections virales : une réponse immunitaire insuffisante ?	15
1.2 Maladie inflammatoire des voies respiratoires : une réponse immunitaire excessive ?	17
1.3 Mécanismes de défense pulmonaire, focus sur l'immunité innée :	20
1.3.1 Mécanismes passifs :	20
1.3.2 Acteurs cellulaires :.....	21
1.3.3 Reconnaissance des pathogènes et réponse immunitaire innée :.....	24
<i>a) Structure des TLR :</i>	<i>25</i>
<i>b) TLR et ligands :.....</i>	<i>26</i>
<i>c) Activation des TLR et transduction du signal pathogène :</i>	<i>28</i>
<i>d) Interface avec l'immunité acquise :</i>	<i>35</i>
2 IMMUNITE INNEE, EXERCICE ET ENTRAINEMENT :	38
2.1 Etudes sur l'Homme :.....	38
2.1.1 Données épidémiologiques :	38
2.1.2 Données expérimentales :.....	39
<i>a) Exercice ponctuel :</i>	<i>39</i>
<i>b) Entraînement :</i>	<i>42</i>

2.2	Etudes sur le cheval :	46
	a) Exercice ponctuel :	46
	b) Entraînement :	51
3	CONCLUSION :	54
OBJECTIFS DE LA THESE		56
PARTIE EXPERIMENTALE		58
1	MISE AU POINT TECHNIQUE DE L'ETUDE (ARTICLE 1) :	59
1.1	Matériel et méthode :	59
1.1.1	Chevaux :	59
1.1.2	Lavages broncho-alvéolaires :	60
1.1.3	Isolation des macrophages alvéolaires et culture :	60
1.1.4	Détermination des conditions de stimulation des macrophages alvéolaires avec les ligands de TLR :	60
1.1.5	Extraction de l'ARN et transcription inverse :	61
1.1.6	Analyse de l'expression des gènes par PCR :	61
1.1.7	Expression des TLR dans les macrophages alvéolaires :	63
1.1.8	Dosage des cytokines par ELISA :	63
1.1.9	Evaluation de la réponse des lymphocytes aux ligands de TLR :	63
1.1.10	Evaluation de l'effet d'un immunodépresseur sur notre modèle expérimental :	63
1.1.11	Analyses des données :	64
1.2	Résultats :	64
1.2.1	Isolation des macrophages alvéolaires et culture :	65
1.2.2	Sélection des gènes de référence :	65
1.2.3	Expression relative des TLR dans les macrophages alvéolaires :	65
1.2.4	Détermination des conditions de stimulation des macrophages alvéolaires par les ligands de TLR :	66
1.2.5	Quantification des cytokines par ELISA :	67

1.2.6	Evaluation de la réponse des lymphocytes aux ligands de TLR :.....	68
1.2.7	Evaluation du modèle en situation d'immunodépression :.....	68
1.3	Discussion :	69
1.3.1	Isolation des macrophages alvéolaires et culture :.....	70
1.3.2	Détermination des conditions expérimentales de stimulation des macrophages alvéolaires et par PCR :.....	72
	a) Choix des gènes de référence :	73
	b) TLR exprimés par les macrophages alvéolaires :.....	74
	c) Choix des doses et durée d'incubation des ligands avec les cellules :.....	75
1.3.3	Dosage des cytokines dans le milieu de culture par ELISA :.....	77
1.3.4	Evaluation du modèle en condition immunosuppressive :.....	78
1.3.5	Difficultés rencontrées et points à améliorer :	79
1.4	Conclusion de la première étude :	80
2	ETUDE EXPERIMENTALE : EXPLORATION DU LIEN ENTRE IMMUNITE INNEE, EXERCICE ET ENTRAINEMENT (ARTICLE 2)	82
2.1	Matériel et méthode :	82
2.1.1	Chevaux :	82
2.1.2	Protocole expérimental :.....	83
2.1.3	Prélèvements respiratoires :.....	85
2.1.4	Stimulation et évaluation de la réponse des macrophages alvéolaires <i>ex vivo</i> :	86
2.1.5	Expression des TLR d'intérêt par les macrophages alvéolaires :	86
2.1.6	Dosage du cortisol :.....	86
2.1.7	Analyses des données :.....	87
2.2	Résultats :	87
2.2.1	Evolution des paramètres sportifs :.....	87
2.2.2	Lavages broncho-alvéolaires :	89
2.2.3	Lavages trachéaux :	93

2.2.4	Effet de l'effort intensif ponctuel sur la production de cytokines et l'expression des TLR par les macrophages alvéolaires <i>ex vivo</i> :	96
2.2.5	Effet de l'entraînement sur la production de cytokines et l'expression des TLR par les macrophages alvéolaires <i>ex vivo</i> :	97
2.2.6	Evolution de la production de cortisol avec l'effort et l'entraînement :	100
2.3	Discussion :	101
2.3.1	Effet de l'effort et l'entraînement sur les prélèvements respiratoires :	101
a)	<i>Timing de prélèvement post-effort :</i>	102
b)	<i>Effet de l'entraînement sur la cytologie du LBA :</i>	102
c)	<i>Effet de l'effort sur la cytologie du LBA des chevaux avant et après l'entraînement :</i>	104
d)	<i>Effet de l'entraînement sur la cytologie, la bactériologie et la virologie du LT :</i>	105
2.3.2	Evolution des paramètres sportifs :	106
2.3.3	Effet de l'effort et l'entraînement sur l'immunité innée respiratoire :	108
a)	<i>Effet de l'effort ponctuel :</i>	108
b)	<i>Effet de l'entraînement :</i>	110
2.3.4	Facteurs influençant l'immunité pulmonaire :	112
a)	<i>Hormones produites en réponse à l'effort :</i>	113
b)	<i>Conditions environnementales :</i>	114
c)	<i>Etat de surentrainement :</i>	115
d)	<i>Etat général des chevaux :</i>	115
e)	<i>Autres facteurs :</i>	116
2.3.5	Problèmes rencontrés et points à améliorer :	117
2.4	Conclusion de la seconde étude :	119
3	ETUDE DE TERRAIN : EXPLORATION DU LIEN ENTRE INFLAMMATION ET IMMUNITÉ INNÉE	120
3.1	Matériel et méthode :	120

3.1.1	Sélection des chevaux :	120
3.1.2	Evaluation de la réponse immunitaire innée des macrophages alvéolaires :	121
3.1.3	Analyses des données :	121
3.2	Résultats :	121
3.2.1	Répartition des groupes :	121
3.2.2	Prélèvements respiratoires :	122
3.2.3	Réponse immunitaire des macrophages alvéolaires <i>ex vivo</i> :	123
3.2.4	Expression des TLR par les macrophages alvéolaires :	123
3.3	Discussion :	124
3.3.1	Sélection des chevaux :	124
3.3.2	Réponse immunitaire des macrophages alvéolaires :	125
3.3.3	Problèmes rencontrés et points à améliorer :	128
3.4	Conclusion de la troisième étude :	128
<u>CONCLUSION GENERALE</u>		130
<u>PERSPECTIVES</u>		134
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>		137
<u>ANNEXES</u>		151
	ANNEXE 1 : Détail des séances d'entraînement réalisées par les chevaux au cours du pré-entraînement.	152
	ANNEXE 2 : Détail des séances d'entraînement réalisées par les chevaux au cours de l'entraînement intensif.	153
	ANNEXE 3 : Détail des tests d'effort standardisés réalisés par les chevaux à la fin de chaque phase du protocole expérimental.	154
	ANNEXE 4 : Détail des examens réalisés sur les chevaux de terrain référés.	155
<u>ARTICLES ORIGINAUX</u>		156
	ARTICLE 1.....	157
	ARTICLE 2.....	166

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cytologies du LBA de chevaux sains et atteints d'IAD	18
Figure 2 : Structure type d'un récepteur Toll-like.	25
Figure 3 : Composition schématique de la paroi des bactéries Gram+, Gram- et des mycoplasmes.....	28
Figure 4 : Schématisation de la cascade de signalisation MyD88-dépendante	29
Figure 5 : Schéma des cascades de signalisation TRIF-dépendante et MyD88-dépendante. .	30
Figure 6 : Schématisation de la cascade de signalisation induite par l'activation du dimère TLR2/6 ou TLR2/1, à l'origine de la production de cytokines pro-inflammatoires.....	32
Figure 7 : Schématisation de la cascade de signalisation induite par la stimulation du TLR 3.	33
Figure 8 : Schématisation de la cascade de signalisation induite par la stimulation du TLR 4.	34
Figure 9 : Schématisation de la cascade de signalisation induite par l'activation du TLR 9.	35
Figure 10 : Rôle des TLR dans l'interface entre l'immunité innée et acquise	37
Figure 11 : Comparaison des profils cytokiniques en cas d'infection ou d'exercice	43
Figure 12 : Relation entre intensité de l'exercice et risque d'infection respiratoire.....	44
Figure 13 : Phagocytose et activité oxydative des neutrophiles sanguins de chevaux avant et à différents temps suivant la réalisation d'un effort intensif.	47
Figure 14 : Phagocytose des macrophages alvéolaires avant et après la réalisation d'un effort intensif par les chevaux avant entraînement et après 7 semaines d'entraînement.	48
Figure 15 : Explosion oxydative des macrophages alvéolaires et des lymphocytes pulmonaires prélevés avant et après la réalisation d'un exercice intensif par les chevaux avant l'entraînement et après 7 semaines d'entraînement.	48
Figure 16 : expression relative des gènes TNF α , IFN β , Il-6 et Il-1 β par les leucocytes pulmonaires stimulés ou non avec du LPS avant et après un effort	49
Figure 17 : expression relative des gènes TNF α , IFN β , IP-10 et RANTES par les leucocytes pulmonaires stimulés ou non avec du Poly(I:C) avant et après un effort.	50
Figure 18 : Activité de phagocytose des macrophages alvéolaires prélevés sur des chevaux au repos à différents moments de l'entraînement	52

Figure 19 : Réponse oxydative des macrophages alvéolaires et des lymphocytes pulmonaires prélevés sur des chevaux au repos à différents moments de l'entraînement	53
Figure 20 : Phagocytose et réponse oxydative des neutrophiles et des monocytes chez des Pur-sang arabes ou des Pur-sang anglais avant et après une séance d'entraînement.....	54
Figure 21 : Schématisation du protocole expérimental utilisé pour évaluer l'effet de la dexaméthasone sur l'activité des macrophages alvéolaires ex vivo.	64
Figure 22 : Expression relative des différents TLR par les macrophages alvéolaires	66
Figure 23 : Quantification des cytokines IFN β et TNF α par ELISA dans le surnageant de culture des macrophages alvéolaires, prélevé à 1, 3, 6, 12 et 24 heures d'incubation avec les ligands de TLR.....	67
Figure 24 : Quantification des cytokines IFN β et TNF α dans le surnageant de culture des macrophages alvéolaires et des lymphocytes pulmonaires stimulés par les ligands de TLR..	68
Figure 25 : Evaluation de l'effet immunosuppresseur de la dexaméthasone sur la production de cytokines IFN β et TNF α par les macrophages alvéolaires stimulés par les ligands de TLR ex vivo.....	69
Figure 26 : Schématisation du protocole expérimental d'évaluation de la réponse immune des macrophages alvéolaires ex vivo.	81
Figure 27 : Schématisation du protocole expérimental mis en place pour évaluer l'effet de l'effort et l'entraînement sur l'immunité innée pulmonaire.	85
Figure 28 : Evaluation des valeurs de V _{La4} et de V200 avant l'entraînement et à la fin du pré-entraînement de l'entraînement intensif et du désentraînement	88
Figure 29 : Evolution du temps à fatigue relevé à chaque étape du protocole d'entraînement.	89
Figure 30 : Effet de l'entraînement sur la cytologie du LBA de repos.....	90
Figure 31 : effet de l'effort sur la sécrétion d'IFN β et de TNF α par les macrophages alvéolaires prélevés à 3, 24 ou 48 heures post-effort et stimulés par les ligands de TLR.	91
Figure 32 : Effet de l'effort sur la cytologie du LBA prélevés au repos et 24 heures après l'effort sur les chevaux non entraînés et entraînés	92
Figure 33 : Effet de l'entraînement sur la cytologie du lavage trachéal des chevaux prélevés 1 heure après l'effort.....	94
Figure 34 : Effet de l'effort sur la production d'IFN β et de TNF α par les macrophages alvéolaires stimulés par les ligands de TLR chez le cheval non entraîné et le cheval entraîné	96

Figure 35 : Effet de l'effort ponctuel sur l'expression relative des TLR 2, 3, 4 et 6 exprimés par les macrophages alvéolaires des chevaux non entraînés et entraînés.	97
Figure 36 : effet de l'entraînement sur la production d'IFN β et de TNF α par les macrophages alvéolaires prélevés au repos et stimulés ex vivo par les ligands de TLR.....	98
Figure 37 : Effet de l'entraînement sur l'expression relative des TLR 2, 3, 4 et 6 par les macrophages alvéolaires	99
Figure 38 : a) effet de l'entraînement intensif et du désentraînement sur la production d'IFN β et de TNF α par les macrophages alvéolaires ex vivo non stimulés et stimulés par le CpG. b) effet de l'entraînement et de l'effort sur l'expression relative du TLR 9 par les macrophages alvéolaires	100
Figure 39 : Effet de l'effort et l'entraînement sur les concentrations plasmatiques de cortisol	101
Figure 40 : Evolution de l'état général d'un même cheval au cours du protocole expérimental : a) avant l'entraînement, b) après l'entraînement intensif et c) à la fin du désentraînement.	116
Figure 41 : Comparaison des productions de TNF α et d'IFN β par les macrophages alvéolaires stimulés ex vivo prélevés sur des chevaux sains, atteints d'IAD ou d'infection bactérienne.	123
Figure 42 : Expression relative des TLR 2, 3, 4 et 6 par les macrophages alvéolaires de chevaux sains, atteints d'IAD ou d'infection bactérienne.	124

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principaux motifs pathogènes reconnus par les différents TLR	27
Tableau 2 : Liste et origine des primers utilisés pour l'amplification des gènes de référence et des gènes d'intérêt par PCR.....	62
Tableau 3 : Stabilité des gènes de référence testés pour normaliser les résultats de PCR. Les résultats ont été obtenus à l'aide du logiciel GeNorm	65
Tableau 4 : Combinaisons temps/dose sélectionnées pour la stimulation des macrophages alvéolaires ex vivo par les ligands de TLR.....	66
Tableau 5 : Effet de l'entraînement et de l'effort sur le nombre de cellules totales pulmonaires, du nombre de macrophages, lymphocytes et neutrophiles pulmonaires (en nb de cellules/mm ³)	93
Tableau 6 : Effet de l'entraînement sur la bactériologie réalisée sur le lavage trachéal.....	95
Tableau 7 : Effet de l'entraînement sur la virologie réalisée sur le lavage trachéal.	95

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACTB = beta actin gene
ACTH = adeno-corticotrophic hormone
ADN = Acide Désoxyribonucléique
ADNc = ADN complémentaire
ARN = Acide Ribonucléique
B2M = beta-2-microglobulin
CDx = cluster of differentiation (par exemple CD14)
CMH = complexe majeur d'histocompatibilité
CPA = cellule présentatrice d'antigène
CpG = Cytosine-Phosphate-Guanine
Ct = cycle threshold
EHV = Equine herpesvirus
ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay
FACS = fluorescent activated cell sorting
FSL-1 = diacylated lipoprotein FSL-1 (Pam2CGDPKHPKSF)
GAPDH = glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GPS = global positioning system
HLA = human leukocyte antigen
HPIE = Hémorragie Pulmonaire Induite par l'Effort
HPRT = hypoxanthine phosphoribosyltransferase
IAD = Inflammatory Airway Disease
Il-x = interleukine (Il-8, Il-1 β par exemple)
IFN-I = interférons de type I (IFN β et IFN α)
IFN-II = interférons de type II (IFN γ)
IgA = Immunoglobuline A
IRAK = interleukine-1 receptor-associated kinase
IRF = interferon regulatory transcription factor
JNK = c-Jun N-terminal kinase
LAK = lymphokine-activated killer cells
LBA = lavage broncho-alvéolaire

LPS = lipopolysaccharide
LT = lavage trachéal
LTA = lipoteichoic acid
LRR = leucine-rich repeat domain
MACS = magnetic activated cell sorting
MBL = mannose-binding lectin
MD2 = myeloid differentiation protein 2
MMR = macrophage mannose receptor
MPL = monophosphoryl lipid A
MyD88 = myeloid differentiation primary response 88
NC = negative control
NFκB = nuclear factor-kappa B
NK = natural killer cells
NO = monoxyde d'azote
NOD = nucleotide-binding oligomerization domain protein
ODN = oligodésoxynucleotide
PAMP = pathogen associated molecular pattern
PBMC = peripheral blood mononuclear cells
PBS = Phosphate buffered saline
PCR = polymerase chain reaction
Poly(I:C) = Polyinosinic : polycytidylic acid
PRR = pattern-recognition receptor
R18S = ribosomal 18S gene
RAO = Recurrent Airway Obstruction
RPL0 = ribosomal protein L0 gene
RPL32 = Ribosomal protein L32
SDHA = succinate dehydrogenase complex subunit A
SP-A ou D = Surfactant protein A ou D
TFRC = transferrin gene
Th = T helper
TIR = domaine d'homologie Toll/Il-1 receptor
TIRAP = Toll-interleukine 1 receptor domain containing adaptor protein
TLR = Toll-like receptor

TNF = tumor necrosis factor

TRAF6 = Tumor necrosis factor receptor associated factor-6

TRAM = toll-like receptor 4 adaptor protein

TRIF = TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon β

URTI = upper respiratory tract infection

V200 = vitesse à laquelle la fréquence cardiaque atteint 200 battements par minute

V_{La4} = vitesse à laquelle la lactatémie atteint 4 mmol/L

V_{O2max} = consommation d'oxygène maximale

RESUME

Les chevaux athlètes sont couramment atteints d'affections respiratoires, touchant principalement les voies respiratoires profondes et à l'origine de contre-performance. Malgré la fréquence de ces affections, les mécanismes impliqués restent méconnus même si le lien entre l'inflammation respiratoire et l'immunité semble incontestable. Les pistes de recherche sont néanmoins nombreuses et les connaissances sur l'étiologie de ces affections nécessitent d'être améliorées.

L'objectif global de cette thèse était de mieux comprendre l'impact de l'effort, l'entraînement et l'inflammation sur l'immunité innée respiratoire pulmonaire.

Pour cela, la première partie de ce travail a consisté à établir un modèle expérimental d'évaluation de l'immunité innée pulmonaire du cheval, notamment un modèle de stimulation des récepteurs Toll-Like (TLR), récepteurs impliqués dans la reconnaissance des motifs pathogènes. Les macrophages alvéolaires ont été isolés des lavages broncho-alvéolaires des chevaux par adhésion et les conditions de stimulation des TLR 2/6, 3 et 4 ont été mises au point par PCR (notamment dose et durée d'incubation des macrophages alvéolaires *ex vivo* avec les ligands de TLR). La production de cytokines par les macrophages alvéolaires a été quantifiée par ELISA et l'expression des TLR par PCR. Ce modèle expérimental est utilisable dans diverses conditions physiologiques ou pathologiques afin d'évaluer la capacité des macrophages alvéolaires à identifier des motifs pathogènes *ex vivo* et d'y apporter une réponse biologique appropriée.

Ce modèle expérimental a été utilisé dans la seconde étape de ce travail afin d'évaluer l'effet de l'effort et l'entraînement sur l'immunité innée respiratoire des chevaux en suivi longitudinal. Un lot de 8 chevaux expérimentaux a été entraîné et des prélèvements respiratoires ont été réalisés à des étapes clés du protocole : au repos avant entraînement, à la fin du pré-entraînement, de l'entraînement intensif et du désentraînement, ainsi qu'après un effort standardisé sur tapis roulant avant et après la période d'entraînement. Les macrophages alvéolaires ont été isolés et leur réponse immune évaluée selon le protocole préalablement défini. Les résultats de cette étude ont montré un effet modeste de l'effort ponctuel sur la

réponse des macrophages alvéolaires au LPS. A l'opposé, on constate un effet dépresseur durable de l'entraînement sur l'immunité innée respiratoire, notamment sur l'immunité anti-virale. En effet, on constate une diminution très significative de la production basale de TNF α et d'IFN β dès le pré-entraînement, non restaurée par la période de désentraînement. De plus, l'expression du TLR 3 est diminuée chez les chevaux entraînés par rapport aux mêmes chevaux avant entraînement. Cette sous-expression est à mettre en relation avec une chute de la réponse des macrophages alvéolaires au Poly(I:C), ligand des TLR 3.

Lors d'une troisième étude, l'effet de l'inflammation a été évalué sur un lot de chevaux de course référés au CIRALE (Centre d'Imagerie et de Recherche sur les Affections Locomotrices Equines) pour des affections respiratoires (8 chevaux atteints d'IAD et 3 souffrant d'une infection bactérienne). La réponse immunitaire innée respiratoire de ces chevaux a été évaluée en utilisant le même modèle que précédemment et comparée à celle obtenue sur des chevaux sains. Les résultats de cette étude suggèrent qu'il n'y a pas de modification majeure de l'immunité innée associée à l'apparition de l'IAD, la réponse des macrophages alvéolaires de ces chevaux n'est pas significativement différente de celle obtenue chez des chevaux sains. A l'opposé, on constate que la réponse des cellules à la stimulation du TLR 4 est augmentée chez les chevaux atteints d'infections respiratoires bactériennes. Cependant le nombre réduit de chevaux inclus dans l'étude nous oblige à rester prudent dans l'interprétation de ces résultats.

Pour conclure, la réalisation de ces travaux a permis d'établir un modèle expérimental permettant d'évaluer la réponse immunitaire des macrophages alvéolaires face à des mimétiques de pathogènes. L'utilisation de ce modèle a permis de mettre en évidence l'effet immunodépresseur de l'entraînement sur l'immunité anti-virale et anti-bactérienne, expliquant en partie la plus grande susceptibilité des chevaux athlètes aux affections pulmonaires durant ces périodes. L'étiopathologie de l'IAD reste encore imprécise, des études complémentaires seraient nécessaires pour compléter nos résultats.

SUMMARY

Lower airway diseases are a common problem in sport and racing horses. As the innate immunity plays an essential role in lung defense mechanisms against pathogens, we aimed to study the effect of acute exercise, training and inflammation on the pulmonary innate immune response.

In the first part of this PhD research, we evaluated an experimental model to assess the equine pulmonary innate immune response, which could be used in several conditions. Alveolar macrophages were isolated from broncho-alveolar lavages using an adhesion method and stimulated with Toll-Like receptors (TLR) agonists for TLR 2/6, 3 and 4. TLR recognize pathogen associated molecular patterns and induce a non-specific immune response, characterized by cytokine production. The best conditions of alveolar macrophage stimulation were selected using a PCR method. Cytokine production after stimulation was measured in culture supernatants by ELISA. Relative TLR expression was quantified by PCR.

This experimental model was used in the second step of this work to evaluate the effect of strenuous exercise and training on respiratory innate immunity of horses. A longitudinal study was organized using eight young Standardbreds. Horses were trained and respiratory samplings were performed at different steps of the protocol: at rest (before training, after moderate, intensive training and detraining) and post-exercise (before and after the training period). Results of this study showed a moderate effect of strenuous exercise on alveolar macrophage response to LPS and a prolonged depressive effect of training on alveolar macrophage response, particularly against viruses. A significative decrease of TNF α and IFN β production was observed after moderate training, not restaured by detraining. Furthermore, TLR3 expression was down-regulated and alveolar macrophage response to Poly(I:C) was decreased in trained compared to untrained horses.

In a third study, the effect of respiratory inflammation on pulmonary innate immunity was assessed in client horses presented at the CIRALE for respiratory diseases (8 horses

suffering from IAD and 3 having bacterial infections). Their pulmonary innate immune response to TLR stimulation was compared with the response of healthy horses. Results showed that the alveolar macrophage response of IAD horses was not different from those of healthy horses. Alveolar macrophage response to TLR 4 stimulation was higher in the bacterial infection group than in the healthy group. However, the low number of horses included in each group implies to interpret these results with caution.

To conclude, this PhD research provides an experimental model to evaluate the ability of alveolar macrophages to recognize pathogens and initiate an immune response. The effect of strenuous exercise and training was assessed using this experimental model. It revealed a depressive effect of training on viral and bacterial immunity, which may partly explain the susceptibility of horses to respiratory diseases during training periods. Molecular mechanisms involved in IAD remain unknown, complementary studies including higher number of horses should be performed to complete these data.

INTRODUCTION GENERALE

La contre-performance est un problème majeur dans la filière des courses, engendrant de lourdes conséquences économiques. Dans la carrière de ces jeunes athlètes, les affections respiratoires représentent la seconde cause d'interruption après les atteintes musculo-squelettiques (Wilsher *et al.*, 2006). Elles sont souvent sous-évaluées en raison d'une apparition fréquemment sub-clinique. Parmi les affections des voies respiratoires profondes, on retrouve principalement la maladie inflammatoire des petites voies respiratoires (Inflammatory Airway Disease, IAD), les infections virales, l'Hémorragie Pulmonaire Induite par l'Exercice (HPIE), la maladie obstructive récurrente des voies respiratoires (Recurrent Airway Obstruction, RAO, qui touche des chevaux plus âgés) et les infections bactériennes. Dans une étude menée sur des Trotteurs de course contre-performants, il a été diagnostiqué 84.2% d'affections sub-cliniques touchant les voies respiratoires profondes dont 78% d'IAD, 62% d'inflammation trachéale et 31% d'HPIE (Richard *et al.*, 2010b), certains chevaux présentant des affections concomitantes. Une relation entre HPIE et inflammation pulmonaire est d'ailleurs reconnue, l'HPIE se développant plus favorablement suite à une inflammation pulmonaire (McKane *et al.*, 2010; Michelotto *et al.*, 2011; Newton *et al.*, 2002).

Malgré la fréquence de ces affections, leur étiologie et leur pathogénie ne sont toujours pas clairement définies. Une réponse inadaptée de l'immunité innée, 1^{ère} ligne de défense de l'organisme, pourrait être impliquée. L'immunité innée, ou non spécifique, regroupe de nombreux acteurs physiques, chimiques, cellulaires et moléculaires, permettant de protéger l'organisme contre les agressions externes. De multiples mécanismes sont mis en jeu pour orienter les réponses immunitaire et inflammatoire, mais des dysfonctionnements existent.

L'objectif général de ce travail de thèse est d'évaluer les modifications précoces de l'immunité innée entrant en jeu dans l'apparition des affections respiratoires touchant le cheval athlète.

REVUE DE LITTERATURE

1 AFFECTIONS RESPIRATOIRES PROFONDES DU JEUNE CHEVAL

ATHLETE ET IMMUNITE INNEE :

1.1 Infections virales : une réponse immunitaire insuffisante ?

Les affections virales sont considérées comme la cause majeure d'épidémies respiratoires contagieuses. Les causes les plus fréquentes de maladies respiratoires virales sont la grippe (virus influenza équin) et la rhinopneumonie (herpesvirus équins 1 et 4). Le risque d'exposition à ces virus est augmenté lors de rassemblements de chevaux, surtout chez les chevaux de moins de 2 ans (Carlson *et al.*, 2012).

La grippe équine est à l'origine de nombreuses épidémies à travers le monde (Hong Kong 1992, Australie 2007, Afrique du Sud 2003, etc), ayant pour conséquences des pertes économiques majeures dans l'industrie équine. En France, l'épidémie de grippe de Grosbois (centre d'entraînement de Trotteurs Français) a duré au moins 5 mois durant lesquels 19 foyers ont pu être identifiés répartis sur 10 départements, jusqu'au sud de la France. 271 chevaux présentaient des symptômes évocateurs de la grippe, sur un effectif total de 1655 chevaux (d'après les données du Réseau d'Epidémio-Surveillance en Pathologie Equine, RESPE).

Le virus se propage par les voies aériennes, les zones de rassemblement de chevaux (ventes, concours, courses, etc) sont donc des foyers à risques. La vaccination, pourtant obligatoire, ne permet pas de prévenir complètement le risque d'affection en raison de la grande variabilité du virus. La période d'incubation chez le cheval dépend de son statut d'immunisation ainsi que de la charge virale mais elle est en général d'environ 24 heures. Le cheval infecté récupère généralement en 2 semaines de repos mais la toux peut persister plus longtemps, accompagnée de lésions de l'épithélium pulmonaire. Des infections bactériennes secondaires peuvent apparaître, prolongeant ainsi la période de repos forcé. Les signes sont souvent sub-cliniques chez des chevaux régulièrement vaccinés et parfois seul un état de contre-performance peut être un révélateur non-spécifique de la maladie. Les analyses de laboratoires peuvent cependant confirmer le diagnostic (Cullinane *et al.*, 2013).

Les herpesvirus équins sont des virus à ADN double-brins, capables de rester latents après une 1^{ère} infection. Les conditions de réactivation du virus ne sont pas clairement définies mais

le stress (compétition, exercice intensif, fatigue, transport, etc) semble être le principal facteur favorisant la sortie de latence. Comme dans les cas de grippe, la présence du virus prédispose le système pulmonaire à des infections bactériennes opportunistes. On retrouve 2 catégories d'herpesvirus :

- Les alpha-herpesvirus équins (EHV-1 et EHV-4) sont responsables de pertes économiques majeures dans la filière équine en induisant notamment des problèmes respiratoires chez le jeune cheval, des atteintes neurologiques parfois mortelles, et des avortements chez les poulinières. Ce virus reste latent dans les ganglions trijumeaux chez plus de 80% de chevaux. La plupart du temps, la maladie est sub-clinique ou les signes sont subtils. Le 1^{er} site de réplication viral est l'épithélium nasal. Seulement 12 heures sont nécessaires au virus pour gagner les ganglions lymphatiques bronchiaux lors d'infections expérimentales avec des souches virulentes d'EHV-1 (Kydd *et al.*, 2006). Une étude s'intéressant à un groupe de 70 Pur-Sang de course a révélé 25,7 et 82,8% de chevaux porteurs de EHV-1 et EHV-4 respectivement, 17% étant porteurs des 2 souches virales dans les ganglions trijumeaux et/ou les tissus lymphoïdes (Pusterla *et al.*, 2012). Les vaccins existants contre EHV-1/4 ne protègent pas efficacement contre l'infection mais réduisent la charge virale ainsi que les signes cliniques (Harless *et al.*, 2006).
- Les gamma-herpesvirus équins (EHV-2 et EHV-5), présents dans le monde entier mais moins fréquemment isolés, sont également à l'origine d'atteintes respiratoires. Des cas d'épidémies associées à des atteintes respiratoires sévères touchant les jeunes chevaux sont rapportées (Fortier *et al.*, 2010). Les études tentant d'établir un lien entre la détection d'EHV-2 et les atteintes respiratoires sont contradictoires, néanmoins, une étude récente a rapporté une corrélation significative entre la présence de neutrophilie pulmonaire et la détection du virus (Fortier *et al.*, 2013). Les études concernant EHV-5 montrent un tropisme pour les voies respiratoires ainsi qu'un lien avec des infections bactériennes secondaires à *Rhodococcus equi* ou des lésions fibrotiques pulmonaire (Fortier *et al.*, 2010). Aucun vaccin n'existe actuellement pour ces virus.

Aucun traitement antiviral n'existe chez le cheval alors qu'il y aurait un intérêt réel à mettre au point de nouvelles molécules visant à stimuler la réponse immunitaire innée afin de faciliter l'élimination des agents pathogènes. La gestion de ces maladies repose actuellement

essentiellement sur une prophylaxie sanitaire et médicale. De nombreuses équipes travaillent à l'élaboration de nouveaux vaccins, les vaccins actuels restant insuffisamment protecteurs contre les principaux virus respiratoires (Glorieux *et al.*, 2012; Shaw, 2012).

1.2 Maladie inflammatoire des voies respiratoires : une réponse immunitaire excessive ?

D'après le Consensus de l'American College of Veterinary Internal Medicine (Couetil *et al.*, 2007), l'IAD peut affecter des chevaux de tout âge avec des signes généralement sub-cliniques au repos, ce qui distingue les chevaux IAD de ceux atteints de RAO. La RAO concerne des chevaux matures ou âgés, l'inflammation des voies respiratoires profondes est plus sévère, et des efforts respiratoires marqués au repos sont observés lorsque le cheval est en crise suite à l'exposition à des allergènes présents dans l'environnement.

Pour être considéré atteint d'IAD, un cheval doit présenter au minimum les critères suivants :

- Baisse de performance, intolérance à l'effort avec ou sans toux, présence ou non de mucus trachéal en excès, présence ou non de jetage nasal. Les conséquences de l'IAD sur les performances sont bien établies et sont causées notamment par l'inflammation pulmonaire, à l'origine d'une hypoxémie et d'efforts respiratoires exagérés à l'entraînement, ainsi que des temps de récupération respiratoire après l'effort plus longs.
- Inflammation aseptique détectée par l'examen cytologique du lavage broncho-alvéolaire (LBA), ou dysfonction pulmonaire telle qu'une obstruction des voies respiratoires profondes, une hyper-sensibilité des voies respiratoires ou anomalie des gaz sanguins au repos ou à l'effort.

Les critères d'exclusion étant :

- Signes cliniques d'infection bactérienne ou virale (fièvre, perte d'appétit, modification de l'hématologie, etc),
- Efforts respiratoires augmentés au repos (typique RAO).

Le diagnostic de l'IAD est réalisé à l'aide de la cytologie du LBA défini par une augmentation des neutrophiles (>5%) le plus fréquemment (tandis qu'elle est >20% chez les RAO) et/ou une augmentation des mastocytes (>2%) et/ou des éosinophiles (>0.1%).

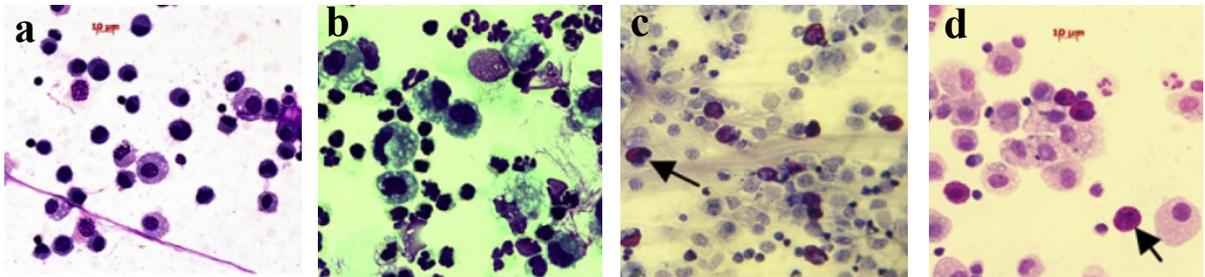


Figure 1 : Cytologies du LBA de chevaux sains et atteints d'IAD (Hoffman, 2008), a) cheval sain, b) IAD à profil neutrophilique, c) IAD à profil éosinophilique, d) IAD à profil mastocytaire.

Les causes d'apparition de la maladie sont peu connues et semblent multiples. Le milieu environnemental dans lequel évolue le cheval a un rôle majeur dans le développement de l'IAD. La vie en écurie est un facteur prédisposant, en raison de la présence de poussières contenant des allergènes, moisissures, β -glycanes et des endotoxines (ces chevaux présentent principalement des mastocytes et/ou des éosinophiles dans le LBA). L'entraînement intensif est un facteur aggravant car, en augmentant la fréquence et l'amplitude respiratoire à l'effort, il augmente le dépôt de particules environnementales ainsi que celui des bactéries aériennes ou oropharyngiennes dans les voies respiratoires profondes (Raidal *et al.*, 1997). Même si ces particules/bactéries ne sont pas obligatoirement pathogènes, elles peuvent être à l'origine d'une irritation chronique et d'une saturation des mécanismes de clearance, favorisant ainsi l'apparition d'une inflammation respiratoire.

Le rôle des bactéries et des virus dans l'étiologie ou la pathogénie de l'IAD reste controversé. Des études suggèrent que des infections bactériennes cliniques ou subcliniques joueraient un rôle dans le développement de l'IAD. Une étude longitudinale de 3 ans réalisée en Grande-Bretagne chez des Pur-Sang de course a montré une corrélation positive entre la présence d'IAD et d'infections mettant en cause *Streptococcus pneumoniae* (chez les moins de 2 ans), *Streptococcus zooepidemicus*, *Actinobacillus spp* et *Mycoplasma equirhinis* (Wood *et al.*, 2005a). Certains virus peuvent également être détectés dans des prélèvements respiratoires de chevaux atteints d'IAD, néanmoins la détection de virus dans le LT (EHV-1 et EHV-4) ne permet pas de présager de l'existence d'une inflammation profonde (Wood *et*

al., 2005b). La contribution des agents infectieux dans le développement de l'IAD reste donc encore incertaine et probablement mineure par rapport aux facteurs environnementaux.

Si l'on se réfère aux critères d'inclusion du consensus, les études rapportant des données de prévalence indiquent que 68% à 78% de chevaux intolérants à l'effort ou contre-performants seraient atteints d'IAD (Lavoie *et al.*, 2011; Richard *et al.*, 2010b), et que 84% des cas d'IAD (selon cytologie restrictive >10% neutrophiles et/ou >2% mastocytes et/ou >1% éosinophiles) seraient associés à une autre affection (inflammation trachéale ou HPIE). Dans une autre étude, l'équipe de Wood rapporte une incidence de 9% par mois (9 nouveaux cas/100 chevaux/mois) chez des Pur-Sang de course britanniques âgés de 2 à 4 ans, la prévalence annuelle atteignant jusqu'à 78% chez des 2 ans et diminuant progressivement avec l'âge (20% à 4 ans) (Wood *et al.*, 2005b). La durée d'un épisode d'IAD a été évaluée à approximativement 8 semaines. Les différences observées entre les études peuvent être dues aux populations de chevaux étudiés, à la définition de l'IAD utilisée, à la région géographique de l'étude, à la période de l'année, etc. La plus haute prévalence chez les jeunes chevaux pourrait être liée au fait qu'ils débutent l'entraînement plutôt qu'à un effet de l'âge lui-même (Cardwell *et al.*, 2011). En effet, les auteurs rapportent une fréquence plus élevée de trIAD (inflammation basée sur la cytologie du lavage trachéal) et de mucus trachéal sur des chevaux débutant l'entraînement par rapport à des chevaux à l'entraînement depuis une plus longue période, sans effet significatif de l'âge. Il faut cependant noter que l'absence de cytologie sur le LBA ne permet pas d'extrapoler ces résultats aux voies respiratoires profondes.

Les moyens de prévention et de traitement de l'IAD combinent des modifications environnementales et l'administration de traitements anti-inflammatoires, idéalement par nébulisation. Cependant, l'intensité de l'entraînement doit être réduite pour les chevaux encours de traitement et ils ne peuvent pas participer à des courses pour des raisons de dopage. L'arrêt temporaire est en moyenne de 2 à 3 semaines et peut se prolonger au-delà selon la gravité de la maladie ou l'existence d'infections concomitantes. L'impact économique est donc important, d'autant plus si l'entraînement du cheval a dû être interrompu durant la période de traitement.

Les liens entre l'inflammation respiratoire et l'immunité semblent incontestables, bien que peu étudiés chez le cheval. Les pistes de recherche, inspirées des découvertes réalisées

chez l'homme ou chez la souris, sont néanmoins nombreuses. Il apparaît indispensable d'améliorer les connaissances dans ce domaine.

1.3 Mécanismes de défense pulmonaire, focus sur l'immunité innée :

L'immunité respiratoire comprend des barrières physiques mettant en jeu des mécanismes de défense passifs et des acteurs cellulaires. Lorsqu'un pathogène franchit les barrières anatomiques et contourne les mécanismes de défense passifs, ce sont les acteurs de l'immunité innée respiratoire qui entrent en jeu. L'immunité innée constitue une barrière non spécifique contre les agents pathogènes et n'est pas renforcée par leurs expositions répétées, contrairement à l'immunité adaptative. Elle comprend des facteurs solubles (facteurs du complément, cytokines, peptides microbicides) et des acteurs cellulaires. Dans le poumon, les 1^{ères} cellules à entrer en contact avec l'agent pathogène sont les macrophages alvéolaires. Ils représentent le principal type cellulaire pulmonaire chez le sujet sain. Leur rôle est primordial dans les défenses contre les agents infectieux grâce à leur capacité à reconnaître les agents pathogènes, leur fonction de phagocytose, de présentation de l'antigène et de recrutement d'autres cellules immunitaires. Dans la majorité des cas, leur intervention suffit à éliminer l'intrus mais, lorsque l'invasion est trop importante ou que les défenses immunitaires sont affaiblies, les macrophages alvéolaires vont recruter d'autres acteurs cellulaires (neutrophiles, etc) et activer le système immunitaire acquis. Leur rôle est central et leur bon fonctionnement est primordial pour une défense immune respiratoire efficace. Le système immunitaire acquis, représenté principalement par les lymphocytes n'est recruté qu'en 2^{nde} ligne, lorsque le système immunitaire inné n'est plus en mesure d'éradiquer à lui-seul l'intrus. Il comprend des acteurs cellulaires spécifiques de l'intrus ainsi que des médiateurs humoraux.

1.3.1 Mécanismes passifs :

Les mécanismes passifs de l'immunité font intervenir des barrières anatomiques, des phénomènes physiques et des acteurs chimiques. Parmi ceux-ci, on retrouve le « filtre » nasal, la formation de mucus, l'impaction des particules aéroportées dans les voies respiratoires (les mouvements ciliaires, la toux, etc). Ces systèmes sont efficaces pour la clearance des particules de plus de 5 µm. Les particules de taille inférieure contournent ces mécanismes et peuvent gagner les voies respiratoires plus profondes où d'autres mécanismes interviennent

(Zhang *et al.*, 2000). Par exemple, le mucus sécrété semble présenter des capacités d'optimisation de la phagocytose par les macrophages et diminuerait la charge bactérienne présente dans les cellules (Schwab *et al.*, 2013). Dans les voies respiratoires profondes, le surfactant alvéolaire est un film lipoprotéique sécrété par les cellules épithéliales alvéolaires (pneumocytes de type 2). Outre son rôle dans la réduction de la tension superficielle air/liquide nécessaire à l'expansion des alvéoles lors de la respiration, il possède également un rôle de barrière physiologique et une fonction immuno-régulatrice.

Les acteurs chimiques sont des molécules libres présentes dans le mucus. Dans le poumon, ils sont représentés, entre autres, par :

- Les mucines entrant dans la composition du mucus, qui joueraient un rôle anti-inflammatoire durant une infection respiratoire, notamment par l'inhibition de la signalisation de certains récepteurs Toll-like, TLR (Kim, 2011).
- Les collectines (protéines du surfactant A et D (SP-A et SP-D) et les lectines (Mannose-binding lectin MBL)), qui participent à l'homéostasie du surfactant, possèdent un domaine de reconnaissance des carbohydrates qui leur permet de se lier aux pathogènes. Cette liaison favorise la phagocytose d'éléments par les macrophages alvéolaires (Zaas *et al.*, 2005). Les chevaux atteints d'IAD présentent un taux de SP-D sérique supérieur à celui des chevaux sains (Richard *et al.*, 2012), reflétant probablement des lésions alvéolaires (augmentation de la perméabilité).
- Les défensines, qui sont des substances cationiques microbicides sécrétées dans le fluide pulmonaire. Elles augmentent en réponse à l'inflammation et ont un rôle dans la neutralisation des pathogènes et des substances inflammatoires (Zaas *et al.*, 2005).

1.3.2 Acteurs cellulaires :

Les principales cellules de l'immunité innée sont : les macrophages (qui possèdent une importante activité phagocytaire, régulatrice et interviennent dans la présentation antigénique), les neutrophiles (notamment pour la défense contre les infections bactériennes), les cellules dendritiques (qui jouent un rôle dans l'orchestration de la réponse immune), et les cellules Natural Killer (NK) (qui reconnaissent les cellules modifiées, virales ou cancéreuses). Dans le compartiment pulmonaire d'un cheval sain, on retrouve principalement des macrophages et des lymphocytes (les lymphocytes pulmonaires, cellules de l'immunité

acquise, seront traités dans un prochain chapitre). Les proportions leucocytaires du BAL augmentent progressivement dès la naissance pour atteindre les pourcentages de l'adulte à partir de l'âge de 3 mois, les leucocytes ayant les mêmes capacités que ceux des adultes (Flaminio *et al.*, 2000). Dès qu'une inflammation s'installe au niveau du poumon, un recrutement de neutrophiles et/ou mastocytes et/ou éosinophiles est observé.

Les macrophages alvéolaires sont des phagocytes mononucléés, dérivant des monocytes circulants, d'origine médullaire. Ils ont une durée de vie de 2 à 4 mois contre seulement 24h pour les monocytes sanguins. Les macrophages alvéolaires sont présents en sentinelles dans le poumon, ils possèdent donc un rôle central dans l'initiation de la réponse immunitaire pulmonaire. Les poumons du cheval possèdent environ 48 billions de macrophages alvéolaires (Stone *et al.*, 1992). Ce sont les premières cellules phagocytaires à rencontrer l'agent pathogène. Généralement la phagocytose induite par les macrophages est suffisante pour éradiquer l'intrus. Lorsque la charge pathogène est trop importante ou l'agent trop virulent, les macrophages alvéolaires vont produire des cytokines/chemokines capables de recruter de nombreux polynucléaires neutrophiles (Zhang *et al.*, 2000) et d'activer le système immunitaire acquis via la présentation de l'antigène.

L'activation des macrophages induit :

- la phagocytose, plus lente que celle des neutrophiles mais qui permet la conservation de peptides qui seront présentés aux lymphocytes.
- la sécrétion de facteurs intervenant dans les mécanismes de l'inflammation (complément, cytokines, enzymes, radicaux libres, etc).

La phagocytose est un phénomène qui augmente la consommation d'oxygène par les cellules, à l'origine de la formation de radicaux libres oxygénés comme le monoxyde d'azote (NO) qui possède des propriétés inflammatoires (vasodilatation, œdème par exemple).

Le rôle de ces macrophages alvéolaires est primordial dans le bon fonctionnement de l'immunité respiratoire, de par leurs fonctions dans la lutte contre l'agent pathogène mais également par leur rôle charnière entre immunité innée et acquise. On comprend ainsi qu'une défaillance à ce niveau puisse être à l'origine d'une sensibilité accrue aux infections respiratoires. C'est pourquoi nous nous intéresserons plus particulièrement à leur fonctionnement dans la réalisation de ces travaux de thèse.

Dans le poumon, il existe 3 autres populations de macrophages caractérisées par leur localisation anatomique, leurs caractéristiques morphologiques et leurs fonctions (Geiser, 2010).

- Macrophage pleural : intermédiaires entre macrophage et monocyte, ils ont une activité constitutive plutôt anti-inflammatoire (expression d'Il-10) et basculent vers une activité pro-inflammatoire en cas d'inflammation (sécrétion de TNF et Il-6, attractant des neutrophiles).
- Macrophages intravasculaires : accès direct au compartiment sanguin, ils ont une activité de phagocytose principalement.
- Macrophages interstitiels : précurseurs immédiats des macrophages de surface, ils transitent entre le sang et la surface alvéolaire. Leur fonction principale consiste à présenter l'antigène aux cellules de l'immunité innée, de par leur situation stratégique dans le tissu conjonctif.

Les polynucléaires neutrophiles ont une maturation d'environ 5 jours à partir des cellules souches pluripotentes de la moelle, et une durée de vie d'environ 2 jours. Les neutrophiles activés libèrent des granules (lysosomes) agissant sur les substances phagocytées soit dans la cellule, soit directement dans le milieu extra-cellulaire. Dans les poumons, les macrophages alvéolaires sont capables de recruter un grand nombre de neutrophiles circulants lorsqu'un agent pathogène est détecté, via la sécrétion de chimiokines. Le stock de neutrophiles présents dans la vascularisation pulmonaire représente environ 40% des neutrophiles totaux de l'organisme. Ils offrent une activité phagocytaire efficace, complémentaire aux macrophages alvéolaires et expriment de nombreuses cytokines dont TNF α , Il-1 β et Il-6 (Zhang *et al.*, 2000).

Les polynucléaires éosinophiles et les mastocytes (issus des basophiles circulants) peuvent également être recrutés dans le poumon. Ils ont un rôle dans la production de médiateurs de la réaction immuno-allergique et inflammatoire comme, par exemple, la libération d'histamine par les mastocytes qui participe aux phénomènes de vasodilatation, perméabilité capillaire, œdème, etc.

D'autres acteurs cellulaires interviennent dans les processus de l'immunité innée, comme les cellules épithéliales, les cellules dendritiques, les cellules Natural Killer mais leur fonction ne sera pas développée ici.

1.3.3 Reconnaissance des pathogènes et réponse immunitaire innée :

Les cellules de l'immunité innée ont la particularité de pouvoir répondre de façon non-spécifique aux pathogènes. Dans le poumon, elles sont continuellement en contact avec des micro-organismes et des particules inhalées. Cependant, elles ont la capacité de distinguer le caractère inoffensif ou pathogène des micro-organismes, préservant le poumon de processus inflammatoires inadaptés. Cette reconnaissance du caractère pathogène d'un intrus est possible grâce à des récepteurs spécifiques appelés PRR (pattern-recognition receptors) capables de reconnaître des motifs communs présents sur les micro-organismes, les PAMP (pathogen associated molecular pattern) (Zaas & Schwartz, 2005). Les PAMP sont des motifs répétés, invariants dans la structure moléculaire des micro-organismes, c'est le cas de l'acide lipotéichoïque des bactéries Gram+, du lipopolysaccharide de la paroi des bactéries Gram- (LPS), de motifs répétés non méthylés CpG contenus dans l'ADN bactérien, d'ARN double ou simple brin de virus par exemple. Ils sont essentiels à la survie des micro-organismes et, à ce titre, sont peu susceptibles au système d'échappement par mutation. La liaison de ces composants pathogènes sur ces récepteurs induit une contre-attaque rapide du système immunitaire dès les 4 premières heures, tandis que la réponse adaptative intervient plus tardivement (>96h).

Les cellules phagocytaires, comme les macrophages alvéolaires, sont équipés de divers PRR membranaires capables de reconnaître directement les pathogènes (McGuinness *et al.*, 2003). Parmi eux, on retrouve :

- Les lectines de type C : lectines membranaires capables d'interagir avec des glycoprotéines possédant un mannose ou un galactose présent sur les bactéries et champignons. Elles induisent la phagocytose et la présentation antigénique. Parmi elles, on retrouve notamment le macrophage mannose receptor (MMR).
- Les récepteurs « scavengers » : récepteurs de surface capables de reconnaître une large gamme de ligands, principalement des lipoprotéines de faible densité et le LPS. Ils interviennent dans la clearance des corps apoptotiques, la fixation et la phagocytose des micro-organismes ainsi que dans le métabolisme lipidique.
- Les récepteurs du complément : impliqués dans l'adhésion, la migration, l'activation et l'élimination des pathogènes, ils reconnaissent des protéines activées du système du complément.

- Les récepteurs intracellulaires NOD (nucleotide-binding Oligomerization Domain proteins) : reconnaissent des PAMP intracellulaires et sont capables d'activer la voie NF-κB (Nuclear Factor-Kappa B).
- Les Toll-Like receptors ou TLR: capables d'interagir de façon spécifique avec différents ligands, ils jouent un rôle dans l'activation de la réponse inflammatoire et la réponse antivirale.

Dans cette étude, nous nous focaliserons sur le fonctionnement des TLR, les autres récepteurs de l'immunité innée ne seront donc pas développés. En effet, présentés par les macrophages alvéolaires, ils jouent un rôle crucial dans la reconnaissance précoce des agents pathogènes et permettent aux cellules qui les portent d'orienter leur réponse en fonction du type d'intrus. Une anomalie dans leur fonctionnement pourrait être mise en cause dans la susceptibilité des chevaux aux pathologies respiratoires.

a) Structure des TLR :

Les TLR sont des récepteurs transmembranaires extra ou intracellulaires. Ils font partie de la famille des glycoprotéines transmembranaires de type I, caractérisés par :

- Un domaine extracellulaire NH₂-terminal riche en leucines (LRR, leucine-rich repeat domain). Ces LRR sont variés et probablement impliqués dans la liaison des ligands et la dimérisation des TLR.
- Une queue intra-cellulaire COOH-terminal qui contient une région conservée appelée domaine d'homologie Toll/IL-1 receptor (TIR). Elle permet l'interaction entre le TLR activé et les protéines responsables de la transduction du signal, voir Figure 2 (Astakhova *et al.*, 2009).



Figure 2 : Structure type d'un récepteur Toll-like (Astakhova et al., 2009).

Certains TLR sont exprimés à la surface des cellules (TLR 1/2, 2/6, 4 ou 5) tandis que d'autres sont intracellulaires (TLR 9, 3, 7/8), localisés dans la membrane des endosomes. Ces

derniers reconnaissent des PAMP issus de l'endocytose de pathogènes. Certains TLR forment des hétérodimères, c'est le cas du TLR 2 qui peut s'associer avec le TLR 1 ou le TLR 6, et du TLR 7 qui s'associe avec le TLR 8. D'autres fonctionnent uniquement en présence de molécules co-stimulatrices, comme CD14 et MD-2 qui permettent le bon fonctionnement du TLR 4 (Basu *et al.*, 2004).

b) TLR et ligands :

A l'origine, leur découverte est le résultat de leur implication dans le développement embryonnaire chez la Drosophile. Leur rôle dans les mécanismes de défense contre les infections a été mis en évidence dans un second temps chez l'insecte adulte puis chez les plantes et les vertébrés, soulignant un système bien conservé au cours de l'évolution. Chez la Drosophile, ces récepteurs sont appelés Toll receptors, leurs homologues dans d'autres espèces ont été nommés Toll-Like receptors, TLR.

A ce jour, une dizaine de membres de la famille des TLR ayant des fonctions distinctes ont été identifiés chez les Mammifères (Akira *et al.*, 2006). La plupart de leurs agonistes a été découvert et sont repris dans le tableau 1 (Akira *et al.*, 2006; O'Neill, 2004).

Tableau 1 : Principaux motifs pathogènes reconnus par les différents TLR (Akira et al., 2006).

Microbial Components	Species	TLR Usage
Bacteria		
LPS	Gram-negative bacteria	TLR4
Diacyl lipopeptides	<i>Mycoplasma</i>	TLR6/TLR2
Triacyl lipopeptides	Bacteria and mycobacteria	TLR1/TLR2
LTA	Group B <i>Streptococcus</i>	TLR6/TLR2
PG	Gram-positive bacteria	TLR2
Porins	<i>Neisseria</i>	TLR2
Lipoarabinomannan	Mycobacteria	TLR2
Flagellin	Flagellated bacteria	TLR5
CpG-DNA	Bacteria and mycobacteria	TLR9
ND	Uropathogenic bacteria	TLR11
Fungus		
Zyosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TLR6/TLR2
Phospholipomannan	<i>Candida albicans</i>	TLR2
Mannan	<i>Candida albicans</i>	TLR4
Glucuronoxylomannan	<i>Cryptococcus neoformans</i>	TLR2 and TLR4
Parasites		
tGPI-mutin	<i>Trypanosoma</i>	TLR2
Glycoinositolphospholipids	<i>Trypanosoma</i>	TLR4
Hemozoin	<i>Plasmodium</i>	TLR9
Profilin-like molecule	<i>Toxoplasma gondii</i>	TLR11
Viruses		
DNA	Viruses	TLR9
dsRNA	Viruses	TLR3
ssRNA	RNA viruses	TLR7 and TLR8
Envelope proteins	RSV, MMTV	TLR4
Hemagglutinin protein	Measles virus	TLR2
ND	HCMV, HSV1	TLR2
Host		
Heat-shock protein 60, 70		TLR4
Fibrinogen		TLR4

Il s'agit de composants caractéristiques de différents types de micro-organismes pathogènes : bactéries, virus, mycoplasmes, champignons, etc (cf figure 3 (Akira et al., 2006)).

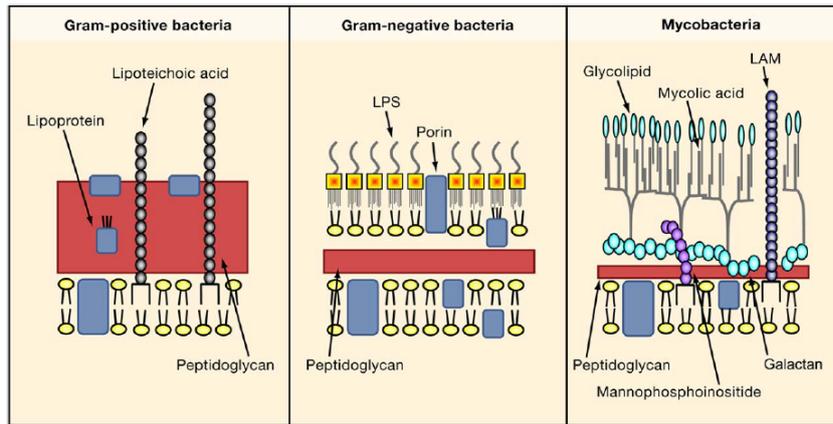


Figure 3 : Composition schématique de la paroi des bactéries Gram+, Gram- et des mycoplasmes (Akira et al., 2006).

Les TLR sont exprimés par de nombreux types cellulaires, principalement par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme les macrophages ou les cellules dendritiques mais également par d'autres cellules comme les cellules B, T ou les cellules épithéliales. Le profil de TLR et leur rôle sont variables d'un type cellulaire à un autre, dépendant de la localisation et de la fonction de la cellule. De plus, leur expression n'est pas statique et peut varier sous l'effet de divers facteurs, comme la présence de pathogènes, l'environnement cytokinique ou le stress (Akira *et al.*, 2006).

c) Activation des TLR et transduction du signal pathogène :

Lorsqu'un TLR est activé suite à la liaison spécifique d'un ligand, une cascade de signalisation impliquant différents acteurs moléculaires se met en place (Akira *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2009; Takeda *et al.*, 2004b). Le TLR se dimérise, ce qui permet l'interaction de molécules de signalisation avec le domaine intracellulaire du TLR. C'est ainsi que des adaptateurs contenant un domaine TIR tels que MyD88 (Myeloid Differentiation primary response 88), TIRAP (Toll-Interleukin 1 Receptor domain containing Adaptor Protein), TRIF (TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon- β) et TRAM (toll-like receptor 4 adaptor protein) sont recrutés et interagissent directement avec le domaine TIR des TLR activés. Tous les TLR, à l'exception du TLR 3 recrutent MyD88. Les TLR 1, 2/6 et 4 recrutent également TIRAP qui sert d'intermédiaire entre le TLR et MyD88. Le TLR 4 recrute l'adaptateur TRIF via TRAM tandis que le TLR 3 recrute directement TRIF. L'activation de ces adaptateurs induit une cascade de signalisation aboutissant à l'activation de facteurs de transcription tels que NF- κ B et IRFs (interferon regulatory transcription

factors) qui vont induire l'expression de cytokines inflammatoires, d'interférons de type I et de chimiokines. En raison de la complexité des cascades de signalisation, la transduction du signal issue de l'activation des TLR est catégorisée en 2 voies : une voie MyD88-dépendante commune à tous les TLR excepté au TLR 3, et une voie MyD88-indépendante, propre aux TLR 3 et 4 (également appelée voie TRIF-dépendante).

- **La voie MyD88-dépendante :** MyD88 possède un domaine TIR C-terminal avec lequel il s'associe aux TLR, et un domaine « death » N-terminal grâce auquel il recrute IL-1 receptor-associated kinase (IRAK). IRAK est activé par phosphorylation et s'associe avec TRAF6 (TNF receptor associated factor-6). TRAF6 activé induit 2 voies de signalisation aboutissant à l'activation de JNK (c-Jun N-terminal kinase) et NF- κ B, facteurs de transcription qui vont activer l'expression de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , Il-1 β , Il-6 par exemple). La voie MyD88 induit également l'expression de molécules impliquées dans la régulation de l'inflammation et l'immunité adaptative. Le détail de la cascade de signalisation MyD88-dépendante est explicité dans la figure 4 (Takeda *et al.*, 2004b).

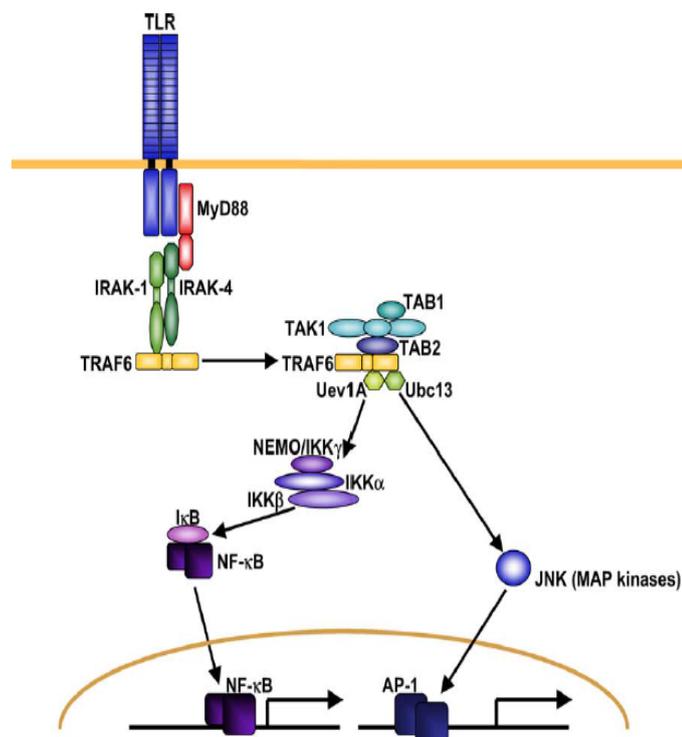
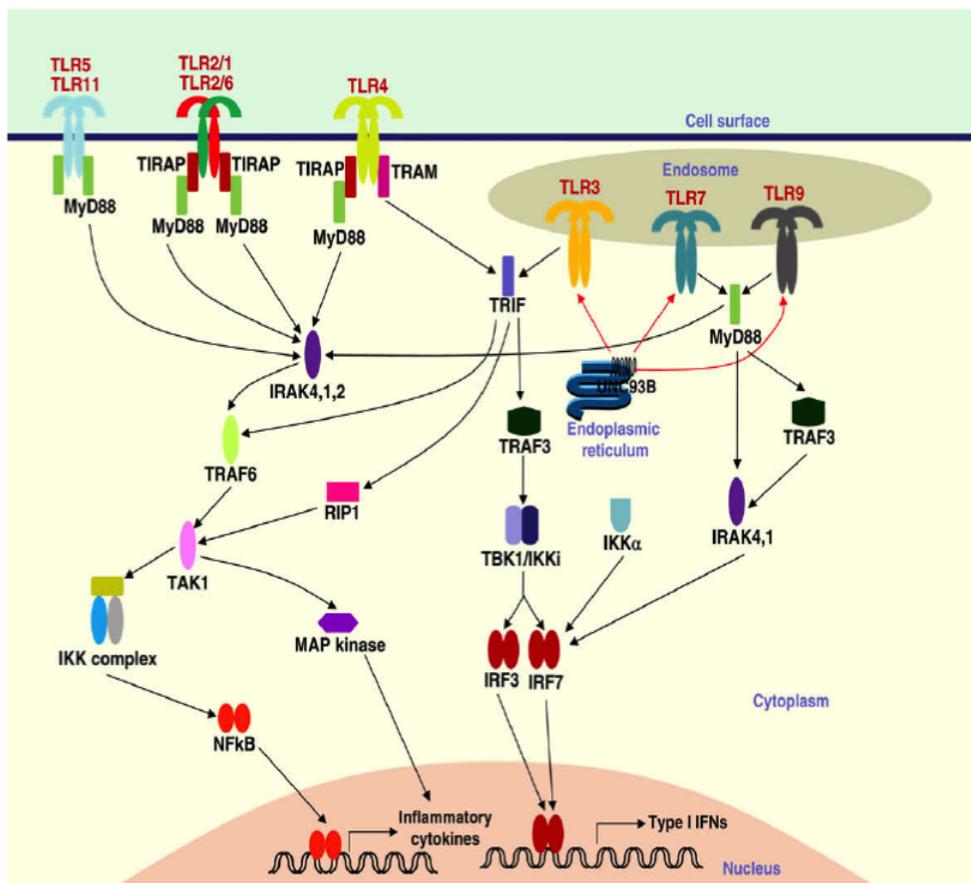


Figure 4 : Schématisation de la cascade de signalisation MyD88-dépendante (Kiyoshi Takeda & Shizuo Akira, 2004).

- La voie MyD88-indépendante ou TRIF-dépendante** : elle est utilisée par les TLR 3 et 4 uniquement. L'adaptateur TRIF, et non MyD88, est recruté par le TLR activé. NF- κ B va alors être activé par TRIF par 2 voies indépendantes : via l'activation de TRAF6 et via l'interaction de TRIF avec RIP1. L'activation de NF- κ B induit alors l'expression de cytokines pro-inflammatoires. TRIF active également une 3^{ème} voie aboutissant à l'activation du facteur de transcription IRF3 qui va induire l'expression d'interférons de type I (IFN β , IFN α). Il faut noter que l'activation des TLR 7/8 et 9 peut induire également l'expression d'interférons de type I (notamment IFN α), via l'activation de IRF7. La cascade de signalisation est décrite plus en détail dans la figure 5 (Kumar *et al.*, 2009).



*Figure 5 : Schéma des cascades de signalisation TRIF-dépendante et MyD88-dépendante (Kumar *et al.*, 2009).*

La stimulation des TLR par un pathogène induit dans tous les cas la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Les cytokines sont des glycoprotéines, comparables aux hormones qui peuvent être membranaires ou sécrétées suite à une stimulation. Elles peuvent être synthétisées par plusieurs types de cellules et avoir une action variée sur de nombreuses

cellules cibles. Les cytokines agissent de façon autocrine, juxtacrine, paracrine et/ou endocrine par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. Elles sont classées selon l'homologie de leurs structures. Parmi les principales cytokines pro-inflammatoires sécrétées en réponse à l'activation des TLR, on retrouve :

- **Le TNF α** : c'est la plus importante cytokine pro-inflammatoire. Il induit la synthèse de protéines membranaires au niveau de l'endothélium vasculaire qui seront indispensables à la diapédèse des cellules recrutées. TNF α est responsable de l'activation des cellules immunitaires, notamment les macrophages et les lymphocytes mais il joue également un rôle dans des processus systémiques comme la fièvre ou la stimulation de la synthèse de molécules de la phase aiguë de l'inflammation. Il est produit très rapidement après la reconnaissance d'un pathogène, principalement par les macrophages. Sa réponse reste localisée, une production de TNF α dans le poumon n'induirait pas forcément de production systémique (Zhang *et al.*, 2000).
- **Les interleukines** : on peut citer Il-1 β qui agit en synergie avec TNF α , Il-12 qui oriente la réponse immunitaire vers un profil Th1. Il semble que l'expression d'Il-1 β soit corrélée de façon positive à la quantité de neutrophiles dans le LBA comme le montre des études sur des chevaux RAO ou IAD (Giguere *et al.*, 2002; Lavoie *et al.*, 2011). La production d'Il-1 β par les macrophages alvéolaires pourrait donc être impliquée dans le recrutement des neutrophiles dans le poumon.
- **Les chimiokines** : ce sont de petites cytokines chimio-attractantes dont le rôle est de recruter et d'activer les cellules immunitaires sur le site de l'inflammation. Par exemple, CXCL8, sécrété par les macrophages, assure l'attraction et l'activation des neutrophiles.

La stimulation des TLR 3, 4, 7/8 et 9 induit l'expression d'interférons de type I (IFN α et IFN β). Ces cytokines jouent un rôle primordial principalement dans la réponse anti-virale, même si elles peuvent être induites aussi en cas d'infection bactérienne. Dans le compartiment pulmonaire, les cellules productrices d'IFN-I sont les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales. Dans le compartiment sanguin, ce sont surtout les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Le rôle majeur des IFN-I est de limiter la charge virale en induisant l'apoptose des cellules infectées et en protégeant les cellules saines (inhibiteur des processus de réplication par exemple). De plus, les IFN-I sont à l'interface entre immunité innée et acquise (Swiecki *et al.*, 2011). Par exemple, ils favorisent la présentation de

l'antigène par les cellules dendritiques et participent à l'homéostasie des cellules T et B (Mattei *et al.*, 2010). Ils possèdent également un potentiel anti-inflammatoire (Billiau, 2006).

Dans ce travail de thèse, nous nous intéresserons au fonctionnement de 4 TLR : les TLR 2/6, 3, 4 et 9, capables de reconnaître les principaux types d'agents pathogènes susceptibles d'être rencontrés dans le compartiment pulmonaire.

- **Le TLR 2** : il est capable de reconnaître une large gamme de composants pathogènes, notamment le peptidoglycane et l'acide lipotéichoïque (LTA) des bactéries Gram+, des lipoprotéines et lipopeptides de bactéries et mycoplasmes, le zymosan à la surface des champignons (levures). Ceci s'explique par le fait qu'il soit capable de former des dimères avec 2 autres TLR, le TLR 1 et le TLR 6. L'hétérodimère 2/6 peut être stimulé expérimentalement à l'aide du FSL-1 qui est une lipoprotéine synthétique dérivée de *Mycoplasma salivarium*. Son activation induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires via la voie MyD88-dépendante, cf figure 6 (Takeda *et al.*, 2004a).

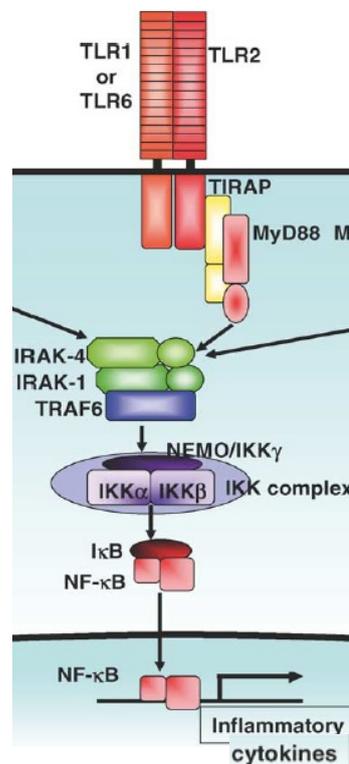


Figure 6 : Schématisation de la cascade de signalisation induite par l'activation du dimère TLR2/6 ou TLR2/1, à l'origine de la production de cytokines pro-inflammatoires (Takeda & Akira, 2004).

- **Le TLR 3 :** TLR intracellulaire, il est primordial dans la réponse anti-virale. Il est capable de reconnaître les ARN double-brins issus de la réplication de la plupart des virus (dont des virus à ARN simple brin) dans des cellules infectées. Sa stimulation induit la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et surtout d'interférons de type I tels qu'IFN β et IFN α via la voie TRIF-dépendante exclusivement (cf figure 7 (Akira *et al.*, 2006)). Les interférons de type I jouent un rôle important dans la défense anti-virale. Expérimentalement, le TLR 3 peut être stimulé par du Poly(I:C), analogue synthétique d'ARN double-brin.

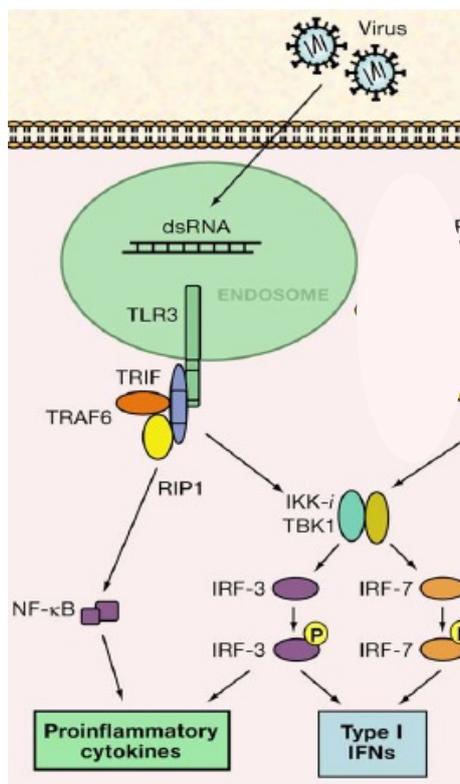


Figure 7 : Schématisation de la cascade de signalisation induite par la stimulation du TLR 3 (Akira *et al.*, 2006).

- **Le TLR 4 :** TLR important pour la reconnaissance des composants de la paroi des bactéries Gram-, principalement le lipopolysaccharide (LPS). La fixation du LPS au récepteur nécessite l'intervention de 2 molécules accessoires : MD-2 et CD14, sans lesquelles la transduction du signal est impossible. L'activation du TLR 4 induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires mais également celle d'interférons de

type I. C'est le seul TLR qui est capable d'utiliser les 2 voies de signalisation, MyD88 et TRIF dépendantes (cf figure 8 (Akira *et al.*, 2006)). Il peut être stimulé *in vitro* par du LPS extrait de bactéries, comme *Escherichia coli*.

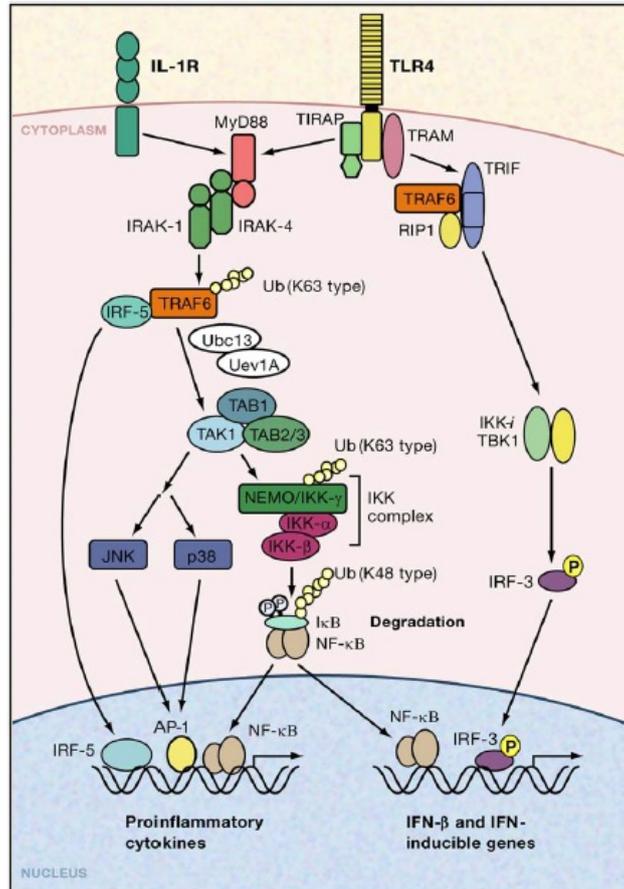


Figure 8 : Schématisation de la cascade de signalisation induite par la stimulation du TLR 4 (Akira *et al.*, 2006).

- **Le TLR 9 :** le TLR 9 est un récepteur intracellulaire, il est impliqué dans la reconnaissance des bactéries à ADN, contenant des motifs CpG non méthylés. Sa stimulation induit la production de cytokines pro-inflammatoires mais aussi d'interférons de type I via la voie MyD88 (cf figure 9 (Akira *et al.*, 2006)), suggérant un rôle également dans la réponse anti-virale (reconnaissance de virus à ADN). Il intervient, de plus, dans l'immunité adaptative par sa capacité à stimuler la prolifération des cellules B notamment. Il peut être stimulé expérimentalement par du CpG pour lequel différents motifs sont disponibles.

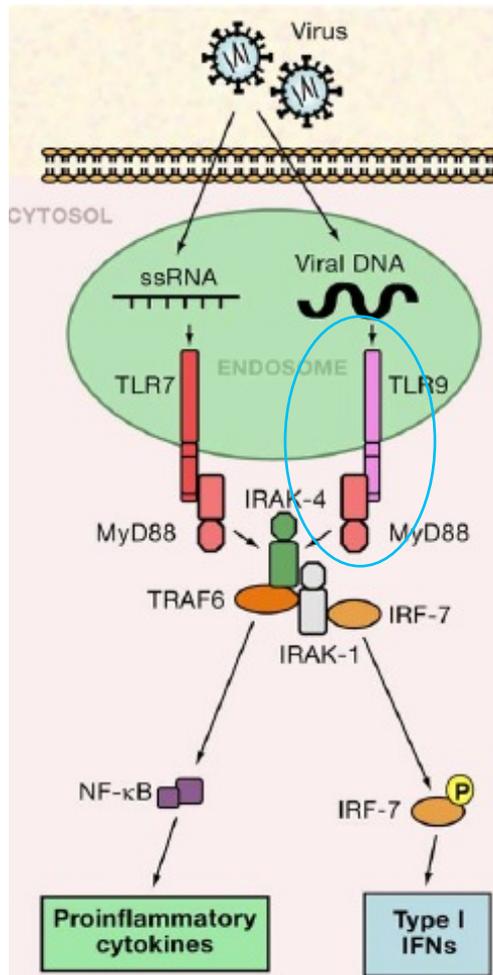


Figure 9 : Schématisation de la cascade de signalisation induite par l'activation du TLR 9 (Akira et al., 2006).

d) Interface avec l'immunité acquise :

Les 2 branches de l'immunité, innée et acquise (ou adaptative), sont intimement liées. L'immunité innée aide au développement d'une réponse adaptative spécifique grâce à la présentation de l'antigène et les acteurs de l'immunité adaptative régulent en retour la réponse innée via la sécrétion de cytokines ayant un rôle régulateur.

La réponse immunitaire adaptative est médiée à la fois par des processus humoraux et cellulaires. La réponse humorale consiste en la production d'anticorps spécifiques par les cellules B (seuls 1,5 à 4% de lymphocytes pulmonaires équins sont des lymphocytes B, CD21+). La réponse cellulaire fait intervenir des cellules T effectrices (comme les cellules T cytotoxiques) qui présentent des antigènes spécifiques et participent aux phénomènes de mémoire immunitaire. Les lymphocytes présents dans le LBA de chevaux sains sont

représentés majoritairement par des lymphocytes T (83 à 93 % de CD3+, dont 40% de lymphocytes T cytotoxiques CD8+ et 58% de lymphocytes T auxiliaires ou helper CD4+ (Hansen *et al.*, 2013; Hines *et al.*, 1996)). La réponse adaptative dans son ensemble est régulée par les lymphocytes T helper (Th) qui produisent diverses cytokines afin d'orienter et de contrôler la réponse immune. Les lymphocytes de type Th1 interviennent plutôt dans la défense contre des pathogènes intracellulaires comme les virus, ils produisent de l'IFN γ et Il-2, stimulant ainsi l'activation et la prolifération des cellules T cytotoxiques et des macrophages, ce qui favorise la génération de lymphocytes T mémoire. La réponse de type Th2 induit la sécrétion d'Il-4, Il-5, Il-6 et Il-13, elle est impliquée dans la protection contre des pathogènes extracellulaires et les phénomènes allergiques et stimule une immunité plutôt humorale (activation et prolifération des cellules B, production d'anticorps).

Les TLR ont un rôle primordial dans l'initiation de la réponse innée grâce à la reconnaissance des pathogènes mais ils agissent également dans la réponse adaptative. En effet, certains TLR sont exprimés par les lymphocytes mais le profil de TLR exprimés et leurs fonctions diffèrent significativement de ce que l'on observe pour l'immunité non-spécifique. Les lymphocytes B expriment principalement les TLR endosomaux, notamment les TLR 7/8 et 9 tandis que les TLR capables de reconnaître des composants bactériens sont peu exprimés. Leur activation induit la prolifération des lymphocytes B ainsi que la production d'immunoglobulines (Kato *et al.*, 2013), ce qui a soulevé l'intérêt des ligands de TLR en tant qu'adjuvant de vaccins. Les TLR exprimés par les lymphocytes T, principalement TLR 3, 1/2, 5 et 7/8, ont un effet co-stimulateur sur l'activation des lymphocytes T en favorisant la prolifération de certaines sous-populations (Basu *et al.*, 2004) et la production de cytokines (IFN γ) (Kabelitz, 2007; Oberg *et al.*, 2011).

Les TLR ont donc plutôt une fonction co-stimulatrice et régulatrice dans la mise en place de l'immunité adaptative tandis que leur rôle est clairement initiateur de réponse immune concernant les cellules de l'immunité innée.

Les cellules dendritiques, à l'interface directe entre immunité innée et adaptative, sont également équipées de TLR lorsqu'elles sont immatures. La présence de TLR leur permet de réagir plus rapidement lors d'une infection virale : une fois activées, elles migrent vers un ganglion via les vaisseaux lymphatiques pour y présenter l'antigène précocement détecté (Abbal *et al.*, 2013). Elles arborent alors des récepteurs membranaires différents, spécifiques de la présentation d'antigènes (molécules HLA de type I et II, molécules de co-stimulation),

la réponse adaptative induite est ainsi orientée vers l'une ou l'autre voie, cf figure 10 (Takeda *et al.*, 2005).

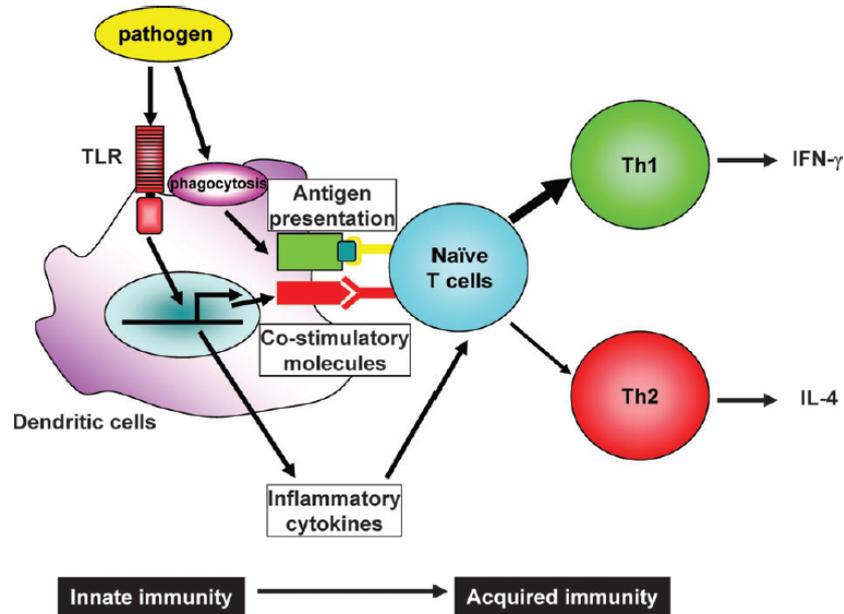


Figure 10 : Rôle des TLR dans l'interface entre l'immunité innée et acquise (Takeda & Akira, 2005).

La bonne santé d'un individu dépend d'une réponse immunitaire parfaitement contrôlée et adaptée. Il ne s'agit pas d'avoir une réponse immunitaire exacerbée face à n'importe quel micro-organisme, comme c'est le cas pour les allergies, ni une réponse immune trop faible qui mènerait à des infections. Cependant le juste équilibre est un état fragile, qui peut être perturbé par de nombreux facteurs, qu'ils soient propres à l'individu (état physiologique, âge, hormones, etc) ou environnementaux (saison, alimentation, activité, etc). Dans le chapitre suivant, nous développerons les conséquences de l'effort et de l'entraînement sur l'immunité, en insistant particulièrement sur les fonctions de la réponse immunitaire innée.

2 IMMUNITE INNEE, EXERCICE ET ENTRAINEMENT :

2.1 Etudes sur l'Homme :

2.1.1 Données épidémiologiques :

Tout comme chez l'athlète équin, les problèmes respiratoires sont également très fréquents chez l'athlète humain. En effet, durant l'entraînement ou les compétitions, les sportifs de haut niveau sont confrontés à des sessions d'effort répétés qui impliquent une ventilation pulmonaire intense dans des conditions environnementales parfois défavorables au système pulmonaire, comme c'est le cas notamment pour les nageurs. Les résultats d'un questionnaire portant sur la santé des athlètes rapportent une prévalence de troubles respiratoires fréquents chez environ un quart des 700 athlètes interrogés. Les symptômes les plus souvent présentés sont un essoufflement, des sécrétions et une respiration « sifflante » (Hull *et al.*, 2012). De la toux est aussi rapportée, apparaissant plus fréquemment en post-effort. Chez les skieurs de fond, la prévalence de toux atteindrait jusqu'à 86% des athlètes (Kippelen *et al.*, 2012).

Les infections du tractus respiratoire touchent principalement les voies respiratoires supérieures (en anglais « Upper Respiratory Tract Infection », URTI) et occasionnellement les voies profondes (pneumonies bactériennes). Elles apparaissent de façon aiguë surtout lors des périodes d'entraînement intensif dans les sports d'endurance notamment (Hull *et al.*, 2012). Les athlètes présentent des signes d'URTI en moyenne 2 à 5 fois par an (Lin *et al.*, 2010), le risque est accru par des contacts inter-athlètes répétés (sports d'équipe, rassemblements sportifs). Les causes infectieuses sont le plus souvent dues à des virus (principalement rhinovirus, influenza, réactivation du virus Epstein Barr, herpes virus). Seules 5% des URTI sont d'origine bactérienne. La recherche de l'agent pathogène est infructueuse dans 70% des cas (Kippelen *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2010; Walsh *et al.*, 2011), suggérant des causes d'URTI non-infectieuses, parmi lesquelles on retrouve les inflammations aseptiques et les allergies, avec une prévalence supérieure chez les athlètes d'environ 40% par rapport à des non-sportifs (Hull *et al.*, 2012).

Parmi les troubles respiratoires chroniques, le problème majeur chez l'athlète est la bronchoconstriction induite par l'exercice, également appelé asthme induit par l'exercice avec une prévalence plus élevée chez les sportifs (50 à 70%) que dans la population générale (environ 10%), surtout chez les nageurs et les athlètes s'entraînant par temps froid (sports d'hiver) (Hull *et al.*, 2012; Kippelen *et al.*, 2012; Parsons *et al.*, 2005). La prévalence d'asthme induite par l'effort serait une conséquence d'entraînements d'endurance intensifs (efforts intenses prolongés) (Fitch *et al.*, 2008). Les conditions environnementales jouent un rôle important, tout comme chez les chevaux (présence d'allergènes, air froid, polluants). Les particules inhalées en plus grande quantité et plus profondément irritent les voies respiratoires, modifient les fonctions et la réactivité pulmonaires, préparant le terrain pour le développement d'une inflammation chronique. De plus, la ventilation importante et prolongée induite par l'effort entraîne une déshydratation des voies respiratoires, celle-ci est associée à la libération de médiateurs de l'inflammation et à des remodelages de l'épithélium, propice au développement progressif d'atteintes chroniques telles que l'asthme (Kippelen *et al.*, 2012).

2.1.2 Données expérimentales :

a) Exercice ponctuel :

La réalisation d'un exercice aigu ou d'un test d'effort est la méthode de choix pour évaluer l'impact de l'exercice ponctuel sur les paramètres immunitaires. De nombreux facteurs doivent être pris en compte dans la réalisation du test et des précautions doivent être prises quand on compare les résultats de différentes études : intensité, durée, type d'exercice, population testée, conditions du test, etc. Globalement, de nombreuses fonctions immunitaires sont modifiées après un effort intensif, touchant principalement l'immunité innée (Burrell *et al.*, 1996; Horohov, 2008; Mackinnon, 2000; Walsh *et al.*, 2011) :

- **Les neutrophiles :** Le nombre de neutrophiles augmente rapidement avec l'effort (quelques minutes), il est suivi d'une nouvelle augmentation quelques heures post-effort, dont l'amplitude varie avec l'intensité et la durée de l'exercice. Les phénomènes de dégranulation, phagocytose et la réponse oxydative des neutrophiles non stimulés sont augmentés par l'exercice mais leur capacité à répondre à des

stimuli exogènes est diminuée, l'hypothèse étant que les neutrophiles nouvellement recrutés ne seraient pas suffisamment matures.

- **Les monocytes/macrophages** : l'exercice ponctuel induit une augmentation transitoire du nombre de monocytes (\approx 2h) à partir des pools marginaux vers la circulation. Le phénotype des monocytes est modifié, d'un profil CD14+/CD16- au profit du CD14+/CD16+, phénotype pro-inflammatoire, plus mature (Walsh *et al.*, 2011). Leurs protéines de surface sont également modifiées, avec une diminution de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH-II) et des TLR 1, 2 et 4 (Lancaster *et al.*, 2005). L'exercice diminuerait également la réponse des monocytes aux ligands de TLR (diminution de la sécrétion d'Il-6, Il-1 et TNF α). La diminution de l'expression des récepteurs (Gleeson *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2011) serait probablement en cause. Les effets sur les macrophages sont extrapolés des études sur la souris, chez lesquelles on observe un effet stimulant de l'exercice modéré et intensif sur la phagocytose des macrophages, la production de radicaux libres et le chimiotactisme. En revanche, l'exercice prolongé induirait une diminution d'expression des molécules du CMH-II ainsi qu'une sensibilité accrue des macrophages alvéolaires face aux infections virales (Kohut *et al.*, 1998a; Kohut *et al.*, 1998b).
- **Les cellules Natural Killer (NK)** : les principales études constatent une mobilisation rapide dans la circulation en réponse à l'effort ponctuel mais une diminution lors d'un effort intensif prolongé (remarginalisation possible vers les tissus). Leur fonction cytotoxique est dépendante de la durée et de l'intensité de l'effort : augmentation de 50 à 100% après un exercice modéré ou intensif ponctuel (probablement due à l'augmentation transitoire du nombre de NK sanguins) tandis que leur activité est déprimée plusieurs heures lorsque l'exercice s'intensifie et se prolonge, période de susceptibilité accrue aux infections virales notamment (Walsh *et al.*, 2011).
- **Les cellules dendritiques** : il existe très peu d'études sur le sujet mais il semblerait que le nombre de cellules augmente avec l'effort (Walsh *et al.*, 2011). On ne retrouve pas d'information de l'impact sur leur fonction.

- **La production de cytokines :** augmentation des concentrations plasmatiques de cytokines pro et anti-inflammatoires (TNF α , Il-1 β , Il-6, Il-10, etc). Une étude comparative a ainsi révélé des perturbations de la régulation anti-inflammatoire post-effort médiée par Il-6 (myokine produite par le muscle en activité, rôle dans le métabolisme des lipides et glucides) chez les coureurs souffrant fréquemment de symptômes respiratoires par rapport à des coureurs sains. Il semblerait d'ailleurs exister une prédisposition génétique à la surexpression d'Il-6 chez les athlètes enclins aux affections respiratoires (Walsh *et al.*, 2011). Une diminution de la production de cytokines *ex vivo* en réponse à des endotoxines a également été observée. Une étude menée chez la souris rapporte une production plus élevée d'IFN β par des macrophages alvéolaires infectés par des virus après un effort intensif. Cet effet est corrélé à l'augmentation de la réplication virale dans les cellules et reflète une résistance antivirale des macrophages alvéolaires diminuée par l'effort intensif (Kohut *et al.*, 1998b).
- **Les lymphocytes :** une lymphocytose est observée pendant et immédiatement après l'effort, suivi d'une chute du nombre de lymphocytes (cellules Th1 principalement) pendant la période de récupération, proportionnelle à la durée et l'intensité de l'effort. Cependant, l'activité des cellules T est stimulée suite à l'effort (Walsh *et al.*, 2011).
- **Les immunoglobulines :** l'effet de l'effort sur les concentrations salivaires d'IgA (glycoprotéines mucosales sécrétées par les cellules B, importantes dans les défenses respiratoires précoces contre les virus) est influencé par le type, la durée et l'intensité de l'effort, c'est pourquoi les résultats des études divergent. La plupart des auteurs rapportent cependant une diminution transitoire des concentrations salivaires d'IgA après l'effort prolongé modéré ou intensif (Walsh *et al.*, 2011).

Ces modifications peuvent durer de 3 à 72h post-effort, augmentant le risque d'atteintes virale ou bactérienne. On parle d' « open-window » ou fenêtre de susceptibilité pour définir cette sensibilité accrue aux affections après un effort très intense. Ces effets immunosuppresseurs, malgré la susceptibilité aux infections qu'ils induisent, sont rapportés

comme étant une adaptation physiologique à l'effort. La production d'Il-6 inhibe la sécrétion du TNF α , stimule la production de cytokines de type Th2 et parallèlement, la sécrétion de cytokines de type Th1 est inhibée par le cortisol et l'adrénaline sécrétés durant l'effort. La dominance d'une réponse de type Th2 permet ainsi de réduire les réactions inflammatoires aiguës et les dommages tissulaires pouvant résulter de l'effort intensif au niveau des systèmes musculaire et ostéoarticulaire. Ces modifications de l'immunité ne se développent d'ailleurs pas après un effort modéré en dessous de 60% de VO₂ max, moins de 60 min.

Les causes impliquées dans cette immunodépression post-exercice ne sont pas totalement élucidées mais l'origine hormono-dépendante paraît être une cause majeure.

Concernant le compartiment pulmonaire, les études chez l'homme sont focalisées sur les concentrations en IgA salivaires ou dans les voies respiratoires supérieures, probablement due au fait que les affections respiratoires humaines touchent plus rarement les voies respiratoires profondes et que la pratique de LT et de LBA est trop invasive.

Les études récentes sur la bronchoconstriction induite par l'exercice chez l'athlète prônent l'hypothèse d'une up-régulation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires pulmonaires sous l'effet de l'exercice (réactions inflammatoires et allergiques facilitées), ce qui aurait pour conséquence de diminuer le seuil de bronchoconstriction face aux particules inhalées (Kuchar *et al.*, 2013).

b) Entraînement :

Plusieurs études ont rapporté un effet bénéfique de l'exercice régulier sur la diminution de l'inflammation chronique liée à des maladies comme le cancer, les maladies cardiovasculaires, le diabète, etc (Pedersen *et al.*, 2006). Le mécanisme sous-jacent n'est pas entièrement élucidé mais des études mettent en évidence une adaptation des réponses immunitaires comprenant notamment une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires comme TNF α (Beavers *et al.*, 2010) et une augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires comme Il-6, produite par le travail du muscle, Il-1ra et Il-10. La présence d'Il-6 en l'absence de TNF α semble indiquer à l'organisme un besoin accru d'énergie, en relation avec l'effort, ce qui diffère d'un état infectieux où Il-6 et TNF α sont

présents simultanément dans la circulation, reflétant un profil cytokinique différent (cf figure 11 (Walsh *et al.*, 2011)).

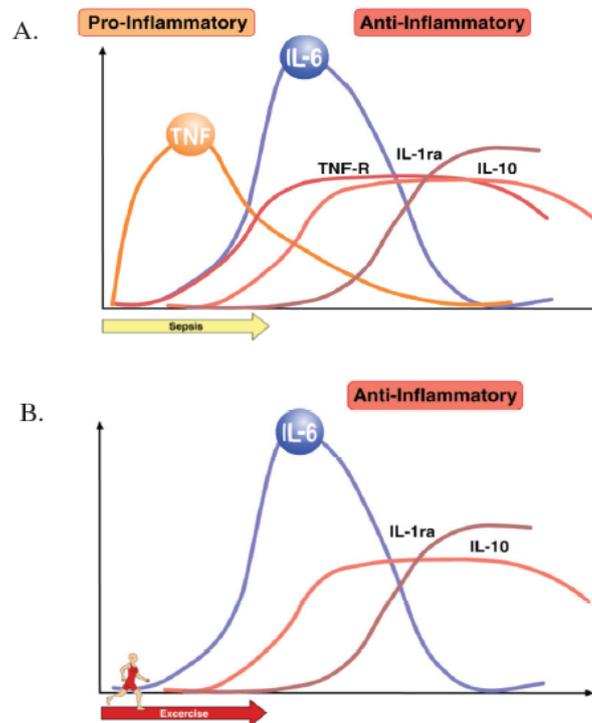


Figure 11 : Comparaison des profils cytokiniques en cas d'infection (A) ou d'exercice (B).

Cependant la pratique d'efforts répétés associée à l'entraînement montre un impact sur les fonctions immunitaires qui est « dose-dépendant ». En effet, la relation entre l'exercice et le risque d'URTI se modélise sous la forme d'une courbe en « J » (cf figure 12), d'après (Nieman, 2000), suggérant une optimisation des fonctions immunitaires associée à l'entraînement modéré qui s'oppose à une diminution des fonctions immunitaires lorsque l'intensité des efforts augmentent (Gleeson, 2007).

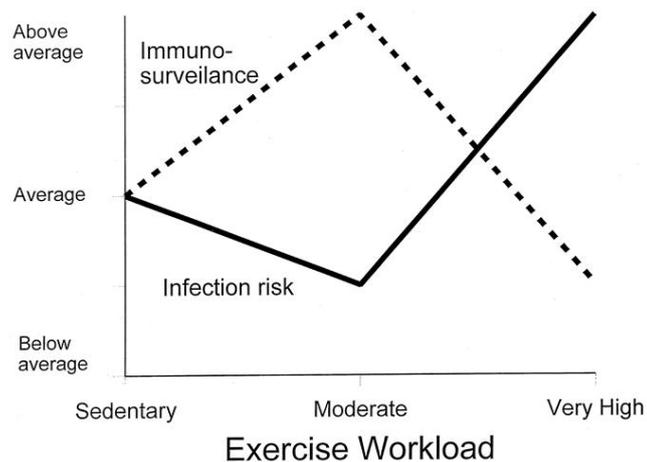


Figure 12 : Relation entre intensité de l'exercice et risque d'infection respiratoire (Nieman, 2000).

De façon plus concrète, il a été rapporté que 2 heures d'exercice modéré par jour diminuaient de 29% le risque d'URTI par rapport à des individus sédentaires (Lin *et al.*, 2010). A l'opposé, le risque d'URTI est augmenté d'environ 40% chez des athlètes soumis à des périodes d'entraînement intensif en vue d'une compétition et plus particulièrement dans les sports d'endurance, et jusqu'à 100-500% dans la semaine suivant une épreuve d'endurance (Gleeson, 2007; Mackinnon, 2000).

Les résultats des études sur les modifications des fonctions immunitaires induites par l'entraînement sont souvent contradictoires. Beaucoup de paramètres, à l'origine de ces divergences, entrent en ligne de compte : durée de l'entraînement, intensité des efforts, type d'effort, individus évalués, etc. C'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser avec précaution les résultats issus de la littérature. Le consensus réalisé en 2011 (Walsh *et al.*, 2011) rapporte les résultats suivants :

- ***Les neutrophiles :*** l'exercice régulier ne semble pas entraîner de modifications du nombre de leucocytes en général (à l'exception de l'over-training). Quelques études rapportent cependant une diminution du nombre de neutrophiles sanguins chez des individus atteints d'inflammations chroniques, appuyant l'hypothèse d'une action anti-inflammatoire de l'exercice régulier. Concernant leur fonction, il semble que l'entraînement intensif atténuerait le métabolisme oxydatif mais les connaissances sur ce sujet sont limitées.

- **Les monocytes/macrophages** : des études longitudinales et transversales rapportent que les monocytes sanguins de personnes faisant de l'exercice régulier présentent une réponse diminuée face au LPS, une diminution de l'expression du TLR 4 et un pourcentage plus faible de monocytes de type « inflammatoires » (CD14+/CD16+) (Flynn *et al.*, 2003; Gleeson *et al.*, 2006; McFarlin *et al.*, 2004). Des études sur la souris montrent que l'exercice régulier modéré serait capable de diminuer l'infiltration des macrophages dans des sites d'inflammation chronique (comme les tumeurs) (Zielinski *et al.*, 2004). Des études sur les macrophages péritonéaux de souris rapportent un effet bénéfique de l'entraînement sur la production de cytokines induite par une stimulation au LPS (Kizaki *et al.*, 2008; Sugiura *et al.*, 2002). De même, l'entraînement modéré régulier apporterait une protection contre des infections intranasales et cet effet serait médié par les macrophages (Murphy *et al.*, 2004).
- **Les cellules NK** : les effets de l'entraînement sur ce type cellulaire sont relativement controversés. L'entraînement modéré semblerait augmenter l'activité cytotoxique des cellules par rapport à des sujets sédentaires, tandis que l'entraînement intensif diminuerait leur nombre et leur activité.
- **Les cellules dendritiques** : les études chez le rat suggèrent une augmentation du nombre et de la fonction des cellules (expression du MCH-II, production d'Il-12) suite à l'entraînement.
- **Les lymphocytes** : au repos, le nombre et la fonction des lymphocytes est similaire que le sujet soit entraîné ou sédentaire. En revanche, lorsque l'entraînement s'intensifie, le nombre de lymphocytes T de type 1, la réponse proliférative et la production d'immunoglobulines par les lymphocytes B sont diminués.
- **Les immunoglobulines** : les études rapportent une augmentation des concentrations et de la sécrétion d'IgA avec l'entraînement modéré, en relation avec la diminution du taux d'URTI associée à l'exercice régulier de faible intensité. Une diminution progressive des concentrations d'IgA salivaires et nasales est constatée au fur et à mesure que l'entraînement s'intensifie.

De même que pour l'effort intensif, l'immunodépression résultant d'un entraînement intensif pourrait être une adaptation physiologique visant à réduire les phénomènes inflammatoires liés à la répétition d'efforts soutenus, altérant ainsi la balance entre cytokines pro et anti-inflammatoires. Il est également envisageable que l'immunodépression chronique lié à l'entraînement intensif puisse résulter de l'accumulation des effets dépressifs d'efforts successifs (pas de récupération complète entre les « open-windows »). Par exemple, la réalisation d'un exercice prolongé répété 3 jours consécutifs entraîne une diminution cumulée des concentrations d'IgA salivaires. Dans le même sens, la répétition d'exercices intensifs à long terme altère la quantité d'hormones sécrétées durant l'effort ainsi que le nombre et la sensibilité des récepteurs hormonaux, influençant par la même les fonctions immunitaires (Gleeson, 2007).

2.2 Etudes sur le cheval :

a) Exercice ponctuel :

Bien que le cheval soit l'une des espèces les plus résistantes à l'effort, les résultats issus de la littérature rapportent une diminution des fonctions immunitaires en relation avec l'intensité de l'exercice. Globalement, les études rapportent les altérations immunes suivantes (Horohov, 2008) :

- ***Le nombre de leucocytes*** : comme chez l'homme, on retrouve une augmentation du nombre de leucocytes, dont l'amplitude est fonction de la durée et de l'intensité de l'effort. On observe une réponse biphasique avec une augmentation rapide du nombre de lymphocytes, neutrophiles et monocytes sanguins suivi d'une diminution rapide du nombre de lymphocytes dès la phase de récupération post-effort. Les modifications dans les proportions leucocytaires peuvent s'expliquer par 3 phénomènes : l'hémoconcentration induite par l'effort, l'augmentation des catécholamines (mobilisation des leucocytes marginaux comme rate, foie, poumons) puis du cortisol (mobilisation des granulocytes de la moelle). Il faut également noter que le type d'effort (intensité et durée) n'influe pas le nombre et les proportions de leucocytes de la même façon (Kingston, 2008).

- **Les neutrophiles** : Les fonctions phagocytaires et l'explosion oxydative des neutrophiles semblent stables ou améliorées après à un exercice modéré (30-40% de VO₂max) tandis qu'elles seraient transitoirement diminuées suite à un exercice sur tapis roulant ou une course d'endurance (Raidal *et al.*, 2000b; Robson *et al.*, 2003), voir figure 13.

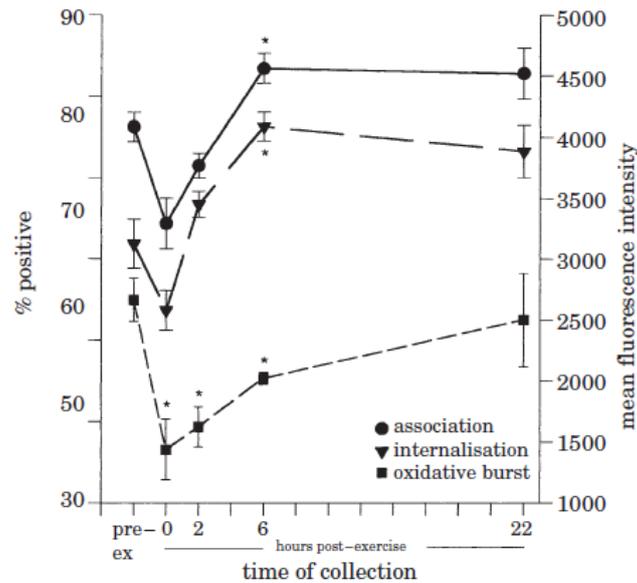


Figure 13 : Phagocytose et activité oxydative des neutrophiles sanguins de chevaux avant et à différents temps suivant la réalisation d'un effort intensif. () signifie une différence significative ($p < 0.05$) entre les prélèvements pré et post-effort (Raidal *et al.*, 2000b).*

- **Les monocytes/macrophages** : comme pour les neutrophiles, la réponse oxydative des monocytes sanguins est diminuée suite à un effort intense et prolongé, tel qu'une course d'endurance. L'effet observé perdure plusieurs jours après la course (Robson *et al.*, 2003). Concernant les macrophages alvéolaires, la phagocytose est diminuée suite à l'effort ponctuel intensif (prélèvements 30 min post-effort) mais uniquement chez des chevaux déjà entraînés, tandis que l'activité oxydative post-effort est augmentée que ce soit chez le cheval entraîné ou non (Raidal *et al.*, 2000a; Wong *et al.*, 1990), voir figures 14 et 15. L'hypothèse des auteurs étant qu'un afflux de globules rouges dans le poumon en post-effort pourrait diminuer les fonctions phagocytaires des macrophages alvéolaires.

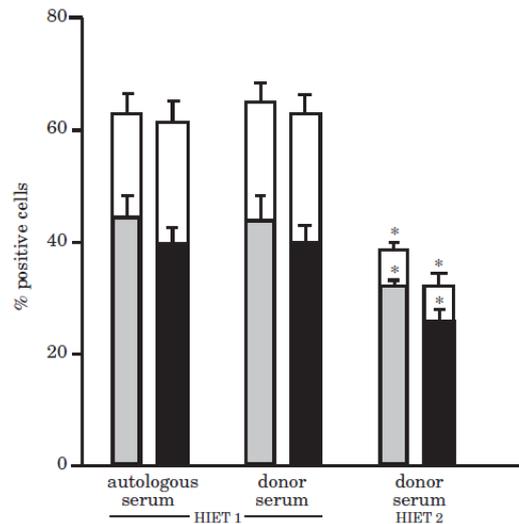
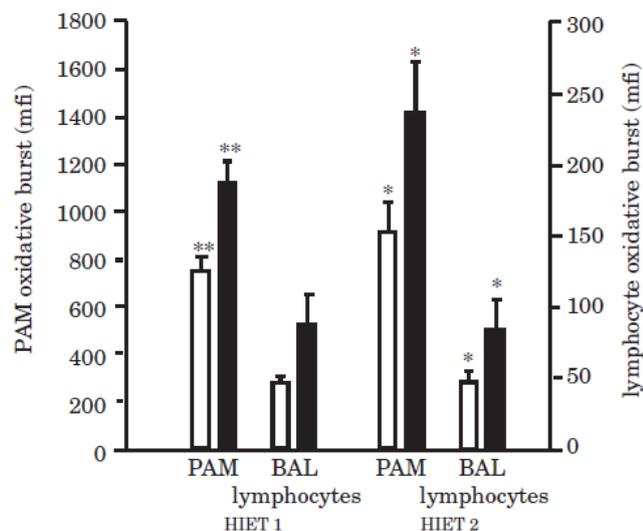


Figure 14 : Phagocytose des macrophages alvéolaires avant et après la réalisation d'un effort intensif par les chevaux avant entraînement (Hiet 1) et après 7 semaines d'entraînement (Hiet 2). () signifie une différence significative ($p < 0.05$) entre les résultats pré et post-effort. Blanc = association, Gris = ingestion pré-effort, Noir = ingestion post-effort (Raidal et al., 2000a).*



*Figure 15 : Explosion oxydative des macrophages alvéolaires et des lymphocytes pulmonaires prélevés avant et après la réalisation d'un exercice intensif par les chevaux avant l'entraînement (Hiet 1) et après 7 semaines d'entraînement (Hiet 2). * et ** signifient une différence significative ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$) entre les valeurs pré et post-effort. En blanc, les valeurs pré-exercice et en noir, les valeurs post-exercice (Raidal et al., 2000a).*

- ***Les cellules NK et LAK (lymphokine-activated killers cells)*** : l'exercice modéré induit une augmentation de la fonction des cellules NK et des LAK chez l'homme et

le cheval, mais dès que l'exercice s'intensifie, une dépression de leur fonction est observée.

- ***La production de cytokines*** : l'effort diminue la production de certaines cytokines en réponse à des pathogènes. Par exemple, les PBMC (peripheral blood mononuclear cells) produisent moins d'IFN γ en réponse au virus influenza après un effort (Folsom *et al.*, 2001). Dans la même optique, une étude menée au sein du laboratoire (Mignot *et al.*, 2012) sur l'expression des cytokines par les cellules totales du LBA de Pur-Sang a permis de montrer une diminution significative de la production de cytokines post-effort (IFN β , TNF α , IL-6) par les cellules en réponse à des stimulants de TLR comme le LPS et le Poly(I:C), suggérant une susceptibilité accrue aux pathogènes respiratoires durant la période post-effort, figure 16 et 17. L'expression basale des cytokines par les PBMC sanguins ou pulmonaires ne semble en revanche pas être atteinte par les effets modulateurs de l'effort (Ainsworth, 2003; Mignot *et al.*, 2012).

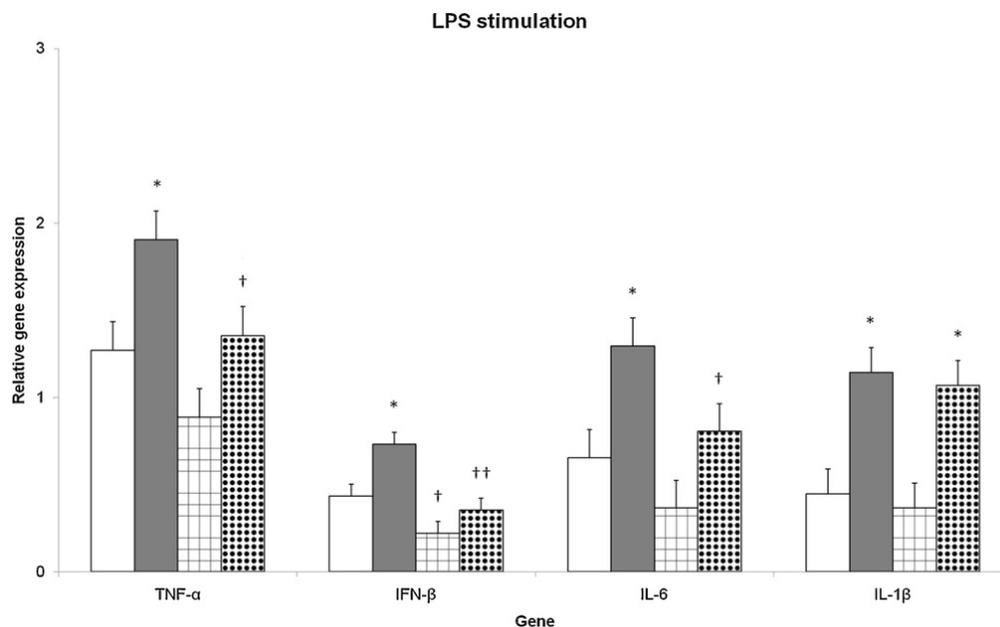
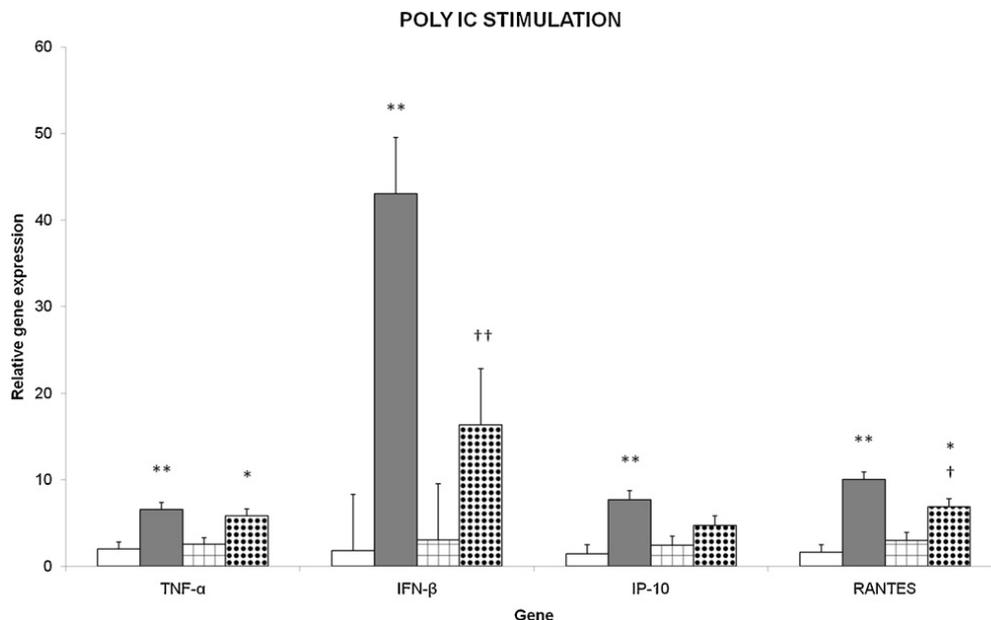


Figure 16 : expression relative des gènes TNF α , IFN β , IL-6 et IL-1 β par les leucocytes pulmonaires stimulés ou non avec du LPS avant et après un effort. Blanc = groupe contrôle pré-exercice, gris = groupe LPS pré-exercice, quadrillé = groupe contrôle post-exercice, noir/blanc = groupe LPS post-exercice. () signifie une différence significative ($p < 0.05$) entre le groupe contrôle et LPS, (†, ††) signifient une différence significative (respectivement $p < 0.05$ et $p < 0.01$) entre les groupes pré et post-exercice (Mignot *et al.*, 2012).*



*Figure 17 : expression relative des gènes TNF α , IFN β , IP-10 (interferon gamma-induced protein 10 kDa) et RANTES (chemokine (c-c motif) ligand 5) par les leucocytes pulmonaires stimulés ou non avec du Poly(I:C) avant et après un effort. Blanc = groupe contrôle pré-exercice, gris = groupe Poly(I:C) pré-exercice, quadrillé = groupe contrôle post-exercice, noir/blanc = groupe Poly(I:C) post-exercice. * et ** signifient une différence significative ($p < 0.05$ et $p < 0.01$ respectivement) entre le groupe contrôle et Poly(I:C). †, †† signifient une différence significative (respectivement $p < 0.05$ et 0.01) entre les groupes pré et post-exercice (Mignot *et al.*, 2012).*

- **Les lymphocytes :** l'exercice intensif tendrait à modifier les populations lymphocytaires avec une diminution des CD4⁺ (Th) et une augmentation des CD8⁺ (T cytotoxiques) (Malinowski *et al.*, 2004). Une étude menée sur des Pur-Sang entraînés décrit une diminution de la prolifération des lymphocytes 12 à 16h après une course (Nesse *et al.*, 2002). De même, une perte de l'efficacité de la vaccination contre influenza et une sensibilité accrue au virus a pu être mise en évidence chez des poneys soumis à un effort par rapport à des poneys au repos (Folsom *et al.*, 2001). La réponse oxydative des lymphocytes pulmonaires est quant à elle augmentée après un effort intensif sur des chevaux entraînés, voir figure 15 (Raidal *et al.*, 2000a).
- **Les immunoglobulines :** une diminution des concentrations sériques d'IgA est observée chez des chevaux non entraînés soumis à des conditions d'entraînement intensif, reflétant une réponse immune « mucoale » réduite (Souza *et al.*, 2010).

Les mécanismes impliqués dans ces modifications sont encore flous. Le mécanisme principal semble être hormono-dépendant : les catécholamines seraient responsables des effets immédiats de l'exercice tandis que le cortisol serait à l'origine des effets à plus long-terme (Horohov, 2008). De nombreux autres médiateurs semblent jouer également un rôle, tels que les β -endorphines (rôle immunosuppresseur), les hormones de croissance, les enképhalines (neurotransmetteur libéré suite à un signal douloureux), etc.

b) Entraînement :

Comparativement aux conséquences de l'effort, il existe relativement peu d'études sur les modifications des fonctions immunitaires en relation avec l'entraînement et les résultats sont parfois divergents. Les études sur le cheval rapportent :

- ***Le nombre des cellules :*** de façon générale, le nombre total de leucocytes et leur proportion ne semblent pas être affectés par l'entraînement de type course ou endurance (Kingston, 2008).
- ***Les neutrophiles :*** lorsque les chevaux sont prélevés au repos, la phagocytose des neutrophiles sanguins est augmentée avec l'entraînement mais chute fortement lors de surentrainement. L'explosion oxydative des neutrophiles et des lymphocytes sanguins atteint un pic d'intensité à la fin de l'entraînement intensif, suivi par une chute brutale au cours du surentrainement (Raidal *et al.*, 2001). Cependant, les auteurs pensent que les modifications observées sur les fonctions cellulaires sont plutôt la conséquence du prolongement de l'entraînement intensif plutôt que l'augmentation de l'intensité chez les chevaux surentrainés car il n'y a pas de différence significative entre le lot surentrainé (augmentations brutales de l'intensité et de la durée des entraînements) et le groupe contrôle, entraîné intensivement (augmentations plus modérées des durée et intensité d'entraînements). Au cours d'une autre étude, les auteurs ont également observé l'effet de l'effort sur les réponses immunitaires en fonction de l'état d'entraînement des chevaux. La phagocytose des neutrophiles sanguins est ainsi significativement réduite chez les chevaux entraînés intensivement pré et post-effort par rapport à des chevaux entraînés de façon plus modérée (Raidal *et al.*, 2000b). La

même tendance est observée pour la réponse oxydative mais la différence n'est pas significative. A l'inverse, une étude menée chez des chevaux de sport rapporte une efficacité optimisée des fonctions neutrophiliques après l'effort modéré (lactate < 3 mmol/L) chez des chevaux entraînés modérément, par rapport à des chevaux non entraînés (Escribano *et al.*, 2005). Les mêmes observations ont été faites chez des Pur-Sang de course après une session d'entraînement de routine (lactate > 4 mmol/L), en revanche, aucune différence n'a été constatée après un tel effort chez l'Arabe d'endurance (Cywinska *et al.*, 2013).

- **Les monocytes/macrophages :** les mêmes auteurs ont observé les conséquences de l'entraînement sur les fonctions des macrophages alvéolaires prélevés sur des chevaux au repos. Les résultats montrent que l'entraînement ne semble pas altérer les capacités phagocytaires des macrophages alvéolaires, voir figure 18 (Raidal *et al.*, 2001). En revanche, leur réponse oxydative est variable avec une tendance similaire à celle observée pour les cellules sanguines (augmentation jusqu'au début du surentraînement puis diminution et restauration du niveau basal avant la fin de la période de surentraînement). A l'opposé, une diminution de la phagocytose et de la production de NO par les macrophages alvéolaires de jeunes chevaux à l'entraînement a été montrée dans une étude plus récente (Michelotto *et al.*, 2010).

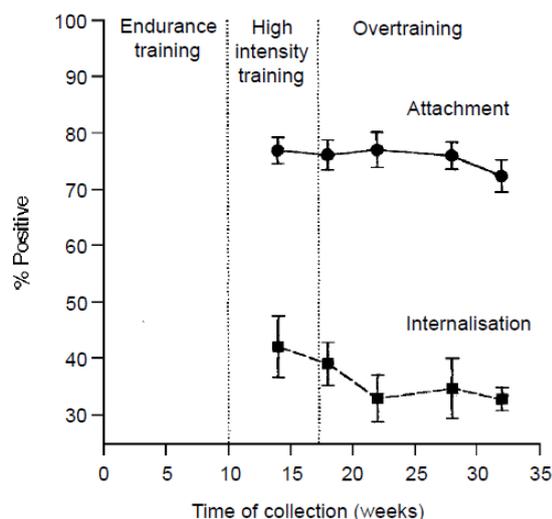


Figure 18 : *Activité de phagocytose (attachement et ingestion) des macrophages alvéolaires prélevés sur des chevaux au repos à différents moments de l'entraînement. L'entraînement n'a pas d'effet significatif sur les capacités d'attachement et d'ingestion de particules par les macrophages alvéolaires (Raidal et al., 2001).*

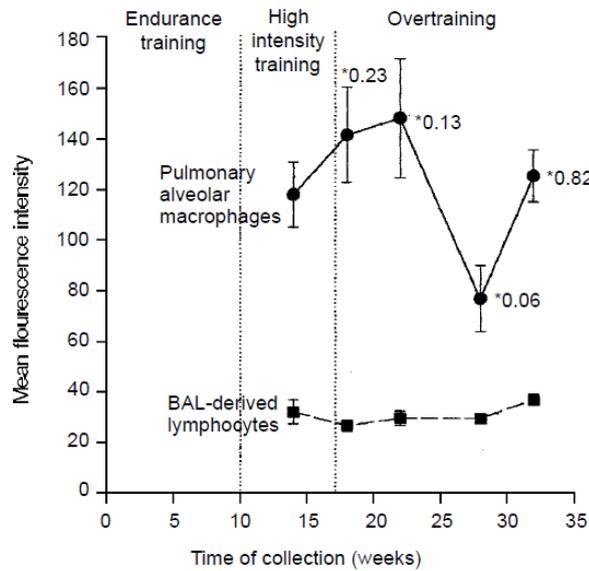
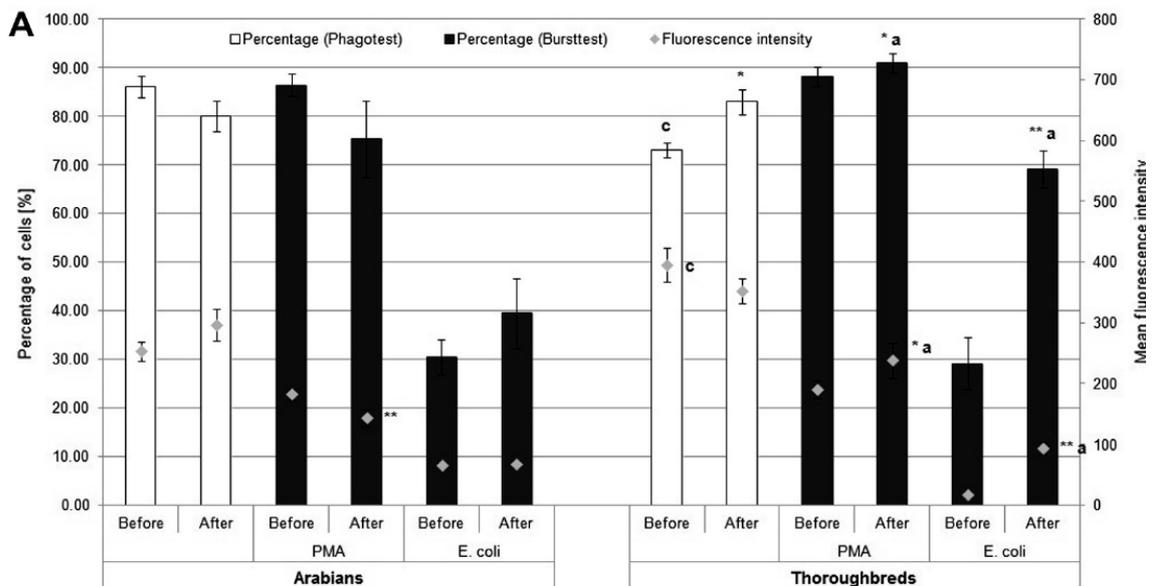


Figure 19 : Réponse oxydative des macrophages alvéolaires et des lymphocytes pulmonaires prélevés sur des chevaux au repos à différents moments de l'entraînement. L'entraînement intensif et le surentraînement ont un effet significatif sur la réponse oxydative des macrophages alvéolaires (représenté par une *) mais pas sur celle des lymphocytes (Raidal *et al.*, 2001).

Concernant les monocytes sanguins, l'entraînement de routine chez le Pur-Sang de course semble augmenter l'activité phagocytaire post-effort tandis qu'elle reste inchangée chez le cheval d'endurance (Cywinska *et al.*, 2013), figure 20.



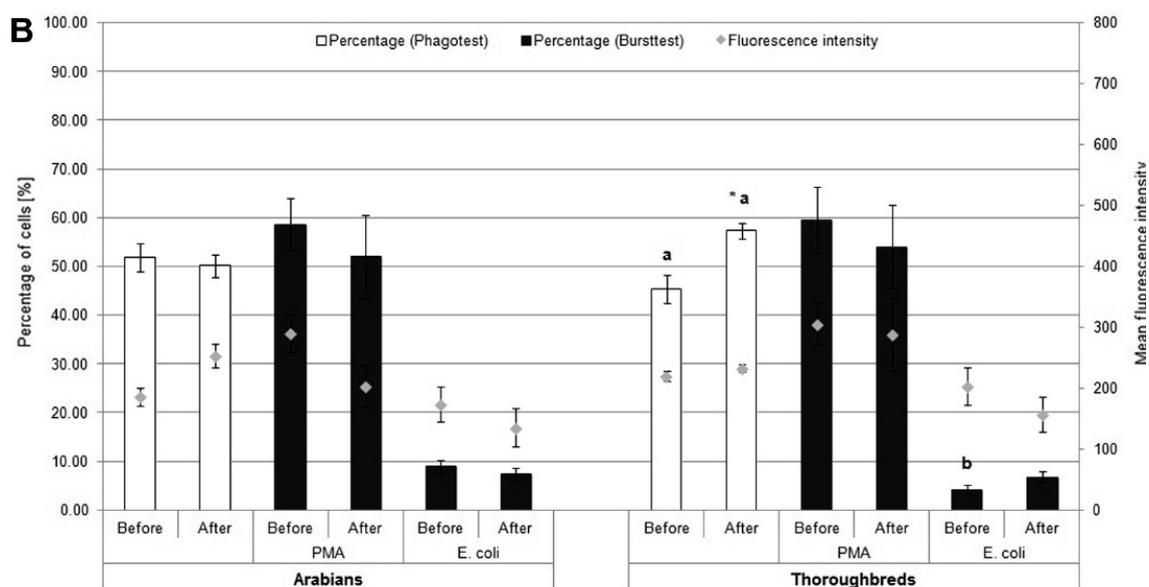


Figure 20 : Phagocytose et réponse oxydative des neutrophiles (A) et des monocytes (B)chez des Pur-sang arabes ou des Pur-sang anglais avant et après une séance d'entraînement. Le PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate) et E.coli ont été utilisés pour les tests d'explosion oxydative. Les différences significatives entre le statut pré et post-effort ont notées * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$ et entre les pur-sang arabe et anglais ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$ et ^c $p < 0.001$ (Cywinska *et al.*, 2013).

- **Les lymphocytes :** une étude concernant l'effet de l'effort combiné à l'état d'entraînement rapporte que l'entraînement type modéré (15-20 min à 50% de VO_2max , 3 fois par semaine pendant 8 semaines) tendrait à diminuer le pourcentage de lymphocytes CD8⁺ (T cytotoxiques) post-effort comparé à des chevaux non entraînés, pour lesquels ils augmentent (Malinowski *et al.*, 2004). Pas d'effet observé sur les pourcentages de CD4⁺, ni sur la lymphoprolifération induite par les mitogènes. La réponse oxydative des lymphocytes pulmonaires est inchangée par l'entraînement (figure 19), tandis que celle des lymphocytes sanguins est améliorée mais se dégrade avec le surentraînement (Raidal *et al.*, 2001).

3 CONCLUSION :

Au terme de cette revue de littérature, il apparait que les macrophages alvéolaires jouent un rôle essentiel dans l'initiation de la réponse immunitaire innée et l'évolution vers

une réponse immunitaire adaptative. Cependant, ce type cellulaire n'a été que peu étudié dans l'espèce équine : les principales études chez le cheval concernent principalement les cellules sanguines au travers des fonctions de phagocytose, d'explosion oxydative. En revanche, les mécanismes de reconnaissance des pathogènes des cellules phagocytaires n'ont pas encore été investigués. C'est pourquoi nos travaux de recherche s'attacheront à explorer ces mécanismes, qui représentent une étape clé dans l'initiation de la réponse immune respiratoire.

La compréhension de ces mécanismes de reconnaissance des pathogènes au travers de l'étude des TLR représente donc un nouvel aspect pour aborder la fonctionnalité des macrophages alvéolaires. Grâce au fait que les TLR aient été étudiés dans d'autres espèces, nous disposons actuellement des outils nécessaires à l'exploration de leur fonctionnement. Plus d'une dizaine de TLR ont été décrits chez les Mammifères mais nous n'en avons ciblé que 4 d'entre eux, ce qui a permis de couvrir les différentes voies d'activation des TLR et d'étudier les différents types de TLR capables de reconnaître des pathogènes variés, susceptibles d'être rencontrés dans le poumon.

Que ce soit chez l'homme ou le cheval, il existe peu d'informations sur la façon dont l'exercice et l'entraînement modifient la réponse immune respiratoire. En dépit du fait que les athlètes humains ou équins souffrent fréquemment d'atteintes du système respiratoire, les études réalisées jusqu'alors dans les deux espèces portent principalement sur le compartiment sanguin et concernent surtout les fonctions cellulaires des monocytes, neutrophiles et cellules NK. Les résultats obtenus sur les monocytes sanguins ne peuvent certainement pas être extrapolés aux macrophages tissulaires en raison d'un phénotype et d'une localisation différents.

Il est enfin bien décrit que le jeune cheval athlète est particulièrement prédisposé aux affections respiratoires infectieuses, telles que les gripes et inflammatoires telles que l'IAD. Cependant, l'étiopathologie de ces maladies reste encore imprécise : il s'avère donc important d'apporter de nouvelles connaissances sur l'immunité innée respiratoire afin de mieux comprendre les modifications précoces induites par les maladies.

C'est pourquoi le but de cette thèse est de contribuer à clarifier les conséquences de l'effort, l'entraînement et l'inflammation sur les fonctions immunes pulmonaires au travers de l'étude des TLR des macrophages alvéolaires et des voies de signalisation qui sont activées par leur stimulation.

OBJECTIFS DE LA THESE

Les objectifs de ce travail de thèse ont été :

1) de mettre au point des outils permettant d'évaluer l'immunité non spécifique pulmonaire du cheval, notamment un modèle de stimulation des TLR des macrophages alvéolaires équins, utilisable dans diverses situations.

2) d'étudier l'impact de l'effort ponctuel et l'entraînement sur les fonctions immunitaires innées pulmonaires. L'hypothèse était que l'exercice intensif ponctuel et l'entraînement auraient un effet dépresseur sur les capacités immunitaires innées des macrophages alvéolaires, à l'origine d'une plus grande sensibilité des chevaux de course aux affections pulmonaires. Pour vérifier cette hypothèse, un suivi longitudinal de la réponse immunitaire innée pulmonaire de huit chevaux soumis à l'effort et l'entraînement, en conditions standardisées, a été réalisé à l'aide du protocole expérimental établi dans la première étape.

3) enfin, d'évaluer, en conditions de terrain, la réponse immune non spécifique pulmonaire de chevaux présentant les symptômes de l'IAD à l'aide du modèle expérimental mis au point dans la première étape. L'hypothèse était que les chevaux de course atteints d'inflammation des petites voies respiratoires présenteraient une réponse immune pulmonaire inadaptée, probablement exagérée face aux agresseurs et donc à l'origine de l'apparition d'une inflammation pulmonaire.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les matériel, méthode et résultats publiés seront repris ici de façon succincte, agrémentés des résultats complémentaires n'ayant pas été publiés. Pour plus de détails, le lecteur est invité à se référer aux articles originaux en partie 8.

1 MISE AU POINT TECHNIQUE DE L'ETUDE (ARTICLE 1) :

Cette étape a fait l'objet d'une publication dans la revue *Veterinary Immunology and Immunopathology* (Waldschmidt *et al.*, 2013). Il s'agit, dans cette première partie, de mettre au point les techniques de laboratoire qui seront utilisées dans la suite de l'étude, c'est-à-dire :

- isoler les macrophages alvéolaires du LBA dans un milieu de survie avec une pureté et une viabilité optimales,
- déterminer l'expression génique des différents TLR dans les macrophages alvéolaires.
- déterminer la meilleure combinaison dose/temps d'incubation des ligands de TLR sélectionnés pour l'étude, en utilisant une technique transcriptomique basée sur la mesure de l'expression de cytokines d'intérêt. Les cytokines sélectionnées pour cette étape sont Il-1 β et TNF α pour la voie Myd88 et IFN β et IFN α pour la voie TRIF.
- mettre au point des techniques de dosages des cytokines directement dans le milieu de culture par ELISA. Deux cytokines seront mesurées, une pour chaque voie de signalisation des TLR : IFN β et TNF α .

1.1 Matériel et méthode :

1.1.1 Chevaux :

Quatre chevaux Trotteurs Français ont été utilisés pour cette partie (5 ± 1 ans, 500 ± 55 kg), à jour de leurs vaccins et régulièrement vermifugés. Ils ont été examinés afin de s'assurer de leur bonne santé (examen clinique, hématologie, endoscopie, cytologie de lavage

broncho-alvéolaire). Ces chevaux étaient hébergés au pré avec un accès à l'eau, nourris à l'herbe et complémentés avec du foin en période hivernale.

1.1.2 Lavages broncho-alvéolaires :

Les LBA ont été réalisés sous contrôle endoscopique, sur les chevaux sédatisés (Romifidine + Butorphanol), à l'aide d'une sonde BIVONA. Deux sites pulmonaires ont été prélevés à l'aide de 300 mL de NaCl préchauffé à 37°C. Le pourcentage de récupération de liquide était supérieur à 80%. Le LBA était homogénéisé dans un flacon puis réparti dans des tubes de 50 mL pour l'isolation des cellules, réalisée à 4°C. Pour chaque LBA, une analyse cytologique était réalisée et les LBA dont les cytologies révélaient la présence de cellules inflammatoires étaient exclus (>5% neutrophiles, >2% mastocytes et/ou >2% éosinophiles).

1.1.3 Isolation des macrophages alvéolaires et culture :

Chaque LBA a été traité de façon indépendante, les cellules pulmonaires ont été isolées dans du milieu de culture en utilisant une technique mise au point précédemment au laboratoire (Mignot *et al.*, 2012). Le nombre de cellules obtenu a été évalué en utilisant une cellule de Thoma et leur viabilité déterminée à l'aide du bleu Trypan. Les cellules pulmonaires ont été réparties à une densité de 2,5 millions de cellules dans des plaques de culture de 6 puits et incubées 3h à 37°C, 5% de CO₂. Après la période d'incubation, les surnageants ont été éliminés et les macrophages adhérents ont été rincés délicatement 3 fois à l'aide de PBS afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Les macrophages alvéolaires ont ensuite été incubés selon différentes conditions dans du milieu de culture.

1.1.4 Détermination des conditions de stimulation des macrophages alvéolaires avec les ligands de TLR :

Trois ligands de TLR ont été utilisés pour stimuler les macrophages alvéolaires : le LPS, lipopolysaccharide bactérien issu d'*Escherichia coli* et ligand du TLR 4, le Poly(I:C), mimétique d'ARN double-brin viraux et ligand du TLR 3 et le FSL-1, lipoprotéine bactérienne synthétique et ligand des TLR 2/6. Pour chaque ligand, différentes doses et différents temps d'incubation ont été testés afin d'évaluer la meilleure combinaison. Cinq

temps d'incubation (1, 3, 6, 12 et 24h) ont été testés pour le Poly(I:C) et deux temps pour le LPS et le FSL-1 (1 et 3h). Quatre doses ont été testés pour le Poly(I:C) (0.1, 1, 10 et 100 µg/mL) et le LPS (1, 10, 100 et 1000 ng/mL) et cinq doses pour le FSL-1 (0.1, 1, 10, 100 et 1000 ng/mL). Pour chaque ligand, une dose et un temps d'incubation ont été sélectionnés pour stimuler les macrophages alvéolaires.

1.1.5 Extraction de l'ARN et transcription inverse :

Après incubation des macrophages alvéolaires, l'ARN total a été extrait à l'aide du kit RNeasy de QIAGEN, selon les recommandations du fabricant. L'ADN contaminant a été éliminé en utilisant un kit spécifique (Turbo DNA-free de Invitrogen). La concentration et la qualité des échantillons ont été déterminés par Nanodrop® ND2000 et les ADN complémentaires (ADNc) ont été générés grâce au kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit de Fermentas. Pour chaque échantillon, 500 ng d'ARN étaient engagés par RT. Pour chaque expérience, des contrôles négatifs étaient réalisés (au minimum un échantillon pour lequel la reverse transcriptase était absente et un échantillon pour lequel de l'eau remplaçait l'ARN).

1.1.6 Analyse de l'expression des gènes par PCR :

Les ADNc ont été quantifiés par PCR en utilisant un mix Sybr Green (Fisher) à l'aide du thermocycleur Applied Biosystem 7900 HT. Un cycle initial de 15 min à 95°C était réalisé pour activer la polymérase, puis 40 cycles étaient appliqués, comprenant chacun : une étape de dénaturation de 15 secondes à 95°C et une phase d'hybridation/extension des amorces de 1 min à 60°C. A la fin des cycles, une phase de dissociation était systématiquement réalisée afin de s'assurer de la présence d'un seul amplicon par PCR. Quatre gènes cibles ont été quantifiés : les gènes du TNF α , IL-1 β , IFN α et IFN β à l'aide d'amorces spécifiques (cf table 1). L'expression relative des gènes a été normalisée via l'utilisation de gènes de référence. Le logiciel Qbase Plus de Biogazelle a été utilisé pour analyser les résultats obtenus. Sept gènes de référence ont été évalués pour leur stabilité : SDHA, HPRT, B2M, GAPDH, TFRC, RPL32 et ACTB (table 1). Les 3 gènes les plus stables, déterminés à l'aide du logiciel GeNorm (Biogazelle), ont été sélectionnés pour normaliser les résultats.

Tableau 2 : Liste et origine des primers utilisés pour l'amplification des gènes de référence et des gènes d'intérêt par PCR.

Abbreviation	Gene name	Sequences F and R (5' to 3')	Amplicon size (bp)	Origin
SDHA	Succinate dehydrogenase complex subunit A	GAGGAATGGTCTGGAATACTG GCCTCTGCTCCATAAATCG	91	(Mignot <i>et al.</i> , 2012)
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	AATTATGGACAGGACTGAACGG ATAATCCAGCAGGTCAGCAAAG	121	(Mignot <i>et al.</i> , 2012)
B2M	Beta-2 microglobulin	CCTGCTCGGGCTACTCTC CATTCTCTGCTGGGTGACG	89	(Mignot <i>et al.</i> , 2012)
TFRC	Transferrin gene	TGGCTACTTGGGCTATTGTAAACG GGTGGTTCTGTCCCTCTATCTCC	90	in silico designed
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	ATCTGACCTGCCGCCTGGAG CGATGCCTGCTTCACCACCTTC	68	in silico designed
RPL32	ribosomal protein L32 gene	GGGAGCAATAAGAAAACGAAGC CTTGAGGAGACATTGTGAGC	140	in silico designed
ACTB	beta actin gene	GGACCTGACGGACTACCTC CACGCACGATTTCCCTCTC	83	in silico designed
IL-1β	Intereukine-1 beta	CTTCCAAGACCTGGACCTCA GCCACAATGATTGACACGAC	108	(Mignot <i>et al.</i> , 2012)
TNFα	Tumor necrosis factor alpha	TGCTCCTCACCCACCCATCA TGCTCTGGGGACTCCGTGTTG	123	(Mignot <i>et al.</i> , 2012)
IFNβ	Interferon beta	CCCGAGGACACAATGAACTT GAAAATACGCCAGGTGTGCT	117	(Mignot <i>et al.</i> , 2012)
IFNα	Interferon alpha	GGCAACACAAGGGTCTTGAT GGGGGAATCCAAAGTCATT	91	in silico designed
TLR1	Toll-like receptor 1 gene	ACTTTGCCACCACAATCTC CCAAAAGCAGCAACAGTGAA	275	(Quintana <i>et al.</i> , 2011)
TLR2	Toll-like receptor 2 gene	ACGGCAGCTGTGAAAAGTCT CCTGAACCAGGAGGACGATA	213	(Quintana <i>et al.</i> , 2011)
TLR3	Toll-like receptor 3 gene	ACCTCCCAGCAAACATAACG CTGGAGGTCCAAAATTTCCA	179	(Quintana <i>et al.</i> , 2011)
TLR4	Toll-like receptor 4 gene	GACGACTCAGGAAAGCCTTG CACAATGCCTGGTATGTTGC	194	(Quintana <i>et al.</i> , 2011)
TLR5	Toll-like receptor 5 gene	TCCATGGAGGGTTGTGATGA CCCCGGAACCTTTGTGACAAT	454	(Kwon <i>et al.</i> , 2010)
TLR6	Toll-like receptor 6 gene	CCTAAAGATATCACCAGCCTGGAA GGCTGATGGGTCCGAAATTA	141	(Gornik <i>et al.</i> , 2011)
TLR7	Toll-like receptor 7 gene	CCTGAGTTTCTTGCCCTCTG AAGCTGGAGTTTTCCCAAT	109	in silico designed
TLR8	Toll-like receptor 8 gene	GGAATCTGACACGGCTTGAT AGAAGGCAGGTGGGAAATCT	272	(Quintana <i>et al.</i> , 2011)
TLR9	Toll-like receptor 9 gene	GTGACTGGCTACCTGGCAAGAC TGGTTATAGAAGTGGCGGTTGTCC	337	(Quintana <i>et al.</i> , 2011)

1.1.7 Expression des TLR dans les macrophages alvéolaires :

L'expression relative des TLR par les macrophages alvéolaires a été évaluée par PCR et comparée à celle obtenue dans les cellules musculaires, considérées comme contrôle négatif en raison du faible taux d'expression des TLR dans le muscle (Zarembler *et al.*, 2002). Les cellules musculaires ont été obtenues par biopsie du *gluteus medius*. Les amorces utilisées pour évaluer l'expression des TLR par PCR sont répertoriées dans le tableau 2.

1.1.8 Dosage des cytokines par ELISA :

Le surnageant de culture des macrophages alvéolaires a été récupéré à différents temps d'incubation (1, 3, 6, 12 et 24h) afin de déterminer le meilleur moment pour doser les cytokines sécrétées dans le milieu de culture. Deux kits commerciaux spécifiques équins ont été utilisés pour doser le TNF α et l'IFN β . La densité optique a été mesurée à 450 nm avec une correction à 540 nm en utilisant un lecteur de plaque et le logiciel Microplate Manager des laboratoires Bio-Rad.

1.1.9 Evaluation de la réponse des lymphocytes aux ligands de TLR :

Les macrophages alvéolaires issus des LBA ont été isolés par adhésion et les lymphocytes pulmonaires ont été triés par cytométrie de flux selon la taille et la granulosité et mis en culture à densité cellulaire identique à celle des macrophages alvéolaires purifiés (1 million de cellules par puit). La réponse des 2 types cellulaires aux ligands de TLR a été évaluée par dosage du TNF α et de l'IFN β par ELISA et comparée afin d'évaluer dans quelle mesure la réponse des lymphocytes pouvait interférer avec celle des macrophages alvéolaires.

1.1.10 Evaluation de l'effet d'un immunodépresseur sur notre modèle expérimental :

Les macrophages alvéolaires ont été mis en culture selon le protocole précédemment décrit. Ils ont subi une étape de pré-incubation avec la dexaméthasone à la dose de 10^{-6} M pendant 4h puis, le milieu de culture a été remplacé par du milieu contenant de la dexaméthasone 10^{-6} M et des ligands de TLR. Les surnageants ont été récupérés après 6h

d'incubation (figure 21). Les macrophages alvéolaires ont donc été en contact avec la dexaméthasone pendant 10h.



Figure 21 : Schématisation du protocole expérimental utilisé pour évaluer l'effet de la dexaméthasone sur l'activité des macrophages alvéolaires ex vivo.

Le choix de la dose de dexaméthasone et du temps d'incubation a été effectué sur base de la littérature en prenant soin de sélectionner une dose suffisamment élevée pour induire une immunosuppression sans induire de mortalité des cellules (Bonin *et al.*, 2013; Mlambo *et al.*, 2003; Urner *et al.*, 2012).

1.1.11 Analyses des données :

Les données issues des PCR et des ELISA ont été représentées sous la forme de moyenne des moindres carrés (least square means, LSmeans) \pm erreur standard (standard error, SE). Le logiciel SAS a été utilisé pour l'analyse statistique des résultats selon un modèle linéaire mixte global. Les différences entre les résultats ont été considérées comme significatives lorsque la valeur de p obtenue était inférieure à 0,05.

1.2 Résultats :

Les résultats sont repris succinctement dans cette partie (se référer à l'article original pour plus de détails) et agrémentés des résultats complémentaires n'ayant pas été publiés.

1.2.1 Isolation des macrophages alvéolaires et culture :

La viabilité des cellules pulmonaires obtenues à partir des LBA était de $85 \pm 5\%$. La pureté des macrophages alvéolaires adhérents après 3h d'incubation était de $75,3 \pm 4\%$. La contamination était principalement due à la présence de lymphocytes ($21,3 \pm 3\%$) et de neutrophiles ($3,4 \pm 2\%$).

1.2.2 Sélection des gènes de référence :

Les valeurs de stabilité des gènes de référence issues du logiciel GeNorm sont détaillées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Stabilité des gènes de référence testés pour normaliser les résultats de PCR. Les résultats ont été obtenus à l'aide du logiciel GeNorm. M représente la valeur de stabilité du gène et CV, le coefficient de variation. Plus les valeurs sont faibles, plus le gène est stable.

Reference target	M value	CV value
RPL32	0.139	0.047
GADPH	0.158	0.065
ACTB	0.179	0.077
B2M	0.287	0.129
HPRT	0.311	0.145
SDHA	0.374	0.216
TFRC	0.394	0.210

M is gene stability value and CV is the coefficient of variation.

RPL32, GAPDH et ACTB ont été sélectionnés comme gènes de référence pour normaliser les résultats de PCR dans la suite de l'étude.

1.2.3 Expression relative des TLR dans les macrophages alvéolaires :

La figure 22 représente l'expression relative des différents TLR par les macrophages alvéolaires en comparaison avec leur expression dans les cellules musculaires.

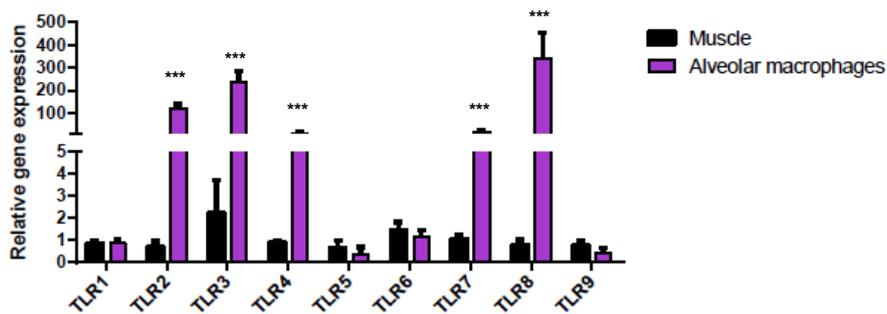


Figure 22 : Expression relative des différents TLR par les macrophages alvéolaires. les différences significatives d'expression entre les macrophages et le muscle (contrôle négatif) sont représentées par ***, soit $p < 0.001$.

Les macrophages alvéolaires expriment de façon significative les TLR 2, 3, 4, 7 et 8 ($p < 0.0001$).

1.2.4 Détermination des conditions de stimulation des macrophages alvéolaires par les ligands de TLR :

Un temps d'incubation et une dose pour chaque ligand ont été sélectionnés pour stimuler les TLR des macrophages alvéolaires. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 4 (se référer à l'article original pour consulter le détail des résultats).

Tableau 4 : Combinaisons temps/dose sélectionnées pour la stimulation des macrophages alvéolaires ex vivo par les ligands de TLR.

TLR ligand	Incubation time (h)	Ligand concentration (ng/mL)
Poly(I:C)	1	1000
FSL-1	3	10
LPS	3	100

1.2.5 Quantification des cytokines par ELISA :

La figure 23 représente la quantification des cytokines IFN β et TNF α par ELISA dans les surnageants de culture prélevés à différents temps d'incubation des macrophages alvéolaires avec les ligands de TLR.

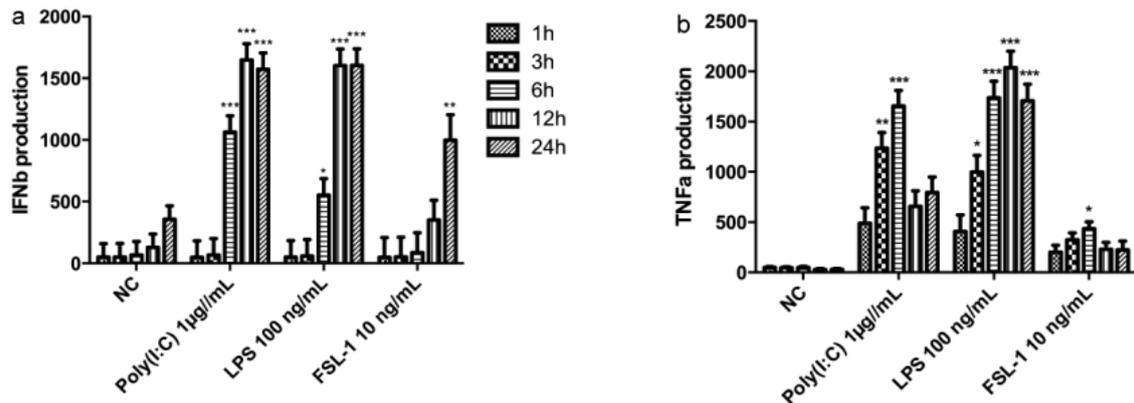


Figure 23 : Quantification des cytokines IFN β et TNF α (en pg/mL) par ELISA dans le surnageant de culture des macrophages alvéolaires, prélevé à 1, 3, 6, 12 et 24 heures d'incubation avec les ligands de TLR. NC = cellules non stimulées. *, **, *** représentent une différence significative (respectivement $p < 0.05$, $p < 0.01$ et $p < 0.001$) de production de cytokines par comparaison au temps 1h.

Les concentrations d'IFN β et de TNF α ne sont pas augmentées dans le surnageant des cellules non stimulées (NC) quel que soit le temps d'incubation. La concentration d'IFN β augmente significativement dans les surnageants à partir de 6h lorsque les macrophages alvéolaires sont stimulés par le Poly(I:C) et le LPS. La production de TNF α augmente significativement à partir de 3h pour le Poly(I:C) et le LPS et à partir de 6h pour le FSL-1. Le temps d'incubation de 6h des macrophages alvéolaires avec les ligands de TLR a finalement été sélectionné pour doser les cytokines dans le surnageant.

Remarque : le CpG, mimétique d'ADN bactérien et ligand du TLR 9 a également été testé sur notre modèle expérimental mais les résultats n'ont pas été inclus dans l'article en raison d'une réponse atypique. La dose de 2,5 μ g/mL a été utilisée pour stimuler les macrophages alvéolaires. Les résultats seront décrits dans la deuxième partie de l'étude.

1.2.6 Evaluation de la réponse des lymphocytes aux ligands de TLR :

La pureté des macrophages alvéolaires obtenus par adhésion était de $75 \pm 3\%$ et la pureté des lymphocytes obtenus par cytométrie de flux était de $94 \pm 3\%$. La figure 24 représente la production d'IFN β et de TNF α par les macrophages alvéolaires et les lymphocytes stimulés par les ligands de TLR.

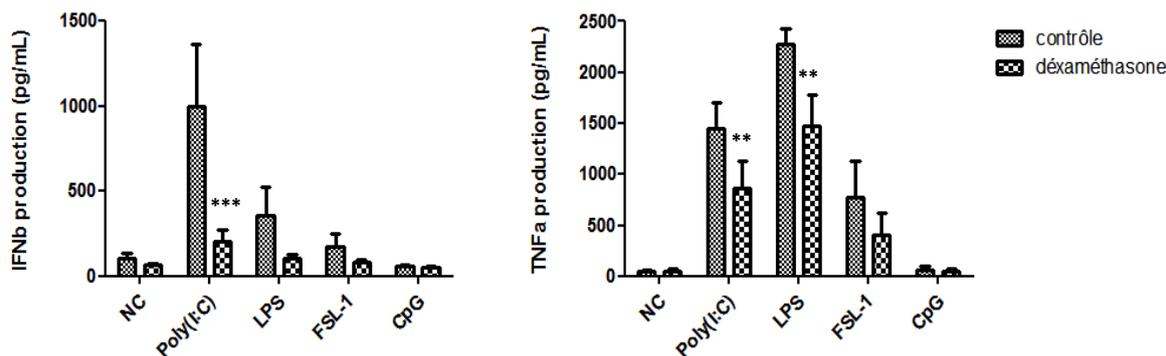


*Figure 24 : Quantification des cytokines IFN β et TNF α dans le surnageant de culture des macrophages alvéolaires et des lymphocytes pulmonaires stimulés par les ligands de TLR. NC = cellules non stimulées. ** et *** représentent une différence significative ($p < 0.01$ et $p < 0.001$ respectivement) entre les cellules stimulées et leur contrôle non stimulé.*

Les résultats indiquent que les lymphocytes stimulés par les ligands de TLR ne sécrètent pas de cytokines dans le surnageant de culture, contrairement aux macrophages alvéolaires.

1.2.7 Evaluation du modèle en situation d'immunodépression :

La figure 25 représente l'effet de la dexaméthasone sur la production de cytokines induite par la stimulation des macrophages alvéolaires.



*Figure 25 : Evaluation de l'effet immunosuppresseur de la dexaméthasone sur la production de cytokines IFN β et TNF α par les macrophages alvéolaires stimulés par les ligands de TLR ex vivo. NC = cellules non stimulées. ** et *** représentent une différence significative ($p < 0.01$ et $p < 0.001$ respectivement) entre les cellules non traitées et les cellules traitées avec la dexaméthasone.*

En présence de dexaméthasone, on observe une diminution significative de la production de TNF α ($p < 0.0121$) et d'IFN β ($p < 0.0017$) par les cellules stimulées avec les ligands de TLR. L'expression relative des TLR n'a pas été modifiée par le traitement avec la dexaméthasone (données non représentées). Notre modèle expérimental nous permet donc de mettre en évidence des modifications de la réponse immunitaire des cellules face à des pathogènes.

1.3 Discussion :

Dans cette première étape, il s'agissait de mettre au point les méthodes qui seraient utilisées dans la suite de l'étude.

Chez le cheval, les techniques employées pour investiguer l'immunité innée pulmonaire sont restreintes et concernent surtout l'évaluation des fonctions cellulaires comme la phagocytose ou la réponse oxydative (Raidal *et al.*, 1998a; Raidal *et al.*, 2000a; Raidal *et al.*, 2001). La quantification des acteurs moléculaires par PCR est également utilisée et s'intéresse principalement aux cytokines sécrétées par les lymphocytes, afin de distinguer une dominance Th1 ou Th2 (Ainsworth, 2003; Hughes *et al.*, 2011; Lavoie *et al.*, 2011; Lavoie *et al.*, 2001).

L'évaluation de la réponse des cellules face à des mimétiques bactériens comme les ligands de TLR est relativement novatrice, elle présente l'avantage de pouvoir investiguer l'étape fondamentale de l'initiation de la réponse immunitaire : la reconnaissance de l'agent

pathogène. C'est en effet de cette étape que découle toute la cascade d'évènements impliqués dans l'établissement de la réponse immune. Toute anomalie dans la reconnaissance du pathogène qu'elle soit exacerbée ou, au contraire insuffisante, aura des répercussions sur l'ensemble de la réponse immune sous-jacente. Chez le cheval, cette méthode a été utilisée sur les monocytes sanguins (Figueiredo *et al.*, 2009b) afin de caractériser la réponse cytokinique des monocytes induite par les ligands de TLR. Dans le poumon, l'évaluation de la réponse des TLR a été utilisée indirectement puisque ce sont surtout des challenges au TLR ou aux allergènes qui ont été employés, dans le but d'observer des altérations de réponses chez des chevaux RAO (Reyner *et al.*, 2009) ou d'évaluer l'effet du clenbutérol (Hoven *et al.*, 2004; Laan *et al.*, 2005). Une étude préliminaire au sein du laboratoire, ayant conduit à la publication d'un article (Mignot *et al.*, 2012), a permis d'explorer avec succès la réponse des cellules totales du LBA stimulées par des ligands de TLR chez des chevaux avant et après un effort. Il s'agissait alors d'affiner cette méthode afin de mettre au point une technique d'investigation de l'immunité innée pulmonaire fiable et utilisable dans de nombreuses conditions physiologiques et/ou pathologiques.

1.3.1 Isolation des macrophages alvéolaires et culture :

Dans le poumon, les macrophages alvéolaires sont les premières cellules phagocytaires à entrer en contact avec le pathogène, ce sont donc elles qui seront à l'origine de la réponse immune sous-jacente via la sécrétion de cytokines spécifiques et la présentation de l'antigène aux cellules de l'immunité acquise. Il est important d'observer la réponse de ces macrophages alvéolaires purifiés, isolés des autres cellules du LBA. Plusieurs raisons à ce choix :

- les résultats observés seront spécifiques à un type cellulaire bien identifié et non à un pool de cellules variable d'un cheval à un autre.
- s'affranchir des interférences pouvant être causées par les autres cellules, et notamment les cellules de l'immunité acquise.

- s'affranchir des variations inter et intra-individuelles dans les cytologies des LBA. L'intérêt est d'autant plus grand lorsqu'il s'agit d'étudier des chevaux présentant une inflammation, où les pourcentages et les populations cellulaires sont très variables et peuvent interférer avec la réponse des macrophages.

Dans la littérature, plusieurs auteurs ont déjà isolé des macrophages alvéolaires et différentes techniques ont été utilisées. Pour étudier les fonctions oxydatives et la phagocytose des macrophages alvéolaires, la cytométrie de flux et la colorimétrie font partie des techniques de choix (Muehlmann *et al.*, 2012; Raidal *et al.*, 1998a; Raidal *et al.*, 1998b). La colorimétrie consiste en l'ingestion par les cellules de particules colorées, le nombre de cellules positives est alors quantifié par mesure de l'absorbance. La cytométrie de flux (ou FACS, Fluorescent Activated Cell Sorting) présente l'avantage de trier et quantifier les cellules directement, en fonction de plusieurs paramètres (taille, fluorescence, etc) sans avoir à les séparer avant l'analyse. Cependant, elle n'a pas pu être employée dans notre étude en raison de la grande perte de cellules associée à cette technique. Si on prend l'exemple de l'évaluation de la réponse oxydative des cellules, le principe repose sur l'ajout d'un composé non fluorescent, qui, une fois oxydé par les cellules activées, émettra une fluorescence. La fluorescence, proportionnelle au degré d'activité des cellules est alors quantifiée à l'aide du cytomètre de flux.

Pour étudier la réponse cytokinique des macrophages alvéolaires *ex vivo*, il est cependant nécessaire de cultiver les cellules dans un milieu adapté afin de pouvoir les stimuler. La séparation magnétique des cellules du LBA par MACS (magnetic activated cell sorting) est la technique qui permet d'isoler les cellules avec la plus grande pureté (Ainsworth, 2009; Joubert *et al.*, 2011). La technique est basée sur la sélection des cellules d'intérêt à l'aide d'anticorps couplés à des microbilles magnétiques et isolées par un champ magnétique. Dans notre cas, l'utilisation de cette technique n'a pas été envisageable en raison de la perte cellulaire engendrée et de l'interférence possible des anticorps présents à la surface des cellules avec la fixation des ligands de TLR, notamment l'anticorps contre CD14, qui est un co-récepteur du TLR4.

C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser la technique basée sur les propriétés d'adhérence des macrophages alvéolaires. C'est la méthode la plus utilisée dans la littérature (Jackson *et al.*, 2004; Laan *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2003; Muehlmann *et al.*, 2012), elle est

simple à mettre en place et n'est pas stressante pour les cellules. Son inconvénient majeur reste la contamination de la culture par des types cellulaires indésirables, notamment par des lymphocytes. Bien que quelques auteurs rapportent une pureté de plus de 95%, il nous a été impossible d'obtenir une pureté supérieure à 80% malgré 3h d'incubation et 3 rinçages successifs, notre moyenne se situant à 75,3% \pm 4% avec une contamination à 21% de lymphocytes. C'est un problème spécifique au cheval étant donné que le LBA d'autres espèces ne contient quasiment que des macrophages alvéolaires. Chez l'homme, par exemple, la part de macrophages alvéolaires représente plus de 95% des cellules (Juarez *et al.*, 2010). Même si les lymphocytes ne sont pas connus pour produire les cytokines qui nous intéressent, il a été nécessaire de s'assurer qu'ils n'interféraient pas avec la réponse des macrophages. L'expérience de stimulation des lymphocytes par les ligands de TLR nous a ainsi permis d'écarter cette éventualité. Cependant, il faut noter que même si les lymphocytes ne produisent pas de TNF α ou d'IFN, cela ne prouve pas qu'ils ne soient pas capables d'interagir avec les macrophages alvéolaires en culture et ainsi d'influencer partiellement leur réponse.

1.3.2 Détermination des conditions expérimentales de stimulation des macrophages alvéolaires et par PCR :

La mise au point des conditions de stimulation des macrophages alvéolaires par les ligands de TLR a été réalisée en utilisant la technique de PCR afin d'évaluer la production des cytokines IFN β , IFN α , Il-1 β et TNF α . Ces cytokines ont été sélectionnées car elles sont représentatives des 2 principales voies de signalisation des TLR, Myd88 et TRIF. La PCR est une technique de choix en immunologie pour évaluer l'expression des cytokines chez le cheval, elle est spécifique, très sensible et permet d'analyser l'expression de nombreuses cytokines pour lesquelles des méthodes de quantification directe ne sont pas encore disponibles sur le marché. Elle a été utilisée et validée par de nombreuses équipes de recherche dans le domaine de l'immunologie équine (Allen *et al.*, 2007; Cook *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2009b; Giguère S., 1999; Joubert *et al.*, 2011; Lavoie *et al.*, 2011; Sanchez-Matamoros *et al.*, 2012).

a) Choix des gènes de référence :

De par la grande sensibilité de la technique de PCR, il est nécessaire de choisir une méthode de normalisation spécifique et efficace afin d'éviter la variabilité potentiellement induite par divers facteurs comme la qualité de l'échantillon, le type cellulaire, la technique d'extraction de l'ARN, etc (Huggett *et al.*, 2005). L'utilisation de gènes de référence est la technique de normalisation la plus utilisée. Le choix des gènes de référence n'est pas à prendre à la légère et peut différer en fonction de divers paramètres (espèce, type cellulaire, état physiologique, maladie, etc). La normalisation peut-être optimisée par l'usage de plusieurs gènes de référence (Vandesompele *et al.*, 2002). C'est pourquoi il paraissait indispensable de tester plusieurs gènes afin de détecter les plus stables pour les macrophages alvéolaires dans nos conditions. Cette étude nous ont permis de sélectionner 3 gènes de référence : RPL32, GAPDH et ACTB qui ont été utilisés pour la normalisation de nos résultats de PCR.

Dans la littérature équine, on retrouve une large palette de gènes de référence qui diffèrent selon les types cellulaires et les applications. Par exemple, R18S fait partie des gènes fréquemment utilisés en raison de sa grande stabilité (Allen *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2009a). Il a été exclu de notre étude car, bien que très stable, la différence de Ct (Cycle seuil ou Cycle Threshold) entre nos gènes d'intérêt et R18S était trop importante (surexpression de R18S par rapport à l'ARNm de nos cytokines). Pour avoir une normalisation correcte, il est préférable d'avoir des taux d'expression équivalents entre gènes de référence et d'intérêt (Cappelli *et al.*, 2008). Concernant les cellules pulmonaires, une étude menée chez des chevaux IAD a permis de définir 4 gènes de référence stables : GAPDH, HPRT, SDHA et RPL32 (Beekman *et al.*, 2011), ce qui va dans le sens de nos résultats sur les macrophages alvéolaires. En revanche, dans les PBMC de chevaux d'endurance soumis à l'effort, les gènes de référence les plus stables sont SDHA et HPRT tandis que GAPDH, TFRC et RPL32 sont parmi les moins stables, ce qui est contradictoire avec nos résultats. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette divergence : la différence de type cellulaire, de compartiment anatomique, de technique, de race, etc. D'où l'intérêt de faire une évaluation systématique des gènes de référence en fonction des caractéristiques propres à l'étude.

b) TLR exprimés par les macrophages alvéolaires :

Les macrophages alvéolaires sont les premières cellules à entrer en contact avec des micro-organismes. A ce titre, elles possèdent des TLR qui leur permettent de reconnaître le caractère pathogène de l'intrus. Bien que quelques équipes se soient intéressées à l'expression des TLR chez le cheval (Gornik *et al.*, 2011; Kwon *et al.*, 2010; Schneberger *et al.*, 2009; Singh Suri *et al.*, 2006), elles ne concernent que certains TLR et aucune ne s'est penchée spécifiquement sur les TLR exprimés par les macrophages alvéolaires. Dans notre article, pour des raisons de clarté, nous n'avons inclus que les résultats d'expression pour les TLR d'intérêt. Nous avons montré que les macrophages alvéolaires équins expriment principalement les TLR 2 et 4 qui reconnaissent les motifs bactériens Gram +/-, ainsi que les TLR 3, 7 et 8 responsables de l'immunité antivirale.

L'expression du TLR 4 a déjà été rapportée chez le cheval et concernait la totalité du poumon (Singh Suri *et al.*, 2006). Dans cette même étude, le TLR 4 avait été détecté sur les macrophages de coupes de poumon par immunohistochimie. En revanche l'expression du TLR 2 n'avait pas pu être mise en évidence, contrairement à ce que suggèrent nos résultats. La même équipe a détecté la présence du TLR 9 dans le poumon équin via une méthode similaire. D'après leur étude, il semblerait que les macrophages alvéolaires soient dotés de TLR 9, contrairement à ce que montrent nos résultats. A l'opposé, l'équipe de Zhang rapporte une expression du TLR 9 principalement dans les leucocytes et les tissus riches en leucocytes comme les ganglions lymphatiques, ainsi que des degrés d'expression très faibles dans les autres tissus, incluant le poumon (Zhang *et al.*, 2008). Cette différence entre les 2 articles peut s'expliquer par le fait que, dans son étude, l'équipe de Zhang normalise ses résultats avec l'expression du TLR 9 dans les ganglions lymphatiques, tissus très riches en TLR 9.

Il faut avoir conscience que la technique de PCR utilisée nous permet seulement d'observer des variations de niveau d'expression d'un gène entre 2 types cellulaires partant du principe que les cellules musculaires n'expriment pas les TLR (Zarembek *et al.*, 2002), il s'agit d'une quantification relative et non absolue. De plus, la quantification de l'ARNm d'un gène ne reflète pas forcément la quantité de protéines constitutives ou produites par la suite, contrairement au FACS qui permet de mettre en évidence la protéine directement. Par exemple, un gène peut ne pas être exprimé à un moment t alors que la protéine correspondante peut malgré tout être présente dans la cellule, et inversement, un gène peut

être exprimé sans que la protéine ne soit synthétisée par la suite, du fait des modifications post-transcriptionnelles. Bien que la technique de PCR ne soit pas sans faille, elle nous donne cependant une indication sensible des gènes susceptibles d'être actifs dans nos cellules. Une étude chez l'homme rapporte d'ailleurs cette ambiguïté sur l'expression des TLR par les macrophages alvéolaires et les monocytes (Juarez *et al.*, 2010). Les auteurs montrent une expression des ARNm des TLR 2, 4 et 9 plus faible dans les macrophages alvéolaires par rapport aux monocytes mais, à l'inverse, une expression des protéines TLR 9 plus élevée dans les macrophages alvéolaires que dans les monocytes. Des différences inter et même intra-espèces dans l'expression des TLR ont également été rapportées, c'est notamment le cas pour les TLR 2, 3 et 4 entre l'homme et la souris (Rehli, 2002), d'où la difficulté d'extrapoler des résultats obtenus dans d'autres espèces ou d'autres conditions.

c) Choix des doses et durée d'incubation des ligands avec les cellules :

Dans la littérature équine, les données concernant la stimulation des TLR sont peu nombreuses et les conditions de stimulation, très variables d'une équipe à l'autre. Dans l'étude préliminaire de notre laboratoire sur la stimulation des TLR 3 et 4 (Mignot *et al.*, 2012), les doses utilisées avaient été sélectionnées sur base bibliographique (Figueiredo *et al.*, 2009b). Il s'avérait nécessaire pour notre protocole et utile pour d'autres équipes d'étudier et publier les conditions optimales de stimulation des TLR pour les macrophages alvéolaires équins. Nous nous sommes intéressés ici à la stimulation des TLR 2/6, 3, 4 et 9, la stimulation des TLR 7/8 faisant l'objet du travail de thèse d'une autre doctorante.

Nous avons choisi d'utiliser la technique de PCR car cette méthode est sensible et permet d'analyser simultanément l'expression de plusieurs gènes d'intérêt. Etant donné le nombre de conditions testées (plusieurs doses et temps d'incubation), cette méthode s'avère être la plus économique. Les cytokines que nous avons choisi d'étudier sont représentatives des 2 voies de signalisation, Myd88 et TRIF, résultant de la stimulation des TLR.

Une étude similaire avait été réalisée sur les monocytes équins pour la stimulation des TLR 2/1 (Pam₃CSK₄), 3 (Poly(I :C)) et 4 (FSL-1) (Figueiredo *et al.*, 2009b). Les résultats de cette étude indiquent une stimulation optimale des monocytes avec 100 pg/mL de LPS, soit une dose 1000 fois inférieure à la dose utilisée pour nos macrophages alvéolaires. D'autres études sur les macrophages alvéolaires ou dérivés de monocytes utilisent également des doses

de LPS comprises entre 10 ng et 10 µg/mL (Allen *et al.*, 2007; Laan *et al.*, 2005; Oshikawa *et al.*, 2003). Cette différence de dose efficace peut s'expliquer par une sensibilité supérieure des monocytes sanguins au LPS, ce qui suggère une tolérance des macrophages alvéolaires au LPS. Une « désensibilisation » des TLR 4 pourrait être la conséquence d'une exposition répétée des macrophages avec des composés bactériens dans le poumon, évitant ainsi des réactions inflammatoires exagérées. Une diminution de l'expression du CD14 a d'ailleurs été rapportée dans les macrophages alvéolaires (Laan *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2004), pouvant expliquer en partie ce mécanisme de tolérance aux endotoxines.

L'équipe de Figueiredo rapporte également que la stimulation du TLR 4 des monocytes avec du LPS n'induit pas l'expression de gènes dépendants de la voie TRIF (dont IFNβ), contrairement à d'autres espèces comme l'homme ou la souris, suggérant que le TLR 4 équin utiliserait exclusivement la voie MyD88. Cependant, nos résultats ne vont pas en ce sens puisque la stimulation des macrophages alvéolaires avec du LPS induit l'expression des gènes pro-inflammatoires mais également celle d'IFNβ, ce qui implique une utilisation des 2 voies de signalisation par le TLR 4 équin.

Concernant la stimulation du TLR 3, la dose efficace de Poly(I:C) pour les monocytes sanguins est de 250 µg/mL d'après la même étude (Figueiredo *et al.*, 2009b), soit une dose 250 fois plus élevée que celle utilisée pour stimuler les macrophages alvéolaires dans notre protocole, ce qui suggère une sensibilité des macrophages alvéolaires plus accrue aux virus.

Les divergences observées entre les monocytes sanguins et les macrophages alvéolaires confirment des différences importantes dans les phénotypes et les fonctions des 2 types cellulaires. Bien que les seconds dérivent directement des premiers, la maturation des monocytes en macrophages et la compartimentalisation pulmonaire induisent des remodelages importants qui nous empêchent d'extrapoler des résultats obtenus sur les monocytes sanguins.

Concernant les durées d'incubation, les résultats varient d'une étude à l'autre entre 1h et 24h (Figueiredo *et al.*, 2009a; Laan *et al.*, 2005; Oshikawa *et al.*, 2003). Nous avons favorisé des temps d'incubation courts (1 à 3h) afin d'être sûrs d'observer la première vague de transcription induite par les ligands et non des réponses secondaires.

Remarque sur le CpG : le CpG, ligand du TLR 9 a également été testé sur notre modèle expérimental en raison de capacités immunomodulatrices observées par d'autres équipes dans le compartiment pulmonaire (Klier *et al.*, 2012). Les résultats obtenus n'ont pas été inclus dans l'article en raison de la sous-expression du TLR 9 dans les macrophages alvéolaires et d'une réponse atypique des cellules stimulées au CpG. L'effet de ce ligand sera développé dans la discussion sur l'effet de l'entraînement (étude expérimentale n°2). La dose de CpG utilisée pour stimuler les cellules était de 2.5 µg/mL.

1.3.3 Dosage des cytokines dans le milieu de culture par ELISA :

La technique de PCR, bien qu'elle présente l'avantage d'être une méthode sensible et accessible pour l'espèce équine, reste une technique de quantification indirecte et relative, elle ne permet donc pas de présager de la quantité de cytokines réellement sécrétées dans le milieu extracellulaire. Il existe en effet des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle capables de contrôler la traduction des ARNm en protéines ainsi qu'un système de stockage de certaines cytokines dans des vésicules intracellulaires. C'est pourquoi le développement d'une technique de quantification directe des cytokines dans le milieu extracellulaire s'avérait nécessaire afin d'avoir une idée plus précise des quantités de cytokines qui pourraient être sécrétées dans le fluide pulmonaire en réponse à une agression. Des « bioassay » ou des marquages intracellulaires ont déjà été utilisés chez le cheval pour doser directement TNF α , Il-6 ou Il-1 β (Giguere *et al.*, 2002; Hansen *et al.*, 2013; Laan *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2003) mais le protocole est relativement lourd. Le dosage par ELISA a l'avantage d'être une technique facile à mettre en place et qui permet d'analyser plusieurs échantillons simultanément. Mais il existe peu de kits spécifiques équins disponibles sur le marché et leur coût reste relativement élevé. C'est pourquoi notre choix s'est limité à l'étude de 2 cytokines représentant les 2 voies de signalisation des TLR : IFN β pour la voie TRIF-dépendante et TNF α pour la voie MyD88-dépendante. Le kit pour la détection de TNF α a d'ailleurs déjà été utilisée chez le cheval (Schwab *et al.*, 2013).

Le temps de stimulation optimal des TLR par les ligands a été évalué pour la détection du TNF α et d'IFN β via les kits commerciaux. Il s'agissait de pouvoir détecter suffisamment de cytokines sans arriver à la saturation du milieu qui aurait pour conséquence de masquer les éventuelles variations lors des études suivantes. Plusieurs durées d'incubation ont été testées

et une incubation de 6 heures a été sélectionnée pour doser les 2 cytokines dans le surnageant de culture.

1.3.4 Evaluation du modèle en condition immunosuppressive :

Le modèle expérimental précédemment mis au point permet une étude de la stimulation des TLR de macrophages alvéolaires *ex vivo* par leur ligand spécifique. Afin de s'assurer que notre modèle nous permettrait de mettre en évidence des modifications de l'immunité innée, nous avons testé l'effet d'un immunosuppresseur, la dexaméthasone, sur la réponse des macrophages alvéolaires stimulés par les ligands de TLR *ex vivo*.

La dexaméthasone est un glucocorticoïde synthétique ayant de puissantes actions anti-inflammatoires et immunosuppressives selon la dose utilisée. Elle est 6 à 12 fois plus puissante que la prednisolone (Leclere *et al.*, 2010). La dexaméthasone agit via les récepteurs aux glucocorticoïdes, elle induit la synthèse de protéines anti-inflammatoires et inhibe la transcription des gènes pro-inflammatoires, notamment IL-1, IL-2, IL-6 et TNF α par les macrophages. Les effets des glucocorticoïdes sont très rapides et peuvent être expliqués en partie par la modification directe des membranes (cytoplasmique et mitochondriale) des cellules immunitaires, altérant ainsi leurs fonctions (synthèse de cytokines, migration, phagocytose, etc), les modifications transcriptomiques intervenant plus tardivement (Stahn, Lowenberg, Hommes, & Buttgerit, 2007). La dexaméthasone peut être utilisée chez le cheval souffrant d'inflammations respiratoires, sous différentes formulations comme dont la nébulisation (malgré l'absence d'Autorisation de Mise sur le Marché sous cette formulation) (Sherck, 2010).

Chez le cheval, une étude menée sur les PBMC a révélé une réversion de l'effet du LPS sur l'induction de l'expression de MD-2 et CD14 après exposition des cellules à la dexaméthasone 10^{-7} M pendant 90 min (Bonin *et al.*, 2013). Dans notre cas, la dexaméthasone a induit une diminution de la production de cytokines par les macrophages alvéolaires, sans induire de diminution de l'expression des TLR, confirmant ainsi la fiabilité de notre modèle dans la détection de variations de la réponse des macrophages alvéolaires.

1.3.5 Difficultés rencontrées et points à améliorer :

La mise au point de l'étude a été à l'origine de nombreuses difficultés techniques. Parmi les principaux obstacles, on peut citer :

- La difficulté d'avoir suffisamment de macrophages alvéolaires pour toutes nos conditions. Un LBA obtenu à partir de 4 sites pulmonaires différents a été nécessaire. De plus, le nombre de cellules récolté varie beaucoup d'un cheval à un autre (de 42 à 195 millions de cellules par LBA), avec certains chevaux pour lesquels il était difficile d'obtenir assez de cellules pulmonaires (60 millions de cellules nécessaires pour pouvoir dupliquer les données).
- La pureté de nos macrophages n'est pas optimale, une étude complémentaire pour évaluer la réponse des lymphocytes contaminants s'est avérée nécessaire. Si ce protocole devait être utilisé pour observer des marqueurs autres que $TNF\alpha$ et $IFN\beta$, il serait nécessaire d'évaluer à nouveau l'interférence de la réponse des lymphocytes avec celle réponse des macrophages.
- L'extraction de l'ARN : cette étape a posé des difficultés en raison du nombre limité de macrophages pour chaque condition. La quantité d'ARN purifié, bien que de bonne qualité, était très juste (parfois moins de 100 ng/ μ L) pour pouvoir étudier l'ensemble des gènes d'intérêt par PCR (notre seuil était de 500 ng d'ARN engagé par RT). La méthode a dû être optimisée pour obtenir une quantité suffisante d'ARN (nombre de cellules par puit, choix du kit).
- La détection des TLR exprimés par les macrophages nécessiterait également des investigations complémentaires afin de déterminer la quantité réelle de récepteurs présents sur et dans les cellules. L'utilisation de cellules marquées contre les TLR d'intérêt analysable par FACS ou immunohistochimie permettrait d'avoir une idée plus précise du pattern de TLR exprimé par les macrophages alvéolaires. Par exemple, le TLR 9 est rapporté comme étant un récepteur intracellulaire mais il peut également être présent à la surface des macrophages comme a pu le montrer une étude réalisée récemment chez l'homme (Juarez *et al.*, 2010).

Malgré ces difficultés techniques, le modèle mis au point reste un modèle unique pour la détection des variations de la réponse immune innée des macrophages alvéolaires *ex vivo*.

1.4 Conclusion de la première étude :

L'objectif de cette première partie était de mettre au point un modèle expérimental permettant d'évaluer l'immunité non spécifique pulmonaire du cheval, notamment un modèle de stimulation des TLR des macrophages alvéolaires équins utilisable dans diverses situations.

La réalisation de ces travaux a montré que les macrophages alvéolaires équins expriment principalement les TLR 2, 3, 4, 7 et 8. Ces TLR peuvent être stimulés *ex vivo* par les ligands de TLR et leur réponse évaluée en dosant les cytokines par méthode indirecte (PCR) ou directe (ELISA). Ce modèle est simple à mettre en place et fiable pour détecter des variations dans la réponse des macrophages alvéolaires induites par une immunodépression expérimentale *ex vivo*.

La figure 26 illustre la technique sélectionnée suite à cette première partie. Ce modèle sera utilisé dans les étapes suivantes.

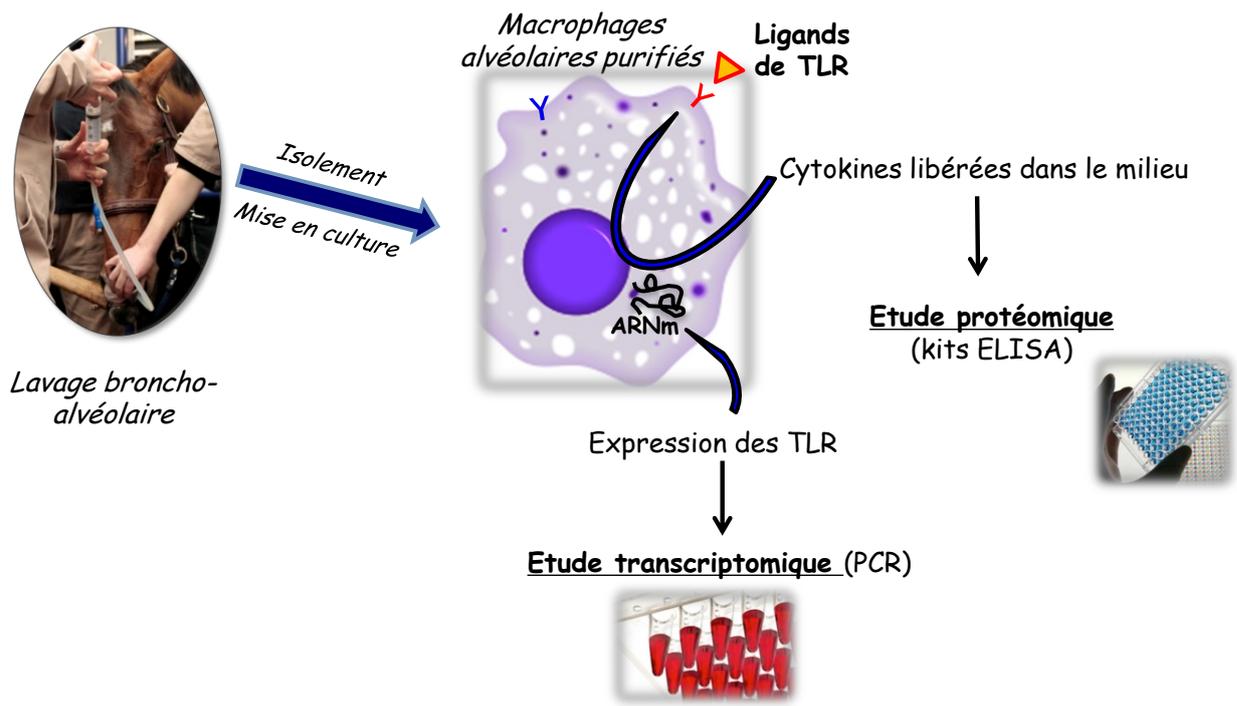


Figure 26 : Schématisation du protocole expérimental d'évaluation de la réponse immune des macrophages alvéolaires ex vivo.

2 ETUDE EXPERIMENTALE : EXPLORATION DU LIEN ENTRE IMMUNITE INNEE, EXERCICE ET ENTRAINEMENT (ARTICLE 2)

L'hypothèse qui a conduit à la réalisation de cette seconde étape était : l'exercice intensif ponctuel et l'entraînement auraient un effet dépresseur sur les capacités immunitaires innées des macrophages alvéolaires. Pour tester cette hypothèse, une étude longitudinale menée sur 8 chevaux expérimentaux, en conditions standardisées, a permis d'évaluer l'effet de l'exercice ponctuel et de l'entraînement modéré et intensif sur l'immunité non spécifique pulmonaire *ex vivo*, à l'aide du modèle expérimental défini dans la première étape.

Les résultats issus de cette étude ont fait l'objet d'un article en co-autariat avec Linda Frellstedt. Les matériel, méthode et résultats publiés concernant les macrophages alvéolaires seront repris ici de façon succincte, agrémentés des résultats complémentaires n'ayant pas été publiés. Pour plus de détails, le lecteur est invité à se référer à l'article original en partie 8.

2.1 Matériel et méthode :

2.1.1 Chevaux :

Huit chevaux trotteurs français ont été utilisés pour cette étude (5 juments et 3 hongres). Il s'agissait de chevaux réformés âgés de 3 à 4 ans au moment du protocole. Chaque cheval a subi un bilan d'inclusion comportant un examen clinique approfondi, une évaluation locomotrice ainsi que des prélèvements sanguins (hémato-biochimie) et respiratoires (cytologies du LT et du LBA, bactériologie sur LT et virologie sur écouvillon nasopharyngé). Pour être inclus dans l'étude, les chevaux devaient être en bonne santé générale, exempts de toute condition limitant les performances et sans signes cliniques, fonctionnels ou cytologiques d'affection respiratoire. Une quinzaine de chevaux a été examinée et huit ont été retenus.

Les chevaux sélectionnés ont subi une période de quarantaine au CIRALE (Centre d'Imagerie et de Recherche sur les Affections Locomotrices Equines, basé à Goustranville, Calvados) durant laquelle ils ont été vermifugés et vaccinés. Pendant la quarantaine et les

périodes de repos, les chevaux étaient logés au CIRALE dans des paddocks. Ils disposaient d'eau et d'ensilage d'herbe préfanée à volonté (herbe fermentée, à teneur plus élevée en humidité que le foin, pauvre en poussières). Pendant les périodes d'entraînement, les chevaux étaient logés chez un entraîneur de trot en boxes sur copeaux, avec accès aux pâtures dans la journée. Ils étaient alors nourris avec de l'ensilage à volonté et une supplémentation en concentrés adaptée à l'intensité du travail effectué par les chevaux. L'utilisation de copeaux dans les boxes et d'enrubanné comme fourrage permettait de limiter les poussières respirées par les chevaux, l'objectif étant d'éviter le développement d'inflammation respiratoire liée à l'environnement et pouvant interférer avec l'effet de l'effort et de l'entraînement.

2.1.2 Protocole expérimental :

Le protocole expérimental se divise en 4 phases :

- **Phase de repos de 14 semaines :** les chevaux provenant d'horizons différents avec des historiques d'entraînement divers, il était nécessaire de les soumettre à une période de repos afin d'homogénéiser leur niveau sportif.
- **Phase de pré-entraînement de 8 semaines :** pour des raisons pratiques, les chevaux ont été séparés en 2 lots d'entraînement, séparés de 2 semaines. Le pré-entraînement consistait en un travail de fond, avec augmentation progressive de la vitesse, réalisé 3 fois par semaine leur permettant de développer leurs capacités pulmonaires et cardiaques afin de pouvoir être entraînés de façon plus intensive. Le détail du travail effectué par les chevaux durant cette période est décrit en annexe 1.
- **Phase d'entraînement intensif de 7 semaines :** il s'agit d'ajouter au travail précédent, un entraînement fractionné alternant des périodes de récupération avec des séquences à vitesse croissante. Ce type de travail était réalisé 1 à 2 fois par semaine à intensité progressive, complété par du travail de fond 2 fois par semaine. Le détail des séances est décrit en annexe 2. Durant cette phase, le travail des chevaux à leur vitesse maximale a permis de personnaliser l'effort effectué en fonction des capacités physiques de chaque individu.

- **Phase de désentraînement** : les chevaux ont été mis au repos pendant 14 semaines. L'objectif étant de déterminer si une période de repos permettrait de restaurer les éventuelles modifications de l'immunité induites par l'effort et l'entraînement.

Durant les sessions d'entraînement, les chevaux étaient équipés d'un cardiofréquencemètre et d'un système GPS sur le sulky permettant de suivre la vitesse et la distance parcourue (équipement Polar). Le protocole d'entraînement et le contenu des séances de travail ont été définis en collaboration avec des entraîneurs de trotteurs dans le but de se rapprocher le plus possible de la réalité du travail effectué par les chevaux de course à l'entraînement. Cependant, pour des raisons pratiques et financières, la durée globale de l'entraînement devait se limiter à 4 mois, ce qui est plus court que ce qui est effectué généralement sur le terrain mais comparable à la durée de l'entraînement dans l'étude de Raidal (Raidal *et al.*, 2000b).

Des tests d'effort ont été réalisés à des étapes-clés du protocole d'entraînement afin d'une part, de suivre l'évolution des paramètres sportifs des chevaux à l'entraînement, et, d'autre part, d'effectuer des prélèvements respiratoires post-effort dans le but d'évaluer l'effet de l'exercice ponctuel sur l'immunité innée. Les tests d'effort étaient réalisés sur tapis roulant à grande vitesse selon un protocole standardisé adapté au trotteur (cf annexe 3). Brièvement, après une période d'échauffement, chaque cheval, équipé d'un système Televet, réalisait 3 paliers de 2 min à vitesse croissante (7, 9 et 11 m/sec) séparés par une courte période de récupération puis un dernier palier à 11 m/sec prolongé jusqu'à fatigue suivi d'une récupération active de 5 min. A chaque palier, un relevé de la fréquence cardiaque et de la lactatémie était effectué afin de déterminer les valeurs de V₂₀₀ (vitesse à laquelle le cheval atteint une fréquence cardiaque de 200 battements par minute) et de V_{La4} (vitesse atteinte lorsque la concentration en lactates sanguins est de 4 mmol/L). A la fin du test, le temps total passé sur le tapis pour chaque cheval est noté. Ces valeurs sont utilisées pour objectiver l'effet de l'entraînement sur les paramètres sportifs des chevaux. Le dernier palier était poursuivi jusqu'à fatigue, c'est-à-dire que le test s'arrêtait à partir du moment où le cheval n'était plus capable de tenir la vitesse imposée par le tapis roulant malgré les sollicitations. La durée totale du test était alors relevée pour chaque individu.

Le protocole expérimental est schématisé dans la figure 27.

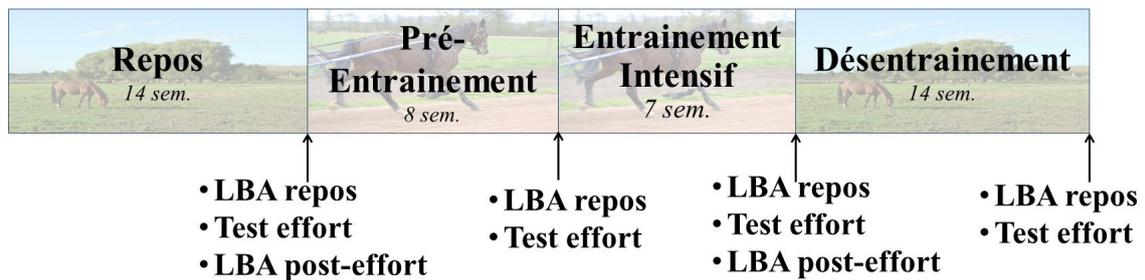


Figure 27 : Schématisation du protocole expérimental mis en place pour évaluer l'effet de l'effort et l'entraînement sur l'immunité innée pulmonaire.

2.1.3 Prélèvements respiratoires :

Des LBA au repos ont été réalisés à la fin de chaque phase (voir figure 27), dans le but d'évaluer l'effet de l'entraînement sur la réponse des macrophages alvéolaires stimulés par les ligands de TLR *ex vivo*.

Des LBA post-effort ont également été réalisés sur les chevaux avant et à la fin de l'entraînement (cf figure 27) afin d'évaluer l'impact de l'effort sur les fonctions immunitaires innées. Les chevaux étaient mis au repos depuis au moins 3 jours avant chaque prélèvement de repos pour éviter l'influence des efforts réalisés au cours des séances d'entraînement précédentes. Des essais préliminaires ont été effectués de façon à déterminer quel était le meilleur moment pour effectuer les prélèvements respiratoires après l'effort. Pour cela, les macrophages alvéolaires des chevaux ont été prélevés au repos (n=8) puis à 3 heures (n=4), 24 heures (n=6) et 48 heures (n=6) après un effort standardisé à fatigue. Ils ont ensuite été stimulés selon le protocole préalablement décrit avec les ligands de TLR. La réponse des macrophages alvéolaires prélevés à différents temps post-effort a été comparée à celle des macrophages prélevés au repos.

Pour chaque LBA, 2 sites pulmonaires étaient prélevés à l'aide de 420 mL de sérum physiologique puis poolés de façon à obtenir suffisamment de cellules pour les stimulations. Lorsque les chevaux devaient être prélevés au repos et post-effort, les LBA étaient réalisés

alternativement dans le poumon droit et le poumon gauche. Une cytologie était effectuée pour chaque prélèvement.

Des lavages trachéaux (LT) ont été réalisés 1h post-effort sur les chevaux non entraînés, à la fin du pré-entraînement et à la fin de l'entraînement intensif. Une cytologie a été effectuée pour chaque prélèvement, ainsi qu'une bactériologie et une virologie.

2.1.4 Stimulation et évaluation de la réponse des macrophages alvéolaires *ex vivo* :

Les macrophages alvéolaires ont été extraits et stimulés avec les ligands de TLR selon le protocole expérimental établi dans la première partie.

2.1.5 Expression des TLR d'intérêt par les macrophages alvéolaires :

L'expression relative des TLR 2, 3, 4 et 6 au cours de l'entraînement et après l'effort a été quantifiée par PCR selon le protocole préalablement établi. Les gènes de référence utilisés pour normaliser les résultats étaient RPL32 (ribosomal protein L32), RPL0 (ribosomal protein L0) et HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) car les PCR étaient réalisées en commun avec les autres cellules étudiées au cours de ce même protocole (cellules sanguines et épithéliales bronchiques). Ces trois gènes ont été sélectionnés comme étant les plus stables pour l'étude des différents types cellulaires simultanément.

2.1.6 Dosage du cortisol :

Le cortisol a été dosé durant les différentes phases du protocole et après les tests d'effort chez les chevaux non entraînés et entraînés à l'aide du kit IMMULITE® 2000 Cortisol. Les prélèvements sanguins ont été réalisés au même moment de la journée de façon à éviter l'influence du rythme circadien sur nos dosages (Cordero *et al.*, 2012).

2.1.7 Analyses des données :

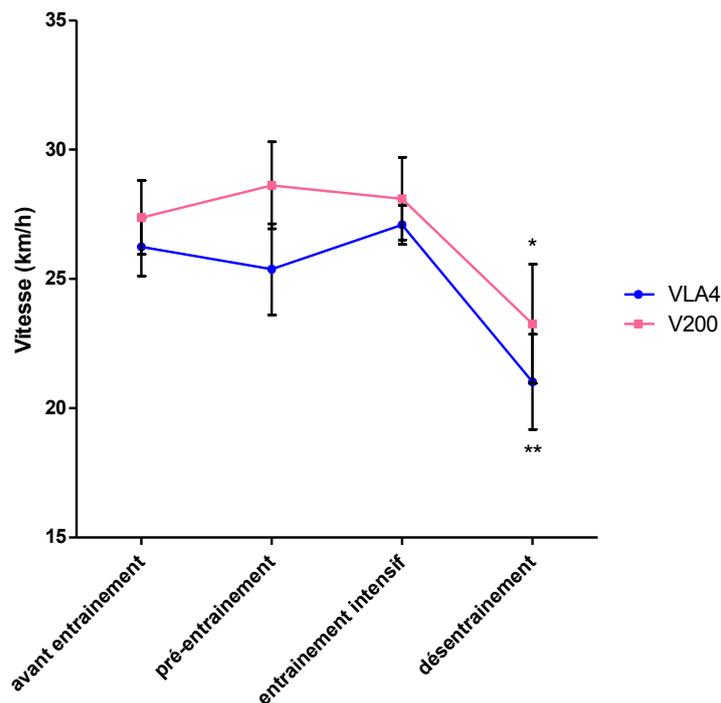
Les données issues des PCR, des ELISA, du dosage du cortisol, des cytologies et des paramètres sportifs ont été représentées sous la forme de moyenne des moindres carrés (least square means, LSmeans) \pm erreur standard (standard error, SE). Le logiciel SAS a été utilisé pour l'analyse statistique des résultats selon un modèle linéaire mixte global. Les différences entre les résultats ont été considérées comme significatives lorsque la valeur de p obtenue était inférieure à 0,05.

2.2 Résultats :

2.2.1 Evolution des paramètres sportifs :

Les valeurs de V200, V_{La4} et le temps total passé par les chevaux sur le tapis roulant ont été utilisées pour évaluer l'évolution des capacités sportives des chevaux au cours de l'entraînement.

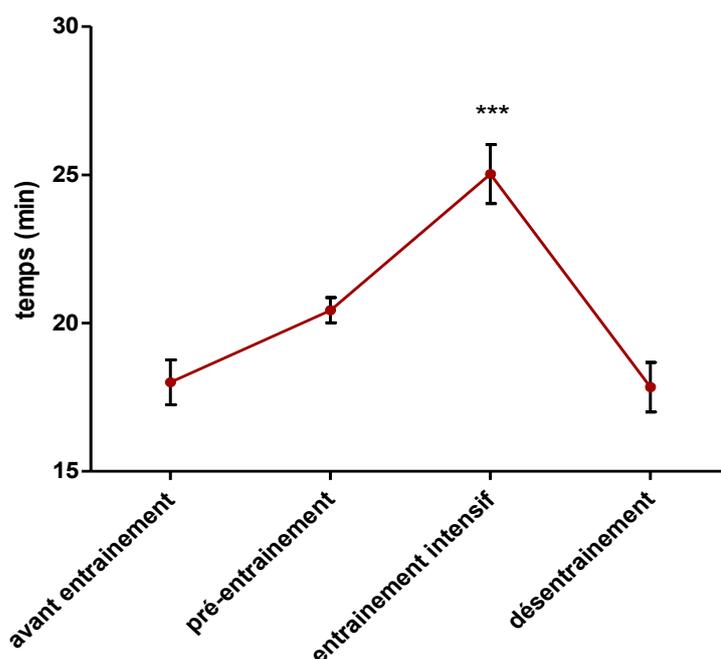
La figure 28 représente l'évolution des valeurs de V_{La4} et de V200 au cours du protocole.



*Figure 28 : Evaluation des valeurs de V_{La4} (courbe bleue) et de V200 (courbe rose) avant l'entraînement et à la fin du pré-entraînement de l'entraînement intensif et du désentraînement. * représente une différence significative ($p < 0.05$) entre les valeurs de V_{La4} du désentraînement et d'avant entraînement. ** représente une différence significative ($p < 0.01$) entre les valeurs de V200 du désentraînement et d'avant entraînement.*

Les résultats montrent un profil d'évolution des valeurs de V_{La4} et de V200 très similaire avec des valeurs de V200 légèrement plus élevées que V_{La4} . Aucune amélioration significative des valeurs de V200 ou V_{La4} n'a pu être mise en évidence au cours du protocole. En revanche, les résultats indiquent une diminution significative des valeurs pour les chevaux testés à la fin de la période de désentraînement par rapport aux chevaux non entraînés.

La figure 29 représente l'évolution du temps à fatigue tout au long du protocole d'entraînement.



*Figure 29 : Evolution du temps à fatigue relevé à chaque étape du protocole d'entraînement. *** représente une différence significative ($p < 0.001$) entre les valeurs d'entraînement intensif et d'avant entraînement.*

Les résultats indiquent une augmentation progressive significative du temps à fatigue jusqu'à la fin de l'entraînement intensif puis un retour aux valeurs d'avant entraînement lors du test d'effort de fin de désentraînement.

2.2.2 Lavages broncho-alvéolaires :

La figure 30 présente l'effet de l'entraînement sur la cytologie du LBA au repos. Les résultats sont présentés sous forme de nuage de points pour chaque type cellulaire, chaque point représentant la valeur pour un cheval. La barre transversale représente la moyenne du pourcentage pour chaque type cellulaire.

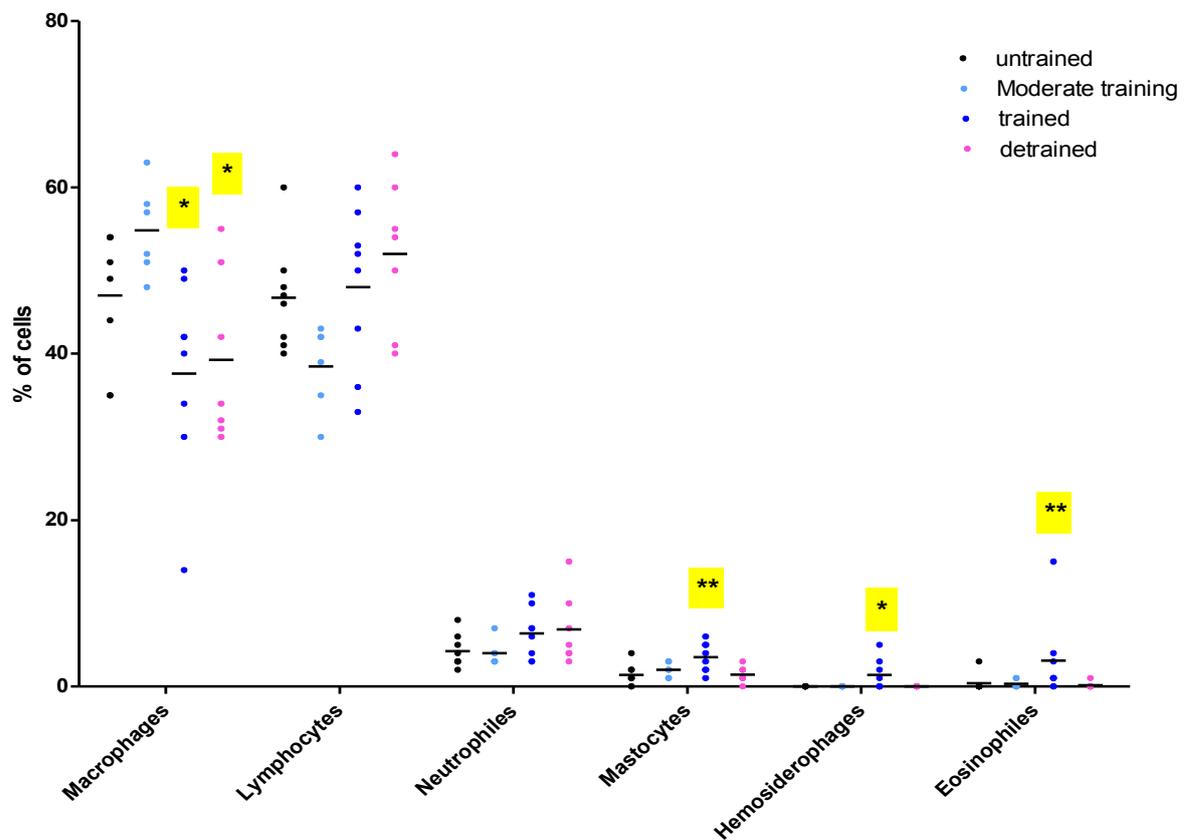
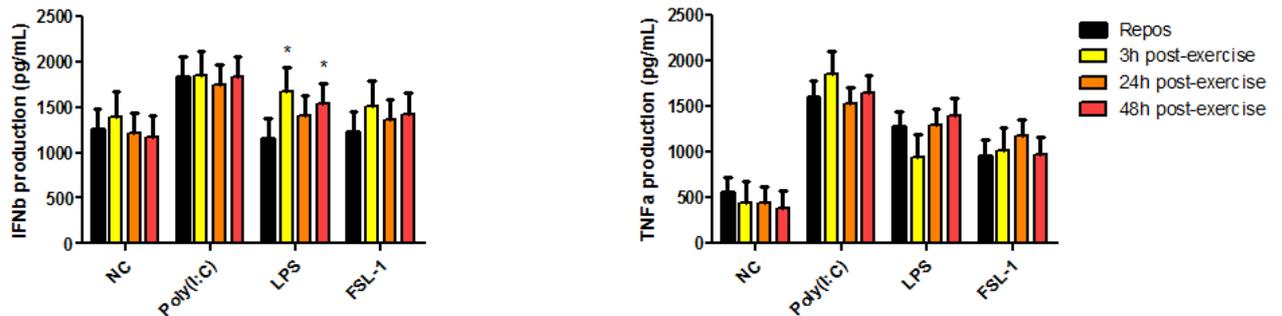


Figure 30 : Effet de l'entraînement sur la cytologie du LBA de repos. * et ** représentent une différence significative ($p < 0.05$ et $p < 0.01$ respectivement) avec les pourcentages de cellules sur les cytologies d'avant entraînement (untrained).

On constate une augmentation significative des pourcentages de mastocytes, hémosidérocytes et éosinophiles lorsque les chevaux sont entraînés de façon intensive. Une tendance à l'augmentation du nombre de neutrophiles, persistant malgré le désentraînement, est également observée mais aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre le statut non entraîné et entraîné. Le pourcentage de macrophages alvéolaires est diminué avec l'entraînement intensif et n'est pas totalement restauré avec le désentraînement.

La figure 31 représente l'effet de l'effort sur la production de cytokines par les macrophages alvéolaires stimulés ou non par les ligands de TLR à 3, 24 ou 48 heures post-exercice.



*Figure 31 : effet de l'effort sur la sécrétion d'IFN β et de TNF α par les macrophages alvéolaires prélevés à 3, 24 ou 48 heures post-effort et stimulés par les ligands de TLR. * représente une différence significative ($p < 0.05$) avec les valeurs de repos. NC = cellules non stimulées.*

Concernant la production d'IFN β et de TNF α par les cellules, on ne constate pas de différence significative post-effort quel que soit le timing de prélèvement pour la stimulation du TLR 3 et 2/6. En revanche, la stimulation du TLR 4 par le LPS induit significativement plus d'IFN β à 3 et 48 heures post-effort. Cependant, il est nécessaire de rester prudent car la production de TNF α , quant à elle, n'est pas modifiée et le nombre de chevaux prélevés à 3 heures est restreint.

La figure 32 présente l'effet de l'effort sur les cytologies de LBA chez le cheval non entraîné et entraîné. Les données sont représentées sous la même forme que précédemment.

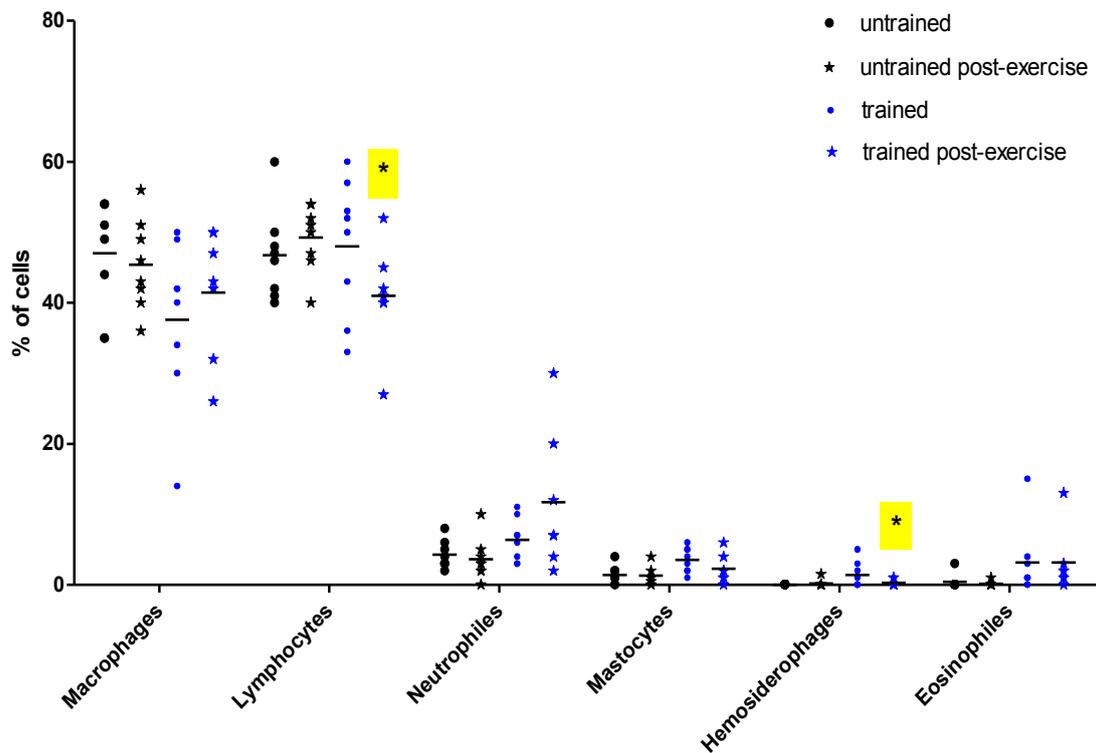


Figure 32 : Effet de l'effort sur la cytologie du LBA prélevés au repos (ronds) et 24 heures après l'effort (étoiles) sur les chevaux non entraînés (noir) et entraînés (bleu). * représente une différence significative ($p < 0.05$) entre le repos et l'effort chez les chevaux entraînés.

On n'observe aucun effet de l'effort ponctuel sur les pourcentages des différents types cellulaires chez le cheval non entraîné. Chez le cheval entraîné, on constate une diminution significative du pourcentage de lymphocytes après l'effort qui reste malgré tout dans les normes de référence comprises entre 30 et 50%. On constate également une tendance à l'augmentation du nombre de neutrophiles mais qui n'est pas significative. Certains chevaux présentant tout de même une inflammation modérée post-exercice (plus de 10% de neutrophiles). Le pourcentage d'hémosidérocytes est significativement plus faible après l'effort intensif chez le cheval entraîné.

Le tableau 5 représente le nombre par mm^3 de cellules pulmonaires totales et des principaux types cellulaires, aux différentes étapes du protocole.

*Tableau 5 : Effet de l'entraînement et de l'effort sur le nombre de cellules totales pulmonaires, du nombre de macrophages, lymphocytes et neutrophiles pulmonaires (en nb de cellules/mm³). * représente une différence significative (p<0.05) avec le nombre de cellules du LBA des chevaux non entraînés.*

	Cellules totales	Macrophages	Lymphocytes	Neutrophiles
Non entraînés	72.5 ± 40.39	34.34 ± 5.83	33.18 ± 5.83	3.13 ± 0.64
Non entraînés post-effort	79.29 ± 36.58	35.1 ± 5.48	39.78 ± 6.15	3.04 ± 0.87
Pré-entraînés	58.28 ± 16.47	31.91 ± 6.29	22.28 ± 6.23	2.6 ± 0.96
Entraînés	113.58 ± 53.14 *	40.54 ± 5.56	55.11 ± 8.09	5.4 ± 0.72 *
Entraînés post-effort	97.97 ± 40.65	39.47 ± 5.37	38.71 ± 6.86	4.78 ± 1.01
Désentraînés	89.45 ± 31.76	34.97 ± 7.31	47.34 ± 20.55	4.73 ± 1.05

Le nombre de cellules pulmonaires n'est pas modifié par l'exercice ponctuel intensif que ce soit chez le cheval entraîné ou non entraîné. A l'opposé, l'entraînement intensif induit une augmentation significative du nombre de cellules pulmonaires de chevaux prélevés au repos, qui ne persiste pas après une période de désentraînement. Le nombre de macrophages et de lymphocytes n'est pas significativement modifié malgré une tendance à l'augmentation avec l'entraînement. Le nombre de neutrophiles est significativement augmenté chez les chevaux après l'entraînement intensif.

2.2.3 Lavages trachéaux :

La figure 33 représente l'effet de l'entraînement sur la cytologie du LT. Les résultats sont présentés sous forme de nuage de points pour chaque type cellulaire, chaque point représentant la valeur pour un cheval. La barre transversale représente la moyenne du pourcentage pour chaque type cellulaire.

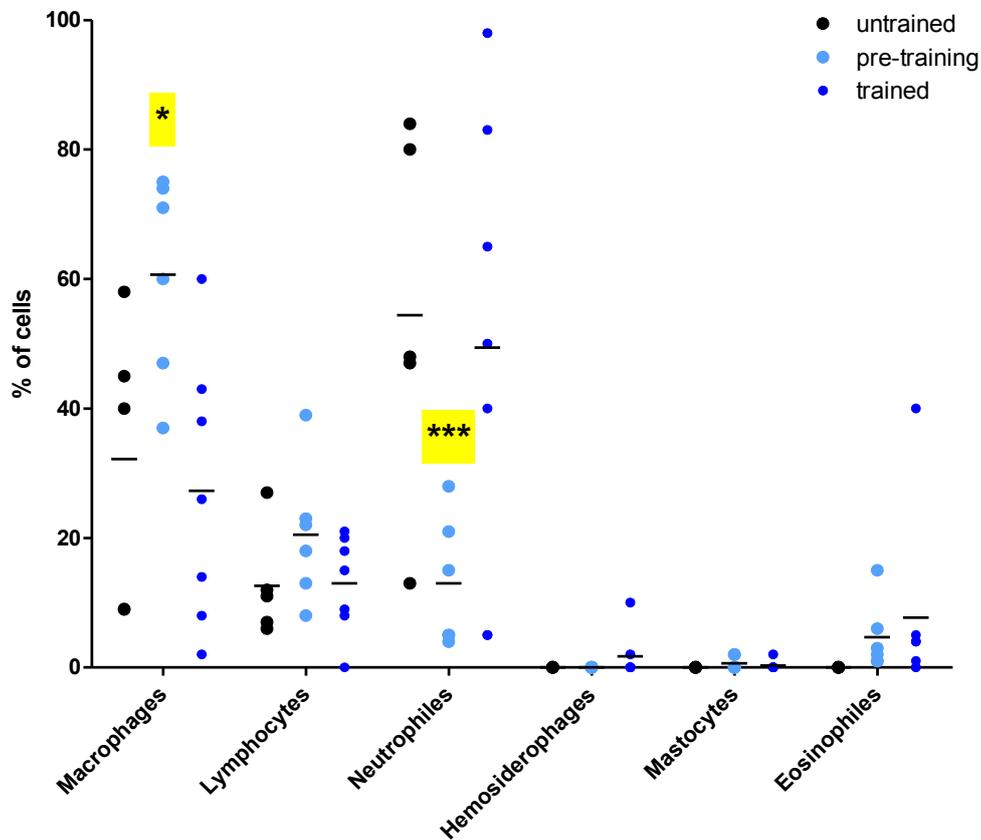


Figure 33 : Effet de l'entraînement sur la cytologie du lavage trachéal des chevaux prélevés 1 heure après l'effort. * et *** représentent une différence significative ($p < 0.05$ et $p < 0.001$ respectivement) avec les cytologies d'avant entraînement (untrained).

On constate une grande variabilité inter-individuelle concernant les pourcentages de macrophages et de neutrophiles. Les pourcentages de neutrophiles des chevaux non entraînés et entraînés sont élevés ($> 40\%$) par rapport à la norme généralement utilisée de 20% . On observe une augmentation significative du pourcentage de macrophages et une diminution du nombre de neutrophiles chez les chevaux prélevés à la fin de la période de pré-entraînement.

Des analyses bactériologiques et virologiques ont été réalisées pour chaque LT. Les résultats sont détaillés dans les tableaux 6 et 7.

Tableau 6 : Effet de l'entraînement sur la bactériologie réalisée sur le lavage trachéal.

Cheval	inclusion	Non-entraîné	Entraînement modéré	Entraînement intensif
1	0	0	ND	0
2	0	0	mycoplasme	0
3	0	Strepto 40000/ml, Staph, Strepto alpha	0	0
4	Gram+ anérobie	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	ND	0	ND	0

Tableau 7 : Effet de l'entraînement sur la virologie réalisée sur le lavage trachéal.

Cheval	inclusion	Non-entraîné	Entraînement modéré	Entraînement intensif
1	0	0	ND	0
2	0	0	EHV5, RhinoB faible	EHV2 faible
3	0	0	EHV5 faible	0
4	0	EHV5	RhinoB faible	EHV5 faible
5	0	0	0	0
6	0	EHV5	EHV5	0
8	0	EHV5	EHV5	EHV5
9	ND	EHV2,5,RhinoB faible	ND	0

Concernant la bactériologie, il n'y a pas d'apparition d'infections bactériennes avec l'entraînement. Seules des contaminations bactériennes ponctuelles ont été détectées pour 2 chevaux au cours du protocole.

Concernant la virologie, on remarque une apparition sub-clinique de virus respiratoires après la période d'inclusion. Le début de l'entraînement semble être la période la plus propice à l'apparition de virus, avec une prédominance pour l'EHV-5.

2.2.4 Effet de l'effort intensif ponctuel sur la production de cytokines et l'expression des TLR par les macrophages alvéolaires *ex vivo* :

La figure 34 représente la variation de la production d'IFN β et de TNF α par les macrophages alvéolaires chez le cheval non entraîné et après entraînement, avant et 24h après la réalisation d'un effort intensif à fatigue.

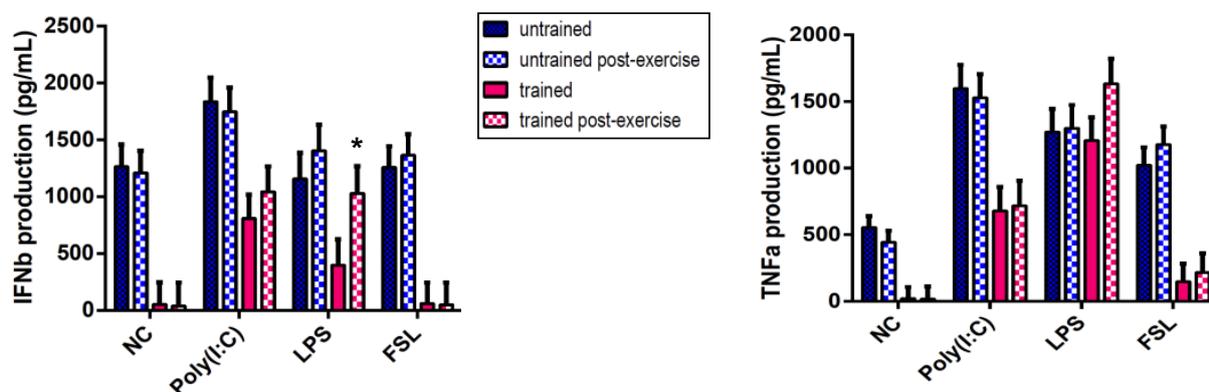
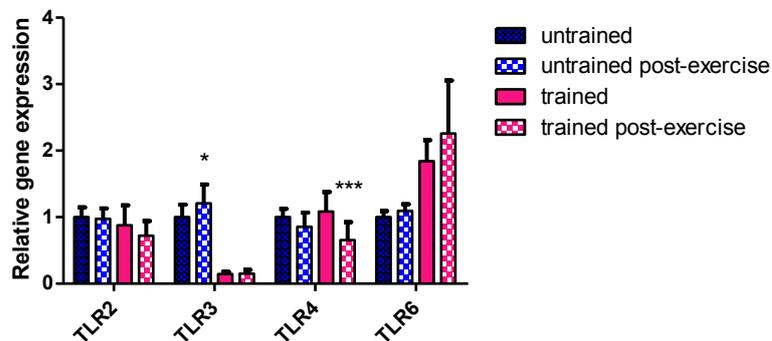


Figure 34 : Effet de l'effort sur la production d'IFN β et de TNF α par les macrophages alvéolaires stimulés par les ligands de TLR chez le cheval non entraîné (bleu) et le cheval entraîné (rose). * représente une différence significative ($p < 0.05$) entre les valeurs de repos et post-effort chez le cheval entraîné. NC = cellules non stimulés.

Les résultats indiquent l'absence d'effet de l'exercice ponctuel sur la production basale d'IFN β et de TNF α par les macrophages alvéolaires non stimulés (NC) que ce soit chez le cheval entraîné ou non entraîné. Concernant les macrophages alvéolaires stimulés, on constate l'absence d'effet de l'effort intensif sur les productions d'IFN β et de TNF α induites par la stimulation des TLR 3 (Poly(I:C)) et 2/6 (FSL-1) que ce soit chez le cheval entraîné ou non entraîné. En revanche, on observe une augmentation significative de la production d'IFN β et une tendance à l'augmentation de la production de TNF α lorsque les cellules sont stimulées par le LPS (TLR 4). Cet effet est observé uniquement chez le cheval entraîné.

La figure 35 représente l'évolution de l'expression des TLR par les macrophages alvéolaires induite par l'effort ponctuel intensif chez le cheval entraîné et non entraîné.

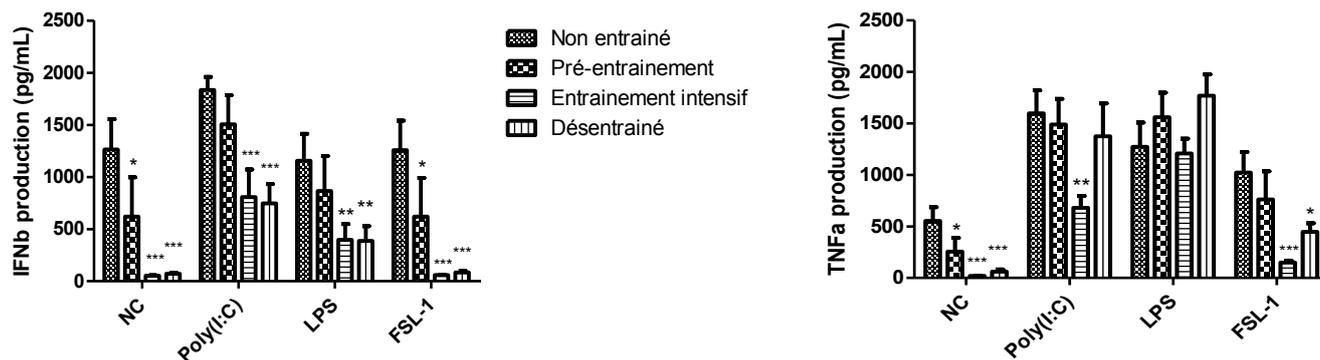


*Figure 35 : Effet de l'effort ponctuel sur l'expression relative des TLR 2, 3, 4 et 6 exprimés par les macrophages alvéolaires des chevaux non entraînés (bleu) et entraînés (rose). * représente une différence significative ($p < 0.05$) entre les valeurs d'expression de repos (artificiellement fixé à 1) et post-effort des chevaux non entraînés. ** représente une différence significative ($p < 0.01$) entre les valeurs d'expression de repos et post-effort des chevaux entraînés.*

Les résultats indiquent l'absence d'effet de l'effort ponctuel intensif sur l'expression des TLR 2 et 6 que ce soit chez le cheval entraîné ou non entraîné. On observe également une augmentation significative de l'expression du TLR 3 en réponse à l'effort, uniquement chez le cheval non entraîné. Concernant le TLR 4, on observe une diminution de l'expression du TLR en réponse à l'effort, uniquement chez le cheval entraîné.

2.2.5 Effet de l'entraînement sur la production de cytokines et l'expression des TLR par les macrophages alvéolaires *ex vivo* :

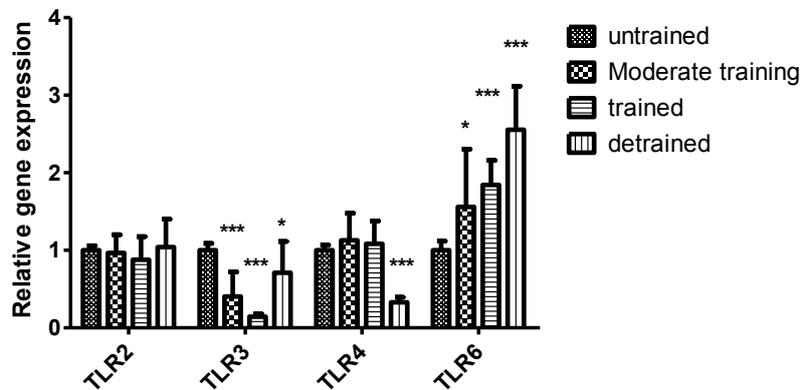
La figure 36 rappelle les résultats obtenus pour la production de cytokines IFN β et TNF α par les macrophages alvéolaires des chevaux au repos, en fonction de leur état d'entraînement.



*Figure 36 : effet de l'entraînement sur la production d'IFNβ et de TNFα par les macrophages alvéolaires prélevés au repos et stimulés ex vivo par les ligands de TLR. *, ** et *** représentent des différences significatives (respectivement $p < 0.05$, $p < 0.01$ et $p < 0.001$) entre les valeurs obtenues au pré-entraînement, à l'entraînement intensif ou au désentraînement et les valeurs obtenues sur les chevaux non entraînés.*

On observe une diminution significative des productions basales d'IFNβ et de TNFα par les macrophages alvéolaires non stimulés dès le pré-entraînement, qui persiste après la période de désentraînement. La sécrétion de TNFα par les macrophages alvéolaires stimulés avec le Poly(I:C) est significativement diminuée par l'entraînement intensif mais le désentraînement permet de restaurer la réponse pro-inflammatoire au ligand. L'activation du TLR 2/6 par le FSL-1 est également diminuée par l'entraînement intensif mais reste significativement plus faible que chez les chevaux non entraînés après la période de désentraînement. A l'opposé, la production de TNFα induite par la stimulation du TLR 4 reste inchangée chez les chevaux tout au long du protocole. Concernant la production d'IFNβ, les résultats indiquent une diminution significative de la production induite par la stimulation au Poly(I:C), cet effet perdure malgré la période de désentraînement. La stimulation des TLR 2/6 et 4 ne permet pas de stimuler la production d'IFNβ que ce soit chez les chevaux non entraînés ou entraînés.

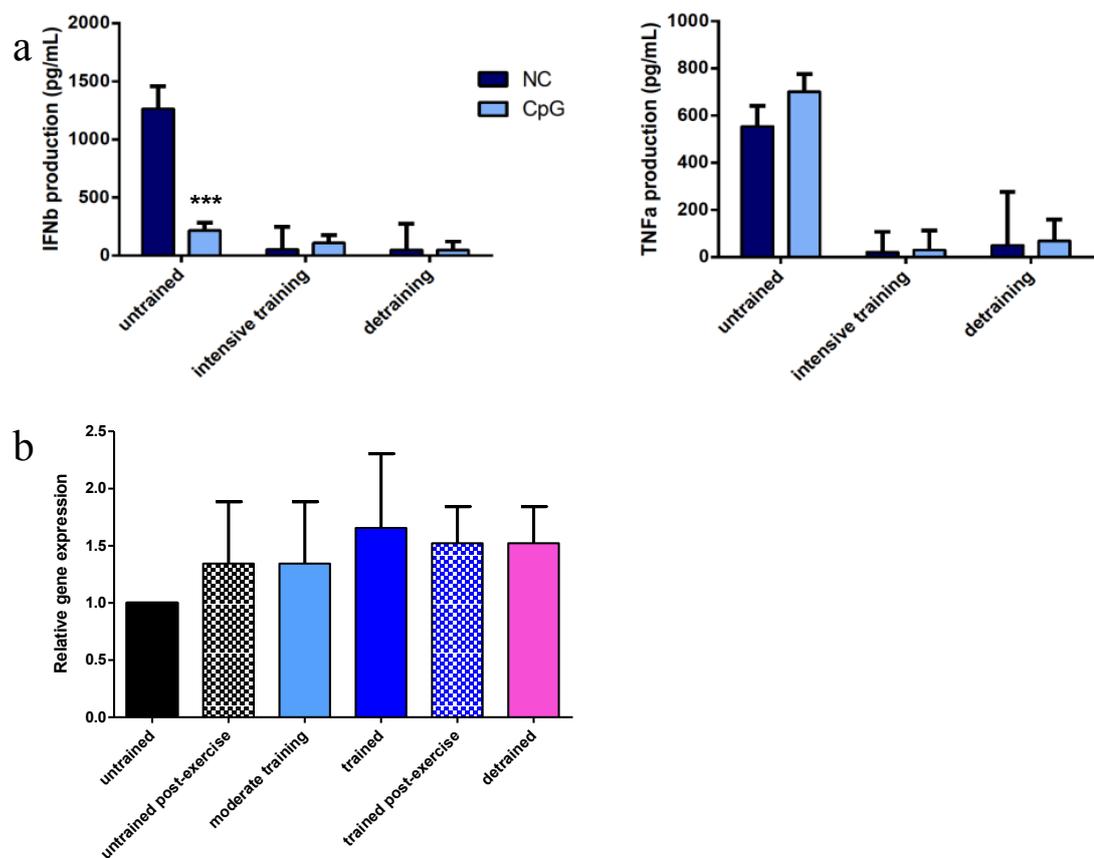
La figure 37 rappelle les résultats obtenus pour l'expression des TLR d'intérêt par les macrophages alvéolaires des chevaux au repos en fonction de leur état d'entraînement.



*Figure 37 : Effet de l'entraînement sur l'expression relative des TLR 2, 3, 4 et 6 par les macrophages alvéolaires. * et *** représentent des différences significatives (respectivement $p < 0.05$ et $p < 0.001$) avec les valeurs d'expression obtenues chez les chevaux non entraînés.*

L'expression du TLR 2 par les macrophages alvéolaires est inchangée par l'entraînement, contrairement à celle du TLR 6 qui est significativement augmentée dès le pré-entraînement et maintenue après la période de désentraînement. L'expression du TLR 3 est très significativement réduite dès l'entraînement modéré et incomplètement restaurée par le désentraînement. L'expression du TLR 4 n'est pas modifiée en réponse à l'entraînement tandis qu'elle diminue significativement après la période de désentraînement.

Cas particulier du CpG : L'exploitation du ligand des TLR 9, le CpG, utilisé au cours de notre étude a donné des résultats plutôt inattendus. La figure 38 représentent a) l'évolution de la production de cytokines IFN β et TNF α par les macrophages alvéolaires stimulés par le CpG au cours du protocole et b) l'évolution de l'expression du TLR 9 par les macrophages alvéolaires.

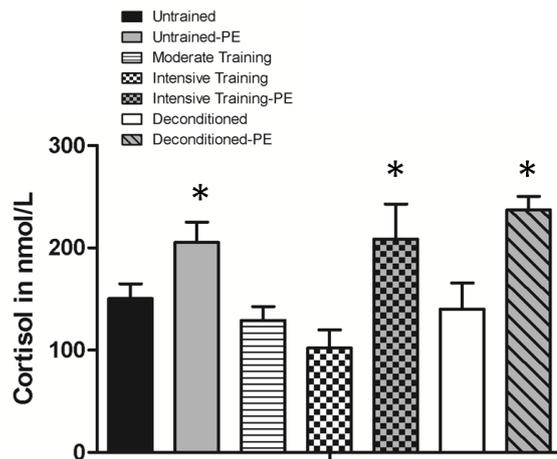


*Figure 38 : a) effet de l'entraînement intensif et du désentraînement sur la production d'IFN β et de TNF α par les macrophages alvéolaires ex vivo non stimulés (NC) et stimulés par le CpG. *** représente une différence significative ($p < 0.001$) entre les cellules stimulées et les cellules non stimulées. b) effet de l'entraînement et de l'effort sur l'expression relative du TLR 9 par les macrophages alvéolaires. L'expression du TLR 9 par les macrophages alvéolaires des chevaux avant l'entraînement est artificiellement fixé à 1.*

Les résultats indiquent une diminution de la production d'IFN β et une absence d'induction de TNF α par rapport aux cellules non stimulées. Aucun effet de l'entraînement n'est observé contrairement aux autres ligands. L'expression du TLR 9 n'est pas modifiée par l'effort ou l'entraînement.

2.2.6 Evolution de la production de cortisol avec l'effort et l'entraînement :

Les variations des concentrations plasmatiques de cortisol lors de notre protocole sont représentées dans la figure 39.



*Figure 39 : Effet de l'effort et l'entraînement sur les concentrations plasmatiques de cortisol. * représente une différence significative ($p < 0.05$) entre les prélèvements réalisés 1heure post-effort et les prélèvements réalisés au repos.*

Nos résultats indiquent que l'exercice intensif est associé à une augmentation des concentrations plasmatiques de cortisol. L'entraînement, même intensif, n'a pas eu d'effet significatif sur la production de cortisol par les chevaux au repos.

2.3 Discussion :

L'objectif de cette partie était d'établir quelles étaient les conséquences d'un effort ponctuel intensif et de l'exercice prolongé (modéré et intensif) sur la réponse des macrophages alvéolaires à la stimulation des TLR. Notre hypothèse étant que l'effort et l'entraînement seraient capables de perturber la mise en place de la réponse immunitaire innée. Il s'agissait d'utiliser les techniques les plus pertinentes mises en place durant l'étude précédente (dosages ELISA et mesure de l'expression des TLR) afin d'évaluer la réponse immunitaire innée des chevaux à des étapes clés du protocole.

2.3.1 Effet de l'effort et l'entraînement sur les prélèvements respiratoires :

Des LBA ont été réalisés tout au long du protocole au repos et 24h post-effort chez les chevaux avant et après l'entraînement, dans le but d'évaluer l'effet de l'effort et l'entraînement sur la réponse des macrophages alvéolaires stimulés par les ligands de TLR *ex vivo*. L'effet de LBA répétés sur l'inflammation pulmonaire reste encore controversé :

certaines études rapportent l'apparition d'une inflammation localisée persistant au moins 48h (Sweeney *et al.*, 1994) tandis que d'autres n'observent pas d'effets sur les cytologies après des LBA répétitifs (Tee *et al.*, 2012). Par précaution, nous avons préféré alterner le prélèvement du poumon gauche et du poumon droit lorsque les chevaux devaient être prélevés au repos et post-effort.

a) Timing de prélèvement post-effort :

La plupart des études sur les chevaux réalisent les prélèvements 24h post-exercice (Ainsworth, 2003; Michelotto *et al.*, 2011; Mignot *et al.*, 2012), les études réalisées par l'équipe de Raidal réalisent les prélèvements respiratoires 30 min post-effort (Raidal *et al.*, 2000a; Raidal *et al.*, 2000b). Nous avons mené une étude afin de déterminer quel était le moment idéal de prélèvement du LBA après l'effort. Nos résultats ne nous ont pas permis de mettre en évidence d'immunodépression post-exercice, contrairement à ce qui est observé chez l'homme (Gleeson, 2007; Walsh *et al.*, 2011). Il ne semble donc pas exister d'«open-window» chez le cheval soumis à un exercice intensif, en tout cas en ce qui concerne la réponse immune des macrophages alvéolaires stimulés par des ligands de TLR. L'«open-window» chez le cheval est également remise en question par une autre équipe (Cywinska *et al.*, 2013). En effet, contrairement à ce qui est observé chez l'homme, leur étude n'a pas permis de mettre en évidence une immunodépression des fonctions phagocytaires des leucocytes sanguins après un entraînement de routine chez des chevaux de course. Des études complémentaires s'avéreraient nécessaires pour savoir si d'autres acteurs de l'immunité respiratoire pourraient être modifiés par l'effort intensif.

b) Effet de l'entraînement sur la cytologie du LBA :

Concernant les prélèvements réalisés au repos, nous avons mis en évidence l'apparition significative d'hémosidérocytes, éosinophiles et mastocytes dans les LBA des chevaux après l'entraînement intensif. L'augmentation des pourcentages d'hémosidérocytes avec l'entraînement reflète l'apparition d'hémorragies pulmonaires induites par l'exercice chez quelques chevaux avec l'intensification de l'entraînement, ce qui est relativement courant chez les chevaux de course. L'apparition d'éosinophiles dans le LBA est un phénomène déjà décrit dans la littérature concernant certains chevaux à l'entraînement (Hare

et al., 1998; Michelotto *et al.*, 2010), il s'agirait plutôt d'une forme d'allergie à connotations environnementale et saisonnière (pollen, allergènes), hypothèse appuyée par l'augmentation concomitante du nombre de mastocytes. Chez l'homme, une plus grande sensibilité des athlètes aux allergies est d'ailleurs rapportée durant les périodes d'entraînement intensif (Hull *et al.*, 2012). Il faut noter cependant que la moyenne est rehaussée par le pourcentage d'éosinophiles élevé qui se distingue chez un cheval.

Une tendance à l'augmentation du nombre de neutrophiles, persistant malgré le désentraînement, est également observée mais aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre le statut non entraîné et entraîné. Il faut également noter que les LBA de cette étude étaient réalisés avec des volumes de NaCl relativement importants par rapport à des LBA plus standards (420 mL par site vs 250 mL en général), bien que compris dans les recommandations de l'International Workshop on Equine Chronic Airway Disease (Robinson, 2001). Il a été décrit qu'un large volume aurait tendance à diluer les neutrophiles, il est donc possible que les pourcentages de neutrophiles soient légèrement sous-évalués (Courouce-Malblanc, 2008), ce qui semble être appuyé par la quantification du nombre de neutrophiles par mm³ de LBA, qui est significativement augmenté par l'entraînement intensif. Ces indications suggèrent l'apparition d'une inflammation légère associée à l'intensification de l'entraînement.

Le pourcentage de macrophages alvéolaires est quant à lui diminué avec l'entraînement intensif, en dessous des valeurs de références comprises entre 50 et 70% (Hoffman, 2008) et n'est pas totalement restauré avec le désentraînement. Cette diminution pourrait s'expliquer en partie par l'augmentation relative du pourcentage des autres types cellulaires car le nombre réel de macrophages alvéolaires dans le LBA ne semble pas être modifié et reste relativement stable au cours de l'entraînement, contrairement à ce que suggèrent les cytologies. L'examen du LBA est généralement délicat car il est conditionné par des phénomènes de dilution comme discuté précédemment et les prélèvements successifs sont limités en raison de la possible interférence d'un prélèvement sur l'autre. Les cytologies d'un LBA sont exprimées en pourcentages de cellules, ce qui représente un résultat relatif. Les hématologies sont, quant à elle, exprimées en nombre de cellules par mm³, les prélèvements sanguins n'étant pas soumis aux phénomènes de dilution comme le LBA. De façon à pouvoir comparer les résultats obtenus sur le sang et le poumon dans l'article 2, les résultats des cytologies de LBA ont également été exprimés en nombre de cellules par mm³. Bien que cette

représentation des résultats ne soit pas couramment utilisée, elle permet d'obtenir une information complémentaire sur les populations cellulaires du poumon.

De façon globale, le nombre de cellules pulmonaires est augmenté avec l'entraînement, ces résultats sont concordants avec ceux obtenus dans d'autres études (Michelotto *et al.*, 2010; Raidal *et al.*, 2000a). Les auteurs associent cet effet à l'augmentation du nombre de neutrophiles après l'entraînement, reflétant le développement d'une inflammation pulmonaire. Dans ce même article, les auteurs constatent une diminution du nombre de cellules viables après l'entraînement (non évalué dans notre cas) et suggèrent un phénomène de compensation par l'augmentation du nombre de cellules pulmonaires.

c) Effet de l'effort sur la cytologie du LBA des chevaux avant et après l'entraînement :

Notre étude n'a pas permis de montrer de modifications des cytologies 24 heures après la réalisation d'un effort intensif à fatigue par le cheval non entraîné. Ces résultats vont dans le sens d'autres études (Clark *et al.*, 1995; Richard *et al.*, 2010a) mais sont en contradiction avec ceux de l'étude préliminaire réalisée sur des Pur-Sang (Mignot *et al.*, 2012) qui rapportait une diminution du pourcentage de macrophages alvéolaires et une augmentation des lymphocytes 24h post-effort.

Chez le cheval entraîné, on constate une diminution significative du pourcentage de lymphocytes après l'effort qui reste malgré tout dans les normes de référence comprises entre 30 et 50% (Hoffman, 2008), cette diminution n'est d'ailleurs pas significativement confirmée par l'examen du nombre de lymphocytes par mm³ de LBA. On constate également une tendance à l'augmentation du nombre de neutrophiles mais qui n'est pas significative. Certains chevaux présentaient tout de même une inflammation modérée post-exercice avec plus de 10% de neutrophiles.

Etonnement, le pourcentage d'hémosidérophages est significativement plus faible après l'effort intensif chez le cheval entraîné alors qu'on s'attendait à avoir une augmentation de ce pourcentage (Clark *et al.*, 1995). Cette différence peut s'expliquer par le fait que le poumon prélevé en post-effort soit différent de celui prélevé au repos. Bien que plusieurs études rapportent que le prélèvement d'un site pulmonaire soit représentatif de l'ensemble des poumons (McGorum *et al.*, 1993; Sweeney *et al.*, 1992), une étude récente sur des Trotteurs

Français a montré que des différences de cytologie existaient en fonction du poumon prélevé (Depecker *et al.*, 2013), notamment que le pourcentage d'hémosidérophages était plus élevé lorsque le poumon droit était prélevé. Ces résultats vont dans le sens de ce que l'on observe puisque le poumon droit était systématiquement prélevé sur nos chevaux au repos, tandis que le gauche était prélevé post-effort. Il est ainsi possible que l'on perde une partie de l'information via cette alternance droite-gauche dans les prélèvements.

Si l'on observe le nombre de cellules pulmonaires totales dans le LBA, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence après l'effort, que ce soit chez le cheval entraîné ou non. Ces résultats sont concordants avec l'étude similaire de Raidal dans laquelle aucune modification du nombre et du pourcentage de cellules vivantes n'avait pu être mise en évidence après l'effort intensif (110% VO₂ max, à fatigue) avant ou après l'entraînement (Raidal *et al.*, 2000a). Ces données suggèrent un impact très modéré de l'effort intensif sur les populations cellulaires du poumon.

d) Effet de l'entraînement sur la cytologie, la bactériologie et la virologie du LT :

Les cytologies obtenues sur les prélèvements trachéaux montrent une grande variabilité inter-individuelle concernant les pourcentages de macrophages et de neutrophiles. Les pourcentages de neutrophiles des chevaux non entraînés et entraînés sont plus élevés (> 40%) que ceux généralement rapportés pour de jeunes chevaux de course sains (< 20% pour 73 à 80% des chevaux) (Richard *et al.*, 2010a). Ceci peut s'expliquer par le fait que nos prélèvements aient eu lieu après l'effort, il a en effet été montré que l'effort pouvait entraîner une augmentation des pourcentages de neutrophiles au-delà du seuil de 20% chez des chevaux sains au repos (Malikides *et al.*, 2007). L'absence de prélèvements trachéaux au repos ne nous permet pas d'exclure la présence d'une inflammation trachéale chez les chevaux non entraînés et entraînés. Il est d'ailleurs important de noter que la détection d'une inflammation dans la trachée ne signifie pas qu'une inflammation soit présente au sein des poumons, et inversement (Malikides *et al.*, 2003).

On observe une augmentation significative du pourcentage de macrophages et une diminution du nombre de neutrophiles chez les chevaux prélevés à la fin de la période de pré-entraînement. Cette observation suggère que l'entraînement modéré aurait un effet positif sur les populations cellulaires trachéales en diminuant l'inflammation. Cependant, il faut rester

prudent car le LT reste un prélèvement peu répétable en raison d'une grande variabilité inter-individuelle mais également intra-individuelle concernant le pourcentage de neutrophiles (augmentation ou diminution du pourcentage jusqu'à 83% après un effort) (Malikides *et al.*, 2007).

Concernant la bactériologie, aucune infection bactérienne n'est apparue avec l'entraînement. Seules des contaminations bactériennes ponctuelles ont été détectées pour 2 chevaux au cours du protocole. En revanche, les virologies révèlent une apparition sub-clinique de virus respiratoires après la période d'inclusion qui pourrait avoir pour origine un changement environnemental et le côtoiement de nombreux chevaux d'origines diverses entre l'écurie d'origine et le site d'entraînement (site du marchand de chevaux, CIRALE, écurie d'entraînement). Le début de l'entraînement semble être la période la plus propice à l'apparition de virus, avec une prédominance pour l'EHV-5.

2.3.2 Evolution des paramètres sportifs :

Les lactates sont les produits de la synthèse d'énergie dans le muscle. Lors d'efforts intenses, les concentrations musculaires en lactate augmentent. Le lactate intracellulaire est alors transporté vers le sang où il s'accumule en vue de sa reconversion par le foie. L'évaluation de la concentration en lactates sanguins est un marqueur efficace de la condition physique du sportif chez l'homme ou le cheval (Campbell, 2011). On retrouve une corrélation exponentielle entre l'accumulation de lactates dans le sang et la vitesse à laquelle est effectué l'effort. Le point d'inflexion correspond au début de la saturation du mécanisme de transport/métabolisation des lactates par l'organisme et au passage d'un métabolisme musculaire anaérobie vers aérobie. Cette inflexion apparaît chez l'homme et le cheval pour une concentration en lactates sanguins comprise entre 2 et 4 mmol/L. La valeur de 4 mmol/L est la plus largement utilisée et divers paramètres sportifs découlent de la mesure de cette valeur dont la V_{La4} , vitesse atteinte lorsque la concentration en lactates sanguins est de 4 mmol/L. C'est cette valeur que nous avons utilisée pour explorer l'effet de l'entraînement sur la production de lactates sanguins. La V_{La4} est une valeur qui augmente avec l'entraînement (Lindner *et al.*, 2009).

La fréquence cardiaque augmente avec l'intensité de l'exercice. Afin d'évaluer l'effet de l'entraînement, la valeur V200 est utilisée, il s'agit de la vitesse à laquelle le cheval atteint une fréquence cardiaque de 200 battements par minute (bpm). Tout comme la V_{La4} , la V200 est une valeur qui augmente avec l'entraînement.

Les résultats obtenus pour notre protocole montrent un profil d'évolution des valeurs de V_{La4} et de V200 très similaire avec des valeurs de V200 légèrement plus élevées que V_{La4} . Contrairement à ce qui était attendu, l'entraînement n'induit aucune amélioration des valeurs, que ce soit pour V_{La4} ou V200. On observe néanmoins une détérioration significative des paramètres sportifs à la fin de la période de désentraînement. Cependant, il faut rester très prudent quant à l'interprétation de ces résultats car la plupart des valeurs de V_{La4} ont dû être extrapolées à partir de la courbe d'évolution de la lactatémie pour certains chevaux qui dépassaient déjà le seuil de 4 mmol/L à l'issue du 1^{er} palier du test d'effort. Différents facteurs peuvent influencer directement ces mesures et expliquer en partie les mauvais paramètres sportifs obtenus. En effet, la lactatémie et la fréquence cardiaque peuvent varier en fonction de l'état émotionnel du cheval : appréhension, anticipation de l'effort lié au tapis, excitation (Campbell, 2011), en fonction également d'affections cardiaques ou respiratoires (exclues dans notre cas par la réalisation d'examens échocardiographiques à l'inclusion et à la fin de l'entraînement, et par les analyses respiratoires). L'apparition progressive d'irrégularités locomotrices à grande vitesse avec l'entraînement pourrait également expliquer en partie l'absence d'amélioration de ces paramètres au cours du protocole.

Malgré l'absence d'amélioration des lactatémies et fréquences cardiaques avec l'entraînement, l'amélioration du temps à fatigue suggère néanmoins un effet positif, progressif de l'entraînement sur la capacité des chevaux à maintenir un effort conséquent et appuient notre hypothèse selon laquelle un contexte émotionnel lié au tapis associé à l'apparition de pathologies locomotrices masquerait l'amélioration des V200 et V_{La4} .

L'effet de l'entraînement sur l'évolution des capacités sportives du cheval peuvent être évaluées en utilisant d'autres marqueurs. Par exemple, l'équipe de Raidal (Raidal *et al.*, 2000a; Raidal *et al.*, 2000b; Raidal *et al.*, 2001) observe l'augmentation de la consommation maximale d'oxygène VO_{2max} ainsi que la durée totale de chaque test d'effort au cours de l'entraînement pour évaluer l'évolution des performances des chevaux. Il utilise cette même

valeur pour adapter l'intensité des tests d'effort (30-40% VO₂max pour un effort modéré et 110% VO₂max pour un effort intensif). La détermination de VO₂max nécessite un équipement spécifique, le cheval doit être équipé d'un masque relié à un appareil qui permet de mesurer la consommation d'oxygène tout au long du test d'effort. La mesure de ce paramètre était impossible pour notre étude car nous ne disposons pas de l'équipement nécessaire.

2.3.3 Effet de l'effort et l'entraînement sur l'immunité innée respiratoire :

L'utilisation du modèle expérimental mis au point dans la première partie nous a permis d'évaluer l'effet de l'effort intensif et l'entraînement sur les capacités de réponse des macrophages alvéolaires face à des mimétiques de pathogènes.

a) Effet de l'effort ponctuel :

Nos résultats indiquent l'absence d'effet de l'exercice ponctuel sur la production basale d'IFN β et de TNF α par les macrophages alvéolaires non stimulés que ce soit chez le cheval entraîné ou non entraîné. D'autres études constatent également l'absence d'influence de l'effort ponctuel sur la production basale de cytokines (dont TNF α et IFN β) par les leucocytes pulmonaires, malgré l'utilisation de techniques de PCR qui sont plus sensibles que les dosages par ELISA (Ainsworth, 2003; Mignot *et al.*, 2012). Ainsi, malgré des fonctions cellulaires modifiées par l'effort comme la diminution de la phagocytose et l'optimisation de la réponse oxydative (Raidal *et al.*, 2000a; Wong *et al.*, 1990), la production constitutive de cytokines ne semble pas être altérée 24 heures après la réalisation d'un effort intensif.

La réponse des macrophages alvéolaires face aux ligands des TLR 2/6 (FSL-1) n'est pas modifiée par l'effort intensif ponctuel, ce qui est cohérent avec l'absence de modification de l'expression de ces mêmes TLR par les macrophages alvéolaires. En revanche, la réponse des cellules au ligand des TLR 4 (LPS) est optimisée après la réalisation d'un effort ponctuel. Cet effet est observé uniquement lorsque le cheval est entraîné et suggère une sensibilisation des macrophages alvéolaires aux bactéries Gram- après l'effort. La réponse anti-virale des macrophages alvéolaires n'est, quant à elle, pas influencée par l'effort. Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus au cours de l'étude préliminaire sur les Pur-Sang (Mignot *et*

al., 2012) dans laquelle une diminution de l'effet du Poly(I:C) et du LPS sur l'expression des cytokines dont (IFN β , TNF α) était mise en évidence 24h post-effort, suggérant une susceptibilité accrue aux virus et aux bactéries. Différents facteurs peuvent expliquer cette divergence :

- la technique de dosage utilisée (l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle peut induire des différences dans les résultats obtenus par PCR et par ELISA),
- les conditions de stimulation des cellules différentes entre les 2 études,
- le type cellulaire (leucocytes pulmonaires totaux contre macrophages alvéolaires isolés) et notamment le fait que le pourcentage de macrophages alvéolaires parmi les leucocytes pulmonaires soit 25% plus faible post-effort dans l'étude sur les Pur-Sang (Mignot *et al.*, 2012), ce qui peut avoir un impact direct sur la production de cytokines puisque le nombre de macrophages alvéolaires, producteurs principaux de TNF α et IFN β seront moins nombreux en culture après l'effort par rapport au repos.
- le type d'effort réalisé par les chevaux (Pur-Sang contre Trotteur), etc.

Ces différences d'une étude à l'autre rendent la comparaison des données relativement délicate.

Si l'on s'intéresse à l'expression des TLR par les macrophages alvéolaires, on constate que leur degré d'expression n'est pas corrélé avec la quantité de cytokines produites par les cellules stimulées par le ligand du TLR correspondant. En effet, bien que l'expression du TLR 3 augmente après l'effort, aucune différence dans la production de cytokines n'est observée après stimulation du TLR 3 post-effort. Inversement, tandis que l'expression du TLR 4 est diminuée, la réponse des cellules au LPS est augmentée post-effort. Ces résultats sont en contradiction avec une étude réalisée chez l'homme dans laquelle il avait été montré que la production de cytokines dépendait directement du degré d'expression du TLR 4 (McFarlin *et al.*, 2004). Cette divergence peut s'expliquer partiellement par le fait que le TLR 4 ait besoin de molécules co-stimulatrices comme MD-2 et CD14 pour fonctionner correctement. Il est donc possible que la régulation de la réponse au LPS se fasse par l'intermédiaire du contrôle de l'expression de ces molécules, comme le suggèrent d'autres études (Bonin *et al.*, 2013; Laan *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2004). Il aurait donc été intéressant de mesurer l'expression des gènes CD14 et MD-2 en complément du gène du TLR 4. Une augmentation de leur expression en réponse à l'effort aurait pu donner une explication à la production plus importante de cytokines après stimulation par le LPS chez le cheval entraîné. L'optimisation

de la réponse des macrophages alvéolaires face au LPS pourrait peut-être s'expliquer par l'augmentation des particules inhalées durant l'effort (inspirations plus profondes et plus nombreuses avec l'exercice), à l'origine d'une sensibilité accrue des cellules aux motifs bactériens, et par conséquent au LPS. Cependant cette hypothèse va à l'encontre de celle émise par d'autres équipes (Laan *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2004) qui suggèrent une tolérance des macrophages alvéolaires aux endotoxines, appuyée par une expression plus faible du CD14 dans les macrophages alvéolaires par rapport aux monocytes sanguins.

Des modifications de l'expression des TLR en réponse à l'environnement cellulaire ont déjà été rapportées chez l'homme et l'animal. Dans les monocytes sanguins, l'expression des TLR 1, 2, 3 et 4 est diminuée après un effort intensif, le mécanisme impliqué n'est pas élucidé mais l'environnement cytokinique ainsi que l'augmentation des concentrations en hormones de stress semble jouer un rôle important dans la régulation de l'expression des TLR (Gleeson *et al.*, 2006; Lancaster *et al.*, 2005). Concernant les macrophages alvéolaires, il a été montré une diminution de l'expression du TLR 4 chez la souris, en réponse à un stimuli inflammatoire (LPS, TNF α) tandis que le TLR 2 était augmenté, suggérant une tolérance au LPS et un élargissement de la réponse immunitaire à d'autres types bactériens (Oshikawa *et al.*, 2003). A l'opposé, chez le porc, l'expression des TLR 2, 4, 5 et 9 ainsi que des gènes associés (CD14 et MyD88) augmente en réponse à la stimulation au LPS (Islam *et al.*, 2012b).

b) Effet de l'entraînement :

On observe une diminution significative des productions basales d'IFN β et de TNF α par les macrophages alvéolaires non stimulés dès le pré-entraînement. La période de désentraînement ne suffit pas à restaurer les niveaux de production de cytokines d'avant la période d'entraînement. Ces résultats vont dans le sens de l'étude de Michelotto qui rapporte une immunodépression des fonctions des macrophages alvéolaires (phagocytose et production de NO) chez de jeunes chevaux à l'entraînement (Michelotto *et al.*, 2010). De plus, une étude transcriptomique récente chez le cheval a montré un effet régulateur de l'entraînement intensif sur l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'immunité (Te Pas *et al.*, 2013).

La production de TNF α induite par la stimulation des TLR 2/6 est diminuée par l'entraînement intensif et n'est pas totalement restaurée par le désentraînement, reflétant une capacité amoindrie des macrophages alvéolaires à répondre aux pathogènes reconnus par le dimère TLR 2/6 (bactéries Gram+ et mycoplasmes principalement). Inversement, l'expression du TLR 6 est augmentée dès la fin de l'entraînement modéré, ce qui peut faire penser à une tentative de compensation de l'altération de la réponse des cellules par l'augmentation de l'expression du récepteur.

La sécrétion de TNF α par les macrophages alvéolaires stimulés avec le Poly(I:C) est significativement diminuée par l'entraînement intensif mais le désentraînement permet de restaurer la réponse pro-inflammatoire au ligand. En parallèle, la production d'IFN β est très significativement diminuée en réponse au Poly(I:C) et perdure malgré les 14 semaines de désentraînement. De plus, l'expression du TLR 3 est fortement diminuée dès la fin de l'entraînement modéré et reste faible après le désentraînement, ce phénomène pourrait expliquer l'altération de la réponse des cellules au ligand du TLR 3. Ces résultats indiquent un effet immunosuppresseur et durable de l'entraînement sur l'immunité antivirale pulmonaire, ce pourrait expliquer en partie la plus grande sensibilité du système respiratoire face aux virus durant la période d'entraînement des chevaux.

A l'opposé, la production de TNF α induite par la stimulation du TLR 4 reste étonnement inchangée chez les chevaux tout au long du protocole. Ainsi, et malgré une sécrétion basale de TNF α pulmonaire amoindrie par l'entraînement, l'activation du TLR par le LPS reste efficace, reflétant une capacité des macrophages alvéolaires à reconnaître des motifs bactériens de type Gram- préservée en période d'entraînement, même intensif. D'ailleurs, il est également important de noter que l'expression du TLR 4 n'est pas modifiée avec l'entraînement, même intensif. En revanche, le fait qu'elle diminue après la période de désentraînement reste sans explication. Ces résultats obtenus sur le compartiment pulmonaire sont en contradiction avec des études réalisées sur le compartiment sanguin chez l'homme. En effet, il a été montré une diminution de la réponse inflammatoire et de l'expression du TLR 4 des monocytes sanguins stimulés au LPS par l'entraînement, suggérant une sensibilité aux infections bactériennes accrue (Flynn *et al.*, 2003; McFarlin *et al.*, 2004). Il semble donc exister une compartimentalisation de la réponse immune avec une réponse différente entre le

compartiment sanguin et le compartiment pulmonaire, ce que nous avons également mis en évidence dans l'article.

La plupart des modifications induites par l'entraînement, que ce soit sur la production de cytokines ou l'expression des TLR (TLR 3 notamment), ne sont étonnement pas totalement restaurées par le désentraînement malgré des capacités sportives des chevaux qui étaient diminuées. Chez le cheval, des modifications intervenant durant le désentraînement ont également été mises en évidence dans une étude transcriptomique récente. Dans cette étude, il a été montré une augmentation de l'expression des gènes codant pour des protéines de l'immunité pendant la période de désentraînement tandis que ces mêmes gènes étaient diminués pendant l'entraînement (Te Pas *et al.*, 2013). A l'opposé, des études chez l'athlète humain rapportent un effet bénéfique du désentraînement sur les fonctions immunitaires (Syu *et al.*, 2012).

Même si l'effort ponctuel intensif n'a pas d'impact important sur la production de cytokines, il semble que la répétition d'efforts successifs induits par l'entraînement ait un effet immunosuppresseur puissant et durable dans le compartiment pulmonaire. Les réponses à la fois anti-virale et anti-bactérienne des macrophages alvéolaires sont altérées. Le remodelage des populations cellulaires (apparition d'une inflammation modérée), associé à une production basale de cytokines affaiblie et une réponse des macrophages alvéolaires aux pathogènes altérée par l'entraînement pourrait expliquer, du moins en partie, la susceptibilité accrue des athlètes équins face aux affections respiratoires en période d'entraînement.

2.3.4 Facteurs influençant l'immunité pulmonaire :

Notre protocole expérimental ne nous permet pas d'expliquer le mécanisme par lequel l'entraînement induit un tel remodelage de la réponse immunitaire innée dans le poumon. Les variations de l'expression des TLR n'expliquent pas totalement la diminution de la production de cytokines par les macrophages alvéolaires. De nombreux facteurs peuvent entrer en jeu dans l'immunodépression induite par l'entraînement.

a) Hormones produites en réponse à l'effort :

Les hormones de stress font partie des causes majeures suspectées dans l'immunodépression induite par l'effort (Gleeson, 2007; Horohov, 2008; Walsh *et al.*, 2011). Le cortisol est produit en réponse à un stress comme l'exercice via l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (figure (Horohov, 2008)) sous l'influence de l'ACTH, il représente la réponse chronique au stress. Bien qu'il soit nécessaire à la physiologie de l'effort (mobilisation des substrats énergétiques, maintien de la glycémie, propriétés anti-inflammatoires, etc), il exerce également des effets dépressifs sur l'immunité. C'est pourquoi il nous a paru important d'évaluer les variations de cortisol chez les chevaux au cours du protocole. Nos résultats indiquent que l'exercice intensif est associé à une augmentation des concentrations plasmatiques de cortisol. Ces données sont en accord avec d'autres études réalisées chez l'homme et le cheval, la sécrétion de cortisol peut durer plus de 2h avec un pic à 20-30 min post-effort (Malinowski *et al.*, 2004). Dans notre cas, l'augmentation des taux de cortisol après l'effort intensif ponctuel n'a pas eu d'impact sur la production de cytokines par les macrophages alvéolaires. Il semble que les chevaux fassent partie des espèces relativement résistantes aux effets aigus des corticostéroïdes comme le cortisol, une exposition prolongée ou des doses élevées sont nécessaires pour observer des effets sur l'immunité (Horohov, 2008). L'entraînement, même intensif, n'a pas eu d'effet significatif sur la production de cortisol par nos chevaux prélevés au repos, tout comme le montraient les travaux de l'équipe de Raidal en 2001. Les auteurs suspectaient alors un effet chronique du cortisol : l'exposition prolongée à des quantités élevées de cortisol après les sessions d'entraînement successives seraient peut-être à l'origine des effets dépressifs observés sur l'immunité pulmonaire (Raidal *et al.*, 2001). Ce phénomène pourrait également être mis en cause dans notre cas.

Les catécholamines sont produites en réponse à un stress aigu, elles agissent durant quelques minutes et sont à l'origine d'une multitude de modifications physiologiques et immunitaires. Chez la souris, il a été montré que la réalisation d'un exercice à fatigue diminuait l'activité antivirale des macrophages pulmonaires. Les auteurs ont montré une implication des catécholamines sécrétées durant l'exercice dans cette immunodépression antivirale (Kohut *et al.*, 1998a). Dans notre étude, la réalisation d'un effort à fatigue n'a pas

eu de conséquences sur l'immunité antivirale pulmonaire, cependant, on ne peut exclure un effet chronique des efforts répétés induits par l'entraînement.

b) Conditions environnementales :

Il a été montré que les conditions environnementales et le mode d'hébergement des chevaux jouaient un rôle considérable sur le système respiratoire. L'hébergement en stabulation par exemple, modifie les fonctions des macrophages alvéolaires, une augmentation de leurs capacités phagocytaires et du métabolisme oxydatif est constatée (Michelotto *et al.*, 2010). L'augmentation de la charge en allergènes et endotoxines liée aux poussières en suspension dans l'écurie est impliquée. Afin de limiter l'interférence de ce phénomène sur notre protocole expérimental, les chevaux étaient hébergés sur copeaux dépoussiérés pendant la période d'entraînement et nourris avec de l'ensilage d'herbe préfanée. L'écurie était ouverte sur l'extérieur et les chevaux sortaient au paddock la journée. La piste, en façade des boxes, comportait une piste intérieure en terre et une piste extérieure en sable. L'émission de poussière lors du travail était limitée par un climat relativement humide durant la période où les chevaux étaient entraînés et le peu de chevaux entraînés simultanément.

Les variations saisonnières modifient les fonctions métaboliques (glucose, insuline, leptine, etc), ce qui peut influencer l'immunité. Une étude récente a rapporté une augmentation de l'immunité cellulaire (augmentation du nombre de cellules NK, variations des sous-populations de lymphocytes et IFN γ) chez les étalons en période de jours longs (influence possible de la testostérone) (Uner *et al.*, 2013). L'influence saisonnière semble moins importante chez les juments et les hongres. De plus, il semble que le rythme circadien ait également un effet sur l'immunité, avec une efficacité accrue le soir plutôt que le matin (Lancaster *et al.*, 2005). Une autre étude sur l'influence de la saison et de la qualité de l'air chez des Trotteurs a montré une augmentation de l'expression d'Il-6 dans les cellules pulmonaires durant les périodes hivernales, coïncidant avec une neutrophilie dans le LBA (Riihimaki *et al.*, 2008). Les auteurs expliquent l'augmentation d'Il-6 par une modification environnementale (respiration d'air froid en hiver associée aux poussières de l'écurie). L'air froid associé à l'augmentation de la fréquence et de l'amplitude des mouvements respiratoires avec l'effort entraîne une bronchoconstriction réflexe et une atteinte des muqueuses qui peut être à l'origine d'une inflammation. Chez le cheval, il a été montré que l'inhalation d'air froid

durant un exercice modéré entraînait des dommages des muqueuses respiratoires ainsi qu'une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires de type Th2 dans le poumon, reflétant une réponse de type « asthme » (Davis *et al.*, 2005). Notre protocole d'entraînement s'est déroulé de mars à fin juillet, les températures positives ont donc permis d'éviter l'influence de l'air froid sur l'immunité respiratoire. Néanmoins, si un tel protocole devait avoir lieu en période hivernal, ce facteur nécessiterait d'être pris en compte.

c) Etat de surentrainement :

Le surentrainement est un déséquilibre entre le travail demandé et les capacités fonctionnelles de l'organisme. Il se traduit par une baisse de performance, de moral ainsi que des anomalies dans les réponses hormonales et immunitaires (Gleeson, 2007). Il est très peu probable que les chevaux aient été surentraînés dans notre cas car des conditions d'entraînement extrêmes sur de longues périodes sont nécessaires pour voir apparaître les premiers signes du surentrainement (Golland *et al.*, 2003; Padalino *et al.*, 2007).

d) Etat général des chevaux :

L'influence de l'état corporel est controversée, certaines études ont montré une augmentation des cytokines pro-inflammatoires circulantes (TNF α , IL-6, IL-1 β) avec l'augmentation du score d'état corporel (Body Condition Score, BCS), notamment en cas d'obésité (Vick *et al.*, 2007) tandis que d'autres équipes ne font pas de lien entre un score d'état corporel élevé et des modifications des cytokines circulantes (Suagee *et al.*, 2013). Durant le protocole expérimental, l'apport énergétique a été proportionnellement augmenté avec l'intensité de l'entraînement. Ainsi, le poids des chevaux est resté stable pendant la période d'entraînement : 461 ± 37 kg avant l'entraînement à 464 ± 33 kg à la fin de l'entraînement intensif mais a augmenté après la période de désentraînement : 524 ± 34 kg. Le développement des masses musculaires induit par l'entraînement a modifié le physique des chevaux, qui s'est dégradé avec le désentraînement. La prise de poids observée avec le désentraînement a probablement participé à la dégradation des paramètres sportifs lors des tests d'effort par rapport aux chevaux avant l'entraînement (cf figure 42).



Figure 40 : Evolution de l'état général d'un même cheval au cours du protocole expérimental : a) avant l'entraînement, b) après l'entraînement intensif et c) à la fin du désentraînement.

La nutrition elle-même peut également avoir un impact sur les fonctions immunitaires (Gleeson *et al.*, 2004). Le choix d'une complémentation spécifique et adaptée à la charge de travail réalisée par les chevaux est indispensable pour ne pas accentuer les effets immunodépresseurs de l'entraînement sur les fonctions immunes.

e) Autres facteurs :

De nombreux autres paramètres, dépendants de l'individu, peuvent avoir un impact sur les fonctions immunitaires. L'âge fait partie de ces facteurs et aurait une influence sur la production de cytokines pro-inflammatoires ainsi que sur l'expression des TLR (Basu *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2013). Certains auteurs rapportent également un effet de la race qui semblerait plutôt lié aux différences d'entraînement ou d'activité plutôt qu'à la race elle-même (Cywinska *et al.*, 2013; Escribano *et al.*, 2005). Comme indiqué précédemment, le sexe peut avoir un effet sur l'immunité selon la période de l'année, notamment chez les étalons (Uner *et al.*, 2013). Afin de limiter le plus possible les interférences individuelles, il est indispensable de bien homogénéiser le lot de chevaux à étudier (race, âge, corpulence, sexe).

Malgré la standardisation d'un grand nombre de paramètres (entraînement, chevaux, nourriture, conditions de vie, etc), le nombre de facteurs pouvant influencer l'immunité innée est relativement vaste. Il est nécessaire de prendre en compte l'impact possible de ces paramètres lors de l'interprétation des résultats. L'effet de l'entraînement sur les capacités immunes des macrophages alvéolaires est indéniable mais il est très probable que d'autres facteurs « parasites » aient également eu une influence sur nos résultats durant notre protocole.

2.3.5 Problèmes rencontrés et points à améliorer :

Le protocole mis au point pour cette étude incluait la gestion de huit chevaux expérimentaux à l'entraînement et des prélèvements associés. Les problèmes majeurs rencontrés au cours de cette étape étaient liés directement à la gestion de ces chevaux. Durant toute la durée du protocole, leur bien-être et leur santé a été évaluée quotidiennement. Une jument (n°7) a dû être exclue de l'étude en raison de sa dangerosité au travail attelé (cabrés au travail, casse d'un sulky). Elle a été remplacée au début de l'entraînement par une jument de même âge et de même condition physique, appartenant au propriétaire de l'écurie. Le protocole d'entraînement de quelques autres chevaux a dû être temporairement interrompu (1 à 2 jours) en raison de blessures sans gravité (atteintes, plaies). Une jument (n°1) a nécessité un traitement oculaire durant le protocole (ulcère cornéen) ne l'empêchant pas de s'entraîner puis une chirurgie de la mandibule (ostéite) qui a nécessité une interruption de son entraînement durant environ un mois. En cours de protocole, une autre jument (n°5) a refusé de faire ses tests sur tapis roulant, les prélèvements post-effort de fin d'entraînement et de désentraînement n'ont donc pas pu être réalisés et une fracture de fatigue a été suspectée en fin de protocole. Le test d'effort de fin de désentraînement du cheval n°2 n'a pas non plus pu être réalisé en raison d'une arthrite du boulet.

Au départ, nous avons fait le choix de huit chevaux afin d'avoir au moins 6 chevaux pouvant être prélevés pour chaque étape. Après cette expérience, il semblerait préférable pour des protocoles futurs de sélectionner au minimum 10 chevaux.

Durant le protocole, seule l'évolution positive du temps à fatigue au cours de l'entraînement et sa dégradation après le désentraînement nous a permis d'affirmer que les performances des chevaux avaient été améliorées par notre protocole d'entraînement. Pour un protocole futur, des améliorations s'avèreraient nécessaires pour ne pas être confrontés à nouveau aux problèmes que nous avons rencontrés :

- le recrutement des chevaux devra être plus sélectif et les investigations locomotrices devront être plus approfondies afin d'éviter l'apparition

d'irrégularités au cours de l'entraînement qui ont pu avoir une influence négative sur l'évolution des paramètres sportifs.

- lors des tests d'effort sur tapis roulant, la vitesse du 1^{er} palier d'effort pourrait être diminuée afin que la concentration en lactates sanguins soit en dessous de 4 mmol/L en fin de palier, ceci pour ne pas avoir à extrapoler la valeur de V_{La4} pour des chevaux ayant de faibles performances.
- des tests d'effort sur piste pourraient être envisagés également, en complément des tests sur tapis roulant, afin d'évaluer les paramètres sportifs en conditions réelles de terrain et s'affranchir du contexte émotionnel lié au tapis qui peut avoir une influence négative sur les paramètres sportifs.
- la mesure de VO_2max pourrait être un paramètre complémentaire intéressant pour évaluer l'effet de l'entraînement.

L'exploitation du ligand des TLR 9, le CpG, utilisé au cours de notre étude a donné des résultats plutôt inattendus. En effet, alors que le CpG est censé induire la production des cytokines $IFN\beta$ et $TNF\alpha$, nos résultats indiquent une diminution de la production d' $IFN\beta$ et une absence d'induction de $TNF\alpha$ par rapport aux cellules non stimulées. Aucun effet de l'entraînement n'est observé contrairement aux autres ligands. Ces résultats peuvent s'expliquer en partie par le fait que le TLR 9 ne semble pas être exprimé par les macrophages alvéolaires (cf étude expérimentale n°1), de plus son expression n'est pas modifiée par l'effort ou l'entraînement. Néanmoins, ceci n'explique pas pourquoi la production d' $IFN\beta$ est diminuée tandis que le $TNF\alpha$ est augmenté. On peut se demander si le motif CpG utilisé dans notre étude ne serait pas capable d'activer une autre voie de signalisation.

Différents motifs de CpG existent avec des efficacités variables d'une espèce à l'autre (Bauer *et al.*, 2001; Klier *et al.*, 2011). Peut-être que d'autres motifs CpG seraient plus efficaces que celui que nous avons utilisé. Le test de différents motifs s'avérerait nécessaire pour évaluer la réponse du TLR 9 dans les macrophages alvéolaires équins.

2.4 Conclusion de la seconde étude :

L'hypothèse de départ était que l'exercice intensif ponctuel et l'entraînement auraient un effet dépresseur sur les capacités immunitaires innées des macrophages alvéolaires. Cette étude du suivi longitudinal de l'immunité innée pulmonaire de 8 chevaux, en conditions standardisées, a permis de mettre en évidence que l'effort ponctuel intensif n'avait pas les effets modulateurs attendus tandis que l'entraînement avait un effet dépresseur à long terme sur l'immunité innée respiratoire. Les populations cellulaires pulmonaires, la production de cytokines et l'expression de certains TLR par les macrophages alvéolaires sont modifiées par l'entraînement, induisant une immunosuppression anti-virale et anti-bactérienne.

Les résultats obtenus grâce à cette étude longitudinale suggèrent qu'une immunodépression pourrait, au moins en partie, expliquer la plus grande sensibilité du système respiratoire des chevaux en période d'entraînement.

3 ETUDE DE TERRAIN : EXPLORATION DU LIEN ENTRE INFLAMMATION ET IMMUNITE INNEE

Cette dernière partie consistait à évaluer, en conditions de terrain, la réponse immune non spécifique pulmonaire de chevaux présentant les symptômes de l'IAD. L'hypothèse était : les chevaux de course atteints d'inflammation des petites voies respiratoires présentent une réponse immune pulmonaire inadaptée, probablement exagérée face aux agressions du système respiratoire profond. Pour vérifier cette hypothèse, la réponse immunitaire innée pulmonaire de chevaux Trotteurs Français en conditions de terrain, à l'entraînement, et souffrant d'affections respiratoires, a été étudiée à l'aide du modèle expérimental mis au point au cours de la première étape.

Les résultats issus de cette étude n'ont pas fait l'objet d'une publication en raison d'un nombre de chevaux trop restreint. A ce titre, l'ensemble des résultats sera détaillé dans cette partie.

3.1 Matériel et méthode :

3.1.1 Sélection des chevaux :

Dix-sept Trotteurs Français à l'entraînement, référés au CIRALE pour un bilan de santé, ont été inclus dans l'étude. Les motifs de consultation étaient : bilan de santé, check-up, contre-performance (non locomotrice), toux, jetage, de l'essoufflement et la présence de mucus trachéal à l'endoscopie. Un bilan respiratoire au repos a été réalisé, incluant une anamnèse détaillée, un examen clinique complet, une endoscopie des voies respiratoires sous sédation et des prélèvements respiratoires (lavage trachéal, LT et lavage broncho-alvéolaire, LBA). Des analyses cytologiques sur le LT et le LBA, et des analyses microbiologiques sur le LT ont été effectuées (culture pour recherche bactériologique et PCR pour recherche virologique des EHV de type 1, 2, 4, 5 et des rhinovirus de type A et B).

3.1.2 Evaluation de la réponse immunitaire innée des macrophages alvéolaires :

Les macrophages alvéolaires des LBA ont été isolés et stimulés avec des ligands de TLR et les cytokines produites ont été dosées selon le protocole précédemment décrit.

L'expression relative des TLR 2, 3, 4 et 6 des macrophages alvéolaires a été évaluée par PCR par rapport à l'expression des TLR dans le muscle (fixé artificiellement à 1, non représentés dans le graphe).

3.1.3 Analyses des données :

Les données concernant les dosages des cytokines sont exprimées par la moyenne \pm erreur standard à la moyenne. Les statistiques ont été réalisées avec GraphPad Prism, en utilisant une analyse de variance à deux facteurs (valeurs de $p < 0.05$ considérées significatives). Les données issues de l'expression relative des TLR ont été analysées avec le logiciel GraphPad Prism en utilisant une analyse de variance à un facteur.

3.2 Résultats :

3.2.1 Répartition des groupes :

Le détail des résultats obtenus pour chaque groupe et chaque cheval est détaillé de façon plus approfondie dans le tableau disponible en annexe 4.

Les résultats d'analyse des prélèvements respiratoires nous ont permis de répartir les chevaux en trois groupes, selon les critères précisés dans le consensus sur l'IAD (Couetil *et al.*, 2007) :

- ***Les chevaux sains*** (n=6) dont le LBA contenait : $< 5\%$ de neutrophiles, $< 2\%$ de mastocytes et $< 0,1\%$ d'éosinophiles. Ces chevaux ont été qualifiés de sains après confirmation de l'absence d'inflammation au niveau des voies respiratoires profondes.

- **Les chevaux souffrant d'IAD** (n=8) dont la cytologie de LBA rapportait >5% de neutrophiles et/ou >2% de mastocytes et/ou >0,1% d'éosinophiles,
- **Les chevaux souffrant d'une infection bactérienne** (n=3) pour lesquels des germes considérés pathogènes ont été isolés dans le LT avec un dénombrement supérieur à 20 000/ml (*Streptococcus zooepidemicus* à 1 million/ml et 14 millions/ml, *Actinobacillus haemolyticus* à 70 000/ml). La détection d'une infection bactérienne exclut ces chevaux du groupe IAD malgré la présence d'une neutrophilie relevée dans le LBA (selon les critères d'inclusion du consensus).

Les 3 groupes sont constitués de jeunes chevaux : en moyenne 3,7+/-1 ans chez les sains, 3,6+/-1,7 ans chez les IAD et 3+/-0 ans chez les infectieux. Les signes cliniques observés chez les IAD étaient discrets alors qu'ils étaient plus marqués chez les chevaux souffrant d'infection bactérienne (jetage séro-muqueux à muco-purulent chez les 3 chevaux, toux à l'auscultation au sac chez 2 chevaux sur 3).

L'endoscopie des voies respiratoires a permis de grader l'hyperplasie lymphoïde folliculaire, ou pharyngite, qui était équivalente dans les 3 groupes (2,2/4 chez les sains, 2,1/4 chez les IAD et 2,3/4 chez les infectieux). Par contre, le score de mucus trachéal était plus élevé chez les chevaux infectieux (en moyenne 3/5) et les chevaux IAD (2,4/5) que chez les chevaux sains (0,7/5).

3.2.2 Prélèvements respiratoires :

Les analyses cytologiques des LBA montraient une neutrophilie moyenne plus élevée chez les infectieux (15,1%) et chez les IAD (8,1%), par rapport aux sains (2,3%). Cette différence s'observe également dans le LT malgré une grande variabilité au sein de chaque groupe (en moyenne 89,3% de neutrophiles chez les infectieux, 61,8% chez les IAD et 36,8% chez les sains). Des éosinophiles ont également été observés dans les LBA de 3 chevaux IAD (en moyenne 0,6% sur les 6 IAD).

Les résultats des analyses bactériologiques ont révélé 1 cas positif dans le groupe sain, résultat considéré comme non significatif (en raison de l'absence de neutrophilie dans le LBA et dans le LT, ainsi que du dénombrement de la bactérie à moins de 10 000/mL), et 3 résultats

positifs dans le groupe des IAD, résultats considérés comme non significatifs car rapportant la présence de germes commensaux (contamination du prélèvement).

Les résultats des analyses virologiques révélèrent la présence de virus chez 3 sujets des 6 chevaux sains (pour EHV-2, 5 ou rhinovirus B), chez 5 sujets des 8 chevaux IAD (pour EHV-2, 4 ou 5) et sur tous les sujets du groupe infectieux (pour EHV-2 ou 5).

3.2.3 Réponse immunitaire des macrophages alvéolaires *ex vivo* :

La figure 40 compare la production de TNF α et d'IFN β par les macrophages alvéolaires chez les chevaux sains, IAD ou souffrant d'une infection bactérienne respiratoire.

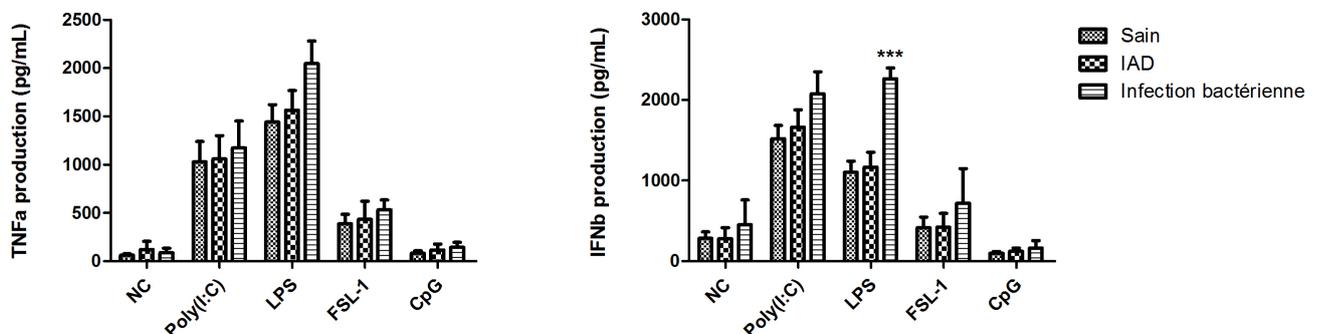


Figure 41 : Comparaison des productions de TNF α et d'IFN β par les macrophages alvéolaires stimulés *ex vivo* prélevés sur des chevaux sains, atteints d'IAD ou d'infection bactérienne. NC = cellules non stimulées. *** représente une différence significative ($p < 0.001$) avec les chevaux sains.

Les productions basales d'IFN β et de TNF α par les macrophages alvéolaires non stimulés sont inchangés quel que soit le groupe. On observe une tendance à l'augmentation de la sécrétion de cytokines par les macrophages alvéolaires stimulés de chevaux souffrant d'infection bactérienne mais cette observation n'est significative que pour la production d'IFN β en réponse à la stimulation du TLR 4. Aucune différence significative n'est constatée entre le groupe sain et le groupe atteint d'IAD.

3.2.4 Expression des TLR par les macrophages alvéolaires :

La figure 41 représente l'expression relative des TLR d'intérêt par les macrophages alvéolaires issus des différents groupes.

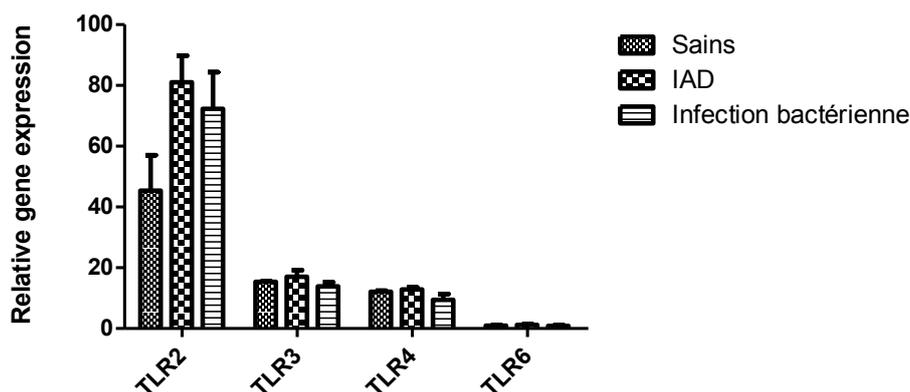


Figure 42 : Expression relative des TLR 2, 3, 4 et 6 par les macrophages alvéolaires de chevaux sains, atteints d'IAD ou d'infection bactérienne.

Les résultats indiquent que l'expression relative des TLR par les macrophages alvéolaires des chevaux atteints d'IAD ou d'infections bactériennes n'est pas significativement différente de celle des chevaux sains. Une tendance à l'augmentation du TLR 2 est mise en évidence chez les chevaux souffrant d'IAD et d'infection bactérienne par rapport aux chevaux sains, bien que non significative.

3.3 Discussion :

L'IAD est un syndrome qui reste encore mal défini, dont l'étiopathogénie est imprécise. A la différence de la RAO (Recurrent Airway Obstruction), elle affecte surtout les chevaux jeunes, soumis à des entraînements et des compétitions de façon régulière. Le but de cette étude était d'explorer *ex vivo* la réponse immunitaire des macrophages alvéolaires de chevaux de terrain à l'entraînement souffrant d'IAD.

3.3.1 Sélection des chevaux :

Les signes cliniques de l'IAD sont souvent subtils et peu spécifiques (contre-performance +/- toux +/- excès de mucus trachéal), ce qui fut également le cas dans notre étude. Le diagnostic de l'IAD est réalisé grâce à l'analyse cytologique du LBA qui révèle des signes d'inflammation (Couetil *et al.*, 2007; Richard *et al.*, 2010a). Cette inflammation est habituellement non septique, même si certains chevaux IAD peuvent présenter des résultats bactériologiques positifs sans signes cliniques généraux. Dans notre étude, nous avons choisi

de ne pas inclure dans le groupe IAD les trois chevaux pour lesquels des bactéries réputées pathogènes et présentes en grande quantité ont été isolées, car ils présentaient des signes cliniques évidents (jetage séro-muqueux à muco-purulent, toux), associés à des neutrophilies élevées dans le LBA et le LT.

Concernant les analyses virologiques, les données récoltées ne nous permettent pas d'établir un lien entre l'IAD et les virus recherchés, comme le constatent également d'autres équipes (Fortier *et al.*, 2009; Richard *et al.*, 2010a; Wood *et al.*, 2005a). Dans notre étude, des résultats positifs pour EHV-2 et 5 ont été observés dans les 3 groupes. Des analyses sur un plus grand nombre de chevaux seraient nécessaires pour préciser le rôle des virus dans les inflammations respiratoires profondes. Récemment, une équipe a montré un lien entre la détection de l'EHV-2 et l'apparition d'un syndrome d'inflammation trachéale (augmentation des neutrophiles dans le LT) mais sans lien significatif avec la neutrophilie du LBA (Fortier *et al.*, 2013). De façon générale, on distingue l'inflammation trachéale de l'inflammation pulmonaire, la relation entre les deux n'est pas clarifiée et des divergences existent : une neutrophilie élevée dans le LT n'est pas synonyme d'inflammation dans le poumon (Malikides *et al.*, 2003; Richard *et al.*, 2010a). Dans notre cas, une neutrophilie plus élevée était constatée chez les chevaux souffrant d'IAD et d'infection bactérienne mais des neutrophilies supérieures à 20% étaient également observées chez certains chevaux sains.

3.3.2 Réponse immunitaire des macrophages alvéolaires :

Les résultats immunologiques révélèrent l'absence de différence significative entre les 3 groupes pour la production basale de cytokines *ex vivo*, suggérant qu'aucune immunosuppression ou réponse excessive des macrophages alvéolaires ne distingue les chevaux malades des chevaux sains.

Concernant la réponse des cellules face aux ligands de TLR seule une augmentation de la production d'IFN β par les macrophages alvéolaires stimulés au LPS a pu être détectée chez les chevaux souffrant d'infections bactériennes, ainsi qu'une tendance à l'augmentation de TNF α , bien que non significative. Cette augmentation de réponse aux LPS pourrait être une conséquence de l'infection bactérienne. D'autres études rapportent une augmentation de l'expression des TLR 2 et 4 des macrophages alvéolaires de porc ou des monocytes équins en réponse à la stimulation au LPS (Islam *et al.*, 2012a; Kwon *et al.*, 2010). Dans notre cas, seule une tendance à l'augmentation de l'expression du TLR 2 est constatée (pas de modification de

l'expression du TLR 4). L'augmentation de la production de cytokines par les macrophages alvéolaires stimulés au LPS pourrait être le reflet d'une « sensibilisation » des macrophages alvéolaires aux mimétiques bactériens due à la présence de bactéries dans les voies aériennes. Dans ce sens, une étude sur des chevaux prédisposés à la RAO a montré une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (dont TNF α) par les macrophages alvéolaires après un challenge avec des allergènes ou des antigènes pro-inflammatoires (Laan *et al.*, 2006). Cependant, il faut rester très prudent quant à l'interprétation de nos résultats en raison du nombre limité de chevaux inclus dans notre étude.

L'exploration de la réponse des macrophages alvéolaires issus de chevaux IAD n'a pas permis de montrer de différence significative par rapport aux chevaux sains dans notre étude. Cependant, plusieurs facteurs pouvant interférer avec nos résultats doivent être pris en compte :

- tout d'abord, les cas d'IAD rencontrés sont peu sévères et peut-être insuffisamment sévères pour pouvoir observer des différences sur nos marqueurs par rapport à des chevaux sains. De plus, ils regroupent des profils neutrophiliques purs (5 sur 8 avec 8,1% de neutrophiles en moyenne) et des profils éosinophiliques +/- neutrophiliques (3 sur 8). Des différences dans la physiopathologie des profils d'IAD ont déjà été décrits (Beekman *et al.*, 2012; Lavoie *et al.*, 2011) et représentent un facteur de variabilité dans notre étude.
- Le nombre réduit de chevaux est également une limite.
- Le niveau d'entraînement des chevaux n'était pas homogène, les conditions de vie des chevaux d'une écurie à l'autre sont différentes. La standardisation de ces facteurs est impossible sur des chevaux de terrain, contrairement à des chevaux expérimentaux et constitue une grande part de variabilité dans notre protocole, ce qui peut fausser les résultats. Ce phénomène pourrait être atténué par l'étude de plus grands effectifs.

Les résultats issus de la bibliographie concernant le profil cytokinique de l'IAD sont également différents d'une étude à l'autre et reflètent une variabilité importante, de par les chevaux et l'étiologie de la maladie elle-même. Certaines études observent une augmentation

de l'expression de cytokines pro-inflammatoires dont TNF α par les cellules pulmonaires de chevaux atteints d'IAD, retrouvée également chez des chevaux RAO et reflétant une stimulation inadaptée de l'immunité innée (Hughes *et al.*, 2011; Lavoie, 2011; Lavoie *et al.*, 2011). En général, les études s'intéressent surtout à la polarisation de la réponse des lymphocytes des chevaux atteints d'IAD en mesurant l'expression des cytokines telles que IFN γ et Il-4, avec des résultats également controversés et des différences selon le profil d'IAD étudié (Beekman *et al.*, 2012; Hughes *et al.*, 2011; Lavoie *et al.*, 2011).

Chez des chevaux RAO, il a été montré une augmentation de la quantité d'ARNm codant pour le TLR 4 dans les cellules épithéliales bronchiques, TLR capable de reconnaître les endotoxines présentes dans les poussières des écuries. L'augmentation du TLR 4 induirait une production d'Il-8, responsable de l'influx de neutrophiles et de la réaction inflammatoire exagérée face aux poussières (Berndt *et al.*, 2007). L'analyse de l'expression des TLR dans les macrophages alvéolaires de chevaux atteints d'IAD ne montre aucune différence significative par rapport à des chevaux sains. Seule une tendance à l'augmentation de l'expression du TLR 2 peut être soulignée sans conséquence sur la production de cytokines induite par la stimulation de ce même TLR.

Contrairement à ce qui était supposé, les chevaux IAD ne semblent pas présenter de réponse immune pulmonaire exagérée par rapport à des chevaux sains, ni de dépression marquée. Il ne faut cependant pas exclure l'hypothèse que les marqueurs ou le modèle utilisés dans notre protocole ne soient pas adaptés pour la détection des modifications précoces induites par l'apparition de l'IAD. Ainsi, de façon complémentaire, il pourrait être intéressant de pouvoir doser directement les cytokines sécrétées dans le poumon, permettant de s'affranchir de l'influence des traitements de laboratoire sur la production de cytokines par les cellules. Cette méthode pourrait être envisagée mais elle soulève de nombreuses difficultés : problème de dilution du fluide épithélial pulmonaire dans le LBA, répétabilité des LBA en fonction du cheval, sensibilité des kits ELISA. Certaines études ont investigué la quantification des cytokines directement dans le fluide du LBA, utilisant diverses méthodes :

- concentration du fluide du LBA de 10 à 40 fois à l'aide de kits de concentration avant ELISA (Desjardins *et al.*, 2004).
- détermination du facteur de dilution du LBA par l'évaluation du rapport de concentration entre urée sanguin et urée pulmonaire (Perkins *et al.*, 2008).

La quantification directe des cytokines produites dans le fluide pulmonaire des chevaux atteints d'IAD par rapport à des chevaux sains pourrait apporter des informations intéressantes.

3.3.3 Problèmes rencontrés et points à améliorer :

Comme discuté précédemment, le nombre réduit de chevaux dans chaque groupe ainsi que leur variabilité (entraînement, conditions de vie) constituent la limite principale de l'étude.

Les prélèvements respiratoires du LBA ont été effectués à l'aveugle. Malgré le fait que le LBA soit censé représenter l'entièreté du poumon (Richard *et al.*, 2010a), une étude récente constate des différences entre les prélèvements effectués dans le poumon droit ou le poumon gauche, avec un diagnostic d'inflammation plus fréquent lorsque le poumon droit était prélevé (Depecker *et al.*, 2013). Bien que le poumon droit soit naturellement prélevé dans la majorité des LBA à l'aveugle, il est possible que le nombre de chevaux atteints d'IAD ait été sous-diagnostiqué. De plus, l'utilisation de volumes importants (420 mL) pour réaliser les LBA a tendance à diluer les neutrophiles (Courouce-Malblanc, 2008; Sweeney *et al.*, 1992).

Des études complémentaires sur des effectifs de chevaux plus importants seraient nécessaires pour pouvoir tirer des conclusions définitives.

3.4 Conclusion de la troisième étude :

L'objectif de cette étude était d'évaluer la réponse immune non spécifique pulmonaire de chevaux en conditions de terrain présentant les symptômes de l'IAD, à l'aide du modèle expérimental mis au point dans la première étape. L'hypothèse de départ était que les chevaux de course atteints d'inflammation des petites voies respiratoires présenteraient une réponse immune pulmonaire inadaptée, probablement exagérée face aux agresseurs.

La réalisation de ces travaux a permis de montrer que, contrairement à notre hypothèse, la réponse des macrophages alvéolaires de chevaux atteints d'IAD n'est pas différente de celle de chevaux sains pour les marqueurs utilisés dans notre modèle expérimental. A l'opposé, la réponse des macrophages alvéolaires de chevaux atteints

d'infection bactérienne est augmentée en réponse à la stimulation du TLR 4. Cependant, le faible nombre de chevaux inclus dans notre étude nous oblige à rester prudents quant à l'interprétation de ces résultats.

CONCLUSION GENERALE

La question de savoir si l'activité physique influence ou non la fonction immunitaire reste encore peu élucidée, tant chez l'homme que chez le cheval. L'effort renforce-t-il ou affaiblit-il l'immunité ? Les réponses sont-elles différentes en fonction de l'intensité et/ou la durée de l'effort ? Ces réponses sont-elles transitoires ou existe-t-il des adaptations durables résultant de l'entraînement ? Ces éventuelles modifications induites par l'effort ont-elles ou non une réelle signification clinique ? Enfin, la difficile question de savoir si le phénomène de surentrainement s'accompagne chez le cheval comme chez l'homme, d'une dépression immunitaire durable mériterait également d'être soulevée.

Sur le plan épidémiologique, une susceptibilité marquée des athlètes équins aux problèmes respiratoires est clairement établie. Ces problèmes peuvent être de type infectieux aigus (viroses respiratoires à influenza, EHV ou autres virus), inflammatoire chronique (IAD), liés aux hémorragies pulmonaires ou encore, de type inflammatoire et allergique (RAO) chez des chevaux plus âgés. Outre les problèmes infectieux, on sait que les jeunes chevaux de sport, notamment de course, souffrent d'inflammation chronique des petites voies aériennes (IAD), inflammation dont l'origine et les mécanismes impliqués restent toujours inconnus. On est en droit de se demander si cette inflammation chronique, fréquemment accompagnée de surinfections bactériennes et/ou mycosiques, n'est pas également liée à une réponse immunitaire inappropriée chez ces chevaux.

Les recherches menées au cours des trente dernières années n'ont pas apporté de réponse définitive à ces questions, et de nombreuses questions subsistent. C'est dans ce contexte que le présent travail a été imaginé et que les protocoles expérimentaux ont été élaborés. Notre choix s'est porté sur l'étude de l'immunité non spécifique pulmonaire, par le biais de l'étude des récepteurs Toll-like des macrophages alvéolaires. Ces travaux ont été effectués selon trois étapes :

- la mise au point d'un modèle expérimental qui permettrait d'évaluer l'immunité non spécifique pulmonaire du cheval.
- l'étude, grâce à ce modèle, de l'impact de l'effort ponctuel et de l'entraînement sur les fonctions immunitaires innées pulmonaires du cheval, en conditions standardisées.

- enfin, l'évaluation de la réponse immune non spécifique pulmonaire de chevaux de course, en conditions de terrain présentant les symptômes de l'IAD.

La réalisation de ce travail de thèse a ainsi permis d'établir un modèle d'étude de la réponse immunitaire des macrophages alvéolaires *ex vivo* chez le cheval. Ce modèle expérimental implique la réalisation d'un LBA, l'isolation et la mise en culture des macrophages alvéolaires ainsi que l'évaluation de leur réponse immune contre des pathogènes synthétiques, ligands des TLR. Cette méthode est facile à mettre en place et pourrait être utilisée dans de nombreuses conditions physiologiques ou physiopathologiques nécessitant d'évaluer la réponse immunitaire innée pulmonaire.

La seconde partie du travail, portant sur les effets de l'effort et de l'entraînement, a été réalisée en conditions standardisées (chevaux, hébergement et nourriture, travail et entraînement). En contrôlant au maximum les facteurs extérieurs pouvant induire des différences individuelles et influencer les paramètres immunitaires, nous avons mis toutes les chances de notre côté pour isoler et identifier les effets de l'effort et de l'entraînement. De façon globale, les résultats obtenus suggèrent qu'il existe une immunosuppression anti-virale et anti-bactérienne induite par l'entraînement, pouvant expliquer partiellement la plus grande susceptibilité des chevaux de course aux affections respiratoires en période d'entraînement. En effet, la production basale de TNF α et d'IFN β par les macrophages alvéolaires est diminuée durablement par l'entraînement. L'expression du TLR 3, impliqué dans la reconnaissance virale, est également diminuée. La production de cytokines par les macrophages alvéolaires stimulés par les ligands des TLR 3 et 2/6 est fortement modifiée par rapport à celles des mêmes chevaux, avant l'entraînement.

A l'opposé, et contrairement à ce qui est généralement observé chez l'homme, l'impact de l'effort intensif ponctuel sur l'immunité innée pulmonaire semble moins important chez le cheval, du moins au travers des paramètres qui avaient été sélectionnés pour réaliser cette étude. Il convient néanmoins de nuancer ces conclusions en rappelant que :

- les techniques utilisées lors de nos études se focalisaient sur les récepteurs Toll-Like des macrophages alvéolaires, qui ne sont qu'un maillon dans cet écheveau extrêmement complexe que représentent les différentes étapes des réactions immunitaires. Ainsi, d'autres études portant sur des fonctions différentes de l'immunité non spécifique (capacité

phagocytaire, réponse oxydative, etc) rapportent parfois des résultats contradictoires avec les nôtres.

- nous avons étudié un certain type de chevaux, réalisant une discipline spécifique, et dès lors, ces résultats ne sont sans doute pas transposables à l'ensemble des disciplines sportives chez le cheval.

L'étude de terrain a été compliquée par la diversité des origines et des caractéristiques des chevaux qui nous ont été présentés, rendant les critères d'inclusion dans chacun des groupes parfois difficiles à sélectionner. De plus, le phénotype du cheval souffrant d'IAD ne fait pas toujours l'unanimité dans la littérature. Malgré le petit nombre de chevaux finalement inclus dans les statistiques, ce travail a néanmoins permis de réaliser deux observations intéressantes :

- la première est que, contrairement à l'hypothèse de départ que nous avons émise, les chevaux souffrant d'IAD ne présentent pas de dépression ou de réaction exagérée sur le plan immunitaire, du moins au niveau des macrophages alvéolaires. En effet, la réponse des macrophages alvéolaires basale et en réponse à la stimulation des TLR n'est pas significativement différente de celle des chevaux sains.
- deuxièmement, les chevaux souffrant d'infections bactériennes présentent des modifications immunitaires significatives (augmentation de la production de cytokines par les macrophages alvéolaires par rapport aux chevaux sains), dont il est difficile pour l'instant de dire si elles sont la cause ou la conséquence.

A nouveau, ces résultats doivent être considérés en gardant à l'esprit qu'un seul maillon de l'immunité innée a été étudié. En outre, il n'est pas évident de conclure sur les conséquences cliniques réelles des résultats que nous avons ainsi obtenus.

En conclusion, ce travail a apporté une pierre à l'édifice encore inachevé des connaissances en matière d'immunologie du cheval de course et de sport. Des protocoles complémentaires devront prolonger ces recherches afin de confirmer les résultats obtenus avec d'autres paramètres de l'immunité, d'autres types de chevaux et d'autres types d'effort et d'entraînement.

PERSPECTIVES

La mise en évidence des effets dépresseurs de l'entraînement sur les fonctions de l'immunité innée soulève la question de l'intérêt de l'utilisation de molécules immunostimulatrices.

La stimulation des cellules de l'immunité innée est déjà employée dans de nombreuses situations thérapeutiques ; des ligands de TLR sont d'ailleurs utilisés en tant qu'adjuvants de vaccins. Administrés conjointement avec un antigène, ils vont stimuler le système immunitaire afin de renforcer les effets du vaccin. Ces propriétés immunostimulatrices concernent notamment les ligands des TLR 3 et 7/8. On retrouve des adjuvants tels que le Poly(I:C), l'acide lipotéichoïque (LTA), CL097 (ligand des TLR 7/8) (Zhang *et al.*, 2013).

Le CpG, agoniste du TLR 9, possède un potentiel thérapeutique en modulant l'éosinophilie et l'asthme chez la souris *via* l'induction d'une réponse Th1 (effet protecteur contre l'inflammation allergique) (Basu *et al.*, 2004). Cette molécule immunomodulatrice a été testée par nébulisation pour ses capacités thérapeutiques chez le cheval poussif (considéré comme l'équivalent de l'asthme chez l'homme) (Klier *et al.*, 2012). Préalablement, 5 ODN (oligodeoxynucléotide) avaient été testés par l'équipe (Klier *et al.*, 2011), un CpG de classe A ayant été sélectionné pour sa capacité à induire des cytokines anti-allergiques *in vitro*. *In vivo*, la nébulisation du CpG a induit une bascule d'une réponse Th2 vers Th1 (augmentation d'IL-10 et IFN γ , diminution d'IL-4) ainsi qu'une diminution du taux de neutrophiles trachéaux, uniquement chez des chevaux RAO.

Dans le cas des effets immunodépresseurs de l'entraînement mis en évidence dans notre étude, des agonistes du TLR 4 pourraient être envisageables. La stimulation du TLR 3 est sans fondement en raison de la diminution de son expression en réponse à l'entraînement. Parmi les molécules intéressantes, le LPS, administré à des animaux confère une résistance non-spécifique contre des challenges avec plusieurs variétés de bactéries ou de virus (Alderson *et al.*, 2006). Cependant sa toxicité l'exclut d'une utilisation thérapeutique en routine clinique. En revanche, le Monophosphoryl lipid A (MPL) est un dérivé non toxique, apyrogène du LPS de *Salmonella minnesota*, qui pourrait être utilisé à des fins thérapeutiques. Il entre déjà dans la composition d'un vaccin contre l'hépatite B en Europe et est en cours de test pour entrer dans la composition d'autres vaccins. Chez la souris, la pré-administration d'un mimétique de MPL (le CRX-527) a permis une protection des souris contre un challenge léthal avec 2 virus respiratoires (influenza et le RSV, Respiratory Syncytial Virus). De plus, la production d'IFN β induite serait comparable à celle obtenue par la stimulation du TLR 3 avec

le Poly(I:C) sur des monocytes humains, tandis que la production de cytokines pro-inflammatoires serait moindre qu'avec le LPS (Alderson *et al.*, 2006).

Chez le cheval, la nébulisation de MPL seul pourrait conférer une résistance contre les risques bactériens et viraux chez les chevaux débutant l'entraînement, notamment en rehaussant les niveaux d'IFN β et TNF α de base *via* la stimulation du TLR 4. Dans ce sens, il a été montré chez la souris que l'administration intra-nasale d'agonistes du TLR 4 était efficace localement et réduisait les problèmes liés à une administration systémique. On pourrait imaginer des vaccinations administrées par les voies aériennes, combinant l'antigène avec un agoniste du TLR 4 afin de bénéficier de la résistance non spécifique locale et de la protection à long-terme *via* l'immunité cellulaire (Alderson *et al.*, 2006). Ainsi, il serait intéressant, dans des études futures, d'évaluer dans un premier temps l'efficacité du MPL *in vivo* sur un lot de chevaux expérimentaux entraînés. Suite à la nébulisation de MPL, les macrophages alvéolaires pourraient être prélevés et leur réponse testée selon le protocole préalablement établi. Il suffirait alors de comparer la réponse des macrophages alvéolaires avant et après nébulisation pour en évaluer l'effet immunostimulateur. Dans le cas d'un effet intéressant, la durée d'action devra également être évaluée afin de définir un protocole de nébulisation adapté.

Le projet IMOPEQ (Immono-MOdulation Pulmonaire EQUine), au sein de notre laboratoire, travaille actuellement à la mise au point d'une molécule immunostimulatrice pouvant être utilisée pour moduler la réponse immunitaire innée pulmonaire des chevaux à l'entraînement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbal M (2013). Innate immunity is an essential partner of adaptative immunity. *Rev. Fr. Allergol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.reval.2013.03.002>.

Ainsworth DM (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. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **91**: 61-71.

Ainsworth DM (2009). Effects of in vitro exposure to hay dust on expression of interleukin-23, -17, -8, and -1 β and chemokine (C-X-C motif) ligand 2 by pulmonary mononuclear cells from horses susceptible to recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.* **70**(10): 1277-1283.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**(4): 783-801.

Alderson MR, McGowan P, Baldrige JR, Probst P (2006). TLR4 agonists as immunomodulatory agents. *J. Endotox. Res.* **12**(5): 313-319.

Allen CA, Payne SL, Harville M, Cohen N, Russell KE (2007). Validation of quantitative polymerase chain reaction assays for measuring cytokine expression in equine macrophages. *J. Immunol. Methods* **328**(1-2): 59-69.

Astakhova NM, Perelygin AA, Zharkikh AA, Lear TL, Coleman SJ, MacLeod JN, *et al.* (2009). Characterization of equine and other vertebrate TLR3, TLR7, and TLR8 genes. *Immunogenetics* **61**(7): 529-539.

Basu S, Fenton MJ (2004). Toll-like receptors: function and roles in lung disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **286**(5): L887-892.

Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, *et al.* (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**(16): 9237-9242.

Beavers KM, Brinkley TE, Nicklas BJ (2010). Effect of exercise training on chronic inflammation. *Clin. Chim. Acta* **411**(11-12): 785-793.

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.

Beekman L, Tohver T, Leguillette R (2012). Comparison of cytokine mRNA expression in the bronchoalveolar lavage fluid of horses with inflammatory airway disease and bronchoalveolar lavage mastocytosis or neutrophilia using REST software analysis. *J. Vet. Intern. Med.* **26**(1): 153-161.

Berndt A, Derksen FJ, Venta PJ, Ewart S, Yuzbasiyan-Gurkan V, Robinson NE (2007). Elevated amount of Toll-like receptor 4 mRNA in bronchial epithelial cells is associated with

airway inflammation in horses with recurrent airway obstruction. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **292**(4): L936-943.

Billiau A (2006). Anti-inflammatory properties of Type I interferons. *Antiviral Res.* **71**(2-3): 108-116.

Bonin CP, Baccarin RY, Nostell K, Nahum LA, Fossum C, de Camargo MM (2013). Lipopolysaccharide-induced inhibition of transcription of tlr4 in vitro is reversed by dexamethasone and correlates with presence of conserved NFkappaB binding sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.02.002>.

Burrell MH, Wood JL, Whitwell KE, Chanter N, Mackintosh ME, Mumford JA (1996). Respiratory disease in thoroughbred horses in training: the relationships between disease and viruses, bacteria and environment. *Vet. Rec.* **139**(13): 308-313.

Campbell EH (2011). Lactate-driven equine conditioning programmes. *Vet. J.* **190**(2): 199-207.

Cappelli K, Felicetti M, Capomaccio S, Spinsanti G, Silvestrelli M, Supplizi AV (2008). Exercise induced stress in horses: selection of the most stable reference genes for quantitative RT-PCR normalization. *BMC molecular biology* **9**: 49.

Cardwell JM, Wood JL, Smith KC, Newton JR (2011). Descriptive results from a longitudinal study of airway inflammation in British National Hunt racehorses. *Equine Vet. J.* **43**(6): 750-755.

Carlson JK, Traub-Dargatz JL, Lunn DP, Morley PS, Kohler A, Kasper K, *et al.* (2012). Equine Viral Respiratory Pathogen Surveillance at Horse Shows and Sales. *J. Eq. Vet. Sci.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2012.06.006>.

Clark CK, Lester GD, Vetro T, Rice B (1995). Bronchoalveolar lavage in horses: effect of exercise and repeated sampling on cytology. *Aust Vet J* **72**(7): 249-252.

Cook VL, Holcombe SJ, Gandy JC, Corl CM, Sordillo LM (2011). Ethyl pyruvate decreases proinflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated equine monocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **141**(1-2): 92-99.

Cordero M, Brorsen BW, McFarlane D (2012). Circadian and circannual rhythms of cortisol, ACTH, and alpha-melanocyte-stimulating hormone in healthy horses. *Domest. Anim. Endocrinol.* **43**(4): 317-324.

Couetil LL, Hoffman AM, Hodgson J, Buechner-Maxwell V, Viel L, Wood JL, *et al.* (2007). Inflammatory airway disease of horses. *J. Vet. Intern. Med.* **21**(2): 356-361.

Courouce-Malblanc A (2008). Physiological parameters and evaluation of the upper and lower respiratory airways in French Standardbred trotters during a standardised exercise on a treadmill: Bull. Acad. Vét. France.

Cullinane A, Newton JR (2013). Equine influenza-A global perspective. *Vet. Microbiol* <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.029>.

Cywinska A, Szarska E, Degorski A, Guzera M, Gorecka R, Strzelec K, *et al.* (2013). Blood phagocyte activity after race training sessions in Thoroughbred and Arabian horses. *Res. Vet. Sci.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.04.020>.

Davis MS, Malayer JR, Vandeventer L, Royer CM, McKenzie EC, Williamson KK (2005). Cold weather exercise and airway cytokine expression. *J. Appl. Physiol.* **98**(6): 2132-2136.

Depecker M, Richard E, Pitel PH, Fortier G, Leleu C, Couroucé-Malblanc A (2013). Influence du poumon prélevé sur le diagnostic cytologique des affections des voies respiratoires profondes chez les chevaux Trotteurs Français à l'entraînement. *39ème Journée de la Recherche Equine*; Paris.

Desjardins I, Theoret C, Joubert P, Wagner B, Lavoie JP (2004). Comparison of TGF-beta 1 concentrations in bronchoalveolar fluid of horses affected with heaves and of normal controls. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **101**(3-4): 133-141.

Escribano BM, Castejon FM, Vivo R, Aguera S, Aguera EI, Rubio MD (2005). Nonspecific immune response of peripheral blood neutrophils in two horse breeds (Anglo-Arabian and Spanish-Arabian): response to exercise. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **28**(2): 145-154.

Figueiredo MD, Salter CE, Andrietti AL, Vandenplas ML, Hurley DJ, Moore JN (2009a). Validation of a reliable set of primer pairs for measuring gene expression by real-time quantitative RT-PCR in equine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **131**(1-2): 65-72.

Figueiredo MD, Vandenplas ML, Hurley DJ, Moore JN (2009b). Differential induction of MyD88- and TRIF-dependent pathways in equine monocytes by Toll-like receptor agonists. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **127**(1-2): 125-134.

Fitch KD, Sue-Chu M, Anderson SD, Boulet LP, Hancox RJ, McKenzie DC, *et al.* (2008). Asthma and the elite athlete: summary of the International Olympic Committee's consensus conference, Lausanne, Switzerland, January 22-24, 2008. *J. Allergy Clin. Immunol.* **122**(2): 254-260, 260 e251-257.

Flaminio MJ, Rush BR, Davis EG, Hennessy K, Shuman W, Wilkerson MJ (2000). Characterization of peripheral blood and pulmonary leukocyte function in healthy foals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **73**(3-4): 267-285.

Flynn MG, McFarlin BK, Phillips MD, Stewart LK, Timmerman KL (2003). Toll-like receptor 4 and CD14 mRNA expression are lower in resistive exercise-trained elderly women. *J. Appl. Physiol.* **95**(5): 1833-1842.

Folsom RW, Littlefield-Chabaud MA, French DD, Pourciau SS, Mistic L, Horohov DW (2001). Exercise alters the immune response to equine influenza virus and increases susceptibility to infection. *Equine Vet. J.* **33**(7): 664-669.

Fortier G, Pronost S, Mischczak F, Fortier C, Leon A, Richard E, *et al.* (2009). Identification of equid herpesvirus-5 in respiratory liquids: a retrospective study of 785 samples taken in 2006-2007. *Vet. J.* **182**(2): 346-348.

- Fortier G, Richard E, Hue E, Fortier C, Pronost S, Pottier D, *et al.* (2013). Long-lasting airway inflammation associated with equid herpesvirus-2 in experimentally challenged horses. *Vet. J.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.12.027>.
- Fortier G, van Erck E, Pronost S, Lekeux P, Thiry E (2010). Equine gammaherpesviruses: pathogenesis, epidemiology and diagnosis. *Vet. J.* **186**(2): 148-156.
- Geiser M (2010). Update on macrophage clearance of inhaled micro- and nanoparticles. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* **23**(4): 207-217.
- Giguere S, Viel L, Lee E, MacKay RJ, Hernandez J, Franchini M (2002). Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **85**(3-4): 147-158.
- Giguère S, PJF (1999). Quantitation of equine cytokine mRNA expression by reverse transcription-competitive polymerase chain reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **61**: 1-15.
- Gleeson M (2007). Immune function in sport and exercise. *J. Appl. Physiol.* **103**(2): 693-699.
- Gleeson M, McFarlin B, Flynn M (2006). Exercise and Toll-like receptors. *Exerc. Immunol. Rev.* **12**: 34-53.
- Gleeson M, Nieman DC, Pedersen BK (2004). Exercise, nutrition and immune function. *J. Sports Sci.* **22**(1): 115-125.
- Glorieux S, Vandekerckhove AP, Goris N, Yang XY, Steukers L, Van de Walle GR, *et al.* (2012). Evaluation of the antiviral activity of (1'S,2'R)-9-[[1',2'-bis(hydroxymethyl)cycloprop-1'-yl]methyl]guanine (A-5021) against equine herpesvirus type 1 in cell monolayers and equine nasal mucosal explants. *Antiviral Res.* **93**(2): 234-238.
- Golland LC, Evans DL, McGowan CM, Hodgson DR, Rose RJ (2003). The Effects of Overtraining on Blood Volumes in Standardbred Racehorses. *Vet. J.* **165**(3): 228-233.
- Gornik K, Moore P, Figueiredo M, Vandenplas M (2011). Expression of Toll-like receptors 2, 3, 4, 6, 9, and MD-2 in the normal equine cornea, limbus, and conjunctiva. *Vet. ophthalmol.* **14**(2): 80-85.
- Hansen S, Sun L, Baptiste KE, Fjeldborg J, Horohov DW (2013). Age-related changes in intracellular expression of IFN-gamma and TNF-alpha in equine lymphocytes measured in bronchoalveolar lavage and peripheral blood. *Dev. Comp. Immunol.* **39**(3): 228-233.
- Hare JE, Viel L (1998). Pulmonary eosinophilia associated with increased airway responsiveness in young racing horses. *J. Vet. Intern. Med.* **12**(3): 163-170.
- Harless W, Pusterla N (2006). Equine Herpesvirus 1 and 4 Respiratory Disease in the Horse. *Clin. Tech. Equine Pract.* **5**(3): 197-202.

- Hines MT, Palmer GH, Byrne KM, Brassfield AL, McGuire TC (1996). Quantitative characterization of lymphocyte populations in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood of normal adult Arabian horses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **51**(1-2): 29-37.
- Hoffman AM (2008). Bronchoalveolar lavage: sampling technique and guidelines for cytologic preparation and interpretation. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* **24**(2): 423-435, vii-viii.
- Horohov DW (2008). Immunological responses to exercise and training. *Equine Exercise Physiology.*
- Hoven vd, Duvigneau, Hartl, Riedelberger, Teinfalt, Gemeiner (2004). The Expression of Messenger RNA for Tumor Necrosis Factor- α ; Interleukin 1b, 6, 8, and 10; Tissue growth factor-b and interferon-g in bronchoalveolar lavage fluid cells from horses challenged with lipopolysaccharide and treated with clenbuterol. *J. Eq. Vet. Sci.* **24**(1): 29-36.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and immunity* **6**(4): 279-284.
- Hughes KJ, Nicolson L, Da Costa N, Franklin SH, Allen KJ, Dunham SP (2011). Evaluation of cytokine mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells from horses with inflammatory airway disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **140**(1-2): 82-89.
- Hull JH, Ansley L, Robson-Ansley P, Parsons JP (2012). Managing respiratory problems in athletes. *Clin. Med.* **12**(4): 351-356.
- Islam MA, Cinar MU, Uddin MJ, Tholen E, Tesfaye D, Looft C, *et al.* (2012a). Expression of Toll-like receptors and downstream genes in lipopolysaccharide-induced porcine alveolar macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **146**(1): 62-73.
- Islam MA, Cinar MU, Uddin MJ, Tholen E, Tesfaye D, Looft C, *et al.* (2012b). Expression of Toll-like receptors and downstream genes in lipopolysaccharide-induced porcine alveolar macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **146**(1): 62-73.
- Jackson KA, Stott JL, Horohov DW, Watson JL (2004). IL-4 induced CD23 (Fc ϵ psilonRII) up-regulation in equine peripheral blood mononuclear cells and pulmonary alveolar macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **101**(3-4): 243-250.
- Jin MS, Lee JO (2008). Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity* **29**(2): 182-191.
- Joubert P, Cordeau ME, Lavoie JP (2011). Cytokine mRNA expression of pulmonary macrophages varies with challenge but not with disease state in horses with heaves or in controls. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **142**(3-4): 236-242.
- Juarez E, Nunez C, Sada E, Ellner JJ, Schwander SK, Torres M (2010). Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. *Resp. Res.* **11**: 2.

- Kabelitz D (2007). Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **19**(1): 39-45.
- Kato A, Hulse KE, Tan BK, Schleimer RP (2013). B-lymphocyte lineage cells and the respiratory system. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**(4): 933-957.
- Kim KC (2011). Role of epithelial mucins during airway infection. *Pulm. Pharmacol. Ther.* doi:10.1016/j.pupt.2011.12.003.
- Kingston (2008). Hematologic and serum biochemical responses to exercise and training. *Equine exercise physiology.*
- Kippelen P, Fitch KD, Anderson SD, Bougault V, Boulet LP, Rundell KW, *et al.* (2012). Respiratory health of elite athletes - preventing airway injury: a critical review. *Br. J. Sports Med.* **46**(7): 471-476.
- Kizaki T, Takemasa T, Sakurai T, Izawa T, Hanawa T, Kamiya S, *et al.* (2008). Adaptation of macrophages to exercise training improves innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **372**(1): 152-156.
- Klier J, Fuchs S, May A, Schillinger U, Plank C, Winter G, *et al.* (2012). A nebulized gelatin nanoparticle-based CpG formulation is effective in immunotherapy of allergic horses. *Pharm. Res.* **29**(6): 1650-1657.
- Klier J, May A, Fuchs S, Schillinger U, Plank C, Winter G, *et al.* (2011). Immunostimulation of bronchoalveolar lavage cells from recurrent airway obstruction-affected horses by different CpG-classes bound to gelatin nanoparticles. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **144**(1-2): 79-87.
- Kohut ML, Davis JM, Jackson DA, Colbert LH, Strasner A, Essig DA, *et al.* (1998a). The role of stress hormones in exercise-induced suppression of alveolar macrophage antiviral function. *J. Neuroimmunol.* **81**(1-2): 193-200.
- Kohut ML, Davis JM, Jackson DA, Jani P, Ghaffar A, Mayer EP, *et al.* (1998b). Exercise effects on IFN-beta expression and viral replication in lung macrophages after HSV-1 infection. *Am. J. Physiol.* **275**(6 Pt 1): L1089-1094.
- Kuchar E, Miskiewicz K, Nitsch-Osuch A, Kurpas D, Han S, Szenborn L (2013). Immunopathology of exercise-induced bronchoconstriction in athletes - A new modified inflammatory hypothesis. *Resp. Physiol. Neurobiol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2013.02.014>.
- Kumar H, Kawai T, Akira S (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **388**(4): 621-625.
- Kwon S, Vandenplas ML, Figueiredo MD, Salter CE, Andrietti AL, Robertson TP, *et al.* (2010). Differential induction of Toll-like receptor gene expression in equine monocytes activated by Toll-like receptor ligands or TNF-alpha. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **138**(3): 213-217.

- Kydd JH, Townsend HG, Hannant D (2006). The equine immune response to equine herpesvirus-1: the virus and its vaccines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **111**(1-2): 15-30.
- Laan TT, Bull S, Pirie R, Fink-Gremmels J (2006). The role of alveolar macrophages in the pathogenesis of recurrent airway obstruction in horses. *J. Vet. Intern. Med.* **20**(1): 167-174.
- Laan TT, Bull S, Pirie RS, Fink-Gremmels J (2005). Evaluation of cytokine production by equine alveolar macrophages exposed to lipopolysaccharide, *Aspergillus fumigatus*, and a suspension of hay dust. *Am. J. Vet. Res.* **66**(9): 1584-1589.
- Lancaster GI, Khan Q, Drysdale P, Wallace F, Jeukendrup AE, Drayson MT, *et al.* (2005). The physiological regulation of toll-like receptor expression and function in humans. *J. Physiol.* **563**(Pt 3): 945-955.
- Lavoie JP, Beauchamp G, Vrins A, Jean D (2011). Evaluation of variations in bronchoalveolar lavage fluid in horses with recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.* **72**(6): 838-842.
- Lavoie JP, Cesarini C, Lavoie-Lamoureux A, Moran K, Lutz S, Picandet V, *et al.* (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**(2): 322-329.
- Lavoie JP, Maghni K, Desnoyers M, Taha R, Martin JG, Hamid QA (2001). Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**(8 Pt 1): 1410-1413.
- Leclere M, Lefebvre-Lavoie J, Beauchamp G, Lavoie JP (2010). Efficacy of oral prednisolone and dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction in the presence of continuous antigen exposure. *Equine Vet. J.* **42**(4): 316-321.
- Lin L, Decker CF (2010). Respiratory tract infections in athletes. *Dis. Mon.* **56**(7): 407-413.
- Lin SM, Frevert CW, Kajikawa O, Wurfel MM, Ballman K, Mongovin S, *et al.* (2004). Differential regulation of membrane CD14 expression and endotoxin-tolerance in alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **31**(2): 162-170.
- Lindner A, Mosen H, Kissenbeck S, Fuhrmann H, Sallmann HP (2009). Effect of blood lactate-guided conditioning of horses with exercises of differing durations and intensities on heart rate and biochemical blood variables. *J. Anim. Sci.* **87**(10): 3211-3217.
- Mackinnon LT (2000). Chronic exercise training effects on immune function. *Med. Sci. Sports Exerc.* **32**(7 Suppl): S369-376.
- Malikides N, Hughes KJ, Hodgson DR, Hodgson JL (2003). Comparison of tracheal aspirates and bronchoalveolar lavage in racehorses. 2. Evaluation of the diagnostic significance of neutrophil percentage. *Aust Vet J* **81**(11): 685-687.
- Malikides N, Hughes KJ, Hodgson JL (2007). Comparison of tracheal aspirates before and after high-speed treadmill exercise in racehorses. *Aust Vet J* **85**(10): 414-419.

Malinowski K, Kearns CF, Guirnalda PD, Roegner V, McKeever KH (2004). Effect of chronic clenbuterol administration and exercise training on immune function in horses. *J. Anim. Sci.* **82**(12): 3500-3507.

Mattei F, Schiavoni G, Tough DF (2010). Regulation of immune cell homeostasis by type I interferons. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**(4): 227-236.

McFarlin BK, Flynn MG, Campbell WW, Stewart LK, Timmerman KL (2004). TLR4 is lower in resistance-trained older women and related to inflammatory cytokines. *Med. Sci. Sports Exerc.* **36**(11): 1876-1883.

McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE, Irving P (1993). Comparison of cellular and molecular components of bronchoalveolar lavage fluid harvested from different segments of the equine lung. *Res. Vet. Sci.* **55**(1): 57-59.

McGuinness DH, Dehal PK, Pleass RJ (2003). Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. *Trends Parasitol.* **19**(7): 312-319.

McKane SA, Slocombe RF (2010). Experimental mild pulmonary inflammation promotes the development of exercise-induced pulmonary haemorrhage. *Equine Vet. J. Suppl.*(38): 235-239.

Michelotto PV, Jr., Muehlmann LA, Zanatta AL, Bieberbach EW, Fernandes LC, Nishiyama A (2010). Platelet-activating factor and evidence of oxidative stress in the bronchoalveolar fluid of Thoroughbred colts during race training. *J. Vet. Intern. Med.* **24**(2): 414-419.

Michelotto PV, Jr., Muehlmann LA, Zanatta AL, Bieberbach EW, Kryczyk M, Fernandes LC, *et al.* (2011). Pulmonary inflammation due to exercise-induced pulmonary haemorrhage in Thoroughbred colts during race training. *Vet. J.* **190**(2): e3-6.

Mignot CC, Pirottin D, Farnir F, de Moffarts B, Molitor C, Lekeux P, *et al.* (2012). Effect of strenuous exercise and ex vivo TLR3 and TLR4 stimulation on inflammatory gene expression in equine pulmonary leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **147**(3-4): 127-135.

Mlambo G, Sigola LB (2003). Rifampicin and dexamethasone have similar effects on macrophage phagocytosis of zymosan, but differ in their effects on nitrite and TNF- α production. *Intern. immunopharmacol.* **3**(4): 513-522.

Moore BD, Balasuriya UB, Watson JL, Bosio CM, MacKay RJ, MacLachlan NJ (2003). Virulent and avirulent strains of equine arteritis virus induce different quantities of TNF-alpha and other proinflammatory cytokines in alveolar and blood-derived equine macrophages. *Virology* **314**(2): 662-670.

Muehlmann LA, Michelotto PV, Jr., Nunes EA, Grandó FC, da Silva FT, Nishiyama A (2012). PAF increases phagocytic capacity and superoxide anion production in equine alveolar macrophages and blood neutrophils. *Res. Vet. Sci.* **93**(1): 393-397.

Murphy EA, Davis JM, Brown AS, Carmichael MD, Van Rooijen N, Ghaffar A, *et al.* (2004). Role of lung macrophages on susceptibility to respiratory infection following short-term

moderate exercise training. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **287**(6): R1354-1358.

Nesse LL, Johansen GI, Blom AK (2002). Effects of racing on lymphocyte proliferation in horses. *Am. J. Vet. Res.* **63**(4): 528-530.

Newton JR, Wood JL (2002). Evidence of an association between inflammatory airway disease and EIPH in young Thoroughbreds during training. *Equine Vet. J. Suppl.*(34): 417-424.

Nieman DC (2000). Is infection risk linked to exercise workload? *Med. Sci. Sports Exerc.* **32**(7 Suppl): S406-411.

O'Neill LAJ (2004). IMMUNOLOGY: After the Toll Rush. *Science* **303**(5663): 1481-1482.

Oberg HH, Juricke M, Kabelitz D, Wesch D (2011). Regulation of T cell activation by TLR ligands. *Eur. J. Cell Biol.* **90**(6-7): 582-592.

Oshikawa K, Sugiyama Y (2003). Gene expression of Toll-like receptors and associated molecules induced by inflammatory stimuli in the primary alveolar macrophage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**(3): 649-655.

Padalino B, Rubino G, Centoducati P, Petazzi F (2007). Training versus Overtraining: Evaluation of Two Protocols. *J. Eq. Vet. Sci.* **27**(1): 28-31.

Parsons JP, Mastronarde JG (2005). Exercise-induced bronchoconstriction in athletes. *Chest* **128**(6): 3966-3974.

Pedersen BK, Saltin B (2006). Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **16 Suppl 1**: 3-63.

Perkins GA, Viel L, Wagner B, Hoffman A, Erb HN, Ainsworth DM (2008). Histamine bronchoprovocation does not affect bronchoalveolar lavage fluid cytology, gene expression and protein concentrations of IL-4, IL-8 and IFN-gamma. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **126**(3-4): 230-235.

Pusterla N, Mapes S, David Wilson W (2012). Prevalence of latent alpha-herpesviruses in Thoroughbred racing horses. *Vet. J.* **193**(2): 579-582.

Quintana AM, Landolt GA, Annis KM, Hussey GS (2011). Immunological characterization of the equine airway epithelium and of a primary equine airway epithelial cell culture model. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **140**(3-4): 226-236.

Raidal SL, Bailey GD, Love DN (1998a). Flow cytometric determination of oxidative burst activity of equine peripheral blood and bronchoalveolar lavage-derived leucocytes. *Vet. J.* **156**(2): 117-126.

Raidal SL, Bailey GD, Love DN (1998b). The flow cytometric evaluation of phagocytosis by equine peripheral blood neutrophils and pulmonary alveolar macrophages. *Vet. J.* **156**(2): 107-116.

Raidal SL, Love DN, Bailey GD (1997). Effect of a single bout of high intensity exercise on lower respiratory tract contamination in the horse. *Aust Vet J* **75**(4): 293-295.

Raidal SL, Love DN, Bailey GD, Rose RJ (2000a). The effect of high intensity exercise on the functional capacity of equine pulmonary alveolar macrophages and BAL-derived lymphocytes. *Res. Vet. Sci.* **68**(3): 249-253.

Raidal SL, Love DN, Bailey GD, Rose RJ (2000b). Effect of single bouts of moderate and high intensity exercise and training on equine peripheral blood neutrophil function. *Res. Vet. Sci.* **68**(2): 141-146.

Raidal SL, Rose RJ, Love DN (2001). Effects of training on resting peripheral blood and BAL-derived leucocyte function in horses. *Equine Vet. J.* **33**(3): 238-243.

Rehli M (2002). Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol.* **23**(8): 375-378.

Reyner CL, Wagner B, Young JC, Ainsworth DM (2009). Effects of in vitro exposure to hay dust on expression of interleukin-23, -17, -8, and -1beta and chemokine (C-X-C motif) ligand 2 by pulmonary mononuclear cells from horses susceptible to recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.* **70**(10): 1277-1283.

Richard EA, Fortier GD, Lekeux PM, Van Erck E (2010a). Laboratory findings in respiratory fluids of the poorly-performing horse. *Vet. J.* **185**(2): 115-122.

Richard EA, Fortier GD, Pitel PH, Dupuis MC, Valette JP, Art T, *et al.* (2010b). Sub-clinical diseases affecting performance in Standardbred trotters: diagnostic methods and predictive parameters. *Vet. J.* **184**(3): 282-289.

Richard EA, Pitel PH, Christmann U, Lekeux P, Fortier G, Pronost S (2012). Serum concentration of surfactant protein D in horses with lower airway inflammation. *Equine Vet. J.* **44**(3): 277-281.

Riihimaki M, Raine A, Elfman L, Pringle J (2008). Markers of respiratory inflammation in horses in relation to seasonal changes in air quality in a conventional racing stable. *Can. J. Vet. Res.* **72**(5): 432-439.

Robinson NE (2001). International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University 16-18 June 2000. *Equine Vet. J.* **33**(1): 5-19.

Robson PJ, Alston TD, Myburgh KH (2003). Prolonged suppression of the innate immune system in the horse following an 80 km endurance race. *Equine Vet. J.* **35**(2): 133-137.

Sanchez-Matamoros A, Kukielka D, De Las Heras AI, Sanchez-Vizcaino JM (2012). Development and evaluation of a SYBR Green real-time RT-PCR assay for evaluation of cytokine gene expression in horse. *Cytokine*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2012.10.004>.

Schneberger D, Caldwell S, Suri SS, Singh B (2009). Expression of toll-like receptor 9 in horse lungs. *Anat Rec (Hoboken)* **292**(7): 1068-1077.

- Schwab U, Caldwell S, Matychak MB, Felipe J (2013). A 3-D airway epithelial cell and macrophage co-culture system to study *Rhodococcus equi* infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.05.003>.
- Shaw A (2012). New technologies for new influenza vaccines. *Vaccine* **30**(33): 4927-4933.
- Sherck AB (2010). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dexamethasone after oral administration in apparently healthy horses. *Am. J. Vet. Res.* **71**(7): 831-839.
- Singh Suri S, Janardhan KS, Parbhakar O, Caldwell S, Appleyard G, Singh B (2006). Expression of toll-like receptor 4 and 2 in horse lungs. *Vet. Res.* **37**(4): 541-551.
- Souza CM, Miotto BA, Bonin CP, Camargo MM (2010). Lower serum IgA levels in horses kept under intensive sanitary management and physical training. *Intern. J. Anim. Biosciences* **4**(12): 2080-2083.
- Stone KC, Mercer RR, Gehr P, Stockstill B, Crapo JD (1992). Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **6**(2): 235-243.
- Suagee JK, Corl BA, Crisman MV, Pleasant RS, Thatcher CD, Geor RJ (2013). Relationships between body condition score and plasma inflammatory cytokines, insulin, and lipids in a mixed population of light-breed horses. *J. Vet. Intern. Med.* **27**(1): 157-163.
- Sugiura H, Nishida H, Sugiura H, Mirbod SM (2002). Immunomodulatory action of chronic exercise on macrophage and lymphocyte cytokine production in mice. *Acta Physiol. Scand.* **174**(3): 247-256.
- Sweeney CR, Rossier Y, Ziemer EL, Lindborg S (1992). Effects of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses. *Am. J. Vet. Res.* **53**(8): 1376-1379.
- Sweeney CR, Rossier Y, Ziemer EL, Lindborg SR (1994). Effect of prior lavage on bronchoalveolar lavage fluid cell population of lavaged and unlavaged lung segments in horses. *Am. J. Vet. Res.* **55**(11): 1501-1504.
- Swiecki M, Colonna M (2011). Type I interferons: diversity of sources, production pathways and effects on immune responses. *Curr. Opin. Virol.* **1**(6): 463-475.
- Syu GD, Chen HI, Jen CJ (2012). Differential effects of acute and chronic exercise on human neutrophil functions. *Med. Sci. Sports Exerc.* **44**(6): 1021-1027.
- Takeda K, Akira S (2004a). Microbial recognition by Toll-like receptors. *J. Dermatol. Sci.* **34**(2): 73-82.
- Takeda K, Akira S (2004b). TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* **16**(1): 3-9.
- Takeda K, Akira S (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* **17**(1): 1-14.

Te Pas MF, Wijnberg ID, Hoekman AJ, de Graaf-Roelfsema E, Keizer HA, van Breda E, *et al.* (2013). Skeletal muscle transcriptome profiles related to different training intensities and detraining in Standardbred horses: A search for overtraining biomarkers. *Vet. J.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.03.052>.

Tee S, Dart A, Macdonald M, Perkins N, Horadagoda N, Jeffcott L (2012). Effects of collecting serial tracheal aspirate and bronchoalveolar lavage samples on the cytological findings of subsequent fluid samples in healthy Standardbred horses. *Aust Vet J* **90**(7): 247-251.

Uner AG, Sulu N, Altinsaat C, Ergun A (2013). Blood Levels of Selected Metabolic Factors, Cytokines, and Lymphocyte Subpopulations in Arabian and Thoroughbred Horses During the Longest and Shortest Days of the Year. *J. Eq. Vet. Sci.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2013.03.001>.

Uerner M, Herrmann IK, Booy C, Roth-Z' Graggen B, Maggiorini M, Beck-Schimmer B (2012). Effect of hypoxia and dexamethasone on inflammation and ion transporter function in pulmonary cells. *Clin. Exp. Immunol.* **169**(2): 119-128.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, *et al.* (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Gen. Biol.* **3**(7): RESEARCH0034.

Vick MM, Adams AA, Murphy BA, Sessions DR, Horohov DW, Cook RF, *et al.* (2007). Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. *J. Anim. Sci.* **85**(5): 1144-1155.

Waldschmidt I, Pirottin D, Art T, Audigie F, Bureau F, Tosi I, *et al.* (2013). Experimental model of equine alveolar macrophage stimulation with TLR ligands. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **155**(1-2): 30-37.

Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, Bishop NC, *et al.* (2011). Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc. Immunol. Rev.* **17**: 6-63.

Wilsher S, Allen WR, Wood JL (2006). Factors associated with failure of thoroughbred horses to train and race. *Equine Vet. J.* **38**(2): 113-118.

Wong CW, Thompson HL, Thong YH, Thornton JR (1990). Effect of strenuous exercise stress on chemiluminescence response of equine alveolar macrophages. *Equine Vet. J.* **22**(1): 33-35.

Wood JL, Newton JR, Chanter N, Mumford JA (2005a). Association between respiratory disease and bacterial and viral infections in British racehorses. *J. Clin. Microbiol.* **43**(1): 120-126.

Wood JL, Newton JR, Chanter N, Mumford JA (2005b). Inflammatory airway disease, nasal discharge and respiratory infections in young British racehorses. *Equine Vet. J.* **37**(3): 236-242.

Zaas AK, Schwartz DA (2005). Innate immunity and the lung: defense at the interface between host and environment. *Trends Cardiovasc. Med.* **15**(6): 195-202.

Zarembek KA, Godowski PJ (2002). Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J. Immunol.* **168**(2): 554-561.

Zhang L, Bai J, Liu J, Wang X, Li Y, Jiang P (2013). Toll-like receptor ligands enhance the protective effects of vaccination against porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. *Vet. Microbiol.* **164**(3-4): 253-260.

Zhang P, Summer WR, Bagby GJ, Nelson S (2000). Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol. Rev.* **173**: 39-51.

Zhang YW, Davis EG, Blecha F, Wilkerson MJ (2008). Molecular cloning and characterization of equine Toll-like receptor 9. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **124**(3-4): 209-219.

Zielinski MR, Muenchow M, Wallig MA, Horn PL, Woods JA (2004). Exercise delays allogeneic tumor growth and reduces intratumoral inflammation and vascularization. *J. Appl. Physiol.* **96**(6): 2249-2256.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Détail des séances d'entraînement réalisées par les chevaux au cours du pré-entraînement.

<i>Type de travail</i>	<i>Tour de piste</i>	<i>Distance parcourue (m)</i>	<i>Vitesse</i>			<i>Temps indicatif (min)</i>
			<i>m/s</i>	<i>km/h</i>	<i>Réduc km</i>	

2 semaines						
<i>Echauffement</i>	2	2000	5,56	20	3'00	6'00
<i>Travail</i>	5 → 9	9000	6,94	25	2'24	22'36
<i>Récupération</i>	1	1000	5,56	20	3'00	3'00

3 semaines						
<i>Echauffement</i>	2	2000	5,56	20	3'00	6'00
<i>Travail</i>	4	4000	6,94	25	2'24	9'36
	5	5000	8,33	30	2'00	10'00
<i>Récupération</i>	1	1000	5,56	20	3'00	3'00

3 semaines						
<i>Echauffement</i>	2	2000	5,56	20	3'00	6'00
<i>Travail</i>	4	4000	6,94	25	2'24	9'36
	5	5000	9,71	35	1'43	8'34
<i>Récupération</i>	1	1000	5,56	20	3'00	3'00

ANNEXE 2 : Détail des séances d'entraînement réalisées par les chevaux au cours de l'entraînement intensif.

Type de travail	Tour de piste	Distance parcourue (m)	Vitesse			Temps indicatif (min)
			m/s	km/h	Réduc km	
7 semaines						
<u>2x/semaine</u>						
<i>Echauffement</i>	2	2000	5,56	20	3'00	6'00
	4	4000	6,94	25	2'24	9'36
<i>Travail</i>	2	2000	9,71	35	1'43	3'20
	1	1000	V _{max}	V _{max}	V _{max}	≈ 1'25
	1	1000	6,94	25	2'24	2'24
	1	1000	V _{max}	V _{max}	V _{max}	≈ 1'25
<i>Récupération</i>	1	1000	5,56	20	3'00	3'00
<u>1x/sem (4sem) puis 2x/sem (3sem) = travail fractionné</u>						
<i>Echauffement</i>	2	2000	5,56	20	3'00	15'00
	3	3000	6,94	25	2'24	7'12
<i>Travail</i>	1	750	9,71	35	1'43	1'43
	1	750	11,11	40	1'30	1'30
	1	750	V _{max}	V _{max}	V _{max}	≈ 1'25
	1	750	V _{max}	V _{max}	V _{max}	≈ 1'25
	1	750	8,33	40	1'30	1'30
<i>Récupération</i>	1	1000	5,56	20	3'00	3'00

ANNEXE 3 : Détail des tests d'effort standardisés réalisés par les chevaux à la fin de chaque phase du protocole expérimental.

Échauffement	1.7 m/s (pas)	5'		
	4.5 m/s (trot)	5'		FC e :
Palier 1	7 m/s ; pente 4 %	2' (puis 2' <u>recup</u> à 4.5m/s, 0 pente)	Lactates 1 :	FC 1 :
Palier 2	9 m/s ; pente 4 %	2' (puis 2' <u>recup</u> à 4.5m/s, 0 pente)	Lactates 2 :	FC 2 :
Palier 3	11 m/s ; pente 4 %	2' (puis 2' <u>recup</u> à 4.5m/s, 0 pente)	Lactates 3 :	FC 3 :
Palier 4 à fatigue	11 m/s ; pente 4 %	Time to fatigue'	Lactates 4 :	FC 4 :
Récupération	4.5 m/s puis 1.7 m/s	3 puis 2'		FC r :
Récupération	Arrêt	5'	FR r ₁ :	FC r ₁ :
		10'	FR r ₂ :	FC r ₂ :
		15'	FR r ₃ :	FC r ₃ :
		20'	FR r ₄ :	FC r ₄ :

ANNEXE 4 : Détail des examens réalisés sur les chevaux de terrain référés.

0,0	0,0	42,5	11,7	36,8	0,8	7,7										2,2	0,7
0	0	50	15	32	0	1	/	non									
0	0	31	4	60	1	4	faib + EBV2	non									
0	0	46	6	47	0	0	-EBV5	non									
0	0	76	10	12	2	0	faib + EBV5 et faib + rhinovirus	non									
0	0	14	20	65	0	1	/	non									
0	0	38	15	5	2	40	/	non									

0,8	0,0	21,9	13,1	61,8	0,3	2,4												2,1	2,4
0,5	0	32	15	50	0	0	Strepto. alpha + Strepto spp	non	oui	non									
0	0	22	21	56	1	0	/	non											
0	0	16	24	56	1	3	/	non											
0	0	45	26	29	0	0	/	oui	non										
0	0	4	4	81	0	11	Strepto alpha-delta	oui	non										
0	0	9	7	84	0	0	Actinomyces + Psychrobacter	oui	non										
1,2	0	2	0	98	0	0	/	non											
2,9	0	45	8	40	0	5	/	non											

0,0	1,7	6,7	4,0	89,3	0,0	0,0												2,3	3,0
0	0	6	2	92	0	0	Streptococcus aspor (1 Mbu) + Micrococci spp (10 000/ml)	non											
0	5	10	5	85	0	0	Actinobacillus baumannii (70 000/ml) + Strepto alpha (100 000/ml)	non											
0	0	4	5	91	0	0	Strepto aspor 140/ml. strepto alpha-delta (50 000/ml.)	oui	non										

ARTICLES ORIGINAUX

ARTICLE 1

Veterinary Immunology and Immunopathology xxx (2013) xxx–xxx



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Immunology and Immunopathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetimm



Research paper

Experimental model of equine alveolar macrophage stimulation with TLR ligands

Ingrid Waldschmidt^{a,b,f,*}, Dimitri Pirottin^{c,f}, Tatiana Art^{b,f}, Fabrice Audigié^{a,f},
Fabrice Bureau^{c,f}, Irene Tosi^{b,f}, Sophie El Abbas^{b,f}, Frédéric Farnir^{d,f},
Eric Richard^{e,f}, Mari-Capucine Dupuis^{a,f}

^a CIRALE-National Veterinary School of Alfort, Goustranville, France

^b Center of Equine Sports Medicine, University of Liège, Liège, Belgium

^c Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, GIGA-Research, University of Liège, Liège, Belgium

^d Department of Animal Production, University of Liège, Liège, Belgium

^e Frank Duncombe Laboratory, Caen, France

^f Hippolia Foundation, Caen, France



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Immunology and Immunopathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetimm



Research paper

Experimental model of equine alveolar macrophage stimulation with TLR ligands

Ingrid Waldschmidt^{a,b,f,*}, Dimitri Pirottin^{c,f}, Tatiana Art^{b,f}, Fabrice Audigié^{a,f},
Fabrice Bureau^{c,f}, Irene Tosi^{b,f}, Sophie El Abbas^{b,f}, Frédéric Farnir^{d,f},
Eric Richard^{e,f}, Mari-Capucine Dupuis^{a,f}

^a CIRALE-National Veterinary School of Alfort, Goustranville, France

^b Center of Equine Sports Medicine, University of Liège, Liège, Belgium

^c Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, GIGA-Research, University of Liège, Liège, Belgium

^d Department of Animal Production, University of Liège, Liège, Belgium

^e Frank Duncombe Laboratory, Caen, France

^f Hippolia Foundation, Caen, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 February 2013

Received in revised form 14 May 2013

Accepted 30 May 2013

Keywords:

Horse

Alveolar macrophages

Innate immunity

mRNA

Cytokines

ABSTRACT

Pulmonary diseases are common in horses and have a major economic impact on the equine industry. Some of them could be associated with an inadequate immune response in the lung, but methods to evaluate this response in horses are lacking.

The aim of this study was to develop and validate an experimental model that could be applied in several physiological and pathological conditions to assess the innate immune response of equine pulmonary cells.

Equine alveolar macrophages (AMs) obtained from bronchoalveolar lavages were isolated from other cells by adhesion. TLR2, 3, and 4 expression in AMs was studied and their responses to commercial ligands (respectively FSL-1, Poly(I:C), and LPS) were evaluated after determination of the appropriate dose and time of incubation. TLR responses were assessed by measuring cytokine production using (1) gene expression of TNF α , IFN β , IL-1 β , and IFN α by qPCR (indirect method); and (2) cytokine production for TNF α and IFN β by ELISA (direct method).

TLR 2, 3, and 4 were expressed by AMs. TLR 2 stimulation with 10 ng/mL of FSL-1 during 3 h significantly increased IL-1 β and TNF α gene expression. TLR 3 stimulation with 1000 ng/mL of Poly(I:C) during 1 h increased IFN β , IFN α , IL-1 β and TNF α expression. TLR 4 stimulation with 100 ng/mL of LPS during 3 h increased TNF α , IFN β , and IL-1 β expression. Results obtained by ELISA quantification of TNF α and IFN β produced by AMs following stimulation during 6 h were similar: FSL-1 increased TNF α production but not IFN β , Poly(I:C) and LPS increased production of IFN β and TNF α . In conclusion, pulmonary innate immunity of horses can be assessed *ex vivo* by measuring cytokine production following stimulation of AMs with TLR agonists.

This experimental model could be applied under several conditions especially to improve the understanding of equine respiratory disease pathogenesis, and to suggest novel therapeutic opportunities.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: R.D. 675, 14430 Goustranville, France. Tel.: +33 2 31 37 57 34.
E-mail address: ingrid.waldschmidt@hotmail.fr (I. Waldschmidt).

1. Introduction

Respiratory diseases are the second cause of poor performance in horses after musculo-skeletal troubles (Wilsher et al., 2006). They remain a major problem for the horse industry worldwide. While many disorders have been described, such as inflammatory airway disease (IAD), exercise-induced pulmonary hemorrhage (EIPH), recurrent airway obstruction (RAO), and pulmonary infections (Fortier et al., 2009; Richard et al., 2010b; Wood et al., 2005), the molecular bases of the pulmonary immunity are still poorly understood. An inadequate immune response in the horse's lung may be involved, for example for IAD which seems to be related to an excessive response of the innate immune system to inhaled antigens (Beekman et al., 2012; Hughes et al., 2011; Lavoie et al., 2011).

Toll-like receptors (TLRs) play a crucial role in innate immunity. They are able to recognize parts of viruses, bacteria, mycoplasma, and fungus via pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that activate a cascade of molecular reactions leading to cytokine release and pathogen elimination. Twelve members of the TLRs family have been identified in mammals. They recognize various components of pathogens. TLRs signaling pathway is categorized into MyD88-dependent and TRIF-dependent pathways. The MyD88-dependent pathway is used by all TLRs except TLR3 and induces expression of inflammatory cytokines and molecules involved in regulation of inflammation. The TRIF-dependent pathway, used by TLR3 and 4, induces inflammatory cytokines and type I interferons (Akira et al., 2006; Kumar et al., 2009; Takeda and Akira, 2004). TLRs signaling pathways are the principal actors of innate immunity and represent the link between innate and adaptive immunity. Studies on TLR expression in humans have shown that tissues and cells involved in immune functions, particularly phagocytes, express the greatest variety of TLR (Zarembek and Godowski, 2002). Few studies focused on TLR expression in horses and most are related to activated cells or whole tissues (Gornik et al., 2011; Kwon et al., 2010; Schneberger et al., 2009; Singh Suri et al., 2006). Studying TLR activity could be performed *ex vivo* by using a set of synthetic ligands that mimic different types of pathogens (Akira, 2003). Up to now, knowledge concerning TLRs-pathways in horses has mainly focused on the blood compartment (Figueiredo et al., 2009; Kwon et al., 2010) while few studies have concerned the lung (Laan et al., 2005; Mignot et al., 2012). In contrast, innate immunity in alveolar cells has been deeply studied in mouse or human to better understand respiratory affections such as asthma or allergy (Bedoret et al., 2009; Naessens et al., 2012; Yang et al., 2012).

The aim of this study was to validate an experimental model to evaluate the innate pulmonary immune response of horses. Alveolar macrophages (AMs) were isolated from bronchoalveolar lavages (BAL) and stimulated with several TLRs ligands, after determination of optimal concentration and time of incubation. AMs response was evaluated by measuring cytokine production with (1) an indirect method based on quantification of mRNA by quantitative

polymerase chain reaction (qPCR) and (2) a direct method using ELISA assays on culture supernatants.

2. Materials and methods

2.1. Horses

Four horses were used for this technical study (French Trotters 5 ± 1 years, 500 ± 55 kg). All horses were controlled for good health (by clinical evaluation, endoscopy, hematology, and bronchoalveolar lavages), had been regularly vaccinated (equine herpesviruses 1 and 4, equine influenza and tetanus) and treated against internal parasites. They were stabled together into a meadow, grass fed complemented with hay in winter and had access to water *ad libitum*.

2.2. Bronchoalveolar lavages

Horses were sedated with romifidine (Sedivet® 0.01 mg/kg) and butorphanol (Torbugesic® 0.005 mg/kg). Bronchoalveolar lavages (BAL) were performed with a nasobronchial tube (Bivona®) under endoscopic control. According to the fact that 90–140 million AMs are necessary for the tests, three hundred milliliters of 37 °C prewarmed sterile 0.9% NaCl solution was used to wash two to four different pulmonary sites (5 syringes of 60 mL per site). NaCl was delivered and then gently retrieved via the Bivona® tube (percentage of recovery: $80 \pm 5\%$). The BAL fluid was collected into a sterile bottle for homogenization and then directly aliquoted in sterile 50 mL centrifuge tubes for cell isolation which was performed at 4 °C.

For each BAL, a differential cell count was performed to control the absence of abnormal inflammatory cell repartition. BAL with >10% neutrophils, >2% mastocytes, and/or >2% eosinophils were excluded from the study (Couetil et al., 2007; Richard et al., 2010a).

2.3. Alveolar macrophages isolation and culture:

BAL of each horse was treated separately and pulmonary cells were isolated using a method previously described (Mignot et al., 2012). Briefly, BAL was centrifuged in 50 mL centrifuge tubes at $250 \times g$ for 10 min at 4 °C. Supernatants of each tube were then eliminated and cell pellets were suspended in cold Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Lonza®, Basel, Switzerland) and pooled in a 50 mL centrifuge tube. This pool was centrifuged again at $250 \times g$ for 7 min at 4 °C, supernatant eliminated and the cell pellet suspended in DPBS and filtered through a Cell Stainer® 70 µm filter (BD, Franklin Lakes, NJ) in order to eliminate mucus. The filter suspension was finally centrifuged at $250 \times g$ for 7 min at 4 °C, the supernatant removed and the cell pellet was suspended in 1 mL of viability medium. Viability medium contained a base of Roswell Park Memorial Institute medium with L-glutamine (RPMI, Lonza®, Basel, Switzerland) supplemented with 5% heat inactivated FBS, 50 UI/mL of penicillin, 0.25 µg/mL of fungizone, 50 µg/mL of streptomycin, 50 µM of β-mercaptoethanol, 100 µM of

sodium-pyruvate and MEM non-essential amino acid solution 1X (all reagents provided from Invitrogen, Paisley, UK).

The total number of cells in the suspension was determined using a hemocytometer. Cell viability was assessed by Trypan blue dye exclusion test (Sigma, Saint-Louis, MO). Following this control, culture media was added to the cell suspension in order to obtain a concentration of 1.25×10^6 cells/mL.

Cells were distributed in 6-well plates (NUNC[®], Thermo Scientific, Aalst, Belgium) at a density of 2.5×10^6 cells per well and incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 3 h. After incubation, supernatants were discarded and non-adherent cells were removed by gently washing adherent AMs with PBS. These AMs were then incubated again with viability medium (negative control, NC) or stimulating medium for different periods, depending on the stimulation.

2.4. Determination of time of incubation and dose of ligand for AMs stimulation

Stimulation of AMs was performed with different types of ligands: bacterial lipopolysaccharide LPS (TLR4 ligand) from *Escherichia coli* (Sigma, Saint-Louis, MO), a mimetic of double-stranded RNA viruses: polyinosinic-polycytidylic acid Poly(I:C) (TLR3 ligand), and synthetic diacylated lipoprotein FSL-1 (TLR2/6 heterodimer ligand) (Invivogen, San Diego, CA). For each ligand, different incubation times and doses were assessed on AMs to find the most efficient time and concentration. Five stimulation times (1, 3, 6, 12, and 24 h) for poly(I:C) and two for LPS and FSL-1 (1 and 3 h) were tested. Four concentrations of poly(I:C) (0.1, 1, 10, and 100 µg/mL) and five of LPS (1, 10, 100 ng/mL, and 1 µg/mL) and FSL-1 (0.1, 1, 10, 100, and 1000 ng/mL) were assessed. One time and one concentration for each ligand were selected for AMs stimulation.

2.5. RNA extraction and reverse transcription

After cell incubation, total cellular RNA was extracted from AMs using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN SA, Courtaboeuf, France), following manufacturer's instructions. Contaminating DNA was eliminated using the Turbo DNA-free kit (Invitrogen, Paisley, UK). Concentration and quality of RNA were assessed on a Nanodrop[®] ND2000 (Thermo Scientific, Aalst, Belgium) and cDNAs were generated using the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas, Burlington, Canada). For each test, negative controls lacking reverse transcriptase and lacking RNA were also prepared.

2.6. Gene expression analysis

cDNAs were quantified by qPCR using Absolute Blue QPCR Sybr Green mix (Fisher Scientific, Aalst, Belgium) on an Applied Biosystem 7900 HT thermocycler (Applied Biosystem, Carlsbad, USA). Cycle conditions included an initial polymerase activation step at 95 °C for 15 min, followed by 40 cycles comprising denaturation at 95 °C for 15 s and annealing+extension at 60 °C for 1 min. A dissociation stage was systematically added to control for the presence of a single amplicon. Four equine target

genes were quantified: tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin-1 beta (IL-1 β) for MyD-88 dependent signaling pathway; interferon beta (IFN β) and interferon alpha (IFN α) for TRIF dependent signaling pathway. Gene-specific oligonucleotide primers were chosen according to previous studies (Mignot et al., 2012) or designed using UCSC genome browser (UCSC Genome Bioinformatics Group, Santa Cruz, Ca: <http://genome.ucsc.edu>) and Primer 3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). One pair of primers was selected for each gene (Table 1) and synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA).

Relative expression of target genes was normalized to the geometric mean of housekeeping genes (HKG) expression using qbase+ software v.2 (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium). Seven equine HKGs were tested for their stability in equine AMs. These genes were: succinate dehydrogenase complex subunit A (SDHA), hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT), beta-2 microglobulin (B2M), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), transferrin (TFRC), ribosomal protein L32 (RPL32), and beta actin (ACTB). GeNorm software (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium) was used to evaluate their stability. The three most stable genes were used as HKGs for the following studies.

2.7. Expression of TLRs in equine AMs

Expression of the three TLR genes targeted by used ligands (TLRs 2, 3, and 4) in AMs was compared to their expression in skeletal muscle (considered as "negative control" because of the low degree of TLR expression in this type of tissue (Zarembek and Godowski, 2002)) provided from microbiopsies of the *gluteus medius*. Each biopsy site was shaved and scrubbed with an antiseptic. Skin was desensitized with mepivacaine (scandicaine 2%) and incised with a scalpel on less than 5 mm long. The microbiopsies were performed with a 14G biopsy needle (Pro-Mag Ultra Biopsy Needle, Angiotech) mounted on a biopsy gun (Pro-Mag Ultra Biopsy Instrument, Angiotech), perpendicularly to the skin, at a depth of 50 mm. They were immediately transferred into RNAlater (Invitrogen) and stored at ambient temperature for 2 h. Biopsies were then stored at 4 °C and finally frozen at -80 °C until RNA extraction. Macrophages were isolated from the BAL as previously described. TLR genes expression in AMs was compared to that in muscle tissue by qPCR, as described in a previous chapter. Primers for TLRs were designed from previous studies (Table 1) and synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA).

2.8. Cytokines measurement by ELISA

AM culture supernatants were removed at different times following stimulation (1, 3, 6, 12, and 24 h) to determine the best moment for dosing cytokines. Protein levels of cytokines were measured using commercially available equine ELISA kits for TNF α (DuoSet[®] ELISA Development System, R&D Systems, Abingdon, UK) and IFN β (Uscn Life Science Inc., Wuhan, China). The optical density value was detected at 450 nm with wavelength correction at 540 nm

Table 1

List of primers used for qPCR amplification of target and reference genes: primer sequences, amplicon sizes and origin of primers (from literature or in silico designed).

Abbreviation	Gene name	Sequences F and R (5'–3')	Amplicon size (bp)	Origin
SDHA	Succinate dehydrogenase complex subunit A	GAGGAATGGTCTGGAATACTG GCCTCTGCTCCATAAATCG	91	Mignot et al. (2012)
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	AATTATGGACAGGACTGAACGG ATAATCCAGCAGGTCAGCAAAG	121	Mignot et al. (2012)
B2M	Beta-2 microglobulin	CCTGCTCGGGCTACTCTC CATTCTCTGCTGGGTGACG	89	Mignot et al. (2012)
TFRC	Transferrin gene	TGGCTACTTGGGCTATTGTAAACG GGTGGTTCTGTTCCTCTATCTCC	90	In silico designed
GADPH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	ATCTGACCTGCCCGCTGGAG CGATGCCGTCTTCCACCTTC	68	In silico designed
RPL32	Ribosomal protein L32 gene	GGGAGCAATAAGAAAACGAAGC CTTGGAGGAGACATTGTGAGC	140	In silico designed
ACTB	Beta actin gene	GGACCTGACGGACTACCTC CACGCACGATTTCCTCTC	83	In silico designed
IL-1 β	Interleukin-1 beta	CTTCCAAGACCTGGACCTCA GCCACAATGATTGACACGAC	108	Mignot et al. (2012)
TNF α	Tumor necrosis factor alpha	TGCTCTCACCCACACCATCA TGCTCTGGGGACTCCGTGTG	123	Mignot et al. (2012)
IFN β	Interferon beta	CCCGAGGACACAATGAACTT GAAAATACGCCAGGTGTGCT	117	Mignot et al. (2012)
IFN α	Interferon alpha	GGCAACACAAGGGTCTTGAT GGGGGAATCCAAGTCATTT	91	In silico designed
TLR2	Toll-like receptor 2 gene	ACGGCAGCTGTGAAAAGTCT CCTGAACCAGGAGGACGATA	213	Quintana et al. (2011)
TLR3	Toll-like receptor 3 gene	ACCTCCAGCAAAACATAAACC CTGGAGGTCCAAAATTCCCA	179	Quintana et al. (2011)
TLR4	Toll-like receptor 4 gene	GACGACTCAGGAAAGCCTTG CACAAATGCCTGGTATGTTC	194	Quintana et al. (2011)

using ELISA plate reader (Bio-Rad laboratories). Concentrations (pg/mL) were determined with the Microplate Manager Software (Bio-Rad laboratories).

2.9. Data analysis

Data are shown as least square means (LSmeans) \pm associated SE (standard error) for quantitative PCR results and ELISA kits results. Data were analyzed by a global linear mixed model (SAS, Cary, NC). Differences were considered to be significant when p value was less than 0.05.

3. Results

3.1. Alveolar macrophages culture

Viability of total alveolar white cells isolated from the BAL was $85 \pm 5\%$. Purity of AMs obtained after 3 h of adhesion was $75.3 \pm 4\%$. Contamination was principally due to lymphocytes ($21.3 \pm 3\%$) and neutrophils ($3.4 \pm 2\%$). We controlled that lymphocytes contamination had no major effect on TLR stimulations: lymphocytes were isolated from the BAL using FACS technology (purity $97.5 \pm 1.5\%$) and stimulated with the same TLR ligands. No significant production of IFN β or TNF α was obtained following TLR stimulations (unpublished data).

3.2. Selection of housekeeping genes

From seven candidate reference genes, the three most stable genes, according to GeNorm, were RPL32, ACTB and

GAPDH (Table 2), which were consequently selected as HKG for the following studies.

3.3. TLRs relative expression in equine alveolar macrophages

TLRs 2, 3, and 4 were significantly over expressed in unstimulated AMs when compared to their expression in muscular cells (artificially set at 1), as shown in Fig. 1 ($p < 0.0001$ for all genes).

3.4. Stimulation of equine alveolar macrophages with TLRs ligands: cytokines mRNA quantification

Relative expression of TNF α , IL-1 β , IFN β and IFN α genes was assessed using all combinations between doses and incubation times for each ligand. However, for reasons of clarity, the following graphs show only the time effect with the selected dose and the dose–response with the selected time.

Table 2

Selected reference genes stability values using GeNorm software.

Reference target	M value	CV value
RPL32	0.139	0.047
GADPH	0.158	0.065
ACTB	0.179	0.077
B2M	0.287	0.129
HPRT	0.311	0.145
SDHA	0.374	0.216
TFRC	0.394	0.210

M is gene stability value and CV is the coefficient of variation.

Please cite this article in press as: Waldschmidt, I., et al., Experimental model of equine alveolar macrophage stimulation with TLR ligands. Vet. Immunol. Immunopathol. (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.05.017>

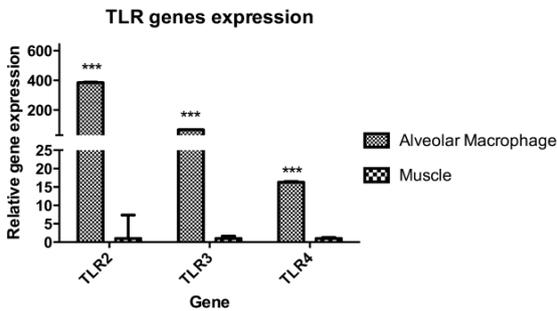


Fig. 1. LSmeans (\pm SE) of TLRs mRNA relative expression measured by qPCR in isolated AMs compared to their expression in muscle, used as control in this experiment. The relative mRNA expression is normalized to the geometric mean of three housekeeping genes (not shown here) using qbase+ software. $n = 3$ for all groups; (***) shows significant differences ($p < 0.001$) of TLR expression between AMs and muscular cells (artificially set at 1).

Stimulation of AMs with 10 ng/ml FSL-1 (TLR2/6 ligand) (Fig. 2a) induced a significant increase expression of target genes *Il-1 β* ($p = 0.0113$), *TNF α* ($p = 0.0081$) and *IFN β* ($p = 0.0033$) only for 3 h of stimulation. Fig. 3a shows the dose–response curve of AMs stimulated by different doses of FSL-1 during 3 h. Expression of *TNF α* ($p = 0.0059$), *IFN β* ($p = 0.0036$) and *Il-1 β* ($p < 0.0001$) increased significantly at the concentration of 10 ng/mL of FSL-1 and then decreased for higher concentrations.

TLR3 stimulation of purified equine AMs with 1 μ g/ml poly(I:C) showed higher response after 1 and 3 h of incubation (Fig. 2b). Poly(I:C) induced a significant increase of *IFN α* ($p = 0.0481$), *IFN β* ($p = 0.0043$) and *Il-1 β* expression ($p = 0.0073$) starting from 1 μ g/mL and 0.1 μ g/mL for *TNF α* expression ($p < 0.0001$) (Fig. 3b).

Stimulation of TLR4 AMs with LPS during 1 or 3 h showed an increase of *IFN β* , *Il-1 β* and *TNF α* for the two durations. Dose–responses at 3 h showed an increase of *IFN β* ($p = 0.0016$), *Il-1 β* ($p < 0.0001$) and *TNF α* ($p = 0.0054$) from 10 ng/mL to the highest dose tested (Figs. 2c and 3c).

According to these results, validated parameters for TLRs 2, 3, and 4 AMs stimulation are summarized in Table 3.

3.5. Stimulation of equine alveolar macrophages with TLRs ligands: cytokines protein quantification

Fig. 4 shows the kinetics of *IFN β* and *TNF α* release in supernatants of AMs stimulated by TLR ligands. *IFN β* was progressively released in supernatants until saturation that was achieved at 12 h for TLR3 ($p < 0.0001$) and TLR4 ($p < 0.0001$) activation but not for TLR2 ($p = 0.2251$). Below saturation of media, there were significant increases

of *IFN β* production for poly(I:C) ($p = 0.0006$) and LPS stimulation ($p = 0.0288$) at 6 h.

TNF α release increased significantly only at 6 h for TLR2 stimulation ($p = 0.0491$) and from 3 h ($p = 0.0088$) for TLR3 and 4 stimulation.

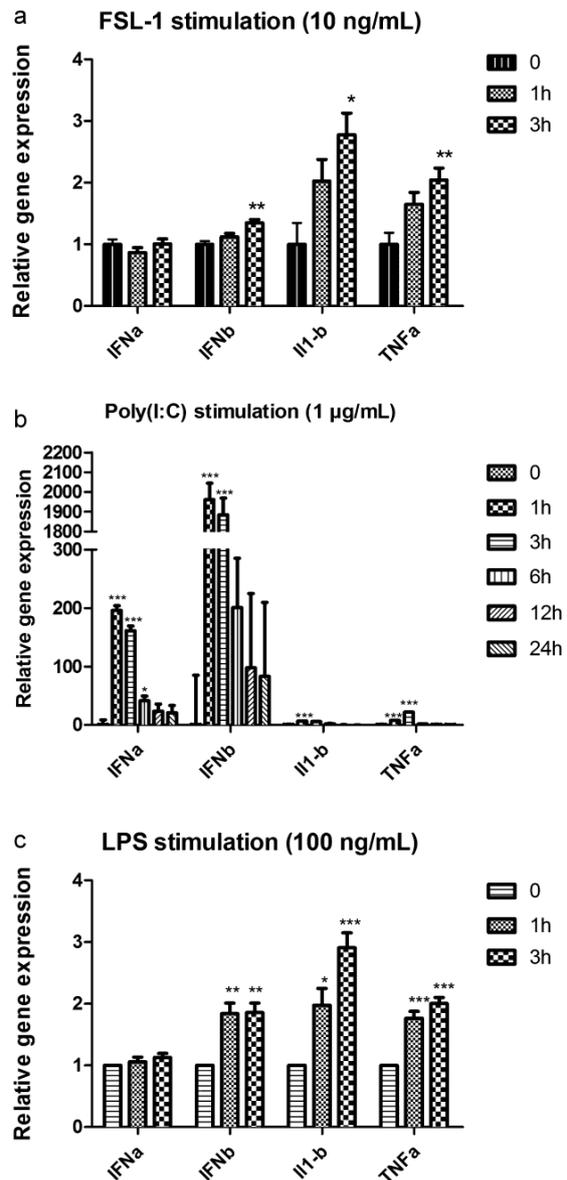


Fig. 2. LSmeans (\pm SE) of cytokines mRNA relative expression of *IFN α* , *IFN β* , *Il-1 β* and *TNF α* measured by qPCR in AMs stimulated by a) 10 ng/mL of FSL-1, b) 1 μ g/mL of Poly(I:C) and c) 100 ng/mL of LPS during different time of incubation, compared to their expression in non-stimulated AMs (0). The relative mRNA expression is normalized to the geometric mean of three housekeeping genes (not shown here) using qbase+ software. $n = 3$ for all groups; (*) shows significant differences ($p < 0.05$) of gene expression between time 0 (unstimulated cells) and other times; (**) shows significant differences ($p < 0.01$) between time 0 (unstimulated cells) and other times; (***) shows significant differences ($p < 0.001$) between time 0 (unstimulated cells) and other times.

Table 3

Selected combinations of incubation time/ligand concentration, allowing optimal AMs stimulation.

TLR ligand	Incubation time (h)	Ligand concentration (ng/mL)
Poly(I:C)	1	1000
FSL-1	3	10
LPS	3	100

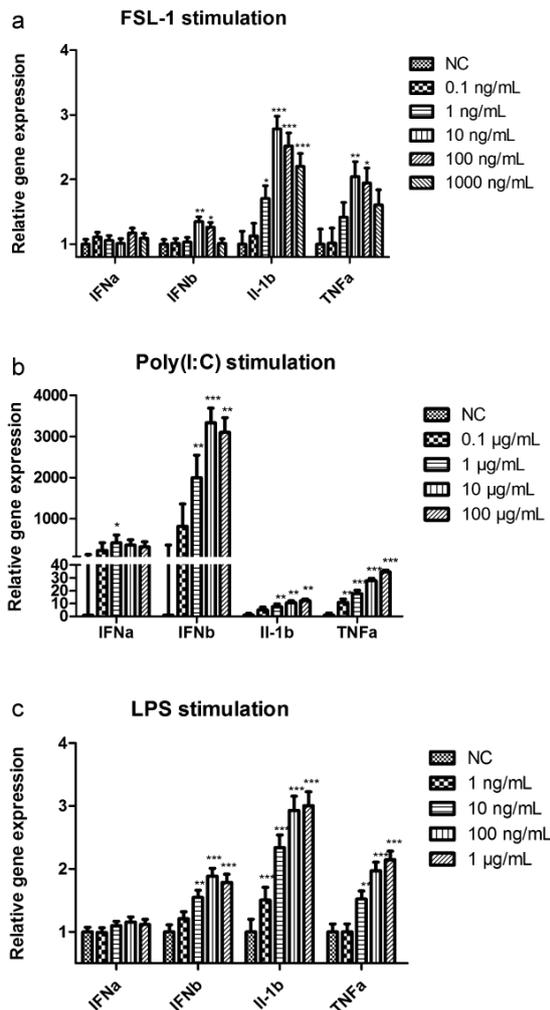


Fig. 3. LSmeans (\pm SE) of cytokines mRNA relative expression of IFN α , IFN β , Il-1 β and TNF α measured by qPCR in AMs stimulated by different doses of (a) FSL-1, (b) Poly(I:C) and (c) LPS during 1 h for Poly(I:C) and 3 h for LPS and FSL-1, compared to their expression in non-stimulated AMs (NC). The relative mRNA expression is normalized to the geometric mean of three housekeeping genes (not shown here) using qbase+ software. $n=3$ for all groups; (*) shows significant differences ($p < 0.05$) between NC and stimulated cells. (**) shows significant differences ($p < 0.01$) between NC and stimulated cells. (***) shows significant differences ($p < 0.001$) between NC and stimulated cells.

Unstimulated AMs did not secrete any significant amount of IFN β ($p = 0.3103$) or TNF α ($p = 0.3301$), whatever the time of the incubation of cells.

The time of 6 h was finally selected to remove supernatants for measuring cytokines production.

4. Discussion

The aim of this study was to validate a method to evaluate the innate immune response of pulmonary AMs of horses. We showed that it was possible to stimulate AMs

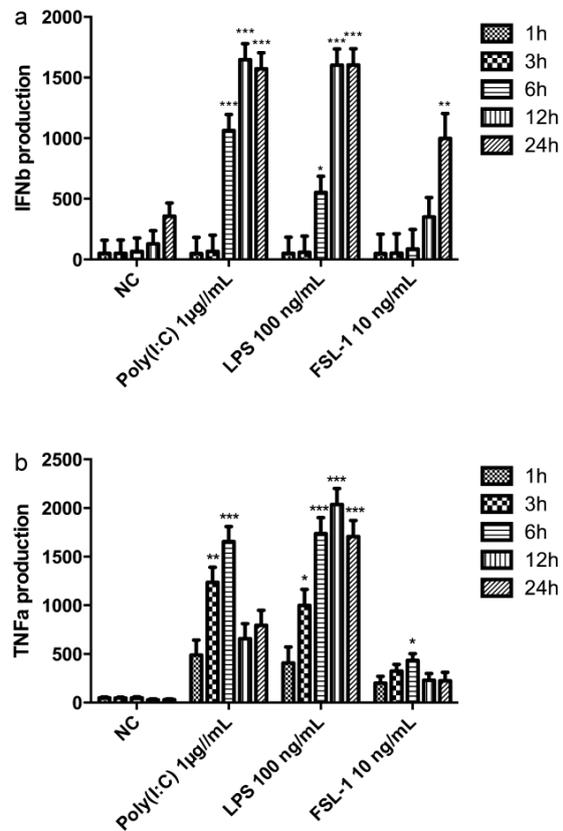


Fig. 4. LSmeans (\pm SE) of IFN β and TNF α protein concentration in supernatants of AMs culture removed after different times of incubation with TLRs ligands at the selected concentration. $n=4$ for all groups. (*) shows significant differences ($p < 0.05$) between 1 h of incubation and other durations for each ligand. (**) shows significant differences ($p < 0.01$) between 1 h of incubation and other durations for each ligand. (***) shows significant differences ($p < 0.001$) between 1 h of incubation and other durations for each ligand.

from the BAL with pathogen mimetics. Cell response was evaluated by measuring cytokines gene expression (indirect method) or cytokines production (direct method).

AMs, as a specialized phagocytic cell population, are the leukocytes that interact with pathogens and initiate the immune response cascade. They represent the predominant innate cellular defense of the lung. That is why this study focused on this cell type rather than on the global alveolar white cells population. In horses, AMs account for 40–60% of the normal alveolar population and this percentage may significantly decrease in cases of pulmonary inflammation (Couetil et al., 2001). In other species such as humans, dogs, pigs or mice, cells obtained from normal BAL are principally AMs (78–98%), thus rendering the process of purification unnecessary (Liu et al., 2012; Mercier et al., 2011). The purification method used in this study was based on the adhesion properties of macrophages (Laan et al., 2005; Muehlmann et al., 2012) and leads to a quite low purity. Despite 3 h of incubation to enable AMs adhesion and three gentle washing steps to discard

non adherent cells, it was very difficult to obtain more than 75% of AMs. Contamination by other cells has to be taken into account when interpreting results even if TLR stimulations have been shown to be ineffective on lymphocytes (unpublished data). Another technique has been described to isolate AMs, magnetic activated cell sorting (MACS), which confers a better purity, ranging from 87 to 99% (Joubert et al., 2011). However, it could not be used to study TLR stimulation because of the binding, by MACS antibodies, of CD14 (cluster of differentiation antigen 14), which is specifically required for the detection of LPS by TLR4 and cooperates with other TLRs, like TLR2 and TLR3 (Akashi-Takamura and Miyake, 2008). Blocking CD14 by MACS antibodies could lead to a loss of TLR sensing for their specific ligands.

Several studies on TLR expression are available for different species but comparing results obtained by qPCR is often difficult because of differences in normalization methods. In human, TLRs expression in different tissues has been evaluated, showing that those involved in immune functions (spleen, blood leukocytes) and those expected to be in contact with micro-organisms (lung, intestines) displayed the most diverse repertoire of TLRs. Furthermore, TLR expression profile seems to be dissimilar between autologous human AMs and monocytes, probably due to differentiation and compartmentalization (Juarez et al., 2010). In horses, expression of TLRs has been evaluated in monocytes activated by TLRs ligands (Kwon et al., 2010). Results showed that activation of a TLR by its specific ligand increases expression not only of the TLR itself but also of other TLRs triggering the same pathway (MyD-88 or TRIF-dependent pathways). Equine pulmonary TLRs expression has been evaluated for TLRs 2, 4, and 9 in the whole lungs of healthy or RAO horses (Berndt et al., 2007; Schneberger et al., 2009; Singh Suri et al., 2006). In the current experiment, we showed that equine AMs significantly over-expressed TLRs 2, 3, and 4 when compared to skeletal muscular tissue.

Studies concerning the innate immune response of horses in general, and TLRs stimulation in particular, have been previously performed mainly on blood cells (Figueiredo et al., 2009; Kwon et al., 2010; Watrang et al., 2012). Concerning equine alveolar cells, it has been performed for TLRs 3 and 4, but on the heterogeneous lung cell population (Mignot et al., 2012).

Two methods have been used to evaluate AMs response to TLRs ligands. First, we used qPCR to determine appropriate doses and durations of incubation. This technique was useful to evaluate several cytokines gene expression profiles following TLRs activation because of the lack of commercially available reagents for direct quantification of most equine cytokines. Because mRNA quantification might not reflect the exact biologically active cytokines levels released by cells, we decided to assay two commercially available equine ELISA kits to quantify protein levels of IFN β and TNF α , which are the targets of respectively TRIF and MyD-88 dependent TLRs signaling pathways. Results obtained with the direct method were very similar to those obtained with qPCR but release of cytokines in the medium occurred a few hours later, possibly representing the time between transcription, mRNA translation, and release into

extracellular compartment. Six hours of AM stimulation was chosen before removing supernatants so as to have a sufficient quantity of IFN β and TNF α , and to avoid saturation of medium, which could hide possible fluctuations of responses. Using ELISA to quantify cytokines production is more representative of cells response and should be preferred when specific kits are available.

In conclusion, despite the fact that pulmonary diseases are highly prevalent in athletic horses, methods to evaluate the pulmonary innate immune response are lacking. The originality of this work was to provide an equine model of TLR stimulation in purified AMs which could be easily used to monitor pulmonary innate immunity and detect inappropriate response (i.e. excessive or insufficient) that may be involved in respiratory disease pathogenesis. We showed that purified equine AMs from the BAL expressed TLRs 2, 3, and 4, and that these TLRs could be stimulated by synthetic ligands. We determined the most efficient concentration and time of incubation for each ligand. Cellular responses were assessed by indirect method using qPCR for several cytokines, or by direct quantification with equine ELISA kits for TNF α and IFN β . This protocol may now be used to evaluate equine pulmonary innate immune response in AMs in several physiological and pathological conditions. This experimental model may increase our understanding of equine respiratory diseases pathogenesis and may suggest novel therapeutic opportunities.

Conflict of interest statement

The authors disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence this work.

Acknowledgements

This work was funded by the Institut Français du Cheval et de l'Équitation (IFCE) and the Conseil Régional de Basse-Normandie. The author thanks Clémence Mignot for its help at the beginning of this work, members of CIRALE, the Center of Equine Sports Medicine of Liege University, GIGA, ANSES, and the Frank Duncombe Laboratory for their cordial welcome and assistance in laboratory experiments.

References

- Akashi-Takamura, S., Miyake, K., 2008. TLR accessory molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 420–425.
- Akira, S., 2003. Mammalian toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 5–11.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801.
- Bedoret, D., Wallemacq, H., Marichal, T., Desmet, C., Quesada Calvo, F., Henry, E., Closset, R., Dewals, B., Thielen, C., Gustin, P., de Leval, L., Van Rooijen, N., Le Moine, A., Vanderplasschen, A., Cataldo, D., Drion, P.V., Moser, M., Lekeux, P., Bureau, F., 2009. Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 3723–3738.
- Beekman, L., Tohver, T., Leguillet, R., 2012. Comparison of cytokine mRNA expression in the bronchoalveolar lavage fluid of horses with inflammatory airway disease and bronchoalveolar lavage mastocytosis or neutrophilia using REST software analysis. *J. Vet. Intern. Med.* 26, 153–161.

- Berndt, A., Derksen, F.J., Venta, P.J., Ewart, S., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Robinson, N.E., 2007. Elevated amount of toll-like receptor 4 mRNA in bronchial epithelial cells is associated with airway inflammation in horses with recurrent airway obstruction. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 292, L936–L943.
- Couetil, L.L., Hoffman, A.M., Hodgson, J., Buechner-Maxwell, V., Viel, L., Wood, J.L., Lavoie, J.P., 2007. Inflammatory airway disease of horses. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 356–361.
- Couetil, L.L., Rosenthal, F.S., DeNicola, D.B., Chilcoat, C.D., 2001. Clinical signs, evaluation of bronchoalveolar lavage fluid, and assessment of pulmonary function in horses with inflammatory respiratory disease. *Am. J. Vet. Res.* 62, 538–546.
- Figueiredo, M.D., Vandenplas, M.L., Hurley, D.J., Moore, J.N., 2009. Differential induction of MyD88- and TRIF-dependent pathways in equine monocytes by Toll-like receptor agonists. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 127, 125–134.
- Fortier, G., van Erck, E., Fortier, C., Richard, E., Pottier, D., Pronost, S., Miszczak, F., Thiry, E., Lekeux, P., 2009. Herpesviruses in respiratory fluids of horses: putative implication in airway inflammation and association with cytological features. *Vet. Microbiol.* 139, 34–41.
- Gornik, K., Moore, P., Figueiredo, M., Vandenplas, M., 2011. Expression of Toll-like receptors 2, 3, 4, 6, 9, and MD-2 in the normal equine cornea, limbus, and conjunctiva. *Vet. Ophthalmol.* 14, 80–85.
- Hughes, K.J., Nicolson, L., Da Costa, N., Franklin, S.H., Allen, K.J., Dunham, S.P., 2011. Evaluation of cytokine mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells from horses with inflammatory airway disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 140, 82–89.
- Joubert, P., Cordeau, M.E., Lavoie, J.P., 2011. Cytokine mRNA expression of pulmonary macrophages varies with challenge but not with disease state in horses with heaves or in controls. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 142, 236–242.
- Juarez, E., Nunez, C., Sada, E., Ellner, J.J., Schwander, S.K., Torres, M., 2010. Differential expression of toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. *Respir. Res.* 11, 2.
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S., 2009. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 621–625.
- Kwon, S., Vandenplas, M.L., Figueiredo, M.D., Salter, C.E., Andrietti, A.L., Robertson, T.P., Moore, J.N., Hurley, D.J., 2010. Differential induction of toll-like receptor gene expression in equine monocytes activated by toll-like receptor ligands or TNF-alpha. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 138, 213–217.
- Laan, T.T., Bull, S., Pirie, R.S., Fink-Gremmels, J., 2005. Evaluation of cytokine production by equine alveolar macrophages exposed to lipopolysaccharide. *Aspergillus fumigatus*, and a suspension of hay dust. *Am. J. Vet. Res.* 66, 1584–1589.
- Lavoie, J.P., Cesarini, C., Lavoie-Lamoureux, A., Moran, K., Lutz, S., Picandet, V., Jean, D., 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.
- Liu, Y., Song, M., Che, T.M., Bravo, D., Pettigrew, J.E., 2012. Anti-inflammatory effects of several plant extracts on porcine alveolar macrophages in vitro. *J. Anim. Sci.* 90, 2774–2783.
- Mercier, E., Bolognin, M., Hoffmann, A.C., Tual, C., Day, M.J., Clercx, C., 2011. Influence of age on bronchoscopic findings in healthy beagle dogs. *Vet. J.* 187, 225–228.
- 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. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 147, 127–135.
- Muehlmann, L.A., Michelotto Jr., P.V., Nunes, E.A., Grando, F.C., da Silva, F.T., Nishiyama, A., 2012. PAF increases phagocytic capacity and superoxide anion production in equine alveolar macrophages and blood neutrophils. *Res. Vet. Sci.* 93, 393–397.
- Naessens, T., Vander Beken, S., Bogaert, P., Van Rooijen, N., Lienenklaus, S., Weiss, S., De Koker, S., Grooten, J., 2012. Innate imprinting of murine resident alveolar macrophages by allergic bronchial inflammation causes a switch from hypoinflammatory to hyperinflammatory reactivity. *Am. J. Pathol.* 181, 174–184.
- Richard, E.A., Fortier, G.D., Lekeux, P.M., Van Erck, E., 2010a. Laboratory findings in respiratory fluids of the poorly-performing horse. *Vet. J.* 185, 115–122.
- Richard, E.A., Fortier, G.D., Pitel, P.H., Dupuis, M.C., Valette, J.P., Art, T., Denois, J.M., Lekeux, P.M., Erck, E.V., 2010b. Sub-clinical diseases affecting performance in standardbred trotters: diagnostic methods and predictive parameters. *Vet. J.* 184, 282–289.
- Quintana, A.M., Landolt, G.A., Annis, K.M., Hussey, G.S., 2011. Immunological characterization of the equine airway epithelium and of a primary equine airway epithelial cell culture model. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 140, 226–236.
- Schneberger, D., Caldwell, S., Suri, S.S., Singh, B., 2009. Expression of toll-like receptor 9 in horse lungs. *Anat. Rec. (Hoboken)* 292, 1068–1077.
- Singh Suri, S., Janardhan, K.S., Parbhakar, O., Caldwell, S., Appleyard, G., Singh, B., 2006. Expression of toll-like receptor 4 and 2 in horse lungs. *Vet. Res.* 37, 541–551.
- Takeda, K., Akira, S., 2004. TLR signaling pathways. *Sem. Immunol.* 16, 3–9.
- Watttrag, E., Palm, A.K., Wagner, B., 2012. Cytokine production and proliferation upon in vitro oligodeoxyribonucleotide stimulation of equine peripheral blood mononuclear cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 146, 113–124.
- Wilsher, S., Allen, W.R., Wood, J.L., 2006. Factors associated with failure of thoroughbred horses to train and race. *Equine Vet. J.* 38, 113–118.
- Wood, J.L., Newton, J.R., Chanter, N., Mumford, J.A., 2005. Association between respiratory disease and bacterial and viral infections in British racehorses. *J. Clin. Microbiol.* 43, 120–126.
- Yang, M., Kumar, R.K., Hansbro, P.M., Foster, P.S., 2012. Emerging roles of pulmonary macrophages in driving the development of severe asthma. *J. Leuk. Biol.* 91, 557–569.
- Zarembek, K.A., Godowski, P.J., 2002. Tissue expression of human toll-like receptors and differential regulation of toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J. Immunol.* 168, 554–561.

ARTICLE 2

1 **Training modifies innate immune responses in blood monocytes and in pulmonary alveolar**
2 **macrophages**

3 Running title: **Training modifies innate immune responses**

4 Linda Frelstedt^{1,6,*†}, Ingrid Waldschmidt^{2,6,†}, Philippe Gosset^{3,6}, Christophe Desmet^{4,6}, Dimitri
5 Pirottin^{4,6}, Fabrice Bureau^{4,6}, Frédéric Farnir⁵, Marie-Capucine Dupuis-Tricaud^{2,6}, Pierre
6 Lekeux^{1,6}, Tatiana Art^{1,6}.

1 **Training modifies innate immune responses in blood monocytes and in pulmonary alveolar**
2 **macrophages**

3 Running title: **Training modifies innate immune responses**

4 Linda Frelstedt^{1,6,*†}, Ingrid Waldschmidt^{2,6,†}, Philippe Gosset^{3,6}, Christophe Desmet^{4,6}, Dimitri
5 Pirottin^{4,6}, Fabrice Bureau^{4,6}, Frédéric Farnir⁵, Marie-Capucine Dupuis-Tricaud^{2,6}, Pierre
6 Lekeux^{1,6}, Tatiana Art^{1,6}.

7 ¹Center of Equine Sports Medicine, University of Liege, Liege, Belgium.

8 ²CIRALE, National Veterinary School of Alfort, Goustranville, France.

9 ³Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, F-59019 Lille, France;
10 Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France; Centre National de la Recherche
11 Scientifique, UMR8204, F-59021 Lille, France; Institut National de la Santé et de la Recherche
12 Médicale, U1019, F-59019 Lille, France; Institut Fédératif de Recherche 142, F-59019 Lille,
13 France.

14 ⁴Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, GIGA-Research, University of Liege,
15 Liege, Belgium.

16 ⁵Department of Animal Production, University of Liege, Liege, Belgium.

17 ⁶Hippolia Foundation, Caen, France.

18 *Corresponding author: Center of Equine Sports Medicine, Faculty of Veterinary Medicine,
19 University of Liege, Boulevard de Colonster 20, Batiment 42, 4000 Liege, Belgium. Tel: +32-
20 4366-4030. Fax: +32-4366-2935. Email address: linda.frelstedt@ulg.ac.be

21 †Authors contributed equally to the study.

22 ‡This work was supported by the Hippolia Foundation, the Conseil Regional de Basse-
23 Normandie and the European Regional Development Fund.

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39 **Abstract**

40 In humans, strenuous exercise causes increased susceptibility to respiratory infections associated
41 with down-regulated expression of Toll-like receptors (TLRs), co-stimulatory and antigen-
42 presenting molecules. Lower airway diseases are also a common problem in sport and racing
43 horses. Because the innate immunity plays an essential role in lung defense mechanisms against
44 pathogens, we aimed to assess the effect of acute exercise and training on innate immune
45 responses in two different compartments. Blood monocytes and PAM were collected from
46 untrained, moderately and intensively trained as well as deconditioned horses before and after a
47 strenuous exercise test (SET). The cells were analysed for TLR expression by real-time PCR,
48 stimulated with TLR ligands *in vitro* and the cytokine production was measured by ELISA. Our
49 results showed that training, but not acute exercise, modified the innate immune responses in
50 both compartments. The expression of TLR3 was down-regulated by training in both cell types,
51 whereas the expression of TLR4 was up-regulated in monocytes only. LPS- and FSL-treated
52 monocytes showed increased cytokine secretion in trained and deconditioned subjects indicating
53 the activation of cells at the systemic level. The production of TNF-alpha and IFN-beta in non-
54 stimulated and stimulated PAM was decreased in trained and deconditioned horses and might
55 therefore explain the increased susceptibility to respiratory viral infections. Our study reports a
56 dissociation between the systemic and local compartments that might suggest beneficial effects
57 of training on monocytes as well as detrimental effects on lung defense mechanisms.

58

59 **Keywords:** exercise, innate immunity, monocytes, pulmonary alveolar macrophages, TNF-
60 alpha, IFN-beta, equine

61 **INTRODUCTION**

62 The relationship between exercise and infection has been explored extensively in animal models
63 and human studies (1-5) but nonetheless, information regarding the effect of exercise or regular
64 training on the innate immune response is scarce. In general, it has been concluded that regular
65 moderate exercise is beneficial and protects from respiratory inflammation and infection (3, 6).

66 In contrast, prolonged strenuous exercise disturbs the immune response and results in an
67 increased risk of respiratory illnesses (3-5, 7). The underlying mechanisms remain unclear.

68 The innate immunity represents the first line of defense and is effective immediately after
69 exposure to pathogens. In the airways, pulmonary alveolar macrophages (PAM) with airway
70 epithelial cells represent the sentinels of this system. In immune cells, a variety of pathogen
71 recognition receptors (PRRs), located on the surface or in intracellular compartments, interact
72 with pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and control the host defense mechanisms.
73 Toll-like receptors (TLR) represent important signaling PRRs that recognize PAMPs. They are
74 essential for the initiation of the immune response against bacteria, viruses and fungi (8, 9). Once
75 TLRs are stimulated by PAMPs, a downstream cascade is activated which results in the
76 production of interferons, pro-inflammatory cytokines, chemokines, and cytotoxic activities (8,
77 9). This first response is essential for an immediate protection against viral and bacterial
78 infection. It has been widely recognized that alteration of this response promotes respiratory
79 infection and lung inflammation as described in athletes after prolonged intense exercise and
80 strenuous competition (3, 7, 10-12). The effect of exercise on the different leukocyte
81 populations, on phagocytosis and oxidative burst activity has been examined and these data
82 revealed an increased phagocytosis associated with a defect in oxidative burst activity in
83 granulocytes (13, 14). Researchers in human sports medicine have compared populations of

84 sedentary and regularly exercising people after a single cycling exercise. They showed that the
85 expression of TLRs 1, 2, 3 and 4 is decreased in peripheral blood monocytes in regularly
86 exercising subjects (8, 15). This altered expression of TLRs is also associated with a lower
87 production of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 α , TNF- α) in response to stimulation with
88 LPS (8). Further, regular exercise induces circulating anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-6)
89 (8, 16) and thereby, limits the effects of pro-inflammatory cytokines.

90 Sport horses, and especially racing horses, suffer frequently from respiratory inflammation and
91 infection, as do human athletes. They have an athletic potential comparable to men and therefore,
92 represent a unique model for the study of exercise and training on the immune function. Easy
93 sampling of peripheral blood and bronchoalveolar lavages allow to perform longitudinal studies
94 in horses implicated in a training program. In order to investigate the effect of acute (single
95 strenuous exercise) and chronic (training) exercise on the innate immunity, we decided to
96 analyze TLR expression and function in the local as well as in the systemic compartment in a
97 group of horses submitted to a program of training. In this study, we focused on TLRs 2 and 4
98 which are mainly involved in the recognition of gram+ and gram- bacteria as well as TLR3 and
99 the recognition of respiratory viruses. For this, the innate immune response was investigated in
100 peripheral blood monocytes and PAM from untrained, trained and deconditioned equine athletes.
101 We examined 1) the expression of TLRs in monocytes and PAM, 2) the baseline cytokine
102 production in monocytes and PAM cultured *ex vivo*, 3) the cytokine production after stimulation
103 of TLRs *ex vivo* and 4) the relationship with serum concentrations of stress markers such as
104 cortisol.

105 **MATERIALS AND METHODS**

106 **Horses**

107 Eight healthy untrained (UT) Standardbred horses were enrolled in this study (see online
108 supplement for details). Our protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the
109 National Veterinary School of Alfort (agreement number: 13/12/11-9).

110 **Training protocol**

111 The horses underwent 8 weeks of moderate training (MT) which was followed by an intensive
112 training (IT) period of 8 weeks. Subsequently, the horses were kept in a grass pasture for a
113 period of deconditioning (DC) (see online supplement).

114 **Standardized exercise test (SET)**

115 The horses underwent a SET on a treadmill until fatigue prior to and at the end of the training
116 period as well as at the end of the deconditioning period. The SET was performed as previously
117 published (17). A fourth step was performed at 11.0 m/s until fatigue.

118 **Reagents**

119 All reagents for the cell isolation and cell culture were obtained from Life Technologies, Paisley,
120 UK unless stated otherwise.

121 **Sample collection**

122 Blood samples and bronchoalveolar lavage fluid were collected before and after SET prior to and
123 at the end of the moderate and the intensive training period as well as at the end of the
124 deconditioning period in order to assess the effect of the training status on the innate immune
125 response (see online supplement).

126 **Blood collection, monocyte isolation and cell culture**

127 Blood was collected aseptically for hematology, monocyte isolation and serum cortisol
128 measurements. PBMC were isolated by Histopaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
129 density gradient (density 1.077 g/ml) centrifugation, monocytes were recovered by adherence
130 and treated with TLR ligands as described in the online supplement.

131 **Bronchoalveolar lavage sampling, PAM isolation and culture**

132 Bronchoalveolar lavages (BAL), PAM isolation and culture were performed as previously
133 described (18). PAM were treated with TLR ligands as described in the online supplement.

134 **Cytokine measurement by ELISA**

135 Cell culture supernatants were assayed for TNF-alpha (R&D Systems, Abingdon, UK) and IFN-
136 beta (USCN Life Science Inc., Wuhan, China) concentrations with commercially available
137 equine ELISA kits.

138 **RNA isolation, cDNA synthesis and real-time PCR**

139 RNA was isolated from non-stimulated control cells (NC) and cDNA were generated as
140 previously described (18).

141 Gene expression of TLR2, TLR3, TLR4 and TLR6 was quantified by real-time PCR as described
142 in the online supplement.

143 **Cortisol measurement**

144 Cortisol concentrations in serum were determined by solid-phase, competitive chemiluminescent
145 immunoassay (IMMULITE® 2000 Cortisol, Siemens Healthcare Diagnostics Products Ltd).

146 **Statistical analysis**

147 Blood cell counts, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cell counts, TNF-alpha and IFN-beta
148 concentrations as well as relative gene expression data were analysed by a global linear mixed
149 model (SAS, Cary, NC, USA). All data are reported as least square means (LSmeans) ±
150 associated SE. Differences were considered to be significant when p value was less than 0.05.

151 **RESULTS**

152 **Training Induces Airway Inflammation**

153 To study the effects of acute exercise and regular training on the innate immune response in the
154 lung, we first examined the cells in the BALF. There was a significant increase in total BAL
155 cells in intensively trained horses at rest and after strenuous exercise compared to total BAL cell
156 counts in untrained (P=0.0071) and moderately trained (P=0.0037) horses (Table 1). No
157 significant difference in BAL macrophage numbers was determined. The number of BAL
158 lymphocytes was significantly increased after intensive training (P=0.029) and deconditioning
159 (P=0.018) in comparison to moderately trained horses. The BAL neutrophils were significantly
160 increased after intensive training when compared to untrained (P=0.015) and moderately trained
161 (P=0.025) horses and may indicate the development of airway inflammation after a period of
162 intensive training.

163 Concurrently, we examined the distribution of cells in peripheral blood in order to determine
164 whether a similar effect could be found in the systemic compartment. Training or acute exercise
165 had no significant effect on the complete white blood cell count or monocyte count (Table 2).
166 The total lymphocyte count was significantly decreased after moderate (P<0.001) and intensive
167 training (P<0.001) and remained decreased in deconditioned (P<0.001) horses. In contrast, acute

168 exercise had no effect on the total lymphocyte count. The peripheral blood neutrophil count was
169 only increased after acute exercise in intensively trained horses ($P < 0.001$).

170 **Training Leads to Decreased Expression of TLR3 in Monocytes and PAM**

171 To characterize the effects on the innate immune system more specifically, we examined the
172 expression of TLRs in monocytes and PAM. We focused on the expression of TLR2/6 which
173 recognizes molecular patterns specific for gram-positive bacteria, TLR4 which recognizes
174 bacterial lipopolysaccharide (LPS) specific for gram-negative bacteria and TLR3 which mediates
175 the response to double-stranded RNA, a marker of viral infection (8, 9), in order to account for
176 the most common respiratory pathogens in horses. In monocytes, the expression of TLR3
177 ($P < 0.015$) and TLR6 ($P < 0.025$) was significantly decreased in trained and deconditioned horses
178 compared with untrained horses (Fig. 1A). The expression of TLR2 was significantly increased
179 in deconditioned horses when compared to untrained ($P = 0.0024$) and intensively trained horses
180 ($P = 0.0028$). Training ($P = 0.0004$) and to a lower degree deconditioning ($P = 0.03$) resulted in an
181 upregulated TLR4 expression when compared to untrained horses. Acute exercise had no
182 significant effect on the TLR expression in monocytes (data not shown).

183 In PAM, moderate ($P < 0.0001$) and intensive ($P < 0.0001$) training induced a significant decrease
184 in TLR3 expression (Fig. 1B) but acute exercise had no effect on TLR3 expression (data not
185 shown). Training or acute exercise had no effect on the expression of TLR2 and TLR4 in PAM.
186 However, deconditioning induced a significant decrease in TLR4 expression ($P = 0.0004$).

187 **Training Results in a Pro-inflammatory Response after *ex vivo* Treatment with TLR** 188 **Agonists in Monocytes**

189 We next investigated the effect of *ex vivo* treatment with TLR agonists in order to assess whether
190 the changes in TLR expression were associated with an altered cytokine secretion after training
191 and/or acute exercise.

192 The baseline TNF-alpha (Fig. 2A) and IFN-beta (Fig. 2B) secretion in monocytes with medium
193 alone did not differ at any time point. Treatment with FSL and LPS resulted in significantly
194 increased TNF-alpha production ($P<0.009$) at all time points in comparison to non-treated cells
195 whereas Poly(I:C) did not. The secretion of TNF-alpha induced by FSL and LPS was
196 significantly higher in trained and deconditioned horses ($P<0.0001$) when compared with
197 untrained animals. In addition, LPS-stimulated cells from deconditioned horses produced
198 significantly more TNF-alpha than cells from moderately and intensively trained horses
199 ($P<0.0001$).

200 No significant increase of IFN-beta levels was detected with the TLR ligands in cells from
201 untrained horses. Stimulation with LPS of cells from intensively trained ($P<0.025$) and
202 deconditioned horses ($P<0.001$) induced a significantly higher secretion of IFN-beta compared to
203 cells from untrained horses. This secretion was also significantly different in deconditioned
204 horses from moderately ($P<0.0001$) and intensively trained ($P=0.0024$) horses. Acute exercise
205 did not affect the secretion of TNF-alpha or IFN-beta in monocytes.

206 **Training Inhibits *ex vivo* TNF-alpha and IFN-beta secretion in PAM after stimulation with**
207 **TLR2 and TLR3 Agonists**

208 To determine whether the anti-viral and anti-bacterial defense mechanisms in the lung are
209 impaired by training or acute exercise, we treated PAM *ex vivo* with TLR agonists and assessed
210 the production of TNF-alpha and IFN-beta. The baseline production of TNF-alpha (Fig. 2C) and

211 IFN-beta (Fig. 2D) in non-stimulated PAM was significantly decreased by moderate ($P<0.05$)
212 and intensive training ($P<0.001$) and remained significantly decreased in deconditioned horses
213 ($P<0.001$). Stimulation with the three ligands significantly increased TNF-alpha production in
214 untrained horses ($P<0.03$). TNF-alpha production induced by FSL and Poly(I:C) was decreased
215 by intensive training ($P<0.005$) and was not restored after a period of deconditioning when
216 treated with FSL ($P=0.0172$). No significant effect of training or deconditioning on the
217 production of TNF-alpha was observed in LPS-treated cells. Acute exercise had no effect on the
218 secretion of TNF-alpha in non-treated or treated PAM.

219 Only treatment with Poly(I:C) induced a significantly increased IFN-beta secretion ($P<0.014$)
220 when compared to baseline. The IFN-beta production induced by Poly(I:C) was decreased by
221 intensive training ($P=0.0009$) and remained decreased in deconditioned horses ($P=0.0006$).
222 Acute exercise increased the secretion of IFN-beta induced by LPS treatment ($P=0.0174$) in
223 trained horses only (pre-exercise: 397.61 ± 229.4 pg/ml vs. post-exercise: 1028.07 ± 240.17 pg/ml).

224 **Cortisol Is Elevated after Acute Exercise but is not Associated with Cytokine Modulation**

225 In order to explore the relationship between cortisol, which is released in situations of physical
226 stress, and the innate immune response, we examined serum cortisol concentrations in
227 association with the different training statuses and acute strenuous exercise. Cortisol levels
228 showed a significant increase one hour after acute exercise in untrained ($P<0.001$), intensively
229 trained ($P<0.001$) and deconditioned ($P<0.001$) horses but were not influenced by the training
230 status itself (Figure 3). Serum cortisol levels were not correlated with cytokine production.

231 **DISCUSSION**

232 Our experimental protocol has allowed us to investigate the effect of exercise and/or training on
233 innate immune responses in horses during a period of 10 months. We demonstrate that the

234 expression of TLR3 and TLR4 in monocytes was modified in an opposite manner by training.
235 The downregulation of TLR3 has been reported in regularly exercising humans (8, 15). In
236 contrast, the amplified expression of TLR4 in monocytes after a period of training and
237 deconditioning is described for the first time. Monocytes are very sensitive to bacterial endotoxin
238 and can be easily stimulated with LPS. Moreover, the increased secretion of TNF-alpha in LPS-
239 stimulated cells from trained and deconditioned individuals might be related to the up-regulated
240 expression of TLR4 and a more efficient recognition of PAMPs by TLRs at the systemic level.
241 When TLR4 is activated it signals via MyD88 and TRIF resulting in the production of TNF-
242 alpha but also type I IFNs (9). An increased responsiveness of TLR4 might therefore also explain
243 the increased IFN-beta secretion in trained and deconditioned horses. Interestingly, down-
244 regulated expression of TLR1-4 in monocytes has been reported in cross-sectional studies (8,
245 15). In our hands, no modulation of TLR2 expression was detected whereas the response of
246 monocytes to the TLR2/6 ligand, FSL, increased. For TLR3, we cannot conclude regarding the
247 function of this receptor since no increased secretion of TNF-alpha and IFN-beta was detected at
248 the dose tested. The difference between our study and the data obtained in humans might be
249 related to the species but also to the type of training applied.

250 In comparison with the systemic level, the response within the lungs completely differs. Training
251 induced mild airway inflammation which was elucidated by an increased total BAL cell count
252 and a significantly increased number of neutrophils and lymphocytes in the BALF after intensive
253 training. Although, the number of PAM was not affected, their function was modified by
254 training. Indeed, the expression of TLR3 is decreased in PAM after moderate and intensive
255 training and remains decreased after a period of deconditioning. The poly(I:C)-induced secretion
256 of TNF-alpha and IFN-beta in PAM was significantly impaired. In addition, the response to the

257 TLR2 ligand was decreased whereas its expression was not modified. This may suggest a local
258 suppression of innate immune defense mechanisms not only related to the modulation of TLR
259 expression. The recruitment of neutrophils and lymphocytes detected after intense training might
260 lead to the generation of a suppressive environment in the lung potentially explaining the defect
261 in macrophage function. The phenotype and the function analysis of the cells recruited in the
262 lung during training might help to decipher this mechanism. Nevertheless, the decrease in IFN-
263 beta production by PAM might be involved in the susceptibility to respiratory viral infections
264 reported in regularly exercising men (13) and horses (19, 20). Previous animal studies have
265 demonstrated that strenuous exercise impairs PAM viral defense mechanisms (4, 21), decreases
266 oxidative burst activity (22), impairs phagocytosis (23) and results in an increased susceptibility
267 to viral infection (4, 21, 24). The underlying mechanisms have not been elucidated yet.

268 Our study concurrently examines cells in two different compartments and reports a dissociation
269 between the immune response in the lungs and in the systemic compartment. We show that
270 regular intense exercise, but not single bouts of exercise, leads to a local decreased secretion of
271 IFN-beta, a major anti-viral cytokine, in the lungs. This decreased pulmonary production of IFN-
272 beta is associated with an inflammatory response in *ex vivo* treated peripheral blood monocytes
273 after pathogen exposure. The stimulation with TLR agonists illustrated the potential of PAM and
274 monocytes to respond to viral or bacterial stimuli at rest or after acute exercise in untrained,
275 trained and deconditioned horses. Acute exercise induces no significant differences in the innate
276 immune response but regular intense exercise results in impaired immune responses in PAM and
277 an enhanced pro-inflammatory potential in peripheral blood monocytes, both after treatment with
278 PAMPs. Earlier studies have already suggested differences between the innate immune response
279 of peripheral blood monocytes and tissue macrophages (13).

280 The response of monocytes in trained and deconditioned subjects to a potential bacterial
281 infection could imply beneficial effects on the immune system after a period of regular training.
282 Following exposure to pathogens, monocytes can be mobilized from the systemic compartment
283 into the lungs where they could compensate the impaired response of PAMs once located within
284 the lung.

285 Further, our data agree with findings from earlier studies that also reported increased serum
286 cortisol levels post-strenuous exercise in horses (25-27). We showed that only acute exercise but
287 not the training status had an effect on the cortisol concentrations. This is in contrast to a
288 longitudinal study that was recently performed in human athletes (11). Morgado et al. reported
289 that the plasma cortisol levels were associated with the training status of swimmers. This
290 discrepancy might be explained by differing species sensitivity to corticosteroids (28). Horses
291 are considered to be corticosteroid-resistant and it has been shown that even experimental
292 increases in corticosteroids fail to induce immunosuppression if the levels remain within the
293 physiological range (29, 30). We did not observe any correlation between the changes in
294 cytokine production and serum cortisol concentrations which is coherent with Kohut et al. (24).
295 In summary, cortisol is useful as a marker of a single strenuous exercise and acute stress but not
296 as a mechanism involved in the control of the immune response.

297 In conclusion, we show that training induces mild airway inflammation and a decreased
298 expression of TLR3 in monocytes and PAM. The low expression of TLR3 in trained individuals
299 is associated with an impaired *ex vivo* TNF-alpha and IFN-beta secretion in PAM. Our findings
300 may explain the increased susceptibility to pulmonary viral infections after prolonged intensive
301 training. The impact of cell recruitment in the airways and the development of an immune-
302 suppressive environment might be an interesting hypothesis. Finally, our model allowed us to

303 examine specific innate immune responses in two different compartments in a longitudinal study
304 and thereby, offers new data that might add to the understanding of the effects of training and
305 acute exercise on immunity.

306 **Acknowledgements**

307 The authors thank the University of Liege, the GIGA, the CIRALE, the Frank Duncombe
308 Laboratory, Zoetis, Raja Fares, Ilham Sbai, Julien De Curraize and Elodie Paumier-André for
309 their support during the study. A special thank you goes to Julien De Curraize for training the
310 horses that participated in the study.

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322 **References**

- 323 1. Nieman DC. Is infection risk linked to exercise workload? *Med Sci Sports Exerc*
324 2000;32:S406-411.
- 325 2. Gleeson M, Walsh NP. The bases expert statement on exercise, immunity, and infection.
326 *J Sports Sci*;30:321-324.
- 327 3. Pedersen BK, Toft AD. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br J Sports*
328 *Med* 2000;34:246-251.
- 329 4. Davis JM, Kohut ML, Colbert LH, Jackson DA, Ghaffar A, Mayer EP. Exercise, alveolar
330 macrophage function, and susceptibility to respiratory infection. *J Appl Physiol* 1997;83:1461-
331 1466.
- 332 5. Kohut ML, Boehm GW, Moynihan JA. Prolonged exercise suppresses antigen-specific
333 cytokine response to upper respiratory infection. *J Appl Physiol* 2001;90:678-684.
- 334 6. Nieman DC. Exercise immunology: Practical applications. *Int J Sports Med* 1997;18
335 Suppl 1:S91-100.
- 336 7. Nieman DC. Risk of upper respiratory tract infection in athletes: An epidemiologic and
337 immunologic perspective. *Journal of athletic training* 1997;32:344-349.
- 338 8. Gleeson M, McFarlin B, Flynn M. Exercise and toll-like receptors. *Exerc Immunol Rev*
339 2006;12:34-53.
- 340 9. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*
341 2006;124:783-801.
- 342 10. Suzuki K, Yamada M, Kurakake S, Okamura N, Yamaya K, Liu Q, Kudoh S, Kowatari
343 K, Nakaji S, Sugawara K. Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but

- 344 neutrophil-priming potentials rise after endurance exercise in humans. *Eur J Appl Physiol*
345 2000;81:281-287.
- 346 11. Morgado JM, Rama L, Silva I, de Jesus Inacio M, Henriques A, Laranjeira P, Pedreiro S,
347 Rosado F, Alves F, Gleeson M, Pais ML, Paiva A, Teixeira AM. Cytokine production by
348 monocytes, neutrophils, and dendritic cells is hampered by long-term intensive training in elite
349 swimmers. *Eur J Appl Physiol* 2012;112:471-482.
- 350 12. Pyne DB, Gleeson M. Effects of intensive exercise training on immunity in athletes. *Int J*
351 *Sports Med* 1998;19 Suppl 3:S183-191; discussion S191-184.
- 352 13. Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, Bishop NC, Fleshner M,
353 Green C, Pedersen BK, Hoffman-Goetz L, Rogers CJ, Northoff H, Abbasi A, Simon P. Position
354 statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev* 2011;17:6-63.
- 355 14. Nieman DC. Immune response to heavy exertion. *J Appl Physiol* 1997;82:1385-1394.
- 356 15. Lancaster GI, Khan Q, Drysdale P, Wallace F, Jeukendrup AE, Drayson MT, Gleeson M.
357 The physiological regulation of toll-like receptor expression and function in humans. *J Physiol*
358 2005;563:945-955.
- 359 16. Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK. Pro- and anti-inflammatory
360 cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol* 1999;515 (Pt 1):287-291.
- 361 17. Richard EA, Fortier GD, Pitel PH, Dupuis MC, Valette JP, Art T, Denoix JM, Lekeux
362 PM, Erck EV. Sub-clinical diseases affecting performance in standardbred trotters: Diagnostic
363 methods and predictive parameters. *Veterinary journal* 2010;184:282-289.
- 364 18. Waldschmidt I, Pirottin D, Art T, Audigie F, Bureau F, Tosi I, El Abbas S, Farnir F,
365 Richard E, Dupuis MC. Experimental model of equine alveolar macrophage stimulation with tlr
366 ligands. *Veterinary immunology and immunopathology* 2013.

- 367 19. Wood JL, Newton JR, Chanter N, Mumford JA. Association between respiratory disease
368 and bacterial and viral infections in british racehorses. *Journal of clinical microbiology*
369 2005;43:120-126.
- 370 20. Wilsher S, Allen WR, Wood JL. Factors associated with failure of thoroughbred horses to
371 train and race. *Equine Vet J* 2006;38:113-118.
- 372 21. Kohut ML, Davis JM, Jackson DA, Jani P, Ghaffar A, Mayer EP, Essig DA. Exercise
373 effects on ifn-beta expression and viral replication in lung macrophages after hsv-1 infection.
374 *The American journal of physiology* 1998;275:L1089-1094.
- 375 22. Raidal SL, Rose RJ, Love DN. Effects of training on resting peripheral blood and bal-
376 derived leucocyte function in horses. *Equine Vet J* 2001;33:238-243.
- 377 23. Raidal SL, Love DN, Bailey GD, Rose RJ. The effect of high intensity exercise on the
378 functional capacity of equine pulmonary alveolar macrophages and bal-derived lymphocytes.
379 *Research in veterinary science* 2000;68:249-253.
- 380 24. Kohut ML, Davis JM, Jackson DA, Colbert LH, Strasner A, Essig DA, Pate RR, Ghaffar
381 A, Mayer EP. The role of stress hormones in exercise-induced suppression of alveolar
382 macrophage antiviral function. *Journal of neuroimmunology* 1998;81:193-200.
- 383 25. Horohov DW, Dimock A, Guirnalda P, Folsom RW, McKeever KH, Malinowski K.
384 Effect of exercise on the immune response of young and old horses. *Am J Vet Res* 1999;60:643-
385 647.
- 386 26. Robson PJ, Alston TD, Myburgh KH. Prolonged suppression of the innate immune
387 system in the horse following an 80 km endurance race. *Equine Vet J* 2003;35:133-137.

- 388 27. Cywinska A, Szarska E, Degorski A, Guzera M, Gorecka R, Strzelec K, Kowalik S,
389 Schollenberger A, Winnicka A. Blood phagocyte activity after race training sessions in
390 thoroughbred and arabian horses. *Research in veterinary science* 2013.
- 391 28. Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. Molecular determinants of glucocorticoid
392 receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocrine reviews* 1996;17:245-261.
- 393 29. Jefferies WM. Cortisol and immunity. *Medical hypotheses* 1991;34:198-208.
- 394 30. Magnuson NS, McGuire TC, Banks KL, Perryman LE. In vitro and in vivo effects of
395 corticosteroids on peripheral blood lymphocytes from ponies. *Am J Vet Res* 1978;39:393-398.

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407 **TABLE 1: EFFECT OF TRAINING AND EXERCISE ON BRONCHOALVEOLAR**
 408 **LAVAGE FLUID CELL COUNTS**

	Total cell count (cells/mm³)	Macrophages/mm³	Lymphocytes/mm³	Neutrophils/mm³
Untrained	72.5±40.39	34.34±5.83	33.18±5.83	3.13±0.64
Untrained-PE	79.29±36.58	35.1±5.48	39.78±6.15	3.04±0.87
Moderate Training	58.28±16.47	31.91±6.29	22.28±6.23	2.6±0.96
Intensive Training	113.58±53.14 ^{†‡}	40.54±5.56	55.11±8.09 [‡]	5.4±0.72 ^{†‡}
Intensive Training-PE	97.97±40.65 ^{†‡}	39.47±5.37	38.71±6.86 [‡]	4.78±1.01
Deconditioned	89.45±31.76	34.97±7.31	47.34±20.55 [‡]	4.73±1.05
Deconditioned-PE	90.45±15.38	31.34±6.64	50.86±8.5 [‡]	4.67±0.97

409

410 *Definition of abbreviations:* PE = post-effort.

411 Data expressed as least square means (LSmeans) ± SE. Significant differences (P<0.05) in cell
 412 counts are identified with † for differences from untrained and ‡ for differences from moderate
 413 training.

414

415

416

417

418

419

420 **TABLE 2: EFFECT OF TRAINING AND EXERCISE ON BLOOD CELL COUNTS**

	WBC (10 ³ cells /mm ³)	Monocytes (10 ³ /mm ³)	Lymphocytes (10 ³ /mm ³)	Neutrophils (10 ³ /mm ³)
Untrained	8.67±2.38	0.39±0.16	4.6±0.73	3.29±1.9
Untrained-PE	9.05±2.36	0.4±0.25	4.4±0.82	3.94±2.16
Moderate Training	9.08±0.4	0.46±0.11	3.65±0.47 [†]	4.35±0.45
Intensive Training	8.63±1.48	0.34±0.14	3.62±0.43 [†]	4.06±1.5
Intensive Training-PE	9.61±1.07	0.28±0.1	3.31±0.7 [†]	5.45±1.57 ^{†‡§}
Deconditioned	8.39±1.19	0.44±0.13	3.35±0.92 [†]	4.25±1.89
Deconditioned-PE	8.35±0.83	0.38±0.12	3.45±0.68 [†]	4.04±1.27

421

422 *Definition of abbreviations:* WBC = white blood cell count; PE = post-effort.

423 Data reported as least square means (LSmeans) ± SE. Significant differences (P<0.05) in cell

424 counts are identified with † for differences from untrained, ‡ for differences from moderate

425 training and § for differences from intensive training.

426

427

428

429

430

431

432 **Legend**

433 **Figure 1:**

434 Relative mRNA expression of TLR2, TLR3, TLR4 and TLR6 in monocytes (A) and PAM (B)
435 from untrained, moderately trained, intensively trained and deconditioned horses. Significant
436 differences ($P < 0.05$) in gene expression are identified with † for differences from untrained, ‡ for
437 differences from moderate training and § for differences from intensive training.

438 **Figure 2:**

439 *Ex vivo* production of TNF-alpha (A,C) and IFN-beta (B,D) in monocytes (A, B) and PAM (C,
440 D) in medium alone and treated with FSL, Poly(I:C), or LPS after 6 hours of incubation.
441 Significant differences ($P < 0.05$) are identified with * for differences from non-treated cells at the
442 corresponding time point, † for differences from untrained, ‡ for differences from moderate
443 training and § for differences from intensive training.

444 **Figure 3:**

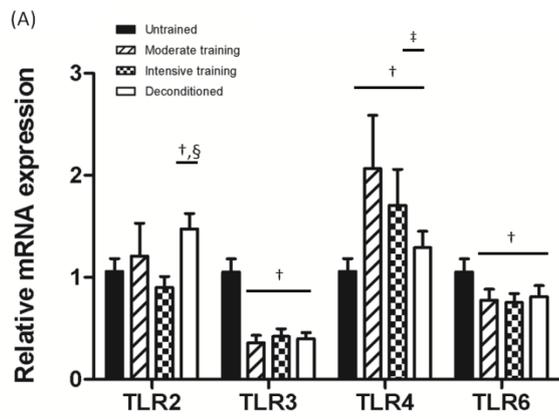
445 Serum cortisol concentrations in untrained, moderately trained, intensively trained and
446 deconditioned horses at rest and after a single strenuous exercise (PE = post-effort). Significant
447 differences ($P < 0.001$) are identified with * for differences in horses at rest and horses after a
448 single strenuous exercise.

449

450

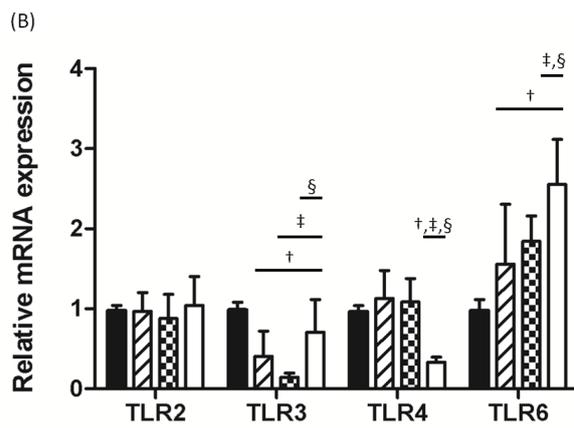
451

452 **Figure 1:**



453

454



455

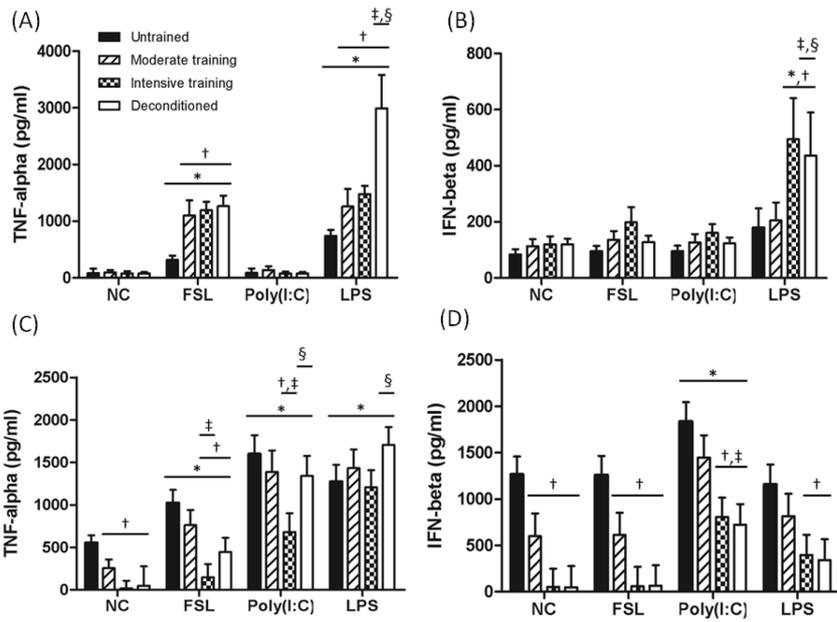
456

457

458

459 **Figure 2:**

460



461

462

463

464

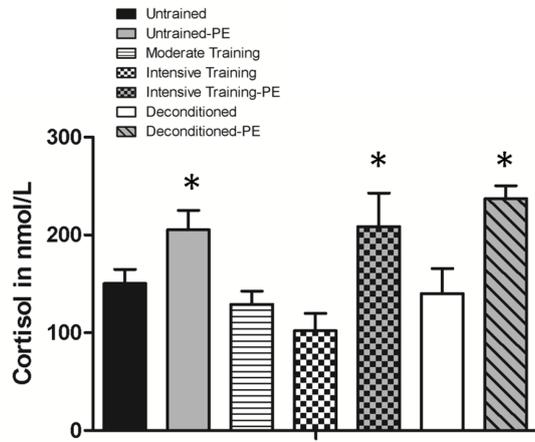
465

466

467

468

469 **Figure 3:**



470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481 **Training modifies innate immune responses in blood monocytes and in pulmonary alveolar**
482 **macrophages**

483 Linda Frelstedt , Ingrid Waldschmidt, Philippe Gosset, Christophe Desmet, Dimitri Pirottin,
484 Fabrice Bureau, Frédéric Farnir, Marie-Capucine Dupuis-Tricaud, Pierre Lekeux, Tatiana Art.

485

486 **ONLINE DATA SUPPLEMENT**

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501 **Supplementary Materials and Methods**

502 **Horses**

503 Eight healthy untrained (UT) Standardbred horses (5 mares and 3 geldings, 2.5 ± 0.5 years, 450
504 ± 45 kg) were used for the study. All horses were determined to be healthy by physical
505 examination, complete blood cell count, serum biochemistry, endoscopic evaluation of the
506 respiratory tract and examination of the tracheal and bronchoalveolar lavage fluid (cytology,
507 bacteriology and virology). The horses had been vaccinated (equine herpesvirus 1 and 4, equine
508 influenza, tetanus) and dewormed prior to starting the study. Prior to the beginning of the study
509 and during the period of deconditioning (DC), the horses were kept in a grass pasture and
510 additionally fed grass silage. During the training period, the horses were stabled individually in
511 well-ventilated stalls on wood shavings. They were fed grass silage and grain. In addition, they
512 had daily access to a large dirt paddock for a minimum of 4 hours.

513

514 **Training Protocol**

515 Prior to the start of the study, the horses were kept in a grass pasture for 3 months. This period
516 allowed the horses to get accustomed to the same environment. The horses started with 8 weeks
517 of moderate training (MT), meaning they were exercised on a sand track three times a week.
518 Each training session consisted of a six minute warm-up at 5.5 m/s, then trotting at progressively
519 increasing speeds (7.0 to 9.7 m/s) for 20 minutes, followed by a recovery period of 3 minutes at
520 5.5 m/s. This was followed by the intensive training (IT) period of 8 weeks. They were exercised
521 five times a week. Three sessions per week were performed as during the moderate training
522 period at gradually increasing speeds up to their individual maximum speeds for 20 minutes.

523 Two sessions per week consisted of interval (“sprint”) training at maximal speeds. During these
524 sessions, the horses underwent a warm-up of 15 minutes at 5.5 m/s, followed by 7 minutes at 7.0
525 m/s, then during a period of 10 minutes the horses maintained speeds of 9.7 to 11.0 m/s with the
526 intercalated intervals (3 x 90 s) at maximal speeds (11.0 to 13.4 m/s), finishing with a recovery
527 period of 3 minutes at 5.5 m/s. Heart rates, distance and speed were monitored continuously
528 during each training session using a GPS on-board system (Equine CS600X Trotting, Polar
529 Electro France SAS). Subsequently, the horses were kept in a grass pasture for an additional
530 three months of deconditioning (DC).

531

532 **Sample collection**

533 Blood samples and bronchoalveolar lavage fluid were collected before and after SET prior to and
534 at the end of the moderate and the intensive training period as well as at the end of the
535 deconditioning period in order to assess the effect of the training status on the innate immune
536 response. A minimum of 48 hours of non-exercise was allowed prior to sampling at rest. In order
537 to assess the effect of one single strenuous exercise on the innate immunity, blood samples were
538 also collected one hour post-SET and bronchoalveolar lavages 24 hours post-SET in untrained,
539 trained and deconditioned horses. The time points for the sampling after the acute exercise had
540 been chosen due to technical limitations. In a preliminary study, we had determined that there
541 were no significant differences when bronchoalveolar lavages had been sampled one hour, 24
542 hours or 48 hours post-exercise.

543

544

545 **Blood collection, monocyte isolation and cell culture**

546 Blood was collected aseptically into EDTA vacutainers (TERUMO Europe N.V., Leuven,
547 Belgium) for hematology, into lithium heparinized vacutainers for monocyte isolation as well as
548 into dry vacutainers for serum cortisol measurements. The blood in dry tubes was allowed to clot
549 at room temperature for two hours and then tubes were centrifuged at 1000 rpm for 10 minutes.
550 Serum was recovered and frozen at -80°C until assayed. PBMC were isolated by Histopaque
551 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) density gradient (density 1.077 g/ml) centrifugation.
552 Absolute cell counts were determined and cell suspensions were diluted in incomplete RPMI
553 1640 medium (Lonza, Basel, Switzerland) at 7×10^6 cells/ml. One milliliter of the cell suspension
554 was placed in each well of a 12-well plate (COSTAR®, Corning Incorporated, Corning, NY,
555 USA). The plates were incubated at 37°C with 5% CO₂ for 90 minutes. After incubation, non-
556 adherent cells were removed by washing, and complete RPMI 1640 medium, containing 10%
557 heat-inactivated fetal bovine serum, penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100 µg/ml), was
558 added to each well of adherent monocytes. The cells were incubated for 6 hours at 37°C with 5%
559 CO₂ either in complete RPMI 1640 medium alone, or in RPMI 1640 supplemented with 100
560 ng/ml FSL (TLR2/6 agonist, CAYLA, Toulouse, France), 1 µg/ml Poly(I:C) (TLR3 agonist,
561 CAYLA, Toulouse, France) or 1 µg/ml LPS (TLR4 agonist, lipopolysaccharides from *E. coli*
562 O55:B5, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cell culture supernatants were recovered and
563 frozen at -80°C until assayed for TNF-alpha and IFN-beta concentrations.

564

565

566

567 **Bronchoalveolar lavage sampling, PAM isolation and culture**

568 PAM were incubated for 6 hours in complete RPMI medium alone, or in RPMI 1640
569 supplemented with 100 ng/ml FSL, 1 µg/ml Poly(I:C) or 1 µg/ml LPS. Cell culture supernatants
570 were recovered and frozen at -80°C until assayed for TNF-alpha and IFN-beta concentrations.

571

572 **Real-time PCR**

573 Gene expression of TLR2, TLR3, TLR4 and TLR6 was quantified by real-time PCR using
574 Absolute Blue qPCR SYBR Green Mix (Fisher Scientific, Aalst, Belgium) on an Applied
575 Biosystems 7900 HT thermocycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Equine gene
576 specific primers were designed from available published sequences (31-33) or designed in silico
577 (Table E1). Specificity of PCR was confirmed by melting curve analysis and agarose gel
578 electrophoresis. Real-time quantitative PCR data for TLR2, TLR3, TLR4 and TLR6 were
579 normalized to the geometric mean of three housekeeping genes (RPL32 (ribosomal protein L32),
580 RPL0 (ribosomal protein L0), HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase)) using qbase+
581 software (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium). Each experimental condition was assayed in
582 duplicate.

583

584

585

586

587 **Table E1**

Name	Primer sequences Forward/Reverse (5' to 3')	Product (bp)	Reference
HPRT	AATTATGGACAGGACTGAACGG ATAATCCAGCAGGTCAGCAAAG	121	(E1)
RPL32	GGGAGCAATAAGAAAACGAAGC CTTGGAGGAGACATTGTGAGC	140	In silico designed
RPL0	CCAAGGTTGAAGCAAAGGAA AAAGCTGGCTGAATTGGTTG	99	In silico designed
TLR1	ACTTTGCCACCACAATCTC CCAAAAGCAGCAACAGTGAA	275	(E2)
TLR2	ACGGCAGCTGTGAAAAGTCT CCTGAACCAGGAGGACGATA	213	(E2)
TLR3	ACCTCCAGCAAACATAACG CTGGAGGTCCAAAATTCCA	179	(E2)
TLR4	GACGACTCAGGAAAGCCTTG CACAATGCCTGGTATGTTGC	194	(E2)
TLR6	CCTAAAGATATCACCAGCCTGGAA GGCTGATGGGTCGGAAATTA	141	(E3)

588

589

590

591

592

593

594

595

596 **Supplementary References**

597 E1. Mignot CC, Pirottin D, Farnir F, de Moffarts B, Molitor C, Lekeux P, Art T. Effect of
598 strenuous exercise and ex vivo tlr3 and tlr4 stimulation on inflammatory gene expression in
599 equine pulmonary leukocytes. *Veterinary immunology and immunopathology* 2012;147:127-135.

600 E2. Quintana AM, Landolt GA, Annis KM, Hussey GS. Immunological characterization of the
601 equine airway epithelium and of a primary equine airway epithelial cell culture model.
602 *Veterinary immunology and immunopathology* 2011;140:226-236.

603 E3. Gornik K, Moore P, Figueiredo M, Vandenplas M. Expression of toll-like receptors 2, 3, 4,
604 6, 9, and md-2 in the normal equine cornea, limbus, and conjunctiva. *Veterinary ophthalmology*
605 2011;14:80-85.

606