



UNIVERSITÉ DE LIÈGE
FACULTÉ DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE
SERVICE DE PHYSIOLOGIE

**EFFETS DE LA COMPOSITION EN AÉROALLERGÈNES ET EN
POUSSIÈRE RESPIRABLE DANS LES FOURRAGES ET LITIÈRES
SUR LA FONCTION PULMONAIRE DES CHEVAUX ATTEINTS DE
MALADIE PULMONAIRE OBSTRUCTIVE CHRONIQUE**

**EFFECTS OF THE AEROALLERGEN AND RESPIRABLE DUST
COMPOSITION OF FORAGES AND BEDDINGS ON PULMONARY
FUNCTION IN HORSES WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY
DISEASE**

SANDRINA VANDENPUT

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE
DE DOCTEUR EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

ANNÉE ACADÉMIQUE 1997-1998

WITH SCIENTIFIC PAPERS IN ENGLISH

UNIVERSITÉ DE LIÈGE
FACULTÉ DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE
SERVICE DE PHYSIOLOGIE

EFFETS DE LA COMPOSITION EN AÉROALLERGÈNES ET EN
POUSSIÈRE RESPIRABLE DANS LES FOURRAGES ET LITIÈRES
SUR LA FONCTION PULMONAIRE DES CHEVAUX ATTEINTS DE
MALADIE PULMONAIRE OBSTRUCTIVE CHRONIQUE

SANDRINA VANDENPUT

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

ANNÉE ACADÉMIQUE 1997-1998

Presses de la Faculté de Médecine Vétérinaire
de l'Université de Liège - B-4000 Liège Belgique

D 97-0480-38

ISBN 2-930212-01-2



9 782930 212012

*à Thierry et à notre merveilleux
petit Bonhomme d'Amour,*

à mes parents et ma famille,

REMERCIEMENTS

La réalisation et la concrétisation d'une thèse de doctorat ne peuvent se faire sans complicité. Pour la jeune diplômée que j'étais au commencement de mes recherches, intégrer le service de Physiologie et toute son équipe a réellement été une grande chance.

Mes premiers remerciements vont à Monsieur le Professeur Pierre Lekeux qui m'a accordé sa confiance en me proposant la réalisation d'une thèse de doctorat. Il n'a eu de cesse de m'encourager dans chacune de mes expériences. Je le remercie pour sa disponibilité permanente et ses conseils scientifiques. De plus, je lui suis reconnaissante d'avoir toujours mis à ma disposition toute la logistique et les compétences humaines indispensables au bon déroulement d'un travail de recherche.

Mes remerciements vont ensuite à toute l'équipe du service de Physiologie. Les trois années passées en son sein ont été une merveilleuse expérience de complicité et un fantastique apprentissage de travail. A ce titre, je ne cesserai de remercier Tania Art pour sa disponibilité sans faille et ses précieux conseils. Toujours prête à rendre service, elle a accompagné chacune de mes études en y prenant une part active et en m'aidant à prendre du recul.

La présence indéfectible de Dominique Votion et de Hannia Duvivier lors de l'élaboration des protocoles expérimentaux et de leur réalisation, assortie de leur amitié, m'a permis de toujours travailler avec le sourire même aux moments les plus durs.

Mes remerciements vont aussi à Nathalie Anciaux, Joost Coghe, Jos Olaerts, Pascale Vancalster, Marie-Lys Van de Weerd, Emmanuelle van Erck et Christophe Uystepuyst, toujours présents à la moindre sollicitation. Je remercie tout particulièrement Sylvia Verbanck, Manuel Pavia et Frédéric Rollin pour m'avoir guidé et accompagné avec enthousiasme dans la réalisation et l'interprétation de ma dernière expérience.

Qu'il me soit donné aussi ici l'opportunité d'exprimer ma reconnaissance à Messieurs les Professeurs Baudouin Nicks, Bertrand Losson et Jacques Mainil, ainsi qu'aux membres de leur service respectif pour la gentillesse avec laquelle ils ont mis à ma disposition le matériel indispensable à ma première étude. En me guidant dans leur domaine de compétence, ils ont plus que largement contribué à l'identification des allergènes.

Mes remerciements vont aussi à Ilham Sbaï qui, par son indéfectible bonne humeur et ses multiples compétences, a été pour moi une alliée essentielle à la réussite du travail. Carine Gresse, Michel Motkin et Didier Delhaise m'ont assisté techniquement dans chacune de mes

expériences. Je les remercie pour leur disponibilité et leur savoir-faire. Finalement, j'ai une dette toute particulière envers Martine Leblond qui a beaucoup contribué à donner à ce travail sa forme définitive.

J'adresse mes plus vifs remerciements aux Professeurs Baudouin Nicks et Maurice Radermecker pour l'intérêt qu'ils ont manifesté à la progression de ce travail.

Je tiens également à remercier Christian Hanzen et ma maman pour la lecture consciencieuse et leurs judicieuses remarques qu'ils ont fait sur la partie française du travail.

Ce travail a pu être réalisé grâce au soutien financier de la Direction générale de l'Agriculture du Ministère de la Région Wallonne.

Je ne puis terminer ces remerciements sans souligner l'importance qu'a jouée le soutien de ma famille tout au long de ces trois années. Je souhaiterai rendre hommage à mes parents pour tout ce qu'ils m'ont apporté sans compter.

Enfin, mes plus vifs remerciements vont à Thierry pour son immense patience et son amour. Compagnon merveilleux, sa présence a été, à tout instant, une source inépuisable de courage. De tout mon coeur, je le remercie d'avoir été chaque jour à mes côtés et d'avoir accepté toutes les contraintes que la réalisation de ce travail ont pu représenter. Son intérêt pour mes recherches ont également été une source de réconfort non négligeable.

PROLOGUE

Avant-propos.....	5
Introduction.....	6
Objectifs de notre étude	9

PREMIÈRE PARTIE : DONNÉES DE LA LITTÉRATURE

1. DÉFINITION	13
2. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE PULMONAIRE OBSTRUCTIVE CHRONIQUE ÉQUINE	14
2.1. Etiologie.....	14
2.2. Pathologie.....	19
2.2.1. Inflammation.....	20
2.2.1.1. <i>Cellules</i>	20
2.2.1.2. <i>Médiateurs</i>	24
2.2.2. Bronchospasme.....	27
2.2.2.1. <i>Implication du système nerveux dans les phénomènes de</i> <i>bronchospasme lors d'une crise</i>	27
2.2.2.2. <i>Rôles des médiateurs de l'inflammation</i>	32
2.2.3. Hyperréactivité bronchique.....	33
2.3. Conséquences de l'inflammation et du bronchospasme sur la fonction pulmonaire	35
2.3.1. Obstruction des voies respiratoires.....	35
2.3.2. Altération des échanges gazeux.....	36
3. MISE EN ÉVIDENCE DE LA MALADIE ET DES TROUBLES FONCTIONNELS ASSOCIÉS.....	37
3.1. Auscultation et percussion.....	38
3.2. Endoscopie.....	38
3.3. Radiographie.....	39
3.4. Evaluation de la cytologie des voies respiratoires.....	39
3.5. Tests de fonction pulmonaire.....	41
3.6. Analyse des gaz sanguins artériels.....	43
3.7. Tests permettant de mettre en évidence la réaction allergique.....	43

3.8. Scintigraphie pulmonaire.....	45
3.9. Rinçage de l'azote alvéolaire en respirations multiples et autres techniques permettant l'étude de la distribution de la ventilation.....	47
4. PRÉVENTION DE L'EXACERBATION DE LA MALADIE PAR GESTION DE L'ENVIRONNEMENT.....	49
5. CARACTÉRISTIQUES ET IDENTIFICATION DES ALLERGÈNES INCRIMINÉS DANS LA MALADIE PULMONAIRE OBSTRUCTIVE CHRONIQUE ÉQUINE.....	52
5.1. Modifications subies par les fourrages et litières au cours du stockage.....	52
5.2. Méthodes d'identification et caractéristiques de culture des trois principaux allergènes incriminés dans la maladie pulmonaire obstructive chronique.....	54
5.2.1. Identification de <i>Faenia rectivirgula</i> et <i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	54
5.2.2. Identification d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	57
RÉFÉRENCES.....	59

DEUXIÈME PARTIE : PRÉSENTATION SYNOPTIQUE DES EXPÉRIENCES

OBJECTIF 1

Détermination <i>in vitro</i> de la charge en poussière respirable et en allergènes de différents types de fourrages, litières et aliments complémentaires destinés aux chevaux (Etude n° 1).....	76
---	----

OBJECTIF 2

2.1. Effets de différents régimes environnementaux sur les paramètres de fonction pulmonaire des chevaux atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique (Etude n° 2).....	82
2.2. Evaluation de la réactivité des voies respiratoires des chevaux atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique, soumis à différents régimes environnementaux (Etude n° 3).....	86

2.3. Etude de la distribution de la ventilation chez le cheval atteint de maladie pulmonaire obstructive chronique et influence du contrôle de l'environnement sur la ventilation (Etude n° 4).....	90
---	----

TROISIÈME PARTIE : PRÉSENTATION SYSTÉMATIQUE DES EXPÉRIENCES

Etude n° 1 : " <i>Airborne dust and aeroallergen concentrations in different sources of feed and bedding for horses</i> ".....	98
--	----

Vandenput S., Istasse L., Nicks B., Lekeux P. *Vet. Quart.* 1997, **19**, 154-158

Etude n° 2 : " <i>Environmental control to maintain stabled COPD horses in clinical remission : effects on pulmonary function</i> ".....	113
--	-----

Vandenput S., Duvivier D.H., Votion D., Art T., Lekeux P. *Equine vet. J.*, **29**, in press

Etude n° 3 : " <i>Effect of a set stabled environmental control on pulmonary function and airway reactivity of COPD affected horses</i> ".....	127
--	-----

Vandenput S., Votion D., Duvivier D.H., Van Erck E., Anciaux N., Art T., Lekeux P. *Vet. J.*, **153**, in press

Etude n° 4 : " <i>Effect of different environmental conditions on ventilation distribution of COPD affected horses</i> "	145
--	-----

Vandenput S., Rollin F., Art T., Lekeux P. Submitted for publication

QUATRIÈME PARTIE : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1. CONCLUSIONS	159
2. PERSPECTIVES.....	160

PROLOGUE

AVANT-PROPOS

Le présent travail est divisé en cinq sections.

Dans le *Prologue*, les justifications et les objectifs du travail sont posés.

Dans la *Première partie*, les données de la littérature relative à la maladie pulmonaire obstructive chronique chez le cheval sont résumées. Ce sujet étant large, seuls les aspects ayant un intérêt direct avec nos investigations ont été développés.

Dans la *Deuxième partie*, chacune des expérimentations réalisées est présentée de façon résumée dans la langue de notre *Alma Mater*, de telle sorte que le lecteur ait une idée globale de l'ensemble du travail.

Dans la *Troisième partie*, chacune des expérimentations est présentée de façon détaillée sous forme originale d'article scientifique (en anglais) publié ou soumis pour publication.

La *Quatrième partie* reprend les conclusions générales tirées de l'ensemble de ces expérimentations et des perspectives sont envisagées.

INTRODUCTION

Le cheval, contrairement à beaucoup d'animaux de rente, a une longue espérance de vie durant laquelle son système respiratoire est sans cesse soumis à différents types d'agressions. Ses capacités sportives ainsi que l'absence de lésions au sein de son tractus respiratoire dépendent largement des conditions dans lesquelles il passe la majorité de son temps.

A l'écurie, le cheval est plus particulièrement exposé à un large éventail d'agents pathogènes respiratoires. On y compte des bactéries, des virus, des spores de moisissures, des endotoxines, des gaz irritants, des particules inertes, des acariens et des parasites. Leur pouvoir potentiel à provoquer une pathologie dépend de leur capacité à initialiser un processus inflammatoire, à induire une réaction allergique, à se comporter comme une toxine ou un irritant, à détruire des tissus (p.e. la migration de parasites), ou simplement à amoindrir l'efficacité des systèmes de défense des poumons, augmentant ainsi la susceptibilité des autres agents pathogènes. De plus, outre le fait d'initialiser ou d'augmenter la probabilité d'une maladie respiratoire, l'environnement d'une écurie peut affecter la durée et la sévérité des épisodes des pathologies pulmonaires.

En résumé, la probabilité qu'un agent pathogène induise une maladie dépend de sa propre pathogénicité, de la quantité présente dans l'environnement du cheval, et de la susceptibilité de l'hôte.

La susceptibilité de l'hôte relève de sa capacité à se défendre. Au niveau du tractus respiratoire, toute une série de protections est mise en oeuvre afin de défendre au mieux les poumons et l'organisme contre les agressions extérieures.

L'air, avant de pénétrer dans les poumons, traverse les voies respiratoires supérieures (les naseaux, le nasopharynx, le larynx et la trachée). Au cours de ce trajet, il est progressivement porté à la température du corps et saturé en vapeur d'eau; en même temps, il est soumis à la filtration aérodynamique. Seules les particules dont le diamètre n'excède pas 5 μm sont capables de déjouer ces systèmes de filtration et d'atteindre ainsi les parties profondes de l'arbre respiratoire. Incapable de les arrêter physiquement, le poumon a mis en place des systèmes de défense très efficaces qui permettent une élimination en moins d'une heure de plus

de 90 % des particules déposées dans les voies profondes (Deconto, 1986). Ainsi, les voies conductrices profondes du cheval sont protégées et épurées principalement par l'appareil mucociliaire composé du mucus et des cellules épithéliales ciliées (Dixon, 1992). Les voies conductrices terminales et les alvéoles sont quant à elles dépourvues de système d'épuration mécanique et dépendent presque exclusivement des systèmes cellulaires et humoraux de défense pour se débarrasser des particules inhalées. Les particules les plus petites ($< 0.5 \mu\text{m}$ de diamètre) sont en majorité exhalées (Buechner-Maxwell, 1993).

Des dysfonctionnements de ces systèmes de défense peuvent faciliter l'attaque par des agents pathogènes tels que les bactéries, les allergènes ou les virus. Certaines maladies infectieuses respiratoires endommagent les surfaces épithéliales et altèrent les réponses immunes (McChesney, 1975; Allen et Bryans, 1986). Ainsi, une atteinte virale du tractus respiratoire peut altérer la clairance mucociliaire durant plus d'un mois (Willoughby *et al.*, 1991; 1992).

Schématiquement, dans une écurie, les principales sources d'allergènes et de particules respirables [par définition, les particules capables d'atteindre les voies profondes du poumon (Lippmann, 1970)] proviennent des fourrages et de la litière. Les agents infectieux (bactéries et virus) sont véhiculés par les chevaux, tandis que les gaz (ammoniac, SO_2) émanent des litières souillées (Wathes *et al.*, 1983). Bien que la ventilation joue un rôle important dans le renouvellement de l'air (Sainsbury, 1981; Webster *et al.*, 1987), elle n'influence pas de manière significative la quantité de poussière inhalée par un cheval au box (Woods *et al.*, 1993). Il s'avère donc que le seul moyen de réduire la charge en poussière et en allergènes inhalée par les animaux est de contrôler la qualité des fourrages et litières.

Tout comme en médecine humaine où l'impact de l'environnement sur le système respiratoire est de plus en plus étudié et de plus en plus source d'inquiétude et d'interrogations, on prend conscience que les capacités sportives et la bonne santé des chevaux imposent un contrôle strict de l'environnement. Plusieurs études ont d'ores et déjà démontré le parallélisme qui existe entre la qualité de l'environnement et certains dysfonctionnements respiratoires chez les chevaux (Clarke, 1987; Clarke *et al.*, 1987).

Plus que pour toute autre pathologie, la qualité de l'environnement est primordiale pour les chevaux présentant une hypersensibilité pulmonaire dirigée contre certains composants de la poussière qui se dégage des milieux d'écurie. De plus, bien qu'aucune étude épidémiologique n'ait réellement été effectuée à ce sujet, plusieurs auteurs rapportent une augmentation du

nombre de chevaux présentant une réaction allergique liée à l'inhalation de poussière d'écurie (Mair, 1995). D'aucuns y rechercheront une similitude avec l'augmentation du nombre de personnes souffrant d'allergie respiratoire depuis ces deux dernières décennies (Burr *et al.*, 1989; Burney *et al.*, 1990). Cette augmentation, trop rapide pour qu'elle puisse être considérée comme le résultat d'une augmentation de la susceptibilité génétique, est souvent attribué à une augmentation de l'exposition à des allergènes et autres irritants des voies respiratoires (Luczynska, 1994). Ainsi en médecine humaine, de nombreuses études ont démontré qu'il existe une relation étroite entre le taux de pollution atmosphérique ou professionnelle et les troubles respiratoires (Ishizaki *et al.*, 1987; Schwartz et Zeger, 1990; Pope *et al.*, 1991; Higgins *et al.*, 1993; Devalia *et al.*, 1994).

Il est difficile d'estimer le nombre de chevaux atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique. Une étude récente, portant sur plusieurs années de pratique équine au Royaume-Uni, signale que 55 % des 300 chevaux présentés pour troubles respiratoires ont été diagnostiqués par différents tests comme souffrant de maladie pulmonaire obstructive chronique (Dixon *et al.*, 1995). Une autre étude réalisée en Suisse a, quant à elle, démontré que 54 % des chevaux étudiés seraient atteints (Bracher *et al.*, 1991). Cependant leurs critères de détermination étant moins spécifiques, il est probable que tous ces chevaux ne puissent être rassemblés sous ce vocable de chevaux atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique, sur simple base d'une auscultation anormale, d'une augmentation significative de sécrétions dans la trachée, avec une prédominance de neutrophiles et d'une altération des échanges gazeux objectivée par une chute de la PaO₂ sous 90 mmHg.

OBJECTIFS DE NOTRE ÉTUDE

Le contrôle à court et à long terme des signes cliniques de la maladie pulmonaire obstructive chronique reste pour les praticiens et les propriétaires de chevaux une priorité absolue. Les traitements médicamenteux de longue durée sont soit très onéreux, soit fastidieux à dispenser, soit délétères à plus ou moins long terme pour d'autres fonctions vitales. Si la solution qui consiste à soustraire les chevaux concernés aux allergènes et irritants est préconisée de longue date, seule la formule consistant à les placer en pâture avait, à ce jour, fait l'objet d'études scientifiques. Ces études ont démontré qu'un séjour en pâture permettait de rétablir et de maintenir chez les chevaux atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique une fonction respiratoire identique à celle de chevaux sains. Cependant, pour nombre de propriétaires, la pâture n'est pas une solution envisageable. Différentes alternatives au foin et à la paille, principales sources d'allergènes et d'irritants dans une écurie, ont dès lors été proposées. Néanmoins, jamais l'impact de telles substitutions n'a été étudié sur l'intégrité du système et de la fonction respiratoires chez les chevaux atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique.

Nombre de questions restaient donc posées quant aux choix des solutions palliatives et à leur efficacité réelle. Sur base de ces interrogations, le but de notre travail était donc de deux ordres :

OBJECTIF 1 : Déterminer pour les aliments et litières les plus fréquemment utilisés et préconisés dans nos régions, leur charge en poussières respirables et en allergènes, et ce, de façon strictement standardisée. Au terme de cette étude, un fourrage et une litière, satisfaisant sur le plan hygiénique et répondant aux besoins des chevaux ont été choisis pour établir l'environnement contrôlé étudié ultérieurement.

OBJECTIF 2 : Etudier l'effet d'un tel contrôle de l'environnement d'écurie sur la mécanique respiratoire, les échanges gazeux, la réactivité bronchique et la ventilation des chevaux atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique.

RÉFÉRENCES

- ALLEN G.P., BRYANS J.T. Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of Equine Herpes Virus-1 infection. *Prog. vet. Microbiol. Immun.*, 1986, **2**, 78-144.
- BRACHER V., VON FELLEBERG R., WINDER N.C., GRUENIG G., HERMANN M., KRAEHEMANN A. An investigation of the incidence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in random populations of Swiss horses. *Equine vet. J.*, 1991, **23**, 136-141.
- BUECHNER-MAXWELL V. Normal respiratory epithelial structure and function. *Compend. contin. Educ. Pract. Vet.*, 1993, **15**, 618-624.
- BURNEY P.G.J., CHINN S., RONA R.J. Has the prevalence of asthma increased in children ? Evidence from the national study of health and growth. *Br. med. J.*, 1990, **300**, 1306-1310.
- BURR M.L., BUTLAND B.K., KING S., VAUGHAN-WILLIAMS E. Changes in asthma prevalence : Two surveys 15 years apart. *Arch. Dis. Child.*, 1989, **64**, 1452-1456.
- CLARKE A.F. A review of environmental and host factors in relation to equine respiratory disease. *Equine vet. J.*, 1987, **19**, 435-441.
- CLARKE A.F., MADELIN T., ALLPRESS R.G. The relationship of air hygiene in stables to lower airway disease and pharyngeal lymphoid hyperplasia in two groups of Thoroughbred horses. *Equine vet. J.*, 1987, **19**, 524-530.
- DECONTO I. Cytomorphologic findings in tracheobronchial secretions from horses with acute or chronic pulmonary disease. In : *Lung Function and Respiratory Diseases in the Horse*, (International Symposium in Hannover, Germany, 27th-29th June 1985), Deegen E., Beadle R.E. (Eds), Calw, Germany : Hippatrika Verlagsgesellschaft, 1986, p. 23-24.
- DEVALIA J.L., RUSZNAK C., DAVIES R.J. Air pollution in the 1990's - Cause of increased respiratory disease ? *Respir. Med.*, 1994, **88**, 241-244.
- DIXON P.M. Respiratory mucociliary clearance in the horse in health and disease, and its pharmaceutical modification. *Vet. Rec.*, 1992, **131**, 229-235.
- DIXON P.M., RAILTON D.I., MCGORUM B.C. Equine pulmonary disease : a case control study of 300 referred cases. Part 1 : Examination techniques, diagnostic criteria and diagnoses. *Equine vet. J.*, 1995, **27**, 416-421.
- HIGGINS B.G., FRANCIS H.C., WARBURTON C.J. The effects of air pollution on peak expiratory flow measurements in patients with asthma and chronic bronchitis. *Thorax*, 1993, **48**, 435-442.
- ISHIZAKI T., KOIZUMI K., IKEMORI R., ISHIYAMA Y., KUSHIBIKI E. Studies of prevalence of Japanese cedar pollinosis among residents in a densely cultivated area. *Ann. Allergy*, 1987, **58**, 265-270.

- LIPPMANN M. "Respirable" dust sampling. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1970, **31**, 138-159.
- LUCZYNSKA C.M. Risk factors for indoor allergen exposure. *Resp. Med.*, 1994, **88**, 723-729.
- MAIR T.S. Changing concepts of COPD. *Equine vet. J.*, 1995, **27**, 402-403.
- MCCHESENEY A.E. Viral respiratory infections of horses : Structure and function of lungs in relation to viral infection. *J. Appl. Physiol.*, 1975, **166**, 76-77.
- POPE C.A., DOCKERY D.W., SPENGLER J.D., RAIZENNE M.E. Respiratory health and PM10 pollution. A daily time series analysis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1991, **144**, 668-674.
- SAINSBURY D.W.B. Ventilation and environment in relation to equine respiratory disease. *Equine vet. J.*, 1981, **13**, 167-170.
- SCHWARTZ J., ZEGER S. Passive smoking, air pollution, and acute respiratory symptoms in a diary study of student nurses. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1990, **141**, 62-67.
- WATHES C.M., JONES C.D.R., WEBSTER A.J.F. Ventilation, air hygiene and animal health. *Vet. Rec.*, 1983, **113**, 554-559.
- WEBSTER A.J.F., CLARKE A.F., MADELIN T., WATHES C.M. Air hygiene in stables. 1: Effects of stable design, ventilation and management on the concentration of respirable dust. *Equine vet. J.*, 1987, **19**, 448-453.
- WILLOUGHBY R.A., ECKER G.L., MCKEE S.L., RIDDOLLS L.J. Use of scintigraphy for the determination of mucociliary clearance rates in normal, sedated, diseased and exercised horses. *Can. J. Vet. Res.*, 1991, **55**, 315-320.
- WILLOUGHBY R.A., ECKER G.L., MCKEE S.L., RIDDOLLS L.J., VERNAILLEN C., DUBOVI E., LEIN D., MAHONY J.B., CHERNESKY M., NAGY E., STAEMPFLI H. The effects of *Equine Rhinovirus*, *Influenza Virus* and *Herpesvirus* infection on tracheal clearance rate in horses. *Can. J. Vet. Res.*, 1992, **56**, 115-121.
- WOODS P.S.A., ROBINSON N.E., SWANSON M.C., REED C.E., BROADSTONE R.V., DERKSEN F.J. Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different management systems. *Equine vet. J.*, 1993, **25**, 208-213.

UNIVERSITÉ DE LIÈGE
FACULTÉ DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE
SERVICE DE PHYSIOLOGIE

EFFETS DE LA COMPOSITION EN AÉROALLERGÈNES ET EN
POUSSIÈRE RESPIRABLE DANS LES FOURRAGES ET LITIÈRES
SUR LA FONCTION PULMONAIRE DES CHEVAUX ATTEINTS DE
MALADIE PULMONAIRE OBSTRUCTIVE CHRONIQUE

SANDRINA VANDENPUT

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

ANNÉE ACADÉMIQUE 1997-1998

Presses de la Faculté de Médecine Vétérinaire
de l'Université de Liège - B-4000 Liège Belgique

D 97-0480-38

ISBN 2-930212-01-2



9 782930 212012

PREMIÈRE PARTIE :

DONNÉES DE LA LITTÉRATURE

Les pathologies respiratoires chroniques sont fréquentes dans l'espèce équine (Viel, 1985; Dixon *et al.*, 1995). Elles sont à prendre en considération car elles représentent un important facteur limitant au bien-être de l'animal et à ses capacités sportives (Rossdale *et al.*, 1985).

Chez les poulains et les jeunes chevaux, la plupart des pathologies respiratoires sont induites par des virus et/ou des bactéries (Viel, 1985). Chez les chevaux adultes, dans les régions au climat tempéré, la majorité des affections respiratoires chroniques est représentée par une entité reprise sous la dénomination de maladie pulmonaire obstructive chronique (Sasse *et al.*, 1986; Dixon *et al.*, 1995a; Mair, 1995; Shuster *et al.*, 1995). Bien qu'on retrouve des descriptions détaillées des symptômes accompagnant cette pathologie dans nombre d'ouvrages anciens, les recherches qui ont fait avancer les connaissances à son sujet sont relativement récentes. Ainsi, depuis le début des années 80, un engouement pour ses implications cliniques, son origine et ses traitements possibles explique le nombre important et sans cesse croissant de publications à ce sujet.

1. DÉFINITION

La maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) est un des syndromes pulmonaires les plus fréquemment rencontrés en pratique équine dans les régions tempérées. Elle se caractérise par l'inflammation de l'arbre trachéo-bronchique s'accompagnant de l'obstruction des voies respiratoires. Cette affection est associée à l'exposition au foin, particulièrement lorsque celui-ci contient beaucoup de moisissures. Les signes cliniques peuvent être très variables en fonction du degré d'atteinte et de l'état de crise; ils comprennent habituellement de l'intolérance à l'effort, du jetage, de la toux, une dyspnée expiratoire et de l'abattement. Les difficultés expiratoires sont dues à une diminution du diamètre des voies respiratoires, attribuable principalement à la contraction des muscles lisses des voies respiratoires et à l'accumulation de sécrétions dans la lumière de celles-ci.

De nombreuses dénominations ont été utilisées pour décrire ce syndrome. Outre les dénominations descriptives telles que "pousse" ou en anglais "heaves", certains auteurs ont

préférée pendant des années une définition à caractère anatomo-pathologique telle que emphysème, bronchiolite chronique ou encore maladie des petites voies respiratoires. Le terme de MPOC ou chronic obstructive pulmonary disease (COPD) est le plus couramment utilisé dans la littérature depuis le début des années 70. Il est cependant regrettable que la notion de récurrence n'apparaisse pas dans la dénomination (Derksen *et al.*, 1985a).

Malgré de nombreuses études, plusieurs inconnues persistent quant à l'étiologie, la physiopathologie et les traitements de la MPOC. De plus, les symptômes, leur durée, leur intensité et les handicaps qu'ils induisent sont sujets à d'énormes variabilités individuelles. C'est pourquoi le diagnostic et surtout le pronostic quant à la capacité sportive du cheval atteint de MPOC sont difficiles et délicats à déterminer.

2. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE PULMONAIRE OBSTRUCTIVE CHRONIQUE ÉQUINE

2.1. ETIOLOGIE

La MPOC équine est définie comme étant une pathologie liée à l'environnement (Derksen, 1993). Il paraît peu probable que les signes cliniques observés chez tous les chevaux atteints de MPOC soient causés par un agent étiologique unique et commun. Ce syndrome est communément défini à l'heure actuelle comme une pathologie multifactorielle ayant une base *génétique*. En effet, l'incidence de la pathologie est plus importante dans la descendance de deux chevaux atteints de MPOC que dans celle de chevaux non atteints (Marti *et al.*, 1991).

L'implication de l'*allergie* dans l'étiologie de la MPOC est appuyée par de nombreuses études (Eyre, 1972; Mansmann *et al.*, 1975; Halliwell *et al.*, 1979; McPherson *et al.*, 1979; Eriksen, 1986; Sasse *et al.*, 1986; McGorum *et al.*, 1993a). Quand ces chevaux sont en

contact, dans une écurie, avec des sources organiques de poussière telles que les fourrages et les litières, ils déclenchent une réaction d'hypersensibilité induite par l'inhalation de certains composants de cette poussière. Les allergènes les plus souvent incriminés incluent des actinomycètes thermophiles tels que *Faenia rectivirgula* [anciennement *Micropolyspora faeni* (Wayne, 1986)] et *Thermoactinomyces vulgaris* ainsi que des champignons tels que *Aspergillus fumigatus* (Lawson *et al.*, 1979; Madelin *et al.*, 1991). Ce sont les spores de ces micro-organismes qui sont, de par leur petite taille (inférieure à 3 µm de diamètre), capables d'atteindre les voies profondes du poumon où elles induisent une réaction allergique doublée d'une action irritative. Le type d'hypersensibilité impliquée apparaît rarement seule chez un individu. Le plus souvent, une combinaison de réactions de type I, III et/ou IV, selon la classification de Gell et Coombs (1968), se manifeste chez le même patient. Cependant, un de ces types d'hypersensibilité prédomine le plus souvent (Barta et Barta, 1990). Dans le cas de la MPOC, il s'agit principalement de réactions d'hypersensibilité de type III (McPherson *et al.*, 1979). Pour ces réactions d'hypersensibilité dite semi-retardées, les antigènes inhalés induisent la formation d'anticorps formant entre eux des complexes antigènes-anticorps ou immunocomplexes susceptibles d'activer le complément, de provoquer l'agrégation plaquettaire et la libération d'amines vasoactives inflammatoires. La réaction inflammatoire qui en résulte s'accompagne d'obstruction des voies respiratoires, ce qui induit l'apparition des signes cliniques.

Lorsque ces chevaux sont soustraits aux allergènes en étant placés en pâture, l'obstruction des voies respiratoires et l'inflammation décroissent jusqu'à disparition des symptômes cliniques (Thomson et McPherson, 1984; Derksen *et al.*, 1985a; Gray *et al.*, 1989). On parle alors de rémission clinique.

Les effets sur la structure et la fonction pulmonaire de l'inhalation des allergènes les plus fréquemment incriminés ont été étudiés à de nombreuses occasions, et ce aussi bien sur des chevaux sains que sur des animaux atteints de MPOC. Chez les individus souffrant de MPOC, quelques heures de mise au box en présence de foin moisi suffisent à induire une altération de la fonction respiratoire se traduisant par une augmentation de la résistance pulmonaire totale, une diminution de la compliance dynamique et de l'hypoxémie. Ces troubles s'accompagnent d'une augmentation significative de neutrophiles dans les liquides pulmonaires récoltés par lavage broncho-alvéolaire (Derksen *et al.*, 1985b; McGorum *et al.*, 1993a). Cette neutrophilie pulmonaire n'est pas associée à une modification de la formule sanguine (Derksen *et al.*, 1987) indiquant que la réaction est purement locale. Par contre, la mise en box dans les mêmes

conditions n'a aucun effet sur les chevaux sains (McGorum *et al.*, 1993a). L'inhalation de spores de *F. rectivirgula* ou d'*A. fumigatus* induit chez les chevaux atteints de MPOC une neutrophilie pulmonaire. Celle-ci est cependant moins sévère que celle observée après la mise au box et ne s'accompagne pas d'altérations de la fonction respiratoire (McGorum *et al.*, 1993a). Par contre, l'inhalation de spores de *T. vulgaris* seul n'induit ni neutrophilie pulmonaire ni altération de la fonction respiratoire chez les chevaux souffrant de MPOC (McGorum *et al.*, 1993a).

Au vu de ces résultats, il apparaît clairement que la MPOC est une hypersensibilité pulmonaire induite par l'inhalation d'allergènes spécifiques plutôt qu'une réaction non spécifique à la poussière et aux irritants retrouvés dans l'environnement d'écurie. Cependant, il est important de souligner que l'inhalation des seuls allergènes n'induit pas des altérations pulmonaires de la même intensité que celles observées lorsque le même animal atteint de MPOC est placé en contact avec du foin moisi. D'autres paramètres tels que la durée de l'exposition, la combinaison des allergènes et/ou d'autres facteurs tels que des bactéries, des endotoxines, de l'ammoniac, des particules de poussière, ... interviennent très probablement dans la pathogénie de la maladie.

Les variations de la population lymphocytaire pulmonaire avant et après la mise en box en présence de foin sont une preuve supplémentaire de l'implication de mécanismes immunitaires dans la MPOC. Les chevaux atteints de MPOC en rémission clinique ont un grand pourcentage de lymphocytes B dans le lavage broncho-alvéolaire. Suite à l'inhalation d'allergènes, on observe une augmentation sélective du pourcentage de lymphocytes CD5+CD8- (probablement CD4+, T helper) (McGorum *et al.*, 1993b).

De plus, on observe chez les chevaux atteints de MPOC un nombre accru de cellules contenant des immunoglobulines (Ig)A et des IgG(Fc) et ce aussi bien autour des vaisseaux sanguins que des bronchioles. De même, des IgA et IgG(Fc) libres sont retrouvés dans les espaces interépithéliaux (Winder et von Fellenberg, 1986; 1988). S'ajoute à cela, chez ces chevaux atteints de MPOC, un grand nombre d'Ig dans les lavages trachéaux et broncho-alvéolaires (Mair *et al.*, 1988; Halliwell *et al.*, 1993) ainsi que des mastocytes dans les bronches et les espaces intracellulaires (Kaup *et al.*, 1990a). Les tests cutanés et la mesure des précipitines sériques servant à l'identification des antigènes responsables donnent peu de résultats concrets. Bien qu'on observe plus de réactions cutanées positives chez les chevaux atteints de MPOC que chez les chevaux sains, des réactions immunologiques sont rencontrées dans les deux groupes. Ainsi, les tests cutanés positifs et la présence de précipitines dirigées

contre des micro-organismes thermophiles retrouvés chez de nombreux chevaux sains et des chevaux atteints de MPOC sont plus que probablement le reflet d'une exposition de ces chevaux à ces allergènes potentiels plutôt qu'une sensibilité exagérée à ceux-ci (Eyre, 1972; Halliwell *et al.*, 1979; Beech et Merryman, 1986; Madelin *et al.*, 1991; Evans *et al.*, 1992; McGorum *et al.*, 1993c).

Certaines *infections virales* du tractus respiratoire sembleraient prédisposer à l'apparition des symptômes de la MPOC (Gerber, 1973; Chabchoub *et al.*, 1994). Ainsi en Suisse, une augmentation significative de cas de MPOC a été signalée au cours des années qui ont suivi une importante épidémie de grippe (influenza) (Breeze, 1979). En médecine humaine, divers travaux suggèrent que les infections respiratoires profondes au cours de la jeune enfance, en particulier les bronchites et les pneumonies, jouent un rôle dans l'apparition d'affections respiratoires telles que l'asthme et les broncho-pneumopathies chroniques obstructives (Shaheen *et al.*, 1995).

D'autre part, il a été vérifié chez les chevaux que les virus peuvent induire des dysfonctionnements pulmonaires à long terme (Derksen, 1991). En effet, les maladies infectieuses respiratoires endommagent les surfaces épithéliales et altèrent les réponses immunes à ce niveau (McChesney, 1975; Allen et Bryans, 1986). Les déciliations temporaires ainsi que les lésions de la muqueuse induites par certains virus peuvent altérer la clairance mucociliaire durant plus d'un mois après une infection virale du tractus respiratoire (Willoughby *et al.*, 1991; 1992). Ce dysfonctionnement de la clairance mucociliaire permettra aux allergènes et aux irritants de pénétrer profondément dans le tractus respiratoire et de stimuler les récepteurs de l'irritation situés sous l'épithélium (Gerber, 1973).

De plus, il a été observé que les taux d'IgE dans les liquides récoltés par lavage broncho-alvéolaire augmentent chez les chevaux souffrant de MPOC ainsi que chez les chevaux atteints d'une pathologie pulmonaire d'origine virale. Cela soutient non seulement le rôle important que jouent les anticorps IgE dirigés contre les allergènes dans l'immunopathogénie de la MPOC mais cela suggère également que les infections respiratoires virales peuvent prédisposer au développement de la maladie chez certains chevaux (Halliwell *et al.*, 1993).

D'autres agents infectieux tels que les *bactéries* peuvent favoriser l'altération de la fonction pulmonaire. Néanmoins aucune étude ne permet de penser, à l'heure actuelle, qu'une infection bactérienne puisse entraîner l'apparition de la MPOC. Cependant, par de nombreux

mécanismes, les bactéries vont favoriser l'aggravation des phénomènes inflammatoires et la destruction cellulaire au sein même des poumons. Lors de pathologies pulmonaires chroniques, les altérations pulmonaires induisent des modifications des systèmes locaux de défense et facilitent ainsi l'infection. Les modifications de viscosité et de quantité du mucus, le rétrécissement des voies respiratoires par l'inflammation et l'oedème, les lésions épithéliales sont autant de facteurs susceptibles de favoriser le développement de surinfections bactériennes (Jansen *et al.*, 1995; Widdicombe, 1995). Les risques de surinfection bactérienne chez les chevaux atteints de MPOC sont d'autant plus important lorsqu'ils sont traités par anti-inflammatoires stéroïdiens.

Les bactéries peuvent aggraver le dysfonctionnement pulmonaire en agissant à plusieurs autres niveaux. Certaines bactéries sécrètent des toxines qui diffusent à travers l'épithélium et provoquent des dommages, en particulier au niveau des cellules ciliées. D'autres induisent une hypersécrétion de mucus (Grünig *et al.*, 1986), aggravant ainsi l'obstruction des voies respiratoires et offrant un terrain plus favorable aux multiplications bactériennes. Certaines bactéries telles que *Streptomyces* sp. et *Bacillus* sp. libèrent des enzymes protéolytiques. Ces dernières, dont les spores ont moins de 5 µm de diamètre, sont retrouvées dans l'environnement du cheval notamment dans le foin et la paille (Grünig *et al.*, 1986). Les enzymes protéolytiques ou protéases peuvent induire de l'inflammation et une bronchoconstriction (Thomson *et al.*, 1983). De plus, les protéases élastolytiques (élastases) peuvent être impliquées dans la destruction tissulaire conduisant, dans certains cas, à de l'emphysème (Grünig *et al.*, 1986).

Il a également été suggéré que la paille et le foin pourraient contenir des *substances capables d'induire des lésions pulmonaires*. Le 3-méthylindol (3 MI), un agent pneumotoxique bien connu chez les bovins, induit, lorsqu'il est administré par voie orale chez le cheval, l'apparition de signes cliniques assez semblables à ceux rencontrés chez les chevaux atteints de MPOC (Breeze *et al.*, 1978) ainsi que des lésions pulmonaires caractérisées par de la bronchiolite nécrosante et de l'emphysème alvéolaire (Breeze *et al.*, 1978; Derksen *et al.*, 1982). Il apparaît néanmoins comme peu probable que le 3 MI induise l'apparition de la maladie puisque, contrairement à ce qui est observé chez les bovins, le 3 MI n'est pas le résultat, chez les chevaux, de la dégradation du tryptophane dans le tractus gastro-intestinal et, qu'en aucune manière, il n'est ingéré comme tel.

2.2. PATHOLOGIE

Toutes les lésions retrouvées lors des phases aiguës de ce syndrome indiquent que l'inflammation des voies respiratoires est la caractéristique prédominante de cette pathologie. Cette réaction inflammatoire s'accompagne de bronchospasmes et d'hyperréactivité des voies respiratoires. La conjonction de ces trois phénomènes expliquent les symptômes cliniques.

La principale lésion observée chez les chevaux atteints de MPOC est une (péri)-bronchiolite aiguë à subaiguë en fonction de la sévérité de la maladie. Les rassemblements péri-bronchiolaires de cellules inflammatoires sont accompagnés d'accumulation intraluminale de neutrophiles. On observe principalement une dégénérescence des cellules de Clara. Dans les cas les plus sévères, les cellules de Clara sont remplacées par des cellules à mucus (Kaup *et al.*, 1990b). L'augmentation de la production de mucus est partiellement expliquée par cette métaplasie, mais également par la stimulation des cellules à mucus et des glandes de la sous-muqueuse par différents médiateurs de l'inflammation et voies nerveuses. Les propriétés rhéologiques du mucus sont également modifiées dans la MPOC équine comme dans toutes pathologies s'accompagnant d'un processus inflammatoire. Le mucus est plus visqueux et l'éventuelle présence de pus accentue cette modification d'élasticité (Dixon, 1992). De la péri-bronchiolite chronique est observée dans les cas les plus sévères (Kaup *et al.*, 1990b).

Au niveau des alvéoles, les changements sont focaux et caractérisés par de la nécrose des cellules épithéliales de type I accompagnée dans certains cas de fibrose alvéolaire et de dégénérescence graisseuse de certaines cellules épithéliales de type II (Kaup *et al.*, 1986; 1990b). On observe également une hyperinflation de certaines alvéoles, qui s'accompagne d'une augmentation du nombre des pores de Kohn permettant une ventilation collatérale (Kaup *et al.*, 1986; 1990b). Néanmoins, la destruction des parois alvéolaires est rarement observée (Breeze, 1979; Kaup *et al.*, 1986). Dans certains cas, des macrophages s'accumulent au niveau des alvéoles (Kaup *et al.*, 1986; Naylor *et al.*, 1992).

Au niveau de l'épithélium des larges voies respiratoires (trachée et bronches), de nombreuses cellules ciliées sont remplacées par des cellules non-ciliées indifférenciées (Drommer *et al.*, 1986; Kaup *et al.*, 1990a). Cette métaplasie est une caractéristique ultrastructurale de la maladie; elle entraîne une perturbation majeure de la clairance mucociliaire, expliquant la présence de placards de mucus qui stagnent dans la trachée et les bronches.

Bien que ces observations ne soient pas effectuées chez tous les chevaux atteints de MPOC, on constate généralement une concordance étroite entre les lésions microscopiques et la sévérité de la maladie (Viel, 1983; Drommer *et al.*, 1986; Viel, 1986; Kaup *et al.*, 1990a). La production excessive de mucus et l'hyperplasie épithéliale contribuent partiellement à l'importance des symptômes cliniques par le biais de l'obstruction de la lumière des voies respiratoires profondes qu'elles induisent (Viel, 1983).

2.2.1. INFLAMMATION

Chez les chevaux atteints de MPOC, l'inhalation d'allergènes et de facteurs irritants induit rapidement l'apparition d'un processus inflammatoire qui perdurera au-delà de la durée d'exposition. Cette inflammation est principalement caractérisée par une accumulation de neutrophiles dans les voies respiratoires profondes (Nuytten *et al.*, 1983; Derksen *et al.*, 1985b; Mair, 1987; Traub-Dargatz *et al.*, 1992). Ces modifications cellulaires dues aux agressions spécifiques et non spécifiques stimulent la production et la libération de nombreux médiateurs. Ces processus inflammatoires ainsi que leur implication relative dans la symptomatologie et la pathogénie font l'objet de nombreuses études résumées dans les paragraphes suivants.

2.2.1.1. Cellules

Les neutrophiles s'accumulent dans le poumon 3 à 5 heures après le début de l'exposition à la poussière d'écurie et de foin (Fairbain *et al.*, 1993; McGorum *et al.*, 1993a). Il existe d'importantes variations entre chevaux (Bracher *et al.*, 1991, Vrins *et al.*, 1991) démontrant qu'une sévère dyspnée n'est pas nécessairement accompagnée d'une sévère inflammation et *vice versa* (Grünig *et al.*, 1989). Ainsi, chez certains chevaux atteints de MPOC, l'apparition de signes cliniques suite à l'exposition aux allergènes ne s'accompagne pas d'un recrutement de neutrophiles dans le poumon (Fairbain *et al.*, 1993), ce qui suggère que les neutrophiles ne sont pas indispensables à l'apparition des symptômes. Toutefois, comme les neutrophiles apparaissent en grand nombre dans les voies respiratoires de la majorité des chevaux atteints de MPOC en contact avec des allergènes et des irritants et qu'on connaît leurs pouvoirs à induire

des lésions pulmonaires par libération de protéases, de radicaux libres, et de médiateurs de l'inflammation, le rôle des neutrophiles dans la pathologie continue d'être activement étudié.

Par contre, lorsque ces chevaux atteints de MPOC sont en rémission clinique, la population cellulaire des sécrétions récoltées par lavage broncho-alvéolaire ne diffère en rien de celle récoltée chez les individus sains (Derksen *et al.*, 1985b; McGorum *et al.*, 1993a). Ces cellules sont alors majoritairement des macrophages et des lymphocytes.

Les neutrophiles sont attirés dans les poumons par des mécanismes spécifiques et non spécifiques. Les mécanismes de chimiotactisme non spécifiques comprennent notamment (1) l'attraction directe due aux particules inhalées, (2) l'activation du système du complément qui induit la production de C5a, facteur majeur du chimiotactisme des neutrophiles, et (3) la production, par les macrophages alvéolaires, de cytokines chimiotactiques (Edwards, 1976; von Essen *et al.*, 1988). Il est fort probable que ces mécanismes non spécifiques d'attraction des neutrophiles ne soient pas prédominants dans le déclenchement des phénomènes inflammatoires observés chez les chevaux atteints de MPOC car ils existent chez tous les chevaux, qu'ils soient ou non atteints de MPOC. Toutefois, ces mécanismes peuvent expliquer l'augmentation modeste de neutrophiles observée dans les sécrétions récoltées par lavage broncho-alvéolaire chez des chevaux et des poneys sains exposés à des environnements poussiéreux (Derksen *et al.*, 1985b; Tremblay *et al.*, 1993). De même, cela pourrait expliquer l'accumulation de neutrophiles observées chez des individus sains à qui on fait inhaler des spores de *F. rectivirgula* (Derksen *et al.*, 1987; 1988). Chez les chevaux atteints de MPOC, il est évident que l'inhalation d'allergènes initialise une réponse immunitaire spécifique. Les cellules résidentes telles que les macrophages et les lymphocytes produisent alors des cytokines qui vont contribuer à l'attraction de neutrophiles dans le poumon. De plus, des lymphocytes T-helper (CD4+) augmentent en nombre dans les sécrétions bronchiques de chevaux atteints de MPOC qui ont été exposés à du foin et de la paille (McGorum *et al.*, 1993b). A l'image de leur importance chez les asthmatiques en médecine humaine, ces lymphocytes T pourraient jouer un rôle déterminant dans le développement de la MPOC et sa symptomatologie.

La réponse d'hypersensibilité des voies respiratoires déclenchée par l'inhalation de poussière de foin peut être immédiate ou plus ou moins retardée. Quel que soit son type, elle est précédée d'une période de sensibilisation, pendant laquelle le sujet, exposé à des doses répétées d'allergène(s), va développer une réponse immune se traduisant par la sensibilisation

des cellules et/ou la synthèse d'anticorps spécifiques. Cette période peut durer de quelques jours à quelques années.

L'hypersensibilité de type I est caractérisée par une réaction allergique survenant immédiatement après le contact avec l'antigène (allergène) (Fig. 1.1.). Cette réaction a pour origine l'activation, par un ou des antigène(s) spécifique(s), de mastocytes sensibilisés par des immunoglobulines E (IgE). Elle aboutit à la libération de médiateurs de l'inflammation tels que l'histamine, certaines prostaglandines et leucotriènes libérés par les cellules sensibilisées présentes dans les voies respiratoires. La réponse IgE est un phénomène localisé au site d'entrée de l'allergène dans l'organisme et ne s'accompagne pas ou très peu d'une infiltration de cellules inflammatoires.

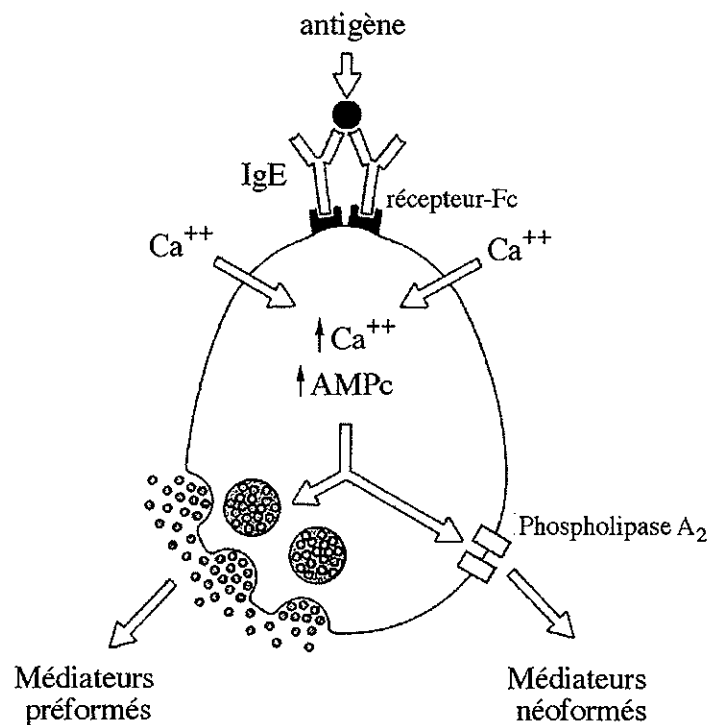


Fig. 1.1. - Hypersensibilité de type I

L'antigène stimule avec l'aide des cellules T la production d'IgE spécifiques par les cellules B. Les IgE spécifiques se lient aux récepteurs mastocytaires par leur extrémité Fc (RFc). Les antigènes atteignant le mastocyte ainsi sensibilisé établissent un pontage entre les IgE liées à sa surface. Ceci déclenche 1) la dégranulation du mastocyte qui libère les médiateurs préformés, i.e. histamine, héparine, facteurs chimiotactiques dans le milieu extracellulaire, 2) des modifications membranaires qui donnent à la phospholipase A₂ la possibilité de libérer de l'acide arachidonique, conduisant à la production de prostaglandines et de leucotriènes (médiateurs néoformés).

Les réponses d'hypersensibilité de type III, quant à elles, se produisent après 3 à 5 heures de contact avec les éléments allergéniques, et sont ou non précédées d'une réponse immédiate. Dans ce type de réaction allergique, les antigènes induisent la formation d'anticorps IgG ou IgM formant avec eux des complexes antigènes-anticorps ou complexes immuns (CI) qui ne seront pas, comme cela est le cas généralement, éliminés par les cellules du système réticulo-histiocytaire. Dans le cas des alvéolites allergiques extrinsèques chez l'homme (maladie des poumons de fermier p.e.) et de la MPOC équine, les anticorps produits contre les antigènes inhalés sont principalement des IgG (Fig. 1.2.).

Lors d'un deuxième contact avec l'antigène (inhalation), des complexes immuns se forment dans les alvéoles, entraînant le déclenchement de nombreux processus inflammatoires. En se liant au complément, ces CI entraînent la libération de facteurs C3a et C5a qui ont, entre autre, d'importantes propriétés chimiotactiques. Ils induisent également la libération d'amines vasoactives par les mastocytes et les basophiles, avec pour conséquences une augmentation de la perméabilité vasculaire et un afflux de neutrophiles.

Dans la majorité des cas, une réaction d'hypersensibilité apparaît rarement seule chez un individu. Cependant un type prédomine le plus souvent. Ainsi, dans le cas de la MPOC équine, les manifestations cliniques semblent résulter, dans la majorité des cas, d'une hypersensibilité de type III. Des expériences et constatations supportent cette conclusion. En effet, les taux d'histamine ne s'élèvent dans les sécrétions récoltées par lavage broncho-alvéolaire que 5 heures après le contact avec les allergènes, alors qu'on n'observe aucune variation après 1.5 heures (McGorum *et al.*, 1993d). Une autre étude a démontré que l'afflux de neutrophiles au sein des voies respiratoires, objectivée par un marquage radioactif des neutrophiles sanguins, n'avait lieu que 3 à 5 heures après le début du challenge (Fairbain *et al.*, 1993). Bien que ces différents résultats montrent l'existence d'une réponse inflammatoire retardée, l'augmentation d'IgE intrapulmonaires observée chez certains chevaux atteints de MPOC, tant en crise aiguë qu'en rémission clinique, laisse présager qu'une réaction de type immédiate a également lieu chez ces individus (Halliwell *et al.*, 1993).

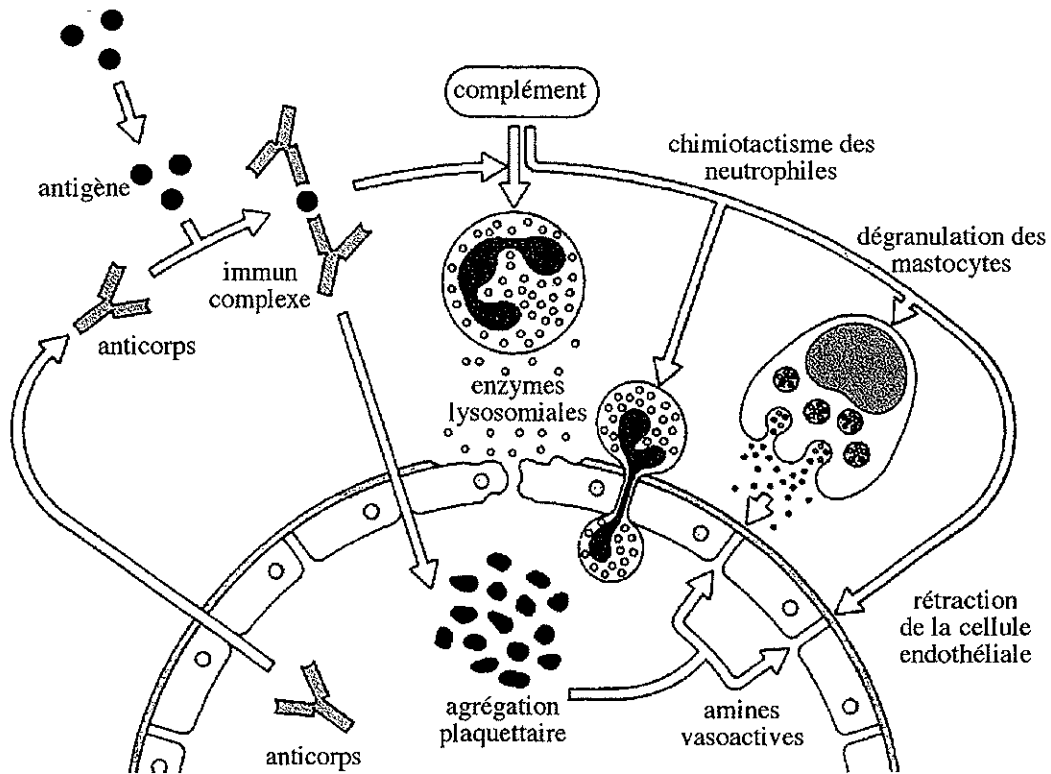


Fig. 1.2. - Hypersensibilité de type III

L'antigène se lie aux anticorps circulants spécifiques, entraînant la formation de complexes immuns. Les complexes activent le complément et agissent sur les plaquettes qui libèrent leurs amines vasoactives. Les fragments C3a et C5a du complément provoquent une rétraction des cellules endothéliales, la dégranulation des mastocytes et l'attraction des neutrophiles. Les produits libérés par les mastocytes, en particulier l'histamine et les leucotriènes, induisent une augmentation du débit sanguin et de la perméabilité capillaire. Les neutrophiles, attirés à proximité des dépôts, amplifient la réaction inflammatoire par la libération de leurs enzymes lysosomiales.

2.2.1.2. Médiateurs

Un grand nombre de médiateurs sont probablement impliqués dans le processus inflammatoire qui caractérise la crise de la MPOC. Mais, à l'heure actuelle, seuls quelques-uns d'entre eux ont été étudiés. Ainsi, l'implication respective de chacune des grandes familles de

médiateurs dans le phénomène inflammatoire qui accompagne ce syndrome est encore méconnue.

L'activation de la cascade de l'acide arachidonique chez les chevaux atteints de MPOC a été confirmée par Gray *et al.* (1989) qui ont mesuré dans le plasma et dans les sécrétions récoltées par lavage broncho-alvéolaire les concentrations en thromboxane (TX)₂, en prostaglandine (PG) I₂ et en PGD₂, et ce après un séjour en pâture et après un contact avec du foin et de la paille. Ces résultats ont été comparés aux valeurs mesurées chez des chevaux sains. Seul le TXB₂ plasmatique augmente significativement chez les chevaux atteints de MPOC après contact avec les allergènes. Un blocage de la voie de la cyclo-oxygénase prévient cette augmentation du TXB₂ plasmatique sans toutefois empêcher l'apparition des symptômes cliniques et de l'hyperréactivité bronchique (Gray *et al.*, 1989). Les auteurs en concluent donc que les produits de la voie de la cyclo-oxygénase ne jouent pas un rôle important dans la réponse des chevaux atteints de MPOC lorsqu'ils entrent en contact avec des allergènes. Cependant, une augmentation de la production pulmonaire de l'acide 15-hydroxyicosatétraénoïque (15-HETE) est observée chez les chevaux atteints de MPOC en rémission clinique par rapport aux individus sains (Gray *et al.*, 1992b). Lors d'une crise, leur production est encore augmentée (Gray *et al.*, 1992b). Bien que le 15-HETE possède quelques actions pro-inflammatoires telles que l'augmentation de la production de mucus et la capacité potentielle d'induire la contraction des muscles lisses (Hoogsteden et Van Hal, 1991), ce médiateur est reconnu actuellement comme ayant avant tout une action anti-inflammatoire. Ainsi, chez l'homme, il inhibe la voie de la cyclo-oxygénase vasculaire (Setty et Stuart, 1986), modifie l'activité de la lipoxigénase et la production de leucotriènes (Vanderhoek *et al.*, 1980a; 1980b). L'augmentation des taux plasmatiques de 15-HETE chez les chevaux atteints de MPOC pourrait donc être un moyen de protection endogène mis en oeuvre contre les processus inflammatoires.

L'épithélium trachéal des chevaux est une source de PGE₂ (Gray *et al.*, 1992a), prostanoloïde inhibiteur qui réduit la production par les granulocytes de médiateurs et qui inhibe la contraction musculaire lisse (Wang *et al.*, 1992). Selon Gray et coll. (1992a), l'épithélium trachéal des chevaux atteints de MPOC semble, lors d'une crise aiguë, produire moins de PGE₂ que les individus sains. A l'opposé des résultats obtenus *in vitro* (Gray *et al.*, 1992a), une autre étude a observé une augmentation significative de PGE₂ chez les chevaux atteints de MPOC dans les liquides récoltés par lavage broncho-alvéolaire (Watson *et al.*, 1992). Le rôle

de ce prostanoïde dans la pathogénie de la MPOC reste, à ce jour, encore inconnu.

Le rôle des leucotriènes est encore obscur chez les chevaux atteints de MPOC. Contrairement à ce qui a été démontré en médecine humaine chez les asthmatiques (Chanarin et Johnston, 1994), les concentrations de leucotriènes dans les liquides récoltés par lavage broncho-alvéolaire ne sont pas différentes de celles mesurées chez des individus sains (Watson *et al.*, 1992). Par ailleurs il a été démontré que, *in vitro*, les leucotriènes induisent chez le cheval une contraction de morceaux de parenchyme pulmonaire mais pas de la trachée (Doucet *et al.*, 1990). Il est important de se souvenir que les leucotriènes sont des autacoïdes et qu'ils agissent localement. Toutefois, le fait de ne pas avoir pu mesurer une augmentation de leur concentration dans les liquides récoltés par lavage broncho-alvéolaire ne permet pas d'exclure le rôle potentiel des leucotriènes dans la pathogénie de la pathologie. L'utilisation d'antagonistes spécifiques capables de se fixer sur les récepteurs des leucotriènes et/ou d'inhibiteurs de synthèse permettra très probablement d'apporter des éléments de réponses dans un futur proche. Leur utilisation permettra de mettre en évidence le lien entre le blocage spécifique de cette voie et l'amélioration clinique potentielle.

Le rôle de l'histamine dans la maladie semble être mineur. Bien que les taux d'histamine mesurés dans les liquides récoltés par lavage broncho-alvéolaire sont plus élevés suite à une exposition à des allergènes (McGorum *et al.*, 1993d), les observations cliniques indiquent que les traitements à base d'antihistaminiques n'apportent aucune amélioration chez la majorité des chevaux atteints (Beech, 1991).

Le rôle que pourrait jouer le facteur d'activation plaquettaire (PAF) dans la pathogénie de la MPOC équine n'a pas encore fait l'objet de beaucoup d'études. Cependant, le PAF, outre sa capacité à agréger les plaquettes sanguines (Saunders et Handley, 1987), est un puissant médiateur de l'inflammation. Une récente étude a démontré que, contrairement à ce qui a été démontré chez l'homme (Cuss *et al.*, 1986), l'inhalation de PAF n'induit pas, dans l'espèce équine, d'altérations de la fonction respiratoire (Fairbairn *et al.*, 1996). Par contre, administré par voie intraveineuse, il induit rapidement une accumulation transitoire de neutrophiles dans les poumons, accumulation qui s'accompagne d'une altération de la fonction respiratoire, et ce aussi bien chez des chevaux sains que atteints de MPOC (Fairbairn *et al.*, 1996). Ces résultats n'apportent pas encore, à l'heure actuelle, de preuve quant aux rôles potentiels que pourrait jouer le PAF dans la physiopathologie de la MPOC, et ce, même si, *in vivo*, Foster *et coll.*

(1992) ont démontré que le PAF induisait une migration neutrophilique et éosinophilique chez le cheval.

2.2.2. BRONCHOSPASME

La diminution rapide de la résistance pulmonaire suite à l'administration de bronchodilatateurs chez les chevaux en crise (Murphy *et al.*, 1980; Broadstone *et al.*, 1988; McKiernan *et al.*, 1990; Derksen *et al.*, 1992; Robinson *et al.*, 1993; Duvivier *et al.*, 1997) indique que la contraction des muscles lisses (bronchospasme) est la composante majeure du phénomène d'obstruction respiratoire. Le bronchospasme est probablement le résultat combiné des effets directs des médiateurs sur les muscles lisses des voies respiratoires et des effets indirects exercés *via* le système nerveux autonome.

2.2.2.1. *Implication du système nerveux dans les phénomènes de bronchospasme lors d'une crise*

Pour rappel, les voies respiratoires sont innervées par des nerfs parasymphatiques, sympathiques ainsi que par des nerfs non adrénergiques non cholinergiques respectivement inhibiteurs (iNANC) et excitateurs (eNANC) (Fig. 1.3.).

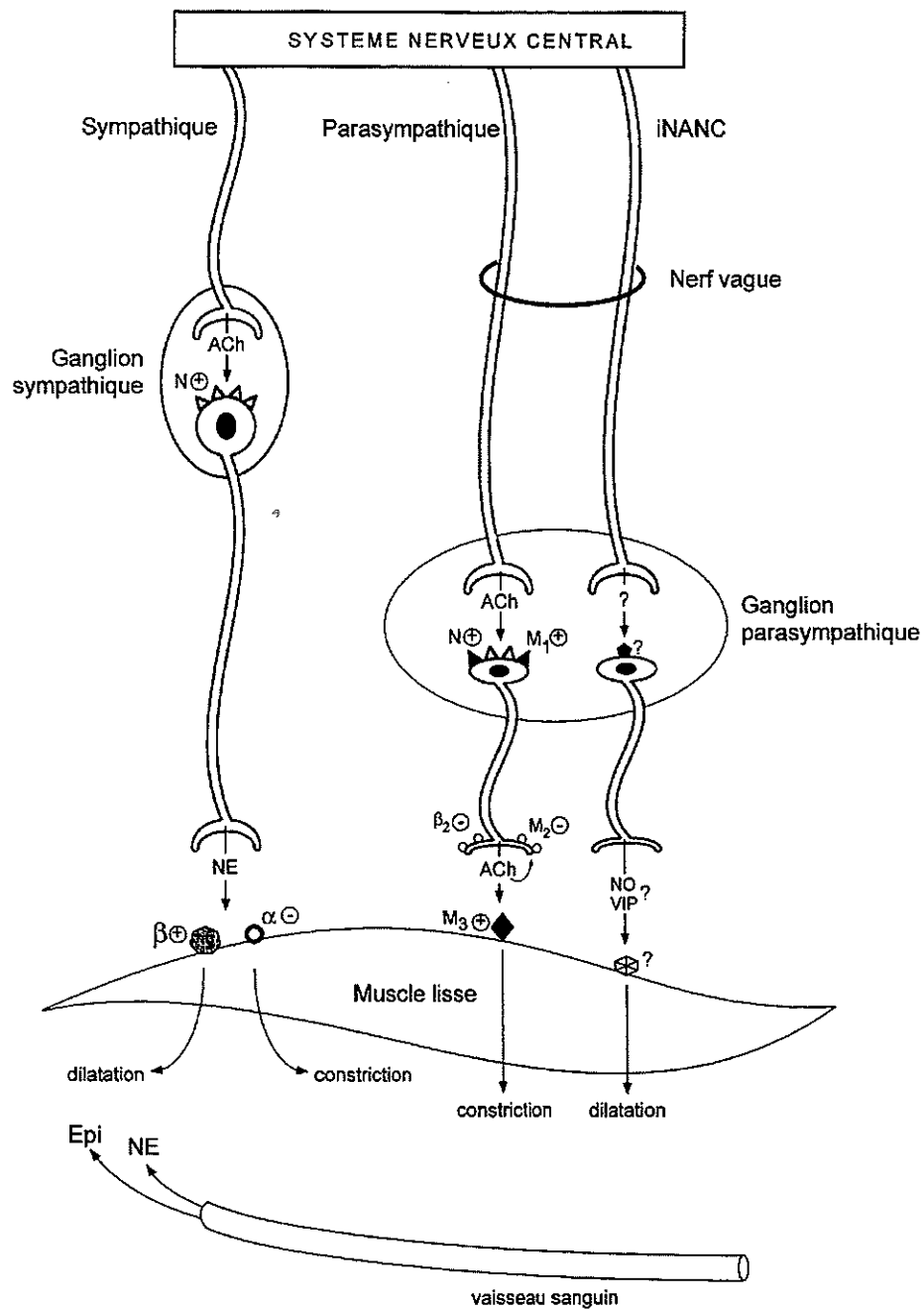


Fig. 1.3. - Contrôle nerveux des muscles lisses des voies respiratoires

ACh = acétylcholine; β = récepteur bêta; M = récepteur muscarinique; α = récepteur alpha; N = récepteur nicotinique; NANC = système nonadrénergique noncholinergique; NE = noradrénaline; NO = oxyde nitrique; VIP = peptide vasoactif intestinal; EPI = adrénaline.

Le système parasympathique est le principal système induisant la contraction des muscles lisses de la trachée ainsi que des larges et petites bronches, chez toutes les espèces et en particulier chez le cheval (Broadstone *et al.*, 1991; LeBlanc *et al.*, 1991). Les nerfs cholinergiques préganglionnaires, issus du système nerveux central, passent par le nerf vague et se dirigent vers les ganglions parasympathiques, situés dans la paroi des voies aériennes. A ce niveau, ils se connectent à de courtes fibres postganglionnaires efférentes, qui aboutissent aux tissus cibles, tels que le muscle lisse respiratoire et les glandes.

Bien que la présence de nerfs sympathiques ait été démontrée, par utilisation de marqueurs immunoréactifs, à tous les niveaux des voies respiratoires chez le cheval (Sonea *et al.*, 1993), leur activation *in vitro* n'entraîne pas la relaxation des muscles lisses de la portion crâniale de la trachée. L'activation des fibres sympathiques provoque essentiellement la libération de noradrénaline. En plus de cette sécrétion locale, les glandes surrénales libèrent de façon systémique de l'adrénaline et de la noradrénaline. Ces deux neuromédiateurs agissent sur les récepteurs adrénergiques (α et β), situés notamment au niveau des fibres musculaires lisses du système respiratoire. D'une manière générale, la stimulation des récepteurs β entraîne essentiellement la relaxation du muscle lisse vasculaire et respiratoire, en réduisant également le tonus cholinergique. A l'inverse, l'activation des récepteurs α est principalement responsable de la bronchoconstriction et de la vasoconstriction.

Chez beaucoup d'espèces, l'activation du iNANC induit la relaxation des muscles lisses de la trachée et des bronches proches de la carina. Dans l'espèce équine, cependant, ces systèmes inhibiteurs semblent manquer au niveau des voies plus périphériques (Broadstone *et al.*, 1991; LeBlanc *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1994b).

Les nerfs du système eNANC, quant à eux, sont probablement davantage impliqués dans la régulation du tonus des vaisseaux sanguins de la circulation bronchique que dans le contrôle des muscles lisses. En effet, chez le cheval, ils sont préférentiellement localisés autour des vaisseaux sanguins de la *lamina propria* et de l'épithélium et sont rares au niveau des muscles lisses (Sonea *et al.*, 1994). Peu étudié chez le cheval à l'heure actuelle, leurs médiateurs seraient des neuropeptides tels que la substance P ou les neurokinines A et B, localisés principalement dans certaines fibres afférentes appelées fibres C (Barnes, 1991). Leur libération serait responsable d'effets moteurs et inflammatoires, dont certains sont regroupés

sous le vocable d'inflammation neurogénique.

Les systèmes nerveux excitateurs - La bronchodilatation obtenue par l'usage de substances anti-cholinergiques telles que l'atropine et l'ipratropium bromide (Broadstone *et al.*, 1988; Robinson *et al.*, 1993) signe l'implication du système nerveux parasympathique dans le bronchospasme chez les chevaux atteints de MPOC. Il pourrait s'agir d'une sensibilité exagérée des récepteurs musculaires muscariniques (M₃) à l'acétylcholine (ACh), d'une diminution de la dégradation de l'ACh par les cholinestérases, d'une augmentation de la quantité d'ACh libérée par les nerfs parasympathiques ou encore d'une absence *in vivo* d'un ou plusieurs facteur(s) qui permettrait(ent) d'inhiber ou de contrôler la contraction induite par l'ACh. Les seules études *in vitro* effectuées à l'heure actuelle ont démontré que les muscles lisses de la trachée et des petites voies respiratoires étaient hyporéactifs à l'ACh chez les chevaux atteints de MPOC par rapport aux individus sains (Broadstone *et al.*, 1991; LeBlanc *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1994b). Ces résultats permettent donc d'exclure une sensibilité exagérée des récepteurs muscariniques de même qu'une diminution de la dégradation de l'ACh pour les estérases spécifiques. D'autres études seront encore indispensables pour infirmer ou confirmer les autres hypothèses avancées.

L'effet de la stimulation du eNANC sur le système respiratoire du cheval n'a pas encore été étudié. Néanmoins, à l'image de ce qui est observé en médecine humaine, l'inflammation neurogénique induite par la stimulation des fibres C semble jouer un rôle dans la pathogénie de certaines maladies telles que l'asthme et la bronchite chronique (Tomaki *et al.*, 1995). Outre ses effets sur les muscles lisses des voies aériennes et sur les glandes muqueuses, elle se caractérise, au même titre que tout autre phénomène inflammatoire, par de la vasodilatation et par une augmentation de la perméabilité vasculaire. La stimulation des fibres C a souvent été associée au concept de "réflexe axonal" qui décrit le phénomène par lequel une branche d'une fibre sensitive afférente peut déclencher la stimulation d'une autre branche collatérale à proximité. Ces fibres C, situées sous l'épithélium des voies respiratoires, peuvent être stimulées par des facteurs exogènes irritants (poussière, ammoniac, ...) et endogènes (médiateurs de l'inflammation). Le rôle de ces réflexes n'a pas encore été étudié chez les chevaux. Mais, il est probable que, durant le développement de la crise chez les chevaux atteints de MPOC, une réponse réflexe soit augmentée notamment par l'activation des récepteurs sensitifs des voies respiratoires par les médiateurs de l'inflammation et qu'elle soit responsable d'une augmentation de libération d'ACh par les neurones post-ganglionnaires

parasympathiques (Robinson *et al.*, 1996). En effet, différentes études ont démontré ce type d'effet chez les personnes souffrant d'asthme. Ainsi, il a été démontré que le nombre de récepteurs sensitifs contenant de la substance P est augmenté chez ces personnes (Ollerenshaw *et al.*, 1991) et que l'excitabilité de leurs neurones afférents est augmentée par de nombreux médiateurs de l'inflammation (Undem *et al.*, 1993).

En plus des changements potentiels des différents composants des arcs réflexes cités ci-dessus, la libération d'ACh par les nerfs parasympathiques post-ganglionnaires terminaux est également régulée localement. Ainsi, la libération d'ACh par les neurones post-ganglionnaires qui innervent les muscles lisses est inhibée par l'activation des récepteurs muscariniques pré-jonctionnels (Wang *et al.*, 1995a) et par les récepteurs α_2 -adrénergiques qui peuvent être activés par les catécholamines (LeBlanc *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1993). Ces récepteurs pré-jonctionnels sont, dans la plupart des autres espèces, de type M_2 et leur dysfonctionnement semble expliquer l'obstruction des voies respiratoires chez des espèces comme le cochon d'Inde (Fryer et Wills-Karp, 1991). Chez le cheval, l'existence de récepteurs de type M_2 est mise en question (Yu *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1995a). Par contre, il semblerait qu'il existe bien une altération de la fonction des récepteurs α_2 -adrénergiques chez les chevaux atteints de MPOC mais son implication clinique n'est pas encore claire (Wang *et al.*, 1993). Chez les chiens, la PGE_2 inhibe la libération d'ACh; il est donc possible que la diminution de production de PGE_2 , par la muqueuse respiratoire, observée chez les chevaux atteints de MPOC favorise la libération d'ACh. Cependant la présence de PGE_2 n'empêche pas la libération d'ACh chez le cheval et son effet inhibiteur n'est effectif qu'au niveau des muscles lisses (Wang *et al.*, 1992; 1994). En conclusion, l'information disponible sur la modulation de la libération de l'ACh chez les chevaux atteints de MPOC par l'activation des récepteurs pré-jonctionnels au niveau des fibres parasympathiques post-ganglionnaires n'est pas définitive. Bien que les mesures de la tension musculaire suggèrent une libération d'ACh plus importante par les nerfs parasympathiques des grandes voies respiratoires en opposition aux petites voies (Broadstone *et al.*, 1991; LeBlanc *et al.*, 1991), les dosages d'ACh libérée par du tissu pulmonaire *in vitro* ne supporte pas cette théorie d'altération de la modulation préjonctionnelle chez ces individus atteints de MPOC (Wang *et al.*, 1995b).

Les systèmes nerveux inhibiteurs - Chez le cheval sain, la fonction inhibitrice du système iNANC agissant sur les muscles lisses est limitée à la trachée et aux larges bronches, parties des voies respiratoires qui contribuent le plus fortement à la résistance pulmonaire à

l'écoulement de l'air (Yu *et al.*, 1994a). Chez les individus atteints de MPOC, il existe une déficience de la fonction du iNANC au niveau des larges bronches (Broadstone *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1994b). Cette perte de la fonction inhibitrice des muscles lisses peut être un des facteurs qui contribuent à l'obstruction des voies respiratoires. L'oxyde nitrique, qui est de toute évidence chez le cheval le plus important des constituants de ce système (Yu *et al.*, 1994a), est rapidement inactivé par les radicaux libres libérés lors de tout phénomène inflammatoire aigu (Gryglewski *et al.*, 1986). Il reste donc à déterminer si l'absence de ce système iNANC est le résultat d'une présence concomitante de réponse inflammatoire durant la crise aiguë ou s'il s'agit d'une carence initiale chez les chevaux atteints de MPOC.

A l'heure actuelle, il n'existe aucune preuve d'un dysfonctionnement du système sympathique chez les chevaux atteints de MPOC. L'inhibition *in vitro* de la contraction des muscles lisses induite par l'utilisation d'agonistes β -adrénergiques est identique chez les chevaux atteints de MPOC que chez les individus sains et ce à tous les niveaux pulmonaires (Broadstone *et al.*, 1991; LeBlanc *et al.*, 1991).

Les facteurs de relaxation libérés par l'épithélium - En plus de l'inhibition induite par les systèmes sympathiques et iNANC, la contraction du muscle lisse semblerait également empêchée par un facteur produit par l'épithélium des voies respiratoires (Tessier *et al.*, 1991). Les lésions épithéliales rencontrées chez les chevaux atteints de MPOC entraveraient logiquement la libération de ce ou ces facteurs de relaxation. Cependant, de récentes études ont démontré qu'il n'en était rien (Löschner *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1994b) et il semblerait même que leur production soit augmentée (Yu *et al.*, 1994b).

2.2.2.2. Rôles des médiateurs de l'inflammation dans le bronchospasme

Les nombreux médiateurs libérés lors des processus inflammatoires associés à la MPOC vont interférer avec le tonus musculaire lisse des voies respiratoires. Par exemple, la PGE₂, un puissant prostanoïde anti-inflammatoire, semblerait pouvoir inhiber la contraction des muscles lisses et donc ainsi prévenir le bronchospasme (Wang *et al.*, 1992). La déficience de production de PGE₂ par la muqueuse chez les chevaux atteints de MPOC pourrait dès lors contribuer largement en l'apparition et au maintien du bronchospasme (Gray *et al.*, 1992a; Yu *et al.*, 1994b). Par contre, l'histamine qui joue un rôle prépondérant dans de nombreuses

pathologies respiratoires, n'a que peu d'effets sur la contraction des muscles lisses chez le cheval. D'autres médiateurs de l'inflammation tels que les thromboxanes et la 15-HETE semblent influencer très peu la contraction musculaire chez le cheval atteint de MPOC puisque l'utilisation d'agents anti-inflammatoires non stéroïdiens ne permet pas d'empêcher le développement de l'obstruction des voies respiratoires qui suit l'exposition à des allergènes et irritants. On ne peut pourtant pas exclure la participation possible des prostanoïdes dans la pathogenèse de la MPOC.

Comme pour d'autres pathologies inflammatoires non infectieuses, il est évident qu'il n'existe pas un médiateur unique qui soit à lui seul responsable des anomalies fonctionnelles. Il existe plutôt une interaction entre plusieurs médiateurs qui agissent sur les muscles lisses des voies respiratoires ainsi qu'au niveau des nerfs sensitifs et moteurs. Dans le cas précis de la MPOC équine, la déficience du système nerveux iNANC couplée à l'activité moindre de la PGE₂, la libération d'ACh par les nerfs parasympathiques ainsi que l'augmentation de production de médiateurs excitateurs tels que l'histamine et les leucotriènes sont autant de processus qui contribuent au bronchospasme.

2.2.3. HYPERRÉACTIVITÉ BRONCHIQUE

L'hyperréactivité bronchique est un phénomène fréquemment observé lors de pathologies respiratoires mettant en oeuvre des processus inflammatoires. Cette réaction exagérée des bronches se traduit par une tendance à induire une bronchoconstriction excessive suite à l'inhalation de stimuli spécifiques (allergènes) et non spécifiques (médiateurs de l'inflammation, irritants tels que la poussière et l'ammoniac, air froid, exercice, ...) (Boushey *et al.*, 1980; Laitinen *et al.*, 1991). Chez les chevaux atteints de MPOC, l'hyperréactivité est uniquement le fait d'une exacerbation de la maladie (Armstrong *et al.*, 1986; Robinson *et al.*, 1986; Robinson et Wilson, 1989), contrairement à ce qui est observé en médecine humaine chez les personnes asthmatiques (Derksen *et al.*, 1985a; Robinson *et al.*, 1986). En effet, en période de rémission clinique, après que les chevaux aient été maintenus en pâture loin de tout allergène, la réactivité de leurs voies respiratoires est identique à celle observée chez les chevaux sains (Derksen *et al.*, 1985c; Armstrong *et al.*, 1986; Fairbairn *et al.*, 1993). Après quelques heures de contact avec des poussières de foin, une hyperréactivité se développe parallèlement à l'apparition des signes cliniques (Fairbairn *et al.*, 1993) et de l'inflammation

des voies respiratoires (Derksen *et al.*, 1985c; Armstrong *et al.*, 1986; Fairbairn *et al.*, 1993). Cette réactivité exagérée des voies respiratoires persiste au moins 3 jours après le contact avec l'allergène (Fairbairn *et al.*, 1993) puis s'atténue de manière à disparaître dans les deux semaines qui suivent la remise en pâture (Robinson *et al.*, 1986).

Le mécanisme exact de l'hyperréactivité bronchique chez le cheval atteint de MPOC n'est pas connu. Il n'est de toute évidence pas le résultat d'une réponse cholinergique exagérée (Broadstone *et al.*, 1988), ni celui d'une déficience de la fonction β -adrénergique (Scott *et al.*, 1988). Cette sensibilité exagérée des voies respiratoires n'est pas modifiée par le blocage de la voie de la cyclo-oxygénase (Gray *et al.*, 1989). De plus, des expériences *in vitro* ont démontré que les muscles lisses des voies respiratoires de chevaux atteints de MPOC ne sont pas plus réactifs à des agonistes non spécifiques tels que l'ACh ou l'histamine (Broadstone *et al.*, 1991; LeBlanc *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1994b). Dès lors, on considère que l'hyperréactivité bronchique est le résultat d'une modification de la structure des voies respiratoires. Elle se développe parallèlement à l'apparition de neutrophiles dans les poumons et est vraisemblablement le résultat de l'inflammation pulmonaire.

Sur le plan clinique, la présence d'hyperréactivité bronchique non spécifique est importante car elle perpétue l'obstruction des voies respiratoires. Ainsi un faible taux d'irritants ou de médiateurs de l'inflammation va induire chez un sujet hyperréactif un important rétrécissement de ses voies respiratoires alors que le même individu soumis aux mêmes concentrations n'aura aucune réaction pulmonaire lorsqu'il est normoréactif.

2.3. CONSÉQUENCES DE L'INFLAMMATION ET DU BRONCHOSPASME SUR LA FONCTION PULMONAIRE

Les modifications pulmonaires qui suivent l'exposition à des allergènes et des irritants sont responsables des symptômes cliniques qui sont, suivant les individus, plus ou moins marqués. Ces symptômes sont le reflet principalement de l'obstruction des voies respiratoires et de l'altération des échanges gazeux.

2.3.1. OBSTRUCTION DES VOIES RESPIRATOIRES

Lors d'une crise aiguë, les chevaux atteints de MPOC présentent une obstruction diffuse des voies respiratoires. Cette diminution du diamètre des voies respiratoires est responsable des altérations transitoires de la fonction respiratoire. En conséquence, ces chevaux présentent une augmentation importante de la résistance pulmonaire à l'écoulement de l'air (R_L) accompagnée d'une nette diminution de la compliance dynamique des poumons (C_{dyn}) (Gillespie *et al.*, 1966; Muylle et Oyaert, 1973; Willoughby et McDonell, 1979).

L'obstruction de ces voies respiratoires est non seulement le résultat du bronchospasme mais également due à l'encombrement de leur lumière par l'hypersécrétion de mucus ainsi qu'aux modifications de leurs parois induites par l'inflammation.

L'importance relative de ces différents composants de l'obstruction est variable suivant les individus. Pour la plupart des chevaux, la composante bronchospastique est majoritaire. En effet, l'administration de bronchodilatateurs tels que l'atropine induit une diminution rapide de R_L (Murphy *et al.*, 1980; Broadstone *et al.*, 1988; McKiernan *et al.*, 1990; Derksen *et al.*, 1992; Robinson *et al.*, 1993) ce qui signe la levée du rétrécissement des voies aériennes. Cependant, la valeur de R_L obtenue suite à l'administration de bronchodilatateurs n'est pas significativement revenue à la valeur que l'on obtient pour ces chevaux en rémission clinique ou pour des individus sains (Broadstone *et al.*, 1988; Derksen *et al.*, 1992), preuve que le mucus et les processus inflammatoires contribuent aussi à l'obstruction partielle des voies respiratoires. Par contre, les bronchodilatateurs ont peu d'effets sur la valeur de la C_{dyn} , indiquant ainsi le peu d'impact qu'ils ont sur les parties périphériques des voies respiratoires.

Cette obstruction des voies respiratoires est également levée par un contrôle strict de

l'environnement. En effet, lorsqu'on place ces mêmes chevaux en pâture pendant plusieurs semaines, les valeurs de R_L et C_{dyn} reviennent à la normale et ne sont dès lors plus significativement différentes de celles mesurées pour des individus sains.

2.3.2. ALTÉRATION DES ÉCHANGES GAZEUX

Les échanges gazeux sont altérés chez les chevaux atteints de MPOC lors des crises. L'hypoxémie est vérifiée lors des épisodes de bronchoconstriction (McPherson *et al.*, 1978; Littlejohn et Bowles, 1981; Viel, 1983; Muylle *et al.*, 1986; Nuytten *et al.*, 1988). Cependant, la pression partielle en oxygène dans le sang artériel (PaO_2) n'est pas altérée en dehors des périodes de crise.

Les raisons de la chute de la PaO_2 lors d'une crise de MPOC sont multiples et peuvent tenir aux mauvais rapports ventilation/perfusion (Gillespie et Tyler, 1969), aux propriétés des parois alvéolo-capillaires (Gillespie et Tyler, 1967), ou aux caractéristiques du réseau vasculaire pulmonaire. Par rapport à des chevaux sains (Hedenstierna *et al.*, 1987), les chevaux atteints de MPOC présentent des inadéquations du rapport ventilation/perfusion (Nyman *et al.*, 1991). L'importance de ces altérations du rapport ventilation/perfusion est corrélée à la sévérité des signes cliniques.

La pression partielle en dioxyde de carbone dans le sang artériel ($PaCO_2$) illustre le rapport entre la production métabolique et la ventilation alvéolaire, c'est-à-dire la fraction de la ventilation qui participe aux échanges gazeux. Cette $PaCO_2$ n'est que rarement augmentée, même lors de crises sévères. En effet, la grande solubilité du CO_2 permet un transfert plus aisé que celui de l' O_2 à travers la paroi alvéolo-capillaire.

3. MISE EN ÉVIDENCE DE LA MALADIE ET DES TROUBLES FONCTIONNELS ASSOCIÉS

Le diagnostic précis de la MPOC et l'évaluation du handicap respiratoire qui en résulte ne sont pas faciles à poser chez des chevaux à des stades peu avancés ou subcliniques de la maladie. L'anamnèse joue parfois un rôle déterminant et rend alors possible un diagnostic de présomption que les examens complémentaires permettront d'affiner. Ceux-ci ne fournissent cependant que des renseignements sur l'état des poumons et l'importance des troubles fonctionnels. Seule l'apparition d'une crise lorsque le cheval est placé dans un environnement contenant des allergènes et des irritants (box avec foin) et la réversibilité des symptômes par administration d'un bronchodilatateur (sulfate d'atropine 0.02 mg/kg par voie intraveineuse) peut fournir un diagnostic de présomption fiable.

La détection de la maladie repose sur la mise en évidence des troubles fonctionnels qui résultent du bronchospasme et des phénomènes inflammatoires. Toute une série de moyens diagnostiques traditionnellement à la disposition des praticiens n'apportent malheureusement que des informations non spécifiques à la pathologie. Les perturbations fonctionnelles s'observent à des degrés divers selon l'état de crise. Les différents examens seront donc particulièrement utiles pour faire le suivi d'un cas en particulier et notamment pour objectiver les bénéfices d'un traitement.

Dans ce chapitre, différentes techniques sont détaillées. La liste de celles-ci n'est pas pour autant exhaustive. Il est évident que d'autres sont probablement déjà utilisées à titre de recherche dans certains laboratoires et qu'ils feront très rapidement l'objet de mises au point et de publications dans un avenir proche.

3.1. AUSCULTATION ET PERCUSSION

L'auscultation est seulement un test qualitatif, non spécifique et ne permet pas d'évaluer la sévérité de la pathologie pulmonaire présente (Kotlikoff et Gillespie, 1983). Néanmoins, particulièrement après un effort ou l'épreuve du sac, elle peut aider à détecter la présence de sécrétions dans la trachée ou d'un rétrécissement au passage de l'air.

La percussion du thorax est habituellement normale, dans les cas peu sévères. Pour les cas plus avancés, cet examen peut révéler une augmentation de l'aire pulmonaire dans sa portion caudodorsale ainsi que la présence de sons plus résonnants, suggérant une hyperinflation pulmonaire.

3.2. ENDOSCOPIE

L'examen endoscopique des voies respiratoires permet de visualiser la quantité de sécrétions présentes dans les voies respiratoires, d'évaluer la sensibilité de celles-ci et permet également d'effectuer des lavages trachéaux et broncho-alvéolaires nécessaires à l'étude de la nature des cellules.

Chez les chevaux atteints de MPOC, les voies respiratoires supérieures sont habituellement normales, même si parfois de l'exsudat remontant de la trachée peut recouvrir le pharynx. Chez la plupart des chevaux sains, le passage de la fibre optique de l'endoscope du larynx jusque dans la trachée s'effectue sans, ou presque, provoquer de toux. Chez les chevaux atteints de MPOC, l'introduction de l'endoscope dans la trachée induit très fréquemment des quintes de toux, suggérant ainsi une irritabilité exacerbée des voies respiratoires. De plus, chez la majorité de ces chevaux, une quantité variable de sécrétions est visualisée dans la trachée (MacNamara *et al.*, 1990). L'évaluation cytologique de ces sécrétions récoltées par lavage trachéal confirme qu'il s'agit le plus souvent d'un exsudat muco-purulent.

3.3. RADIOGRAPHIE

La radiographie du thorax du cheval adulte requiert un équipement généralement non disponible chez le praticien équin. Même avec le matériel le plus puissant, le détail radiographique est faible. Toutefois, lorsque l'équipement permet la réalisation d'images pulmonaires, les radiographies du thorax des chevaux atteints de MPOC révèlent parfois un élargissement du champ pulmonaire dont la radiodensité est variable. Cependant, lorsqu'une pathologie pulmonaire est induite expérimentalement chez le cheval, la preuve a été faite que les anomalies radiologiques apparaissent bien après que les lésions soient installées dans le poumon. Dès lors, les radiographies thoraciques permettent plutôt de distinguer les cas de MPOC des autres pathologies pulmonaires. Par contre, elles n'apportent qu'une aide limitée dans la détection des cas précoces ou subcliniques de MPOC.

3.4. EVALUATION DE LA CYTOLOGIE DES VOIES RESPIRATOIRES

Puisque la MPOC est une pathologie inflammatoire, l'étude des populations cellulaires au sein des poumons apporte une aide précieuse au diagnostic. Les techniques utilisées pour évaluer ces populations cellulaires doivent pouvoir échantillonner les cellules des régions bronchiolaires, zone la plus impliquée, du moins au départ, dans la maladie. La technique la plus souvent utilisée est le lavage trachéal (Beech, 1975; Whitwell et Greet, 1984). Malheureusement, chez les chevaux atteints de MPOC, la cytologie du lavage trachéal ne correspond que très peu à la population cellulaire des voies respiratoires profondes estimée par histopathologie (biopsies pulmonaires) et par lavage broncho-alvéolaire (BAL) (Viel, 1983). En effet, certains chevaux peuvent montrer une augmentation importante du nombre de neutrophiles dans le liquide récolté par lavage trachéal tout en présentant une cytologie du BAL tout à fait normale et *vice versa* (Derksen *et al.*, 1989). De plus, on observe une très grande variabilité du nombre de neutrophiles dans le lavage trachéal (de 0 à 83 %) effectué chez des chevaux sains (Larson et Busch, 1985). Celle-ci est probablement le résultat d'une stimulation des voies respiratoires par des irritants communément rencontrés dans l'environnement du cheval tels que la poussière et qui déclenchent des mécanismes non spécifiques de chimiotactisme des neutrophiles. Chez les chevaux atteints de MPOC, l'inhalation d'allergènes

initialise des réponses immunes spécifiques qui vont stimuler, entre autre, la production par les cellules résidentes, i.e. macrophages et lymphocytes, de cytokines qui vont contribuer à l'infiltration de neutrophiles dans le poumon. Le fait de mettre en évidence des neutrophiles dans le lavage trachéal n'est donc pas un critère fiable de diagnostic de la MPOC.

Par contraste, chez les chevaux sains, des stimuli non spécifiques tels que la poussière et des fragments végétaux ne provoquent pas d'augmentation de neutrophiles dans les liquides récoltés par BAL (Derksen *et al.*, 1985b). Cela s'explique probablement par la déposition de ces particules qui, de part leur taille, ne pénètrent pas profondément dans le système respiratoire.

Le BAL est une méthode relativement simple et peu coûteuse permettant de récolter les cellules et molécules des voies respiratoires profondes (Fogarty, 1990; Sweeney et Beech, 1991; Vrins *et al.*, 1991; McGorum et Dixon, 1994). Fréquemment appliqué en médecine humaine, le lavage broncho-alvéolaire a été adapté en médecine équine pour la première fois en 1980 (Viel, 1983; Derksen *et al.*, 1986) et depuis son utilisation s'est largement répandue aussi bien en recherche qu'en clinique (Lapointe *et al.*, 1994). Une neutrophilie pulmonaire caractérise tous les chevaux atteints de MPOC présentant des signes de maladie (Derksen *et al.*, 1985b; McGorum *et al.*, 1993a). Le nombre des neutrophiles dans le BAL des chevaux atteints de MPOC représente 60 % et plus des cellules nucléées (Derksen *et al.*, 1987; Naylor *et al.*, 1992), alors que chez les chevaux sains, le nombre de neutrophiles est inférieur à 5 % des cellules nucléées totales (Sweeney et Beech, 1991). Cette augmentation du nombre de neutrophiles semble bien en rapport avec la sévérité des signes cliniques (Viel, 1983; Vrins et Doucet, 1989), même s'il existe de grandes variabilités entre individus. Ainsi, une sévère dyspnée n'est pas toujours accompagnée d'une inflammation importante et *vice versa* (Grünig *et al.*, 1989; Vrins *et al.*, 1991).

La neutrophilie pulmonaire est cependant un très bon indicateur de MPOC car elle est plus sensible que l'examen clinique, que l'analyse des gaz sanguins et que les tests de fonction pulmonaire (McGorum et Dixon, 1994), d'autant plus que le profil cytologique des chevaux atteints d'affections inflammatoires pulmonaires autres que la MPOC est différent (Moore *et al.*, 1995). Le nombre total de cellules dans le BAL des chevaux présentant des signes cliniques de MPOC n'augmente pas significativement dans la majorité des cas (Derksen *et al.*, 1985a; Naylor *et al.*, 1992) car le nombre de lymphocytes et de macrophages a souvent tendance à diminuer (Derksen *et al.*, 1985a; Naylor *et al.*, 1992; McGorum et Dixon, 1993). Dans de rares cas de MPOC, parallèlement à l'augmentation du nombre de neutrophiles,

certains chevaux atteints de MPOC symptomatiques présentent une légère augmentation du nombre de mastocytes (Viel, 1983; Derksen *et al.*, 1985b; Winder et von Fellenberg, 1990), de cellules épithéliales ciliées desquamées (Viel, 1983; Deconto, 1986; Vrins et Doucet, 1989) et/ou d'éosinophiles (Viel, 1983; Derksen *et al.*, 1985b). En médecine humaine, l'élévation du pourcentage de mastocytes suggère une exposition récente à un allergène et une réponse allergique de type I (Hunninghake *et al.*, 1979).

Dans les cas chroniques de MPOC, des cellules géantes de type Langherans (Deconto, 1986; Vrins et Doucet, 1989) et des spirales de Curshmann qui représentent les bouchons de mucus délogés des petites voies respiratoires (Viel, 1983; Vrins et Doucet, 1989) sont aussi observées. Des spores sont retrouvées dans tous les liquides de lavage broncho-alvéolaire aussi bien chez des chevaux sains que atteints de MPOC sans que cela n'ait de signification clinique.

La bonne corrélation entre les résultats obtenus d'une part par le lavage broncho-alvéolaire et d'autre part par l'histopathologie (Naylor *et al.*, 1992) chez les chevaux atteints de MPOC incite à utiliser cette méthode à des fins diagnostiques.

La biopsie pulmonaire transcutanée est une technique utilisée chez le cheval depuis le début des années 80 (Raphael et Gunson, 1981). La technique est simple et relativement sûre (Naylor *et al.*, 1992). La seule complication rencontrée est l'hémoptysie mais celle-ci est rare. Ces risques de complication sont plus importants chez les chevaux en forte dyspnée ou présentant une toux persistante (Raphael et Gunson, 1981).

Les modifications histopathologiques rencontrées dans les cas de MPOC équine sont un bon indicateur de l'irréversibilité de certains symptômes ou intolérances.

3.5. TESTS DE FONCTION PULMONAIRE

L'évaluation de la fonction respiratoire à l'aide de tests pulmonaires mécaniques est essentielle à l'identification et au suivi des maladies pulmonaires chez l'homme (Cherniack, 1985). Malheureusement, plusieurs procédés, tel que le volume forcé en fin d'expiration (FEV1), requièrent la coopération du patient et ne sont donc pas réalisables chez les animaux (McPherson *et al.*, 1978).

Malgré les variations significatives des paramètres de mécanique ventilatoire observées

par différentes études sur des chevaux atteints de stades modérés ou avancés de MPOC, il a été démontré qu'aucun test ne permet d'identifier de façon certaine les cas subcliniques ou peu avancés de la maladie (Viel, 1983). Ces tests, outre leur grand intérêt en recherche, sont dès lors surtout nécessaires à l'évaluation du handicap respiratoire d'un cheval et au suivi fonctionnel (Sasse *et al.*, 1986). La compliance dynamique (C_{dyn}), représentant la mesure des résistances tissulaires et de l'élasticité du poumon (Willoughby et McDonell, 1979), constitue une valeur plus sensible que la résistance pulmonaire totale (R_L) pour l'évaluation de la fonction pulmonaire (Muylle *et al.*, 1972; Derksen *et al.*, 1985a; Klein et Deegen, 1986).

Toute méthode de mesure du débit et des volumes respiratoires chez le cheval requiert l'utilisation d'un masque qui assure un minimum de liberté de mouvement autour des naseaux (Willoughby et McDonell, 1979; Art et Lekeux, 1988). La pression, toujours négative à l'intérieur de l'espace pleural, est mesurée de manière indirecte grâce à un ballonnet à paroi mince disposé au bout d'un cathéter et introduit dans l'oesophage jusqu'au niveau thoracique moyen. Le cathéter est relié à un transducteur de pression qui permet d'enregistrer les variations de pression pleurale. L'enregistrement simultané des modifications de débit, de volume et de pression intrapleurale permet les mesures de plusieurs paramètres de mécanique respiratoire chez les chevaux non tranquillisés. La R_L est le rapport entre la chute de la pression de l'air (ΔP) lors de son passage dans les voies respiratoires et le débit de l'air ($\Delta \dot{V}$) et correspond donc à $R_L = \Delta P / \Delta \dot{V}$ (Willoughby et McDonell, 1979). Chez le cheval, comme chez la plupart des espèces, la plus grande proportion de cette perte de pression du gaz en mouvement est produite dans les cavités nasales et les grosses voies respiratoires (Robinson et Sorenson, 1978). La C_{dyn} représente à la fois la mesure de l'élasticité et celle de la résistance tissulaire du poumon (Willoughby et McDonell, 1979). A l'inspiration, une tension se crée dans les tissus pulmonaires élastiques afin de vaincre leur tendance naturelle à s'affaisser surtout lors de l'expansion du thorax. La variation de pression nécessaire pour atteindre un équilibre des forces thoraciques et pleurales est proportionnelle au volume d'air inspiré.

Lors d'une crise de MPOC, le diamètre des petites voies respiratoires diminue et la pression pleurale nécessaire pour vaincre les résistances tissulaires augmente pour un volume respiratoire donné (Muylle et Oyaert, 1973; Willoughby et McDonell, 1979). La diminution de la C_{dyn} peut être partiellement expliquée par l'augmentation de la rigidité du parenchyme pulmonaire. Néanmoins, l'asynchronisme ventilatoire dû aux obstructions partielles des petites voies respiratoires est probablement le facteur le plus impliqué dans la modification de la C_{dyn}. L'augmentation de la résistance pulmonaire totale peut être due à une accumulation excessive de

sécrétions dans la lumière des voies aériennes, à la contraction des muscles lisses, à l'inflammation de la muqueuse ainsi qu'au collapsus dynamique dû à une pression transmurale compressive (Lekeux *et al.*, 1993).

3.6. ANALYSE DES GAZ SANGUINS ARTÉRIELS

Le sang artériel est ponctionné à la base de l'encolure, dans l'artère carotide. Les éventuelles bulles d'air dans la seringue héparinée sont chassées le plus rapidement après la ponction. L'analyse se fait immédiatement après la ponction. Si ce n'est techniquement pas possible, la seringue est placée dans de la glace pilée; le délai séparant la ponction de l'analyse devant néanmoins rester le plus court possible.

L'analyseur des gaz sanguins donne des valeurs corrigées pour la température corporelle, de pression partielle en oxygène (PaO_2) et en dioxyde de carbone (PaCO_2) dans le sang, en plus du pH sanguin et de la concentration en bicarbonates.

Cette technique permet de mettre en évidence d'éventuelles anomalies des gaz dans le sang artériel qui refléteraient les altérations des échanges gazeux. Différents mécanismes peuvent déterminer ces anomalies des gaz dans le sang artériel : hypoventilation alvéolaire, altération de la diffusion capillaire de l'oxygène et inégalités des rapports ventilation/perfusion.

3.7. TESTS PERMETTANT DE METTRE EN ÉVIDENCE LA RÉACTION ALLERGIQUE

Excepté pour les chevaux qui répondent clairement à une exposition aux allergènes, la détection de l'origine allergique de la MPOC peut être difficile. Les tests cutanés, les tests de provocation bronchique ainsi que la sérologie peuvent être utilisés pour aider au diagnostic mais ils fournissent, selon les auteurs, des résultats controversés (Eyre, 1972; Mansmann *et al.*, 1975; Halliwell *et al.*, 1979; Lawson *et al.*, 1979; McPherson *et al.*, 1979; Asmundsson *et al.*, 1983; Madelin *et al.*, 1991).

Les tests cutanés sont largement utilisés en médecine humaine afin de mettre en évidence les allergènes responsables des sensibilités. Chez les chevaux, les corrélations entre les

résultats de ces tests et les signes cliniques sont très variables. L'intérêt de ces tests est donc remis en cause (Eyre, 1972; Halliwell *et al.*, 1979; Evans *et al.*, 1992; McGorum *et al.*, 1993d). Certaines des variations observées peuvent refléter la variabilité de l'antigène, la variabilité de chaque cheval face à la pathologie, la limite de déclenchement de l'allergie, ainsi que la variabilité de la technique et de son interprétation.

Les tests cutanés sont faciles à réaliser et habituellement bien tolérés. La partie médiane de l'encolure est rasée et les sites d'injection, séparés de 3 cm environ chacun, sont préalablement signalés par un marqueur foncé. Chaque allergène (0.1 ml) est injecté par voie intradermique. Un contrôle positif d'histamine (1:1000) ainsi qu'un contrôle négatif d'une solution saline permettent la comparaison entre les injections. Les sites sont examinés 20 à 30 minutes, 3 à 4 heures puis 24 heures après les injections. Des réactions faussement positives peuvent apparaître suite à une irritation non spécifique ou à des contaminants dans la solution. Par ailleurs, des réactions faussement négatives peuvent être causées par une dilution excessive des antigènes, par les thérapeutiques antérieures, ou par la qualité des extraits allergéniques. Ce dernier point est l'écueil principal de l'allergologie vétérinaire.

La recherche des anticorps spécifiques est un test sérologique largement utilisé en médecine humaine afin de déterminer les allergènes responsables de pathologies respiratoires allergiques telles que la "maladie du poumon de fermier" (Burrell et Rylander, 1981). Bien que les anticorps précipitants dirigés contre *Faenia rectivirgula* (*Micropolyspora faeni*) et *Aspergillus fumigatus* soient plus fréquemment rencontrés chez les chevaux atteints de MPOC, un certain pourcentage de chevaux sains en est également porteurs. Cependant, il apparaît que certains chevaux présentant une nette aggravation clinique suite à l'inhalation d'allergènes sont dépourvus d'anticorps spécifiques (Lawson *et al.*, 1979). La présence d'anticorps spécifiques ne signe donc pas obligatoirement la maladie et peut n'être que la traduction du contact, d'où de faux positifs (chez des sujets indemnes, mais exposés) ou de faux négatifs (lorsque l'antigène testé n'est pas le ou l'un des responsable(s) de l'affection, par exemple). Néanmoins, dans le BAL de chevaux atteints de MPOC, les anticorps IgE et IgA spécifiques à *Faenia rectivirgula* (*Micropolyspora faeni*) et à *Thermoactinomyces vulgaris* sont significativement plus nombreux et cela aussi bien chez les individus symptomatiques que chez les asymptomatiques (Halliwell *et al.*, 1993).

En médecine humaine, la démonstration d'une bronchoconstriction réversible induite par un test d'inhalation contribue fortement au diagnostic de l'asthme chez les patients en phase asymptomatique. Le principe des tests de provocation bronchique spécifique repose sur le fait

que les chevaux atteints de MPOC présentent une hyperréactivité respiratoire à des allergènes spécifiques comme le foin poussiéreux ou certains actinomycètes et champignons (Halliwell *et al.*, 1979; McPherson *et al.*, 1979; Mirbahar *et al.*, 1985; Derksen *et al.*, 1988) ou à des substances non-spécifiques telles que l'histamine, la méthacholine et l'acide citrique (Derksen *et al.*, 1985a; Armstrong *et al.*, 1986; Klein et Deegen, 1986; Doucet *et al.*, 1991). Les plus grands obstacles à la technique de bronchoprovocation comme élément de diagnostic chez l'homme comme chez les animaux, demeurent la standardisation des doses, les méthodes choisies pour l'interprétation des résultats et l'établissement des spécificités et sensibilités précises pour chaque agent.

En déplaçant les chevaux suspects de MPOC d'un environnement où les poussières et le foin sont absents vers une écurie qui en est riche, on pratique de manière moins spécifique un test de provocation par inhalation. Les chevaux atteints de MPOC vont alors déclencher une crise en quelques heures à quelques jours (McGorum *et al.*, 1993b).

3.8. SCINTIGRAPHIE PULMONAIRE

La scintigraphie pulmonaire est une technique d'imagerie médicale largement employée en médecine humaine. Contrairement aux autres techniques d'imagerie, la scintigraphie explore les caractéristiques fonctionnelles et métaboliques d'un organe ou d'un système plutôt que leur morphologie. Comparée aux autres techniques d'investigations fonctionnelles, la scintigraphie fournit une évaluation régionale de la fonction plutôt qu'une mesure globale. En médecine équine, les méthodes pour réaliser (Devous *et al.*, 1980; Theodorakis *et al.*, 1983; Attenburrow *et al.*, 1991; O'Callaghan, 1991), et récemment, analyser (Votion *et al.*, 1997a) les images scintigraphiques ont été décrites. Le principe est d'obtenir une image fonctionnelle d'un organe en administrant une substance radioactive qui se distribue à l'organe ou au système à étudier. La radioactivité émise par le traceur (rayons gamma) est enregistrée par une caméra, appelée gamma-caméra, qui connectée à un système informatique permet d'obtenir une image de la distribution du radio-traceur au sein du système.

Les deux applications principales de la scintigraphie dans le cadre de l'évaluation de la fonction respiratoire du cheval sont l'étude du rapport ventilation/perfusion (\dot{V}/\dot{Q}) et l'étude de la clairance alvéolaire.

La scintigraphie permet de s'assurer que la ventilation (\dot{V}) et la perfusion (\dot{Q})

pulmonaire sont harmonieusement associées. Cette adéquation entre \dot{V} et \dot{Q} est primordiale pour assurer l'efficacité des échanges gazeux. Il est en effet reconnu que la majorité des hypoxémies résulte d'une inadéquation entre la distribution de la \dot{V} et de la \dot{Q} (West, 1977). Afin de visualiser la \dot{V} pulmonaire, le cheval inhale un aérosol radioactif qui se répartit au sein des alvéoles en mimant la distribution de la \dot{V} pulmonaire. La \dot{Q} pulmonaire peut être étudiée en administrant, par voie intraveineuse, des macro-agrégats d'albumine humaine marqués radioactivement. Ces particules ayant un diamètre supérieur au diamètre des capillaires pulmonaires ($> 10 \mu\text{m}$), sont totalement bloquées au niveau du lit vasculaire selon une distribution proportionnelle au flux sanguin régional. Cette "embolisation" n'a aucune conséquence fonctionnelle pour l'animal (Gold et McCormack, 1966) car le nombre de capillaires embolisés est dérisoire en regard au nombre de vaisseaux pulmonaires.

Chez le cheval sain, la distribution de la \dot{V} et de la \dot{Q} est étroitement associée et le rapport entre ces paramètres est égal à 1 au niveau de chaque unité fonctionnelle du poumon (Amis *et al.*, 1984). Toute pathologie se traduisant par un phénomène obstructif va empêcher la pénétration de l'aérosol radioactif au niveau du parenchyme pulmonaire et, par conséquent, va modifier le rapport \dot{V}/\dot{Q} (Votion *et al.*, 1997b). De même, tout défaut ou altération de la \dot{Q} peut être imagé par la technique scintigraphique. L'évolution de la pathologie ainsi que l'efficacité d'un traitement peut être suivie et quantifiée par cette méthode d'analyse (Votion *et al.*, 1997a).

L'autre application de la scintigraphie pulmonaire est l'évaluation de l'intégrité de l'épithélium alvéolaire en étudiant la clairance alvéolaire. Le principe est de mesurer le transfert vers le compartiment sanguin d'un aérosol radioactif submicronique déposé dans le compartiment alvéolaire par nébulisation. L'aérosol diffuse passivement au niveau des jonctions intercellulaires de la paroi alvéolo-capillaire. Les jonctions des cellules de l'endothélium vasculaire étant plus perméables que celles de l'épithélium alvéolaire, celui-ci constitue le facteur limitant au transfert de l'aérosol radioactif (Effros *et al.*, 1985). Chez un cheval sain, la demi-vie de l'aérosol au sein du poumon est de l'ordre de 35 minutes (Votion *et al.*, 1997c). Lors d'une crise aiguë de MPOC, les phénomènes inflammatoires altèrent les jonctions intercellulaires de l'épithélium alvéolaire ce qui induit une augmentation de la vitesse de clairance (15 minutes) (Votion *et al.*, 1997d).

Ces deux applications semblent particulièrement intéressantes pour fournir de nouvelles informations quant aux modifications et altérations fonctionnelles qui affectent les chevaux atteints de MPOC lors d'une crise.

3.9. RINÇAGE DE L'AZOTE ALVÉOLAIRE EN RESPIRATIONS MULTIPLES ET AUTRES TECHNIQUES PERMETTANT L'ÉTUDE DE LA VENTILATION

L'étude de la distribution de la ventilation est importante pour quantifier les anomalies de la ventilation associées aux pathologies pulmonaires. En utilisant des gaz insolubles, on peut obtenir des informations quant à la distribution des gaz. Différentes méthodes existent qui permettent cette étude soit de façon indirecte, en étudiant la dynamique de ces traceurs exhalés, soit de façon directe, par la visualisation, via des images scintigraphiques, de la distribution d'un traceur radioactif.

Cette méthode directe est largement appliquée en médecine humaine afin d'étudier la distribution régionale de la \dot{V} en utilisant différents gaz radioactifs dont les plus couramment employés sont l'azote (^{13}N) (Rosenzweig *et al.*, 1969), le xénon (^{133}Xe) (Ball *et al.*, 1962) et le krypton ($^{81\text{m}}\text{Kr}$) (Fazio et Jones, 1975). De part ses qualités physiques, le $^{81\text{m}}\text{Kr}$ est le traceur le plus approprié pour étudier la \dot{V} . La demi-vie du $^{81\text{m}}\text{Kr}$ étant extrêmement courte (13 sec), une image scintigraphique enregistrée à la suite de l'inhalation continue de ce gaz représente l'arrivée de celui-ci dans le compartiment alvéolaire puisque la radioactivité s'éteint avant de s'équilibrer avec le volume alvéolaire (V_A). Amis *et al.* (1984) utilisèrent le $^{81\text{m}}\text{Kr}$ en infusion trachéale pour déterminer la distribution de la \dot{V} chez le cheval sain. De cette étude, il résulte que la \dot{V} par unité de volume alvéolaire (\dot{V}/V_A) se distribue selon un gradient vertical tel que les régions ventrales sont mieux ventilées que les régions dorsales. En outre, à l'aide d'une infusion intraveineuse de $^{81\text{m}}\text{Kr}$ qui permet de visualiser la distribution de la \dot{Q} (Ciofetta *et al.*, 1978), Amis *et al.* (1984) mirent en évidence l'adéquation entre la \dot{V} et la \dot{Q} : chez le cheval sain, \dot{V} et \dot{Q} sont étroitement associés et le rapport \dot{V}/\dot{Q} est uniformément distribué selon l'axe vertical. La présence d'un gradient de \dot{V} et de \dot{Q} est décrite chez l'homme mais chez celui-ci, ils résultent en un gradient de \dot{V}/\dot{Q} tel que la région dorsale du poumon présente un rapport \dot{V}/\dot{Q} plus élevé que la région ventrale (Harf *et al.*, 1978).

Le rinçage de l'azote alvéolaire est une technique qui permet quant à elle l'étude, de façon indirecte, de la distribution de la ventilation. Cette technique non invasive est basée sur la mesure de l'élimination de l'azote alvéolaire au cours de plusieurs respirations tidales. Pour ce faire, le sujet est connecté à une source gazeuse dépourvue d'azote et à un système performant de mesure des gaz expirés et des débits.

De nombreux troubles de la ventilation sont à envisager chez les sujets atteints de maladie respiratoire profonde. C'est pourquoi, très tôt, des expériences mettant en application le savoir-faire appliqué en médecine humaine ont été pratiquées chez les chevaux sains (Spörri et Denac, 1970) et atteints de MPOC (Muylle *et al.*, 1972; Gallivan *et al.*, 1990). Cependant, la technique utilisée ne renseignait que sur la distribution spatiale de la ventilation et présentait de nombreux désavantages techniques. La première difficulté rencontrée par les expérimentateurs étaient qu'ils ne parvenaient pas à obtenir des chevaux non tranquilisés une respiration stable et régulière quant au volume tidal et au débit. Cet obstacle provenait du fait qu'ils utilisaient tous de l'oxygène pur comme gaz dépourvu d'azote. Or, l'oxygène pur déprime considérablement la respiration. Cependant, une respiration régulière au cours de l'expérience est une condition indispensable à l'utilisation de ce type d'analyse pour étudier la distribution aussi bien spatiale que temporelle de la ventilation. La technique et ses intérêts seront détaillés plus loin dans le chapitre 2.3.

Outre la distribution de la ventilation, l'étude des volumes pulmonaires peut apporter de précieux renseignements. Ainsi, la capacité résiduelle fonctionnelle est souvent mesurée car elle est un bon indicateur du volume des gaz restant dans les poumons après une respiration normale. On ne peut mesurer cette capacité qu'indirectement. La méthode du rinçage de l'azote par respirations multiples et la pléthysmographie corporelle permettent cette mesure. Cependant, chez des grands animaux comme les chevaux, la pléthysmographie est très difficilement envisageable sur individus conscients. Et pourtant, dans les situations pathologiques, cette méthode serait la seule à fournir des résultats fiables. En effet, les méthodes utilisant les techniques de dilution gazeuse ne peuvent prendre en mesure que les parties ventilées du poumon, ce qui, en cas de pathologies, peut représenter une erreur de mesure importante.

4. PRÉVENTION DE L'EXACERBATION DE LA MALADIE PAR GESTION DE L'ENVIRONNEMENT

L'air ambiant contient une grande variété de polluants et de contaminants. Ceux-ci peuvent être à l'origine de pathologies plus ou moins graves, quand rien ne s'oppose à leur présence et leur prolifération.

Le poumon est l'organe, avec la peau, le plus soumis aux agressions du milieu extérieur, et ce, de façon quotidienne et ininterrompue. A ce titre, il est certainement l'un des plus protégés contre celles-ci. Le rôle du poumon est non seulement de se protéger mais, en tant que lieu d'échange avec l'organisme, de protéger le corps contre ces agressions extérieures.

La qualité de l'air dépend de la nature de ses contaminants et de leur quantité. En ce qui concerne les animaux et les personnes qui s'en occupent quotidiennement, la situation est cruciale lorsqu'ils sont confinés dans des locaux. En effet, d'une manière générale, les concentrations des aérocontaminants sont plus importantes dans les bâtiments où sont logés des animaux que dans les bâtiments industriels et résidentiels. Dans les bâtiments d'élevage, la principale source de bioaérosols sont les animaux eux-mêmes par le biais de leurs sécrétions et excréments, de leur nourriture et leur litière (Wathes, 1995). La nature et la concentration des particules dans l'air résultent d'un perpétuel équilibre entre les sources elles-mêmes d'une part et les processus d'élimination que sont la ventilation, la sédimentation et l'impaction d'autre part.

Les aérosols dans les locaux où vivent des animaux sont de nature complexe et comprennent des contaminants de nature organique (virus, bactéries, champignons), inorganique (particules de poussières) ainsi que des gaz (ammoniac, SO₂, ...). A l'exception de rares cas de lésions pulmonaires dues à des substances transportées par voie sanguine et issues de l'absorption par la voie digestive (i.e. herbicides, 3 méthyl-indol) ou à partir de l'inhalation directe de certains liquides (erreur de lieu), les polluants atteignent le poumon par les voies respiratoires sous la forme d'un aérosol de composition variable (Lawson *et al.*, 1979; Woods *et al.*, 1993).

Dans les écuries, ce sont les spores de champignons et d'actinomycètes ainsi que des

fragments de végétaux qui représentent la majorité des particules en suspension dans l'air. Le foin et la litière sont les sources principales de ces spores retrouvées dans les ambiances d'écurie (Clarke et Madelin, 1987).

Les interrelations qui existent entre la concentration en poussière et en allergènes dans les écuries et les pathologies respiratoires sont étudiées depuis plusieurs années. Il s'avère que de fortes concentrations en poussière augmentent la sévérité (Clarke *et al.*, 1987) et la durée (Burrell, 1985) de l'inflammation subclinique du tractus respiratoire inférieur, syndrome associé aux pauvres performances sportives.

Le contrôle de l'environnement et de la qualité de l'air inhalé est encore plus crucial pour les chevaux souffrant de MPOC. En effet, l'apparition des signes cliniques est associée à l'inhalation d'allergènes et d'irritants communément rencontrés dans les écuries. Pour ces chevaux, il est donc essentiel de réduire au maximum ces concentrations, en particulier dans les endroits confinés. Beaucoup d'études se sont employées à étudier les concentrations en poussière et/ou en allergènes dans les écuries (Crichlow *et al.*, 1980; Clarke *et al.*, 1987; Dunlea et Dodd, 1994; Raymond *et al.*, 1994; 1997). Cependant, ce n'est que récemment (Woods *et al.*, 1993) qu'une étude a démontré que la concentration de poussière et d'allergènes inhalés n'était pas proportionnelle à la concentration globale au centre du box. Dès lors, il est primordial de considérer les risques imputables aux sources de poussière et d'allergènes qui sont en contact direct avec la région de la tête du cheval, à savoir les fourrages et litières.

La gestion de l'écurie influence beaucoup les taux d'irritants et d'allergènes dans l'air ambiant. Ainsi, il a été démontré que, lors du changement de litière, les taux de poussière peuvent être multipliés par 50 en comparaison aux périodes calmes de la journée (Clarke et Madelin, 1987). Le choix d'une litière accumulée augmente de beaucoup le taux d'ammoniac dans l'air. Le confinement en périodes hivernales pour éviter les pertes de chaleur est une source de contamination de l'air dans les écuries, et donc source de troubles potentiels.

Il n'existe que deux moyens de diminuer la quantité d'irritants et d'allergènes dans l'air ambiant (Clarke, 1987a) : (1) augmenter le taux d'élimination (principalement par la ventilation), et (2) réduire le taux de libération et de production d'irritants et d'aérocontaminants.

En ce qui concerne les allergènes, à savoir les spores d'actinomycètes et de champignons, leur faible poids et taille ne permet pas une bonne élimination par la ventilation ou par la sédimentation (Clarke, 1987b), qui représentent les deux méthodes d'élimination les plus importantes. La seule solution pour réduire leur présence dans l'air ambiant est donc de

limiter leur libération. Les principales sources, aussi bien de poussières que d'allergènes, étant les fourrages et la litière (Woods *et al.*, 1993), il est donc indispensable d'utiliser des méthodes alternatives satisfaisantes aussi bien sur le plan nutritionnel que fonctionnel.

Ainsi depuis quelques années des substituts au foin tels que des pellets d'aliments concentrés, des pellets de luzerne ou du foin détrempe ont été préconisés. De même, le remplacement de la paille par des copeaux de bois, du papier ou des bandes de plastique a également été largement proposé ces dernières années. Bien que du point de vue du confort de l'animal, la substitution de la paille ne semble pas du tout perturber les chevaux (Thompson, 1995), il n'en est pas de même pour le remplacement du foin. D'une part, les pellets ne sont pas appréciés de façon unanime par les chevaux, certains d'entre eux les refusant catégoriquement. D'autre part, le détrempage du foin n'apporte pas en pratique de solution satisfaisante (Dixon *et al.*, 1995b), et ce très probablement parce que les propriétaires ne respectent pas les logiques de cette contrainte et détrempent ou stockent le foin devant le box du cheval, perdant là tout bénéfice.

Bien que de nombreuses études ont démontré l'intérêt du contrôle de l'environnement afin de maintenir des chevaux atteints de MPOC en état de rémission clinique (Eyre, 1972; Cook, 1976; McGorum *et al.*, 1993a), ce contrôle est très difficile à faire accepter par les propriétaires et à instituer en pratique (Dixon *et al.*, 1995a). Dans cette optique, l'utilisation d'ensilage d'herbe préfanée et de copeaux de bois est régulièrement préconisée depuis quelques années (Clarcke, 1987; Dixon *et al.*, 1995b). Cette association a pour avantage de respecter au mieux le bien-être du cheval ainsi que ses besoins alimentaires, tout en limitant les frais du propriétaire.

Ce contrôle de l'environnement est d'autant plus important à instituer qu'un traitement médicamenteux n'a d'effets durables que lorsqu'il est accompagné de mesures strictes visant à réduire la charge en irritants et en allergènes dans le milieu ambiant (Pearson et Riebold, 1989; Derksen *et al.*, 1991; Traub-Dargatz *et al.*, 1992).

5. Caractéristiques et identification des allergènes incriminés dans la maladie pulmonaire obstructive chronique équine

Les allergènes incriminés dans la réaction allergique des chevaux atteints de MPOC ont fait l'objet de nombreuses études, non pas dans le cadre de la pathologie équine mais de par leur implication majeure, en médecine humaine, dans l'initiation des réactions respiratoires et systémiques chez les personnes atteintes de la maladie du poumon de fermier (Pepys *et al.*, 1963; Cross, 1968). Cette pathologie consiste en une alvéolite allergique extrinsèque liée, comme la MPOC, à l'inhalation de particules organiques d'origine végétale. Reconnue comme étant une maladie professionnelle, sa fréquence est extrêmement variable suivant les régions (Staines et Forman, 1961; Grant *et al.*, 1972). Tout comme la MPOC, les formes aiguës ou subaiguës s'améliorent souvent simplement grâce à l'éviction antigénique, complétée, si nécessaire, de corticothérapie. L'étiologie précise de cette affection a été mise en évidence grâce aux études de Pepys *et al.* (1962) au début des années 60, par la détection de précipitines dirigées contre des extraits de foin moisi dans le sérum de patients atteints de cette maladie professionnelle. Des études similaires ont permis de démontrer l'implication de ces mêmes allergènes dans l'étiologie de la MPOC équine (Halliwell *et al.*, 1979; Lawson *et al.*, 1979; McPherson *et al.*, 1979; Asmundsson *et al.*, 1983).

Ces allergènes, et plus particulièrement leur développement, ont largement intéressé les microbiologistes et médecins dont le principal but était d'évaluer les meilleurs moyens de prévention de leur apparition au sein des fourrages et litières. Les résultats obtenus sont précieux pour l'amélioration de la gestion de l'environnement du cheval.

5.1. MODIFICATIONS SUBIES PAR LES FOURRAGES ET LITIÈRES AU COURS DU STOCKAGE

La matière végétale fraîchement coupée est chargée de micro-organismes qui proviennent soit du sol, de l'air ou qui se sont développés en colonies épiphytiques ou saprophytiques sur la plante elle-même (Lacey, 1974). Leur développement ultérieur dépendra uniquement des conditions de stockage, de la nature propre à chaque espèce microbienne présente et de la

disponibilité en éléments nutritifs dans ce substrat (Gregory et Lacey, 1963; Gregory *et al.*, 1963; 1964; Festenstein *et al.*, 1965).

Traditionnellement, les foins sont rangés en trois catégories, sur base du type d'espèces de micro-organismes retrouvés et sur leur abondance. Cette classification est valable pour la paille, pour laquelle il a été démontré que la nature de la microflore était similaire à celle du foin (Lacey, 1974) :

1) les "bons foins" contiennent peu de spores de micro-organismes et ont un pH situé entre 4.5 et 6.5. Les bactéries et les actinomycètes y sont peu représentés. Les champignons mésophiles, déjà communs au moment de la récolte, tels que *Cladosporium* sont présents en grande quantité;

2) les foins moisissés ont un pH de 5.0 à 7.0 et comptent un nombre plus important de spores. Bien que les micro-organismes mésophiles soient encore prédominants, d'autres tels qu'*Aspergillus glaucus* et certains *Streptomyces* sont également abondants;

3) les foins très moisissés quant à eux ont un pH plus élevé, variant entre 6.8 et 7.6. Ils contiennent évidemment un très grand nombre de spores, jusqu'à 1000 millions par gramme de matière sèche, dont la majorité sont des spores d'actinomycètes et de bactéries. Les micro-organismes thermotolérants et thermophiles prédominent, indiquant bien que le ballot a subi une augmentation de la température en son sein.

Ces principales transformations, à savoir les modifications de pH et du nombre de micro-organismes, sont principalement dues à des modifications chimiques dont l'intensité semble directement liée à la température au sein du ballot (Coblentz *et al.*, 1996).

En effet, dès la mise en ballot, on observe une augmentation de la température du substrat dont l'intensité est fonction de sa teneur en eau lors de la mise en ballot (Festenstein, 1966; Coblentz *et al.*, 1996). Plusieurs événements conduisent à cet échauffement du fourrage ou de la litière. Deux étapes y contribuent plus franchement. Néanmoins, la séquence des événements est difficile à déterminer (Gregory *et al.*, 1963). Tout commence néanmoins par le démarrage de l'activité enzymatique de la plante elle-même. Cette activité cessera aux environs de 40° C et est responsable des premières modifications biochimiques subies par le substrat (Gregory *et al.*, 1963). Ainsi, on constate notamment une augmentation de l'azote soluble due à l'activité protéolytique (Kemble et MacPherson, 1954; Festenstein, 1966) ainsi qu'une perte en sucres, principalement des hydrates de carbone solubles tels que le glucose et le sucrose (Festenstein, 1966). Cette activité enzymatique est non seulement limitée par la température

mais également par la teneur en humidité. Si le substrat est relativement pauvre en eau, cette dégradation prendra fin d'elle-même et la température au sein du ballot cessera donc de monter. La seconde étape est le résultat de l'activité des micro-organismes, principalement des espèces mésophiles et thermophiles (Corbaz *et al.*, 1963; Gregory *et al.*, 1963; Festenstein, 1966). La chaleur initiale et la présence d'humidité favorisent leur développement et leur activité. Leur croissance nécessite des hydrates de carbone solubles, de l'azote et de l'eau (Festenstein, 1966). Il en résulte alors une élévation de température, une diminution de la valeur nutritive du fourrage et une augmentation du pH. Plus la température s'élève, plus les micro-organismes thermophiles trouveront des conditions favorables à leur développement. On obtient ainsi des foins moisissés, remplis de champignons et de bactéries ayant produit un grand nombre de spores.

Il est évident que le stockage conduit à une diminution de la qualité des fourrages et litières (Hintz, 1995; Coblenz *et al.*, 1996). Néanmoins cette dégradation est directement proportionnelle à la teneur initiale en eau du substrat lors de sa mise en ballot. Dans le cas précis de la MPOC, il est évident que la multiplication des trois principaux micro-organismes impliqués dans le phénomène allergique est dépendante de la température et que l'élévation de celle-ci est fonction de la teneur initiale en humidité du substrat.

5.2. MÉTHODES D'IDENTIFICATION ET CARACTÉRISTIQUES DE CULTURE DES TROIS PRINCIPAUX ALLERGÈNES INCRIMINÉS DANS LA MALADIE PULMONAIRE OBSTRUCTIVE CHRONIQUE ÉQUINE

Un simple examen microscopique basé sur la morphologie n'est pas suffisant pour différencier et identifier les spores contenues dans la poussière d'écurie (Lacey, 1974). L'identification précise des spores requiert des méthodes de culture et des analyses biochimiques spécifiques (Lacey, 1974).

5.2.1. Identification de *Faenia rectivirgula* et *Thermoactinomyces vulgaris*

Les spores de ces deux actinomycètes sont les principaux allergènes incriminés dans la MPOC. Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses, septées et ramifiées. La plupart d'entre elles sont ubiquistes dans la nature.

Les actinomycètes ont souvent été confondus avec les champignons, du fait de l'aspect mycosique de certaines pathologies qu'elles provoquent et aussi de leur morphologie fongicoïde : filaments ramifiés, organes de sporulations, ... Leurs propriétés chimiques, physiologiques et immunologiques les rangent parmi les procaryotes. Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine; leur cytologie est celle des bactéries. Ajoutés à d'autres caractères tels que l'existence d'espèces anaérobies strictes, leur sensibilité à des actinophages et à des antibiotiques antibactériens, ces propriétés justifient le classement des actinomycètes parmi les bactéries.

Les actinomycètes sont difficiles à identifier. Globalement, quatre critères, morphologiques et chimiques, sont utilisés :

1. la couleur de leurs mycélium aériens : sept couleurs sont considérées (blanc, jaune, vert, gris, rouge, violet et bleu) (Tresner et Backus, 1963);
2. la morphologie des sporophores : les chaînes formées par les spores peuvent être flexibles, en boucles ou courbées, en spirales, ou linéaires;
3. l'aspect de la surface des spores : la microscopie électronique permet d'observer si la spore a un aspect lisse, hérissé, poilu ou verruqueux;
4. leurs propriétés biochimiques.

Sur base de ces différents points, des schémas d'identification des actinomycètes thermophiles ont été étudiés et mis au point afin de faciliter leurs identification et comptage (Kurup et Fink, 1975) (Table 1.1.). Des milieux sélectifs sont utilisés afin d'optimiser la croissance et l'identification tout en évitant les contaminations par d'autres micro-organismes. De même, la température d'incubation doit être sélective. Les deux actinomycètes incriminés sont thermophiles; ils supportent donc des températures élevées et même, se développent mieux à des températures avoisinant les 60° C.

Table 1.1. - Caractéristiques et propriétés des colonies de *Thermoactinomyces vulgaris* et de *Faenia rectivirgula* (selon Kurup et Fink, 1975)

Micro-organismes		
Propriétés et caractéristiques	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	<i>Faenia rectivirgula</i>
Couleur de la colonie	blanc	jaune
Spores	simples	en chaîne
Hyphes aériennes	+	-
Hydrolyse de :		
caséine	+	-
hypoxanthine	+	+
amidon	+	-
esculine	-	+

Sur agar et à 55° C, les colonies de *Thermoactinomyces vulgaris* se développent rapidement et sont blanches (Cross, 1968; Kurup et Fink, 1975). Les hyphes qui se développent dans le substrat (0.6 à 0.8 µm de diamètre) sont branchées. Les spores sont simples et disposées le long de ces hyphes (Fig. 1.4.). La face inférieure de la colonie varie du blanc au brun. Les hyphes aériennes sont de 1 µm de diamètre et sont habituellement blanches. Le développement se produit entre 35 et 65° C mais est optimum entre 55 et 60° C.

T. vulgaris est le seul à hydrolyser à la fois la tyrosine et l'hypoxanthine (Kurup et Fink, 1975) et est parmi les seuls actinomycètes à résister à la novobiocine (Cross, 1968).

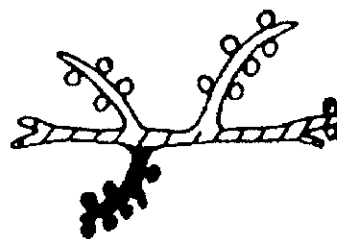


Fig. 1.4. - Aspect microscopique de *Thermoactinomyces vulgaris*. Les hyphes se développant dans le substrat sont représentées en noir.

Les colonies de *Faeni rectivirgula* sont lentes à se développer, petites et de couleur jaune-orangée avec parfois des mycélium de surface blancs (Lacey, 1974). Les hyphes se développant dans le substrat (0.5 - 0.8 μm de diamètre) sont branchées et pénètrent dans l'agar formant ainsi une colonie compacte jaune-orange à jaune-brun. De courtes chaînes de spores se forment dans et à la surface de l'agar (Lacey, 1974). Les hyphes aériennes (environ 1 μm de diamètre) sont habituellement courtes et les chaînes de spores se forment latéralement donnant ainsi un aspect hérissé (Fig. 1.5.). Ces chaînes sont formées de 3 à 10 spores, rondes à ovales et de 0.7 à 1.3 μm de diamètre (Corbaz *et al.*, 1963). Le développement se fait entre 37 et 60° C mais est optimal entre 40 et 55° C.

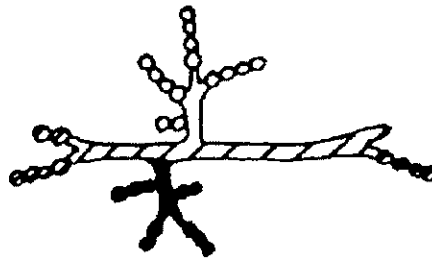


Fig. 1.5. - Aspect microscopique de *Faenia rectivirgula*. Les hyphes se développant dans le substrat sont représentées en noir.

5.2.2. Identification d'*Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus est un champignon. Au même titre que tous les autres champignons ou fungi, il est dépourvu de pigments chlorophylliens, se nourrit par absorption et se reproduit par des spores.

Son appareil végétatif, ou thalle, est filamenteux et porte le nom de mycélium. Dans le langage usuel, ces champignons sont souvent appelés moisissures en opposition aux levures dont les thalles sont réduits à de petits éléments ovoïdes. A l'examen microscopique, ce champignon est facilement reconnaissable par ses têtes aspergillaires qui sont des renflements en vésicule au sommet des mycélium (Fig. 1.6.). Cette tête aspergillaire est partiellement couverte de phialides qui produisent des conidies (spores) en chaîne. Ces conidies dont le diamètre est de 2 à 3.5 μm sont les éléments allergéniques du champignon (Scholer, 1974b).

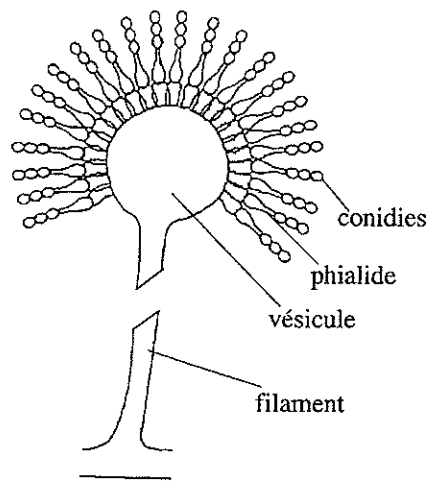


Fig. 1.6. - Représentation d'une tête aspergillaire d'*Aspergillus fumigatus*.

Les colonies d'*Aspergillus fumigatus* se développent préférentiellement entre 44 et 54° C, avec une croissance maximale obtenue entre 50 et 52° C (Scholer, 1974a). Les autres types d'*Aspergillus* ne se développent pas à des températures aussi élevées. *Aspergillus fumigatus* est donc considéré comme une espèce mésophile thermotolérante (Cooney et Emerson, 1964). *Aspergillus fumigatus* est un champignon ubiquiste que l'on retrouve sur le sol, dans les fourrages et litières moisies, ... Les colonies se développent rapidement, en gazon blanc puis vert ou gris bleuâtre. Elles se recouvrent finalement d'un enduit brun sombre.

RÉFÉRENCES

- ALLEN G.P., BRYANS J.T. Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of Equine Herpes Virus-1 infection. *Prog. vet. Microbiol. Immun.*, 1986, **2**, 78-144.
- AMIS T.C., PASCOE J.R., HORNOF W. Topographical distribution of pulmonary ventilation and perfusion in the horse. *Am. J. Vet. Res.*, 1984, **45**, 1597-1601.
- ARMSTRONG P.J., DERKSEN F.J., SLOCOMBE R.F., ROBINSON N.E. Airway responses to aerosolized methacholine and citric acid in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1986, **133**, 357-361.
- ART T., LEKEUX P. Respiratory airflow patterns in ponies at rest and during exercise. *Can. J. Vet. Res.*, 1988, **52**, 299-303.
- ASMUNDSSON T., GUNNARSSON E., JOHANNESSEN T. "Haysickness" in Icelandic horses : Precipitin tests and other studies. *Equine vet. J.*, 1983, **15**, 229-232.
- ATTENBURROW D.P., PORTEGILL M.J., VENNART W. Development of an equine nuclear medicine facility for gamma camera imaging. *Equine vet. J.*, 1991, **21**, 86-90.
- BALL C.W.JR., STEWART P.B., NEWSHAM L.G., BATES D.V. Regional pulmonary function studied with Xenon 133. *J. Clin. Invest.*, 1962, **41**, 519-531.
- BARNES P.J. Neural control of airway smooth muscle. In : *The Lung : Scientific Foundations*, Crystal R.G., West J.B. *et al.* (Eds), New York : Raven Press, Ltd., 1991, p. 903-916.
- BARTA O., BARTA V.-D. Réactions d'hypersensibilité. In : *Immunologie Animale*, Pastoret P.-P., Govaerts A., Bazin H. (Eds), Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 1990, p. 309-311.
- BEECH J. Cytology of tracheobronchial aspirates in horses. *Vet. Path.*, 1975, **12**, 157-164.
- BEECH J., MERRYMAN G.S. Immunotherapy for equine respiratory disease. *Equine vet. Sci.*, 1986, **6**, 6-10.
- BEECH J. Chronic obstructive pulmonary disease. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, 1991, **7**, 79-91.
- BOUSHEY H.A., HOLTZMAN M.J., SHELLER J.R., NADEL J.A. Bronchial hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1980, **121**, 389-406.
- BRACHER V., VON FELLEBERG R., WINDER N.C., GRUENIG G., HERMANN M., KRAEHNEMANN A. An investigation of the incidence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in random populations of Swiss horses. *Equine vet. J.*, 1991, **23**, 136-141.
- BREEZE R., LEE H., GRANT B.D. Toxic lung disease. *Mod. Vet. Pract.*, 1978, **59**, 302.
- BREEZE R.G. Heaves. *Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract.*, 1979, **1**, 219-230.
- BROADSTONE R.V., SCOTT J.S., DERKSEN F.J., ROBINSON N.E. Effects of atropine in

- ponies with recurrent airway obstruction. *J. Appl. Physiol.*, 1988, **65**, 2720-2725.
- BROADSTONE R.V., LEBLANC P.H., DERKSEN F.J., ROBINSON N.E. *In vitro* responses of airway smooth muscle from horses with recurrent airway obstruction. *Pulm. Pharmacol.*, 1991, **4**, 191-202.
- BURRELL R., RYLANDER R. A critical review of the role of precipitins in hypersensitivity pneumonitis. *Eur. J. Respir. Dis.*, 1981, **62**, 332-343.
- BURRELL M.H. Endoscopic and virological observations on respiratory disease in a group of young Thoroughbred horses in training. *Equine vet. J.*, 1985, **17**, 99-103.
- CHABCHOUB A., GHRAM A., LOUZIR H., BOUSSETTA M., JOMAA I., AOUINA T. Recherche des anticorps anti-grippaux dans le sérum de chevaux atteints d'affections broncho-pulmonaires chroniques. *Revue Méd. Vét.*, 1994, **145**, 343-348.
- CHANARIN N., JOHNSTON S.L. Leukotrienes as a target in asthma therapy. *Drugs*, 1994, **47**, 12-24.
- CHERNIACK R.M. Use of pulmonary function tests in the assessment and treatment of patients with airway hyperreactivity. *Clin. Rev. Allergy*, 1985, **3**, 395-409.
- CIOFETTA G., PRATT T.A., HUGHES J.M.B. Regional pulmonary perfusion assessed with continuous intravenous infusion of Kr-81m : a comparison with Tc-99m macroaggregates. *J. Nucl. Med.*, 1978, **19**, 1126-1130.
- CLARCKE A.F. Chronic pulmonary disease - A multifaceted disease complex in the horse. *Ir. vet. J.*, 1987, **41**, 258-264.
- CLARKE A.F. Air hygiene and equine respiratory disease. *In Practice*, 1987a, **9**, 196-204.
- CLARKE A.F. A review of environmental and host factors in relation to equine respiratory disease. *Equine vet. J.*, 1987b, **19**, 435-441.
- CLARKE A.F., MADELIN T.M. Technique for assessing respiratory health hazards from hay and other source materials. *Equine vet. J.*, 1987, **19**, 442-447.
- CLARKE A.F., MADELIN T.M., ALLPRESS R.G. The relationship of air hygiene in stables to lower airway disease and pharyngeal lymphoid hyperplasia in two groups of Thoroughbred horses. *Equine vet. J.*, 1987, **19**, 524-530.
- COBLENTZ W.K., FRITZ J.O., BOLSEN K.K., COCHRAN R.C. Quality changes in alfalfa hay during storage in bales. *J. Dairy Sci.*, 1996, **79**, 873-885.
- COOK W.R. Chronic bronchitis and alveolar emphysema in the horse. *Vet. Rec.*, 1976, **99**, 448-451.
- CORBAZ R., GREGORY P.H., LACEY M.E. Thermophilic and mesophilic actinomycetes in mouldy hay. *J. gen. Microbiol.*, 1963, **32**, 449-455.
- CRAWFORD A.B.H., MAKOWSKA M., PAIVA M., ENGEL L.A. Convection-dependent and diffusion-dependent ventilation maldistribution in normal subjects. *J. Appl. Physiol.*, 1985, **59**, 838-846.

- CRICHLOW E.C., YOSHIDA K., WALLACE K. Dust levels in a riding stable. *Equine vet. J.*, 1980, **12**, 185-188.
- CROSS T. Thermophilic actinomycetes. *J. Appl. Physiol.*, 1968, **31**, 36-53.
- CUSS F.M., DIXON C.M.S., BARNES P.J. Effects of inhaled platelet-activating factor on pulmonary function and bronchial responsiveness in man. *Lancet*, 1986, **2**, 189-192.
- DECONTO I. Cytomorphologic findings in tracheobronchial secretions from horses with acute or chronic pulmonary disease. In : *Lung Function and Respiratory Diseases in the Horse*, (International Symposium in Hannover, Germany, 27th-29th June 1985), Deegen E., Beadle R.E. (Eds), Calw, Germany : Hippatrika Verlagsgesellschaft, 1986, p. 23-24.
- DERKSEN F.J., ROBINSON N.E., SLOCOMBE R.F., HILL R.E. 3-Methylindole-induced pulmonary toxicosis in ponies. *Am. J. Vet. Res.*, 1982, **43**, 603-607.
- DERKSEN F.J., ROBINSON N.E., ARMSTRONG P.J., STICK J.A., SLOCOMBE R.F. Airway reactivity in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *J. Appl. Physiol.*, 1985a, **58**, 598-604.
- DERKSEN F.J., SCOTT J.S., MILLER D.C., SLOCOMBE R.F., ROBINSON N.E. Bronchoalveolar lavage in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1985b, **132**, 1066-1070.
- DERKSEN F.J., SCOTT D., ROBINSON N.E., SLOCOMBE R.F., ARMSTRONG P.J. Intravenous histamine administration in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. J. Vet. Res.*, 1985c, **46**, 774-777.
- DERKSEN F.J., ROBINSON N.E., SLOCOMBE R.F., SCOTT J.S. Bronchoalveolar lavage cytology in ponies with chronic airway disease. In : *Lung Function and Respiratory Diseases in the Horse*, (International Symposium in Hannover, Germany, 27th-29th June 1985), Deegen E., Beadle R.E. (Eds), Calw, Germany : Hippatrika Verlagsgesellschaft, 1986, p. 25-29.
- DERKSEN F.J., SCOTT J.S., SLOCOMBE R.F., ROBINSON N.E. *Micropolyspora faeni* causes airway inflammation but not hyperresponsiveness in sensitized ponies. *J. Appl. Physiol.*, 1987, **62**, 1398-1404.
- DERKSEN F.J., ROBINSON N.E., SCOTT J.S., STICK J.A. Aerosolized *Micropolyspora faeni* antigen as a cause of pulmonary dysfunction in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. J. Vet. Res.*, 1988, **49**, 933-938.
- DERKSEN F.J., BROWN C.M., SONEA I., DARIEN B.J., ROBINSON N.E. Comparison of transtracheal aspirate and bronchoalveolar lavage cytology in 50 horses with chronic lung disease. *Equine vet. J.*, 1989, **21**, 23-26.
- DERKSEN F.J. Chronic obstructive pulmonary disease. In : *Equine Respiratory Disorders*, Beech J. (Ed.), Philadelphia : Lea & Febiger, 1991, p. 223-235.
- DERKSEN F.J., ARTHUR R.M., PASCOE J.R., DILLON G., SWEENEY C.R. Chronic

- obstructive pulmonary disease. Equine roundtable discussion - Part 3. *Equine Pract.*, 1991, **13**, 15-19.
- DERKSEN F.J., ROBINSON N.E., BERNEY C.E. Aerosol pirbuterol : bronchodilator activity and side effects in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Equine vet. J.*, 1992, **24**, 107-112.
- DERKSEN F.J. Chronic obstructive pulmonary disease (heaves) as an inflammatory condition. *Equine vet. J.*, 1993, **25**, 257-258.
- DEVOUS M.D., THEODORAKIS M.C., HILLIDGE C.J. Scintigraphic evaluation of pulmonary perfusion and ventilation in equine respiratory disease. In Proceedings : Annual Convention of the American Disease of Equine Practice, 1980, **25**, 373-374.
- DIXON P.M. Respiratory mucociliary clearance in the horse in health and disease, and its pharmaceutical modification. *Vet. Rec.*, 1992, **131**, 229-235.
- DIXON P.M., RAILTON D.I., MCGORUM B.C. Equine pulmonary disease : a case control study of 300 referred cases. Part 1 : Examination techniques, diagnostic criteria and diagnoses. *Equine vet. J.*, 1995a, **27**, 416-421.
- DIXON P.M., RAILTON D.I., MCGORUM B.C., TOTHILL S. Equine pulmonary disease : a case control study of 300 referred cases. Part 4 : Treatments and re-examination findings. *Equine vet. J.*, 1995b, **27**, 436-439.
- DOUCET M., JONES T.R., FORD-HUTCHINSON A.W. Responses of equine trachealis and lung parenchyma to methacholine, histamine, serotonin, prostanoids, and leukotrienes *in vitro*. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1990, **68**, 379-383.
- DOUCET M.Y., VRINS A.A., FORD-HUTCHINSON A.W. Histamine inhalation challenge in normal horses and in horses with small airway disease. *Can. J. Vet. Res.*, 1991, **55**, 285-293.
- DOUCET M., VRINS A., FORD-HUTCHINSON W.A. Maladies des petites voies respiratoires chez le cheval. II : Méthodes d'investigation et tests de fonction pulmonaire. *Prat. Vet. Equine*, 1992, **24**, 103-111.
- DROMMER W., KAUP F.-J., IREGUI C., DEEGEN E. Transmission and scanning electron microscopic findings in the tracheobronchial tree of horses with chronic obstructive pulmonary disease. In : *Lung Function and Respiratory Diseases in the Horse*, (International Symposium in Hannover, Germany, 27th-29th June 1985), Deegen E., Beadle R.E. (Eds), Calw, Germany : Hippatrika Verlagsgesellschaft, 1986, p. 16-19.
- DUNLEA A.P., DODD V.A. Measurement of respirable dust levels in horse stables. *Can. Agric. Eng.*, 1994, **37**, 205-209.
- DUVIVIER D.H., VOTION D., VANDENPUT S., ART T., LEKEUX P. Airway response of horses with COPD to dry powder inhalation of ipratropium bromide. *Vet. J.*, 1997, **154**, 149-153.

- EDWARDS J.H. A quantitative study on the activation of the alternative pathway of complement by mouldy hay dust and thermophilic actinomycetes. *Clin. Allergy*, 1976, **6**, 19-25.
- EFFROS R. M., MASON G. R., REID E., GRAHAM L., SILVERMAN P. Diffusion of labeled water and lipophilic solutes in the lung. *Microvasc. Res.*, 1985, **29**, 45-55.
- ERIKSEN L. Studies on *Micropolyspora faeni* and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). In : *Lung Function and Respiratory Diseases in the Horse*, (International Symposium in Hannover, Germany, 27th-29th June 1985), Deegen E., Beadle R.E. (Eds), Calw, Germany : Hippatrika Verlagsgesellschaft, 1986, p. 32-34.
- EVANS A.G., PARADIS M.R., O'CALLAGHAN M. Intradermal testing of horses with chronic obstructive pulmonary disease and recurrent urticaria. *Am. J. Vet. Res.*, 1992, **53**, 203-208.
- EYRE P. Equine pulmonary emphysema : a bronchopulmonary mould allergy. *Vet. Rec.*, 1972, **91**, 134-140.
- FAIRBAIN S.M., PAGE C.P., LEES P., CUNNINGHAM F.M. Early neutrophil but not eosinophil or platelet recruitment to the lungs of allergic horses following antigen exposure. *Clin. Exp. Allergy*, 1993, **23**, 821-828.
- FAIRBAIN S.M., MARR K.A., LEES P., CUNNINGHAM F.M. Effects of platelet activating factor on the distribution of radiolabelled leucocytes and platelets in normal horses and asymptomatic horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Res. Vet. Sci.*, 1996, **61**, 107-113.
- FAZIO F., JONES T. Assessment of regional ventilation by continuous inhalation of radioactive krypton 81m. *Brit. Med. J.*, 1975, **165**, 673-676.
- FESTENSTEIN G.N., LACEY J., SKINNER F.A., JENKINS P.A., PEPYS J. Self-heating of hay and grain in Dewar flasks and the development of Farmer's lung antigens. *J. gen. Microbiol.*, 1965, **41**, 389-407.
- FESTENSTEIN G.N. Biochemical changes during moulding of self-heated hay in Dewar flasks. *J. Sci. Fd Agric.*, 1966, **17**, 130-133.
- FOGARTY U. Evaluation of a bronchoalveolar lavage technique. *Equine vet. J.*, 1990, **22**, 174-176.
- FOSTER A.P., LEES P., CUNNINGHAM F.M. Platelet activating factor (PAF) is a mediator of equine neutrophil and eosinophil migration in vitro. *Res. Vet. Sci.*, 1992, **53**, 223-229.
- FRYER A.D., WILLS-KARP M. Dysfunction of M₂-muscarinic receptors in pulmonary parasympathetic nerves after antigen challenge. *J. Appl. Physiol.*, 1991, **71**, 2255-2261.
- GALLIVAN G.J., VIEL L., MCDONELL W.N. An evaluation of the multiple-breath nitrogen washout as a pulmonary function test in horses. *Can. J. Vet. Res.*, 1990, **54**, 99-105.
- GELL P.G.H., COOMBS R.R.A. *Clinical Aspects of Immunology*, Oxford : Blackwell, 1968.

- GERBER H. Chronic pulmonary disease in the horse. *Equine vet. J.*, 1973, **5**, 26-32.
- GILLESPIE J.R., TYLER W.S., EBERLY V.E. Pulmonary ventilation and resistance in emphysematous and control horses. *J. Appl. Physiol.*, 1966, **21**, 416-422.
- GILLESPIE J.R., TYLER W.S. Quantitative electron microscopy of the interalveolar septa of the horse lung. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1967, **95**, 477-483.
- GILLESPIE J.R., TYLER W.S. Chronic alveolar emphysema in the horse. *Adv. Vet. Sci.*, 1969, **13**, 59-99.
- GOLD W.M., MCCORMACK K.R. Pulmonary function response to radioisotope scanning of the lungs. *J. Am. Med. Assoc.*, 1966, **197**, 146-148.
- GRANT I.W.B., BLYTH W., WARDROP V.E., GORDON R.M., PEARSON J.C.G., MAIR A. Prevalence of Farmer's lung in Scotland : a pilot survey. *Br. Med. J.*, 1972, **1**, 530-534.
- GRAY P.R., DERKSEN F.J., ROBINSON N.E., CARPENTER-DEYO L.J., JOHNSON H.G., ROTH R.A. The role of cyclooxygenase products in the acute airway obstruction and airway hyperreactivity of ponies with heaves. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1989, **140**, 154-160.
- GRAY P.R., DERKSEN F.J., BROADSTONE R.V., ROBINSON N.E., PETERS-GOLDEN M. Decreased airway mucosal prostaglandin E2 production during airway obstruction in an animal model of asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992a, **146**, 586-591.
- GRAY P.R., DERKSEN F.J., BROADSTONE R.V., ROBINSON N.E., JOHNSON H.G., OLSON N.C. Increased pulmonary production of immunoreactive 15-hydroxyeicosatetraenoic acid in an animal model of asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992b, **145**, 1092-1097.
- GREGORY P.H., LACEY M.E. Mycological examination of dust from mouldy hay associated with farmer's lung disease. *J. gen. Microbiol.*, 1963, **30**, 75-88.
- GREGORY P.H., LACEY M.E., FESTENSTEIN G.N., SKINNER F.A. Microbial and biochemical changes during the moulding of hay. *J. gen. Microbiol.*, 1963, **33**, 147-174.
- GREGORY P.H., FESTENSTEIN G.N., LACEY M.E., PEPYS J., JENKINS P.A. Farmer's lung disease : the development of antigens in moulding hay. *J. gen. Microbiol.*, 1964, **36**, 429-439.
- GRÜNIG G., VON FELLEBERG R., MAIER R., CORBOZ L. Elastase-producing microorganisms in horse lungs : their possible role in the pathogenesis of chronic pulmonary disease in the horse. *Equine vet. J.*, 1986, **18**, 396-400.
- GRÜNIG G., HERMANN M., HOWALD B., WINDER N.C., VON FELLEBERG R. Partial divergence between airway inflammation and clinical signs in equine chronic pulmonary disease. *Equine vet. J.*, 1989, **21**, 145-148.
- GRYGLEWSKI R.J., PALMER R.M.J., MONCADA S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, 1986, **320**, 454-456.
- HALLIWELL R.E.W., FLEISCHMAN J.B., MACKAY-SMITH M., BEECH J., GUNSON D.E.

- The role of allergy in chronic pulmonary disease of horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1979, **174**, 277-281.
- HALLIWELL R.E.W., MCGORUM B.C., IRVING P., DIXON P.M. Local and systemic antibody production in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. *Vet. Immunol. Immunopath.*, 1993, **38**, 201-215.
- HARF A., PRATT T., HUGHES J.M.B. Regional distribution of VA/ \dot{Q} in man at rest and on exercise measured with krypton-81m. *J. Appl. Physiol. : Respirat. Environ. Exercise Physiol.*, 1978, **44**, 115-123.
- HEDENSTIERNA G., NYMAN G., KVART C., FUNKQUIST B. Ventilation-perfusion relationships in the standing horse : an inert elimination study. *Equine Vet. J.*, 1987, **19**, 514-519.
- HINTZ H.F. Nutrient losses from hay during storage. *Equine Pract.*, 1995, **17**, 12-13.
- HOOGSTEDEN H.C., VAN HAL P.TH.W. Mediators of the induction of nonallergic pulmonary inflammation. In : *Mediators of Pulmonary Inflammation*, Bray M.A., Anderson W.H. (Eds), New York : Marcel Dekker, Inc., 1991, p. 185-277.
- HUNNINGHAKE G.W., GADEK J.E., KAWANAMI O., FERRANS V.J., CRYSTAL R.G. Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease : evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am. J. Pathol.*, 1979, **97**, 149-206.
- JANSEN H.M., SACHS A.P.E., VAN ALPHEN L. Predisposing conditions to bacterial infections in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1995, **151**, 2073-2080.
- KAUP F.-J., DROMMER W., IREGUI C., DEEGEN E. Morphological alterations of the alveolar region in horses with chronic obstructive pulmonary disease. In : *Lung Function and Respiratory Diseases in the Horse*, (International Symposium in Hannover, Germany, 27th-29th June 1985), Deegen E., Beadle R.E. (Eds), Calw, Germany : Hippatrika Verlagsgesellschaft, 1986, p. 20-22.
- KAUP F.-J., DROMMER W., DEEGEN E. Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) I : Alterations of the larger conducting airways. *Equine vet. J.*, 1990a, **22**, 343-348.
- KAUP F.-J., DROMMER W., DAMSCH S., DEEGEN E. Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) II : Pathomorphological changes of the terminal airways and the alveolar region. *Equine vet. J.*, 1990b, **22**, 349-355.
- KEMBLE A.R., MACPHERSON H.T. Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting. *Biochem. J.*, 1954, **58**, 46-53.
- KLEIN H.-J., DEEGEN E. Histamine inhalation provocation test : methods to identify nonspecific airway reactivity in equids. *Am. J. Vet. Res.*, 1986, **47**, 1796-1800.
- KOTLIKOFF M.I., GILLESPIE J.R. Lung sounds in veterinary medicine. Part I : Terminology

- and mechanisms of sound production. *Compend. Contin. Educ.*, 1983, **5**, 634-639.
- KURUP V.P., FINK J.N. A scheme for the identification of thermophilic actinomycetes associated with hypersensitivity pneumonitis. *J. Clin. Microbiol.*, 1975, **2**, 55-61.
- LACEY J. The microbiology of hay and straw. In : *Aspergillosis and Farmer's Lung in Man and Animal*, (Proceedings of the 4th International Symposium 7th-9th October 1971, Davos, Switzerland), de Haller R., Suter F. (Eds), Bern, Switzerland : Hans Huber Publishers, 1974, p. 16-26.
- LAITINEN L.A., LAITINEN A., HEINO M. Airway hyperresponsiveness, epithelial disruption, and epithelial inflammation. In : *The Airway Epithelium. Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology*, Farmer S.G., Hay D.W. (Eds), New York : Marcel Dekker, Inc., 1991, p. 187-211.
- LAPOINTE J.-M., VRINS A., LAVOIE J.P. Effects of centrifugation and specimen preparation technique on bronchoalveolar lavage analysis in horses. *Equine vet. J.*, 1994, **26**, 227-229.
- LARSON V.L., BUSCH R.H. Equine tracheobronchial lavage : comparison of lavage cytologic and pulmonary histopathologic findings. *Am. J. Vet. Res.*, 1985, **46**, 144-146.
- LAWSON G.H.K., MCPHERSON E.A., MURPHY J.R., NICHOLSON J.M., WOODING P., BREEZE R.G., PIRIE H.M. The presence of precipitating antibodies in the sera of horses with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Equine vet. J.*, 1979, **11**, 172-176.
- LEBLANC P.H., BROADSTONE R.V., DERKSEN F.J., ROBINSON N.E. *In vitro* responses of distal airways in horses with recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.*, 1991, **52**, 999-1003.
- LEBLANC P.H., BROADSTONE R.V., DERKSEN F.J., ROBINSON N.E. *In vitro* effects of α_2 -adrenergic receptor stimulation on cholinergic contractions of equine distal airways. *Am. J. Vet. Res.*, 1993, **54**, 788-792.
- LEKEUX P., CLERCX C., ART T. Functional effects of obstructive pulmonary diseases. In : *Pulmonary Function in healthy, Exercising and Diseased Animals*, Lekeux P. (Ed.), Gand, Belgium : V.D.T. Publications, 1993, p. 229-266.
- LITTLEJOHN A., BOWLES F. Studies on the physiopathology of chronic obstructive pulmonary disease in the horse. IV. Blood gas and acid-base values at rest. *Onderstepoort J. vet. Res.*, 1981, **48**, 37-45.
- LÖSCHNER E., WILKENS J.H., DEEGEN E. Epithelium-dependent modulation of equine smooth muscle tone in horses with obstructive airway disease. In Proceedings : 12th Comparative Respiratory Society Meeting, Philadelphia, USA, September 1993.
- MACNAMARA B., BAUER S., IAFE J. Endoscopic evaluation of exercise-induced pulmonary disease and chronic obstructive pulmonary disease in association with poor performance in racing Standardbreds. *J. Appl. Physiol.*, 1990, **196**, 443-445.

- MADÉLIN T.M., CLARKE A.F., MAIR T.S. Prevalence of serum precipitating antibodies in horses to fungal and thermophilic actinomycete antigens : effects of environmental challenge. *Equine vet. J.*, 1991, **23**, 247-252.
- MAIR T.S. Value of tracheal aspirates in the diagnosis of chronic pulmonary diseases in the horse. *Equine vet. J.*, 1987, **19**, 463-465.
- MAIR T.S., STOKES R.C., BOURNE F.J. Increased local IgA production in chronic obstructive pulmonary disease. *Equine vet. J.*, 1988, **20**, 214-216.
- MAIR T.S. Changing concepts of COPD. *Equine vet. J.*, 1995, **27**, 402-403.
- MANSMANN R.A., OSBURN B.I., WHEAT J.D. Chicken hypersensitivity pneumonitis in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1975, **166**, 673-677.
- MARTI E., GERBER H., ESSICH G., OULEHLA J., LAZARY S. The genetic basis of equine allergic diseases. 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. *Equine vet. J.*, 1991, **23**, 457-460.
- MCCHESNEY A.E. Viral respiratory infections of horses : structure and function of lungs in relation to viral infection. *J. Appl. Physiol.*, 1975, **166**, 76-77.
- MCDONELL W.N., HALL L.W. Functional residual capacity in conscious and anaesthetized horses. *Br. J. Anaesthesiol.*, 1974, **46**, 802-803.
- MCGORUM B.C., DIXON P.M. Evaluation of local endobronchial antigen challenges in the investigation of equine chronic obstructive pulmonary disease. *Equine vet. J.*, 1993, **25**, 269-272.
- MCGORUM B.C., DIXON P.M., HALLIWELL R.E.W. Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens. *Equine vet. J.*, 1993a, **25**, 261-267.
- MCGORUM B.C., DIXON P.M., HALLIWELL R.E.W. Phenotypic analysis of peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in control and chronic obstructive pulmonary disease affected horses, before and after "natural (hay and straw) challenges". *Vet. Immunol. Immunopath.*, 1993b, **36**, 207-222.
- MCGORUM B.C., DIXON P.M., HALLIWELL R.E.W. Evaluation of intradermal mould antigen testing in the diagnosis of equine chronic obstructive pulmonary disease. *Equine vet. J.*, 1993c, **25**, 273-275.
- MCGORUM B.C., DIXON P.M., HALLIWELL R.E.W. Quantification of histamine in plasma and pulmonary fluids from horses with chronic obstructive pulmonary disease, before and after "natural (hay and straw) challenges". *Vet. Immunol. Immunopath.*, 1993d, **36**, 223-237.
- MCGORUM B.C., DIXON P.M. The analysis and interpretation of equine bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology. *Equine vet. Educ.*, 1994, **6**, 203-209.
- MCKIERNAN B.C., KORITZ G.D., SCOTT J.S., BERNEY C., ROBINSON N.E. Plasma

- theophylline concentration and lung function in ponies with recurrent obstructive lung disease. *Equine vet. J.*, 1990, **22**, 194-197.
- MCPHERSON E.A., LAWSON G.H.K., MURPHY J.R., NICHOLSON J.M., FRASER J.A., BREEZE R.G., PIRIE H.M. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) : Identification of affected horses. *Equine vet. J.*, 1978, **10**, 47-53.
- MCPHERSON E.A., LAWSON G.H.K., MURPHY J.R., NICHOLSON J.M., BREEZE R.G., PIRIE H.M. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in horses : aetiological studies : responses to intradermal and inhalation antigenic challenge. *Equine vet. J.*, 1979, **11**, 159-166.
- MIRBAHAR K.B., MCDONELL W.N., BIGNELL W., EYRE P. Effects of aerosolized histamine and carbachol in the conscious horse. *Can. J. Comp. Med.*, 1985, **49**, 211-218.
- MOORE B.R., KRAKOWKA S., ROBERTSON J.T., CUMMINS J.M. Cytologic evaluation of bronchoalveolar lavage fluid obtained from Standardbred racehorses with inflammatory airway disease. *Am. J. Vet. Res.*, 1995, **56**, 562-567.
- MURPHY J.R., MCPHERSON E.A., DIXON P.M. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) : effets of bronchodilator drugs on normal and affected horses. *Equine vet. J.*, 1980, **12**, 10-14.
- MUYLLE E., VAN DEN HENDE C., OYAERT W. Nitrogen clearance in horses as a respiratory function test. *Zbl. Vet. Med. A*, 1972, **19**, 310-317.
- MUYLLE E., OYAERT W. Lung function tests in obstructive pulmonary disease in horses. *Equine vet. J.*, 1973, **5**, 37-44.
- MUYLLE E., NUYTTEN J., DEPREZ P., VAN DEN HENDE C., OYAERT W. Comparison of three methods for the evaluation of soundness of pulmonary function in horses. In : *Lung Function and Respiratory Diseases in the Horse*, (International Symposium in Hannover, Germany, 27th-29th June 1985), Deegen E., Beadle R.E. (Eds), Calw, Germany : Hippriatrika Verlagsgesellschaft, 1986, p. 65-66.
- MYERS A., UNDEM B.J. Antigen depolarizes guinea pig bronchial parasympathetic ganglion neurons by activation of histamine H1 receptors. *Am. J. Physiol.*, 1995, in press.
- NAYLOR J.M., CLARK E.G., CLAYTON H.M. Chronic obstructive pulmonary disease : usefulness of clinical signs, bronchoalveolar lavage, and lung biopsy as diagnostic and pronostic aids. *Can. Vet. J.*, 1992, **33**, 591-598.
- NUYTTEN J., MUYLLE E., OYAERT W., VAN DEN HENDE C., VLAMINCK K., DE KEERSMAECKER F. Cytology, bacteriology and phagocytic capacity of tracheo-bronchial aspirates in healthy horses and horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Zbl. Vet. Med. A*, 1983, **30**, 114-120.
- NUYTTEN J., DEPREZ P., PICALET T., VAN DEN HENDE C., MUYLLE E. Comparison of different pulmonary function tests and their prognostic value in horses affected with COPD.

- Equine Vet. Sci.*, 1988, **8**, 361-364.
- NYMAN G., LINDBERG R., WECKNER D., BJÖRK M., KVART C., PERSSON S.G.B., GUSTAFSSON H., HEDENSTIERNA G. Pulmonary gas exchange correlated to clinical signs and lung pathology in horses with chronic bronchiolitis. *Equine vet. J.*, 1991, **23**, 253-260.
- O'CALLAGHAN M.W. Nuclear imaging techniques for equine respiratory disease. *Vet. Clin. North Am. : Equine Pract.*, 1991, **7**, 417-433.
- OLLERENSHAW S.L., JARVIS D., SULLIVAN C.E., WOOLCOCK A.J. Substance P immunoreactive nerves in airways from asthmatics and nonasthmatics. *Eur. Respir. J.*, 1991, **4**, 673-682.
- PEARSON E.G., RIEBOLD T.W. Comparison of bronchodilators in alleviating clinical signs in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1989, **194**, 1287-1291.
- PEPYS J., RIDDELL R.W., CITRON K.M., CLAYTON Y.M. Precipitins against extracts of hay and moulds in the serum of patients with Farmer's lung, aspergillosis, asthma and sarcoidosis. *Thorax*, 1962, **17**, 366-374.
- PEPYS J., JENKINS P.A., FESTENSTEIN G.N., GREGORY P.H., LACEY M.E., SKINNER F.A. Farmer's lung : thermophilic actinomycetes as a source of "Farmer's lung hay" antigen. *Lancet*, 1963, **1**, 607-611.
- RAPHAEL C.F., GUNSON D.E. Percutaneous lung biopsy in the horse. *Cornell Vet.*, 1981, **71**, 439-448.
- RAYMOND S.L., CURTIS E.F., CLARKE A.F. Comparative dust challenges faced by horses when fed alfalfa cubes or hay. *Equine Pract.*, 1994, **16**, 42-47.
- RAYMOND S.L., CURTIS E.F., WINFIELD L.M., CLARKE A.F. A comparison of respirable particles associated with various forage products for horses. *Equine Pract.*, 1997, **19**, 23-26.
- REGOLI D. Peptide receptors in the airways. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1987, **136**, S35-S39.
- ROBINSON N.E., SORENSON P.R. Pathophysiology of airway obstruction in horses : a review. *J. Appl. Physiol.*, 1978, **172**, 299-303.
- ROBINSON N.E., DERKSEN F.J., SLOCOMBE R.F. Airway reactivity in ponies with chronic airway disease. In : *Lung Function and Respiratory Diseases in the Horse*, (International Symposium in Hannover, Germany, 27th-29th June 1985), Deegen E., Beadle R.E. (Eds), Calw, Germany : Hippriatrika Verlagsgesellschaft, 1986, p. 56-60.
- ROBINSON N.E., WILSON R. Airway obstruction in the horse. *J. Equine vet. Sci.*, 1989, **9**, 155-160.
- ROBINSON N.E., DERKSEN F.J., BERNEY C., GOOSSENS L. The airway response of horses with recurrent airway obstruction (heaves) to aerosol administration of ipratropium

- bromide. *Equine vet. J.*, 1993, **25**, 299-303.
- ROBINSON N.E., DERKSEN F.J., OLSZEWSKI M.A., BUECHNER-MAXWELL V.A. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses. *Br. vet. J.*, 1996, **152**, 283-306.
- ROLLIN F., DESMECHT D., ART T., VANDENPUT S., VERBANCK S., VAN MUYLEN A., LOMBA F., LEKEUX P., PAIVA M. Multiple-breath washout and washin experiments in Standardbred horses. 1997, soumis pour publication.
- ROSENZWEIG D.Y., HUGHES J.M.B., JONES T. Uneven ventilation within and between regions of the normal lung measured with nitrogen-13. *Respir. Physiol.*, 1969, **8**, 86-97.
- ROSSDALE P.D., HOPES R., WINGFIELD DIGBY N.J., OFFORD K. Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *Vet. Rec.*, 1985, **116**, 66-69.
- SASSE H.H.L., BOERMA S., SMOLDERS F.A.A. The relationship between pulmonary function tests and other parameters. Results of a research project into the etiology of C.O.P.D. in horses. In : *Lung Function and Respiratory Diseases in the Horse*, (International Symposium in Hannover, Germany, 27th-29th June 1985), Deegen E., Beadle R.E. (Eds), Calw, Germany : Hippatrika Verlagsgesellschaft, 1986, p. 46-48.
- SAUNDERS R.N., HANDLEY D.A. Platelet-activating factor antagonists. *Am. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1987, **27**, 237-255.
- SCOTT J.S., BROADSTONE R.V., DERKSEN F.J., ROBINSON N.E. Beta-adrenergic blockade in ponies with recurrent obstructive pulmonary disease. *J. Appl. Physiol.*, 1988, **64**, 2324-2328.
- SETTY B.N.Y., STUART M.J. 15-Hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid inhibits human vascular cyclooxygenase. *J. Clin. Invest.*, 1986, **77**, 202-211.
- SHAHEEN S.O., BARKER D.J.P., HOLGATE S.T. Do lower respiratory tract infections in early childhood cause chronic obstructive pulmonary disease ? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1995, **151**, 1649-1652.
- SHUSTER R., ROSE J., GALEY F. COPD increase reported in Southern California. *J. Equine Vet. Sci.*, 1995, **15**, 339.
- SONEA I.M., BOWKER R.M., ROBINSON N.E., BROADSTONE R.V. Distribution of dopamine β -hydroxylase and neuropeptide Y immunoreactive nerves in healthy equine lungs. *Am. J. Vet. Res.*, 1993, **54**, 507-513.
- SONEA I.M., BOWKER R.M., ROBINSON N.E., BROADSTONE R.V. Substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive nerve fibers in lungs from adult equids. *Am. J. Vet. Res.*, 1994, **55**, 1066-1074.
- SORENSEN P.R., ROBINSON N.E. Postural effects on lung volumes and asynchronous ventilation in anesthetized horses. *J. Appl. Physiol.*, 1980, **48**, 97-103.
- SPÖRRI H., DENAC M. Der Stickstoff-Einwaschungstest im dienste der

- Lungenfunktionsprüfung. *Zbl. Vet. Med. A*, 1970, **17**, 845-856.
- STAINES F.H., FORMAN J.A.S. A survey of Farmer's lung. *J. Coll. gen. Practit.*, 1961, **4**, 351-382.
- SWEENEY C.R., BEECH J. Bronchoalveolar lavage. In : *Equine Respiratory Disorders*, Beech J. (Ed.), London : Lea and Febiger, 1991, p. 55-61.
- TESSIER G.J., LACKNER P.A., O'GRADY S.M., KANNAN M.S. Modulation of equine tracheal smooth muscle contractility by epithelial-derived and cyclooxygenase metabolites. *Respir. Physiol.*, 1991, **84**, 105-114.
- THEODORAKIS M.C., HILLIDGE C.J., ALLHANDS R.A. External scintigraphy in evaluating delivery techniques of sodium cromolyn ^{99m}Tc-DTPA aerosol in the lung of the horse. *J. Pharm. Sci.*, 1983, **72**, 580-581.
- THOMSON J.R., MCPHERSON E.A., LAWSON G.H.K., WOODING P., BROWN R. A study of the possible role of chymotrypsin in the aetiology of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Vet. Immunol. Immunopath.*, 1983, **4**, 387-395.
- THOMSON J.R., MCPHERSON E.A. Effects of environmental control on pulmonary function of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. *Equine vet. J.*, 1984, **16**, 35-38.
- THOMPSON K.N. Alternate bedding materials for horses. *Equine Pract.*, 1995, **17**, 20-23.
- TOMAKI M., ICHINOSE M., MIURA M., HIRAYAMA Y., YAMAUCHI H., NAKAJIMA N., SHIRATO K. Elevated substance P content in induced sputum from patients with asthma and patients with chronic bronchitis. *Am. Respir. Crit. Care Med.*, 1995, **151**, 613-617.
- TRAUB-DARGATZ J.L., MCKINNON A.O., THRALL M.A., JONES R.L., BRUYNINCKX W., BLANCQUAERT A-M.B., DARGATZ D.A. Evaluation of clinical signs of disease, bronchoalveolar and tracheal wash analysis, and arterial blood gas tensions in 13 horses with chronic obstructive pulmonary disease treated with prednisone, methyl sulfonmethane, and clenbuterol hydrochloride. *Am. J. Vet. Res.*, 1992, **53**, 1908-1916.
- TREMBLAY G.M., FERLAND C., LAPOINTE J.-M., VRINS A., LAVOIE J.P., CORMIER Y. Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses. *Equine vet. J.*, 1993, **25**, 194-197.
- UNDEM B.J., HUBBARD W., WEINRECH D. Immunologically induced neuromodulation of guinea pig nodose ganglion nerves. *J. Auton. Nervous System*, 1993, **44**, 34-44.
- VANDERHOEK J.Y., BRYANT R.W., BAILEY J.M. 15-hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid. A potent and selective inhibitor of platelet lipoxigenase. *J. Biol. Chem.*, 1980a, **255**, 5996-5998.
- VANDERHOEK J.Y., BRYANT R.W., BAILEY J.M. Inhibition of leukotriene biosynthesis by the leukocyte product 15-hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid. *J. Biol. Chem.*, 1980b, **255**, 10064-10066.

- VIEL L. Structural-functional correlations of the lung in horses with small airway disease, Thèse de doctorat, Université de Guelph, Guelph, Canada, 1983.
- VIEL L. Diagnostic procedures, prognosis and therapeutic approaches of chronic respiratory diseases in horses. *Can. Vet. J.*, 1985, **26**, 33-35.
- VIEL L. Structural-functional correlations of the lung in horses with small airway disease. In : *Lung Function and Respiratory Diseases in the Horse*, (International Symposium in Hannover, Germany, 27th-29th June 1985), Deegen E., Beadle R.E. (Eds), Calw, Germany : Hippiafrika Verlagsgesellschaft, 1986, p. 41-45.
- VON ESSEN S.G., ROBBINS R.A., THOMPSON A.B., ERTL R.F., LINDER J., RENNARD S. Mechanisms of neutrophil recruitment to the lung by grain dust exposure. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1988, **138**, 921-927.
- VOTION D., VANDENPUT S., DUVIVIER D.H., ART T., LEKEUX P. Analysis of equine scintigraphical lung images. *Vet. J.*, 1997a, **153**, 49-61.
- VOTION D., GHAFIR Y., VANDENPUT S., DUVIVIER D.H., ART T., LEKEUX P. Analysis of scintigraphical images in diseased and treated horses. 1997b, soumis pour publication.
- VOTION D., VANDENPUT S., DUVIVIER D.H., LAMBERT P., ART T., LEKEUX P. Scintigraphical evaluation of alveolar clearance in horses. 1997c, soumis pour publication.
- VOTION D., DUVIVIER D.H., VANDENPUT S., LAMBERT P., ART T., LEKEUX P. Alveolar clearance in COPD affected horses. 1997d, soumis pour publication.
- VRINS A., DOUCET M. L'examen cytologique du lavage bronchoalvéolaire chez des chevaux présentant les signes cliniques d'une maladie des voies respiratoires inférieures. *Prat. Vet. Equine*, 1989, **21**, 22-27.
- VRINS A., DOUCET M., NUNEZ-OCHOA L. A retrospective study of bronchoalveolar lavage cytology in horses with clinical findings of small airway disease. *J. Vet. Med. A*, 1991, **38**, 472-479.
- WANG Z., YU M., ROBINSON N.E., BROADSTONE R.V., LEBLANC P.H., DERKSEN F.J. Exogenous but not endogenous PGE₂ modulates pony tracheal smooth muscle contractions. *Pulm. Pharmacol.*, 1992, **5**, 225-231.
- WANG Z., ROBINSON N.E., YU M.F. ACh release from horse airway cholinergic nerves : effects of stimulation intensity and muscle preload. *Am. J. Physiol.*, 1993, **264**, L269-L275.
- WANG Z.-W., ROBINSON N.E., YU M.-F. PGE₂ inhibits acetylcholine release from cholinergic nerves in canine but not equine airways. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 1994, **51**, 347-355.
- WANG Z., YU M.F., ROBINSON N.E. Prejunctional muscarinic autoreceptors on horse airway cholinergic nerves. *Life Sci.*, 1995a, **25**, 2255-2262.
- WANG Z., YU M.F., ROBINSON N.E., DERKSEN F.J. Acetylcholine release from airway

- cholinergic nerves in horses with heaves, an airway obstructive disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1995b, **151**, 830-835.
- WATHES C.M. Bioaerosols in animals horses. In : *Bioaerosols Handbook*, Cox C.S., Wathes C.M. (Eds), London : Lewis Publishers, 1995, p 547-577.
- WATSON E.D., SWEENEY C.R., STEENSMA K.A. Arachidonate metabolites in bronchoalveolar lavage fluid from horses with and without COPD. *Equine vet. J.*, 1992, **24**, 379-381.
- WAYNE L.G. Actions of the judicial commission of the international committee on systematic bacteriology on requests for opinions published in 1983 and 1984. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1986, **36**, 357-358.
- WEST J.B. Ventilation-perfusion relationships. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1977, **116**, 919-943.
- WHITWELL K.E., GREET T.R.C. Collection and evaluation of tracheobronchial washes in the horse. *Equine vet. J.*, 1984, **16**, 499-508.
- WIDDICOMBE J. Relationships among the composition of mucus, epithelial lining liquid, and adhesion of microorganisms. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1995, **151**, 2088-2093.
- WILLOUGHBY R.A., MCDONELL W.N. Pulmonary function testing in horses. *Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract.*, 1979, **1**, 171-197.
- WILLOUGHBY R.A., ECKER G.L., MCKEE S.L., RIDDOLLS L.J. Use of scintigraphy for the determination of mucociliary clearance rates in normal, sedated, diseased and exercised horses. *Can. J. Vet. Res.*, 1991, **55**, 315-320.
- WILLOUGHBY R.A., ECKER G.L., MCKEE S.L., RIDDOLLS L.J., VERNAILLEN C., DUBOVI E., LEIN D., MAHONY J.B., CHERNESKY M., NAGY E., STAEMPFLI H. The effects of *Equine Rhinovirus*, *Influenza Virus* and *Herpesvirus* infection on tracheal clearance rate in horses. *Can. J. Vet. Res.*, 1992, **56**, 115-121.
- WINDER N.C., VON FELLEBERG R. Immunofluorescent evaluation of the lower respiratory tract of healthy horses and of horses with chronic bronchiolitis. *Am. J. Vet. Res.*, 1986, **47**, 1271-1274.
- WINDER N.C., VON FELLEBERG R. Chronic small airway disease in the horse : immunohistochemical evaluation of lungs with mild, moderate and severe lesions. *Vet. Rec.*, 1988, **122**, 181-183.
- WINDER N.C., VON FELLEBERG R. Mast cells in normal and pathological specimens of the equine lung. *J. Vet. Med. A*, 1990, **37**, 641-650.
- WOODS P.S.A., ROBINSON N.E., SWANSON M.C., REED C.E., BROADSTONE R.V., DERKSEN F.J. Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different management systems. *Equine vet. J.*, 1993, **25**, 208-213.
- YU M., ROBINSON N.E., WANG Z., DERKSEN F.J. Muscarinic receptor subtypes in equine tracheal smooth muscle. *Vet. Res. Commun.*, 1992, **16**, 301-310.

- YU M.F., WANG Z.W., ROBINSON N.E. Prejunctional alpha-2-adrenoceptors inhibit acetylcholine release from cholinergic nerves in equine airways. *Am. J. Physiol.*, 1993, **265**, L565-L570.
- YU M., WANG Z., ROBINSON N.E., LEBLANC P.H. Inhibitory nerve distribution and mediation of NANC relaxation by nitric oxide in horse airways. *J. Appl. Physiol.*, 1994a, **76**, 339-344.
- YU M.F., WANG Z.W., ROBINSON N.E., DERKSEN F.J. Modulation of bronchial smooth muscle function in horses with heaves. *J. Appl. Physiol.*, 1994b, **77**, 2149-2154.

UNIVERSITÉ DE LIÈGE
FACULTÉ DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE
SERVICE DE PHYSIOLOGIE

EFFETS DE LA COMPOSITION EN AÉROALLERGÈNES ET EN
POUSSIÈRE RESPIRABLE DANS LES FOURRAGES ET LITIÈRES
SUR LA FONCTION PULMONAIRE DES CHEVAUX ATTEINTS DE
MALADIE PULMONAIRE OBSTRUCTIVE CHRONIQUE

SANDRINA VANDENPUT

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

ANNÉE ACADÉMIQUE 1997-1998

Presses de la Faculté de Médecine Vétérinaire
de l'Université de Liège - B-4000 Liège Belgique

D 97-0480-38

ISBN 2-930212-01-2



9 782930 212012

DEUXIÈME PARTIE :

Présentation synoptique des expérimentations

Objectif n° 1

DÉTERMINATION *IN VITRO* DE LA CHARGE EN POUSSIÈRE RESPIRABLE ET EN ALLERGÈNES DE DIFFÉRENTS TYPES DE FOURRAGES, LITIÈRES ET COMPLÉMENTS DESTINÉS À L'ALIMENTATION DES CHEVAUX

Les objectifs précis de cette étude (Etude 1) étaient : (1) de mettre au point des méthodes standardisées de prélèvement de l'air afin (2) d'évaluer la contribution individuelle en poussière et en aéroallergènes de différents types de fourrage, litière et compléments alimentaires communément distribués aux chevaux. Cette évaluation devait se faire sans l'intervention de différents paramètres difficilement contrôlables dans une écurie tels que la ventilation, l'humidité ambiante, l'activité humaine et des animaux.

Afin de comparer les échantillons de façon reproductible, un dispositif permettant de standardiser chaque étape de la mesure a été mis au point. Comme représenté schématiquement (Fig. 2.1.), une quantité précise (100 grammes) de l'échantillon à analyser est placée dans une colonne (1 m de haut, 25 cm de diamètre interne) qui est traversée par un courant d'air de débit constant (200 litres/minute), et cela pendant trois minutes. La poussière libérée par l'action mécanique du vent est collectée dans une enceinte hermétique de 2 m³ où sont placés les instruments de mesure. Au terme de cette période de 3 minutes, les mesures qualitatives et quantitatives sont effectuées, sans que le flux d'air traversant l'échantillon ne soit interrompu. La température et l'humidité relative de la pièce où sont effectuées les mesures sont relativement constantes ($18 \pm 2^\circ \text{C}$ et $60 \pm 5 \%$, respectivement). Un seul type d'échantillon a été étudié par jour afin d'éviter les contaminations entre échantillons. Pour chaque mesure, les comptages de poussière (analyse quantitative) et les prélèvements d'allergènes (analyse qualitative) ont été effectués simultanément.

Différentes études ont démontré que la mise en suspension dans l'air des particules contenues dans un substrat par un courant d'air était la méthode la plus apte à reproduire ce qui se passe lors de la manipulation de ce substrat (Gregory et Lacey, 1963). En effet, les méthodes de dilution dans l'eau surestiment la quantité de poussière et la quantité de micro-organismes libérés (Lacey et Dutkiewicz, 1976).

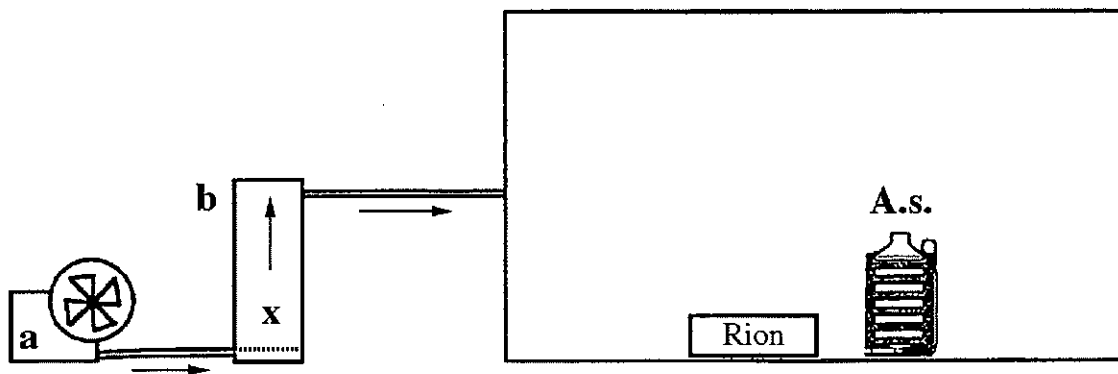


Fig. 2.1. - Dispositif permettant une standardisation des mesures. Les deux instruments (Rion & A.s.) sont placés dans une enceinte hermétique de 2 m³.

a = ventilateur à débit constant; b = colonne où est placé l'échantillon (x) à analyser, Rion = compteur à particule; A.s. = Andersen sampler.

Analyse quantitative - La quantité de poussière libérée par l'échantillon est comptée et répertoriée en fonction de leur taille grâce à un compteur à particule Rion KC-01B (Hawksley & Sons, Lancing, Sussex). Ce compteur identifie, suivant leur taille, toutes les particules qui traversent un faisceau de lumière.

Le compteur est placé au centre de la chambre de 2 m³. Un litre d'air est prélevé pour chaque mesure. L'expérience est répétée 17 à 22 fois par type d'échantillon, en remplaçant à chaque fois les 100 gr à analyser.

Seules les particules dont la taille est comprise entre 0.5 et 5 µm de diamètre sont prises en compte dans notre étude. En effet, cette fraction de poussière est considérée comme la partie de poussière respirable, c'est-à-dire apte à atteindre les parties profondes des poumons (Lippman, 1970). Les particules dont la taille est inférieure à 0.5 µm sont en grande partie expirées car elles sont trop petites pour se déposer. Par contre, les particules supérieures à 5 µm de diamètre sont arrêtées par les filtres compris dans les parties antérieures des voies respiratoires, à savoir les cavités nasales et la partie supérieure de la trachée. Le compteur à particule Rion est calibré chaque année par la firme Hawksley & Sons, qui utilise pour ce faire des aérosols dont la quantité et la taille des particules sont parfaitement connues.

Analyse qualitative - Les allergènes recherchés sont ceux qui sont le plus fréquemment incriminés dans l'étiologie de la MPOC (Lawson *et al.*, 1979; McPherson *et al.*, 1979; Eriksen, 1986; Sasse *et al.*, 1986; Clarke, 1987), à savoir *Faenia rectivirgula* et

Thermoactinomyces vulgaris, deux actinomycètes thermophiles et *Aspergillus fumigatus*, un champignon.

Comptabiliser la quantité des trois allergènes les plus régulièrement incriminés dans le processus allergique nécessite la mise en oeuvre d'une méthode de culture permettant d'une part la croissance optimale de toutes les spores viables, et d'autre part leur identification aisée. Le prélèvement des particules dans l'air se fait grâce à un Andersen sampler (Fig. 2.2.). Il s'agit d'un dispositif, utilisé dans de nombreux milieux scientifiques, qui permet d'impacter sur des milieux de culture coulés dans des boîtes de Pétri les poussières aspirées (Fig. 2.3.). Les 6 étages sont en fait des filtres de taille décroissante, représentés par 400 orifices. Les plus grosses particules de poussière sont donc arrêtées au premier étage. Le volume d'air qui traverse l'Andersen sampler est constant (28.3 m/sec) et est généré par une pompe dont le débit est régulièrement contrôlé.

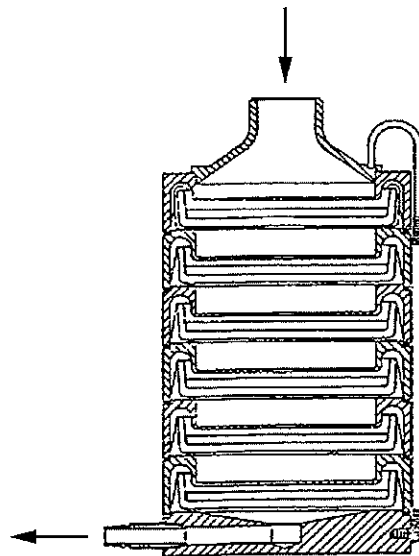


Fig. 2.2. - Coupe d'un Andersen sampler permettant de visualiser les 6 étages où sont placées des boîtes de Pétri en verre. Le courant d'air qui traverse l'Andersen sampler est généré par une pompe à débit constant.

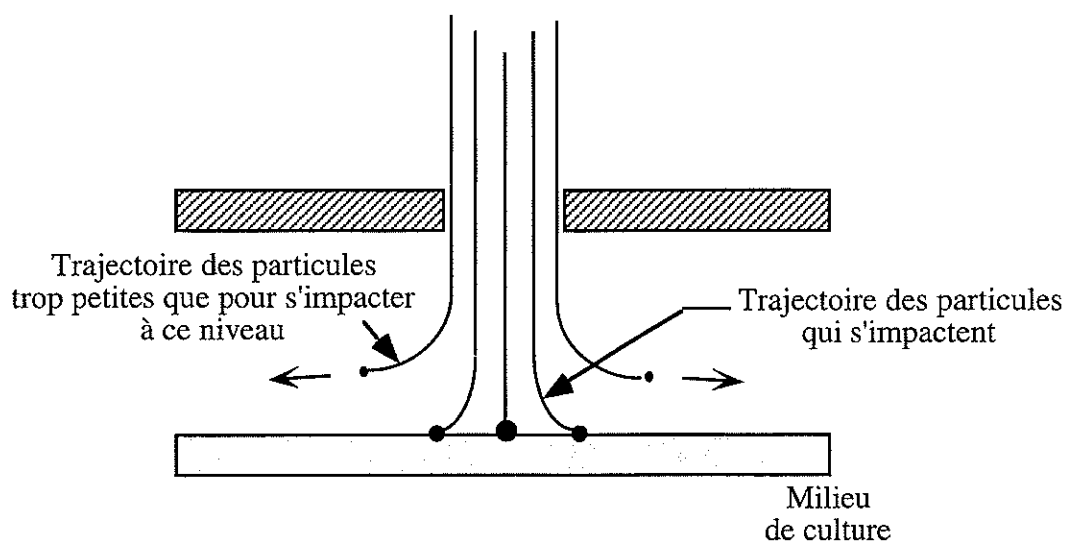


Fig. 2.3. - Représentation schématique de l'impaction des particules sur le milieu de culture coulé dans la boîte de Pétri. Les petites particules ne sont pas arrêtées à cet étage et continuent à être entraînées par le courant d'air.

Deux milieux de culture spécifiques ont été utilisés (Table 2.1.). Le premier permet, en association avec une température sélective de 56° C, de favoriser le développement des deux actinomycètes. Le deuxième milieu permet un développement sélectif d'*Aspergillus sp.* La température d'incubation choisie (46° C) limite très fortement la croissance des autres types d'*Aspergillus* (Kosakiewicz et Smith, 1994). L'aspect microscopique des têtes aspergillaires suffit à confirmer le type d'*Aspergillus*.

Deuxième partie : Présentation synoptique des expérimentations

Table 2.1. - Composition des milieux de culture utilisés pour identifier les trois allergènes les plus fréquemment incriminés dans l'étiologie de la MPOC. La température d'incubation a été choisie pour limiter la croissance d'autres micro-organismes

	<i>Aspergillus</i> sp.		Actinomycètes	
Composition du milieu de culture	extrait de malt	20.0 gr	agar nutritif	14.0 gr
	agar	20.0 gr	hydrolysate de caséine	2.0 gr
	eau distillée	1 litre	agar	10.0 gr
	pénicilline	20 ui/ml	eau distillée	1 litre
	streptomycine	40 ui/ml	cycloheximide	50 µg/ml
	Triton N-101	0.05 %		
Température d'incubation	46° C		56° C	
Temps d'incubation	2 - 3 jours		5 - 6 jours	

L'identification des colonies d'actinomycètes nécessite une étape supplémentaire car leur aspect macroscopique et microscopique n'est pas suffisant pour un diagnostic de certitude. A cette fin, 4 tests d'identification, décrits par Kurup et Fink (1975), ont été effectués :

- le test de décomposition de l'hypoxanthine consiste à voir disparaître les cristaux d'hypoxanthine du milieu de culture (trypticase soy agar (TSA) + 0.4 % d'hypoxanthine/volume) après 3 semaines d'incubation à 28° C,

- les colonies de *Thermoactinomyces vulgaris* utilisent la caséine du milieu pour se développer. Pour effectuer ce test, le milieu est constitué de lait écrémé et d'une quantité identique d'une solution aqueuse de 2 % d'agar (Gordon et Smith, 1955). La disparition de la caséine du milieu est manifeste 7 à 14 jours après la mise en incubation à 28° C. Les colonies de *Faenia rectivirgula* ne modifient absolument pas la composition du milieu,

- l'hydrolyse de l'amidon se constate après inondation des boîtes de Pétri par une solution iodée. On observe alors une zone plus claire qui apparaît autour des colonies de *Thermoactinomyces vulgaris*. Le milieu de culture est constitué de 10 gr d'amidon de pomme de terre, mis en suspension dans 100 ml d'eau distillée froide, le tout additionné à 900 ml de

TSA,

- l'hydrolyse de l'esculine est reconnaissable au noircissement du milieu autour de la colonie de *Faenia rectivirgula*. Le milieu de culture est constitué de 0.1 % poids/volume d'esculine et de 0.05 % poids/volume de citrate ferrique, additionnés au TSA. Les boîtes, après inoculation, sont incubées pendant 2 semaines.

Conclusions

Les résultats de cette étude confirment qu'il est possible, grâce à un dispositif de prélèvement simple, d'évaluer de manière standardisée les caractéristiques qualitatives et quantitatives des matériaux (litières et aliments) utilisés couramment dans le monde du cheval. Les résultats ainsi obtenus nous ont permis d'utiliser en connaissance de cause une combinaison fourrage-litière libérant peu de poussière et d'aéroallergènes et de comparer, dans les études ultérieures, l'impact de cette association sur les chevaux atteints de MPOC.

Objectif n° 2

ETUDE DE L'INTÉRÊT DU CONTRÔLE DE L'ENVIRONNEMENT PAR LA DISTRIBUTION
D'ENSILAGE D'HERBE PRÉFANÉE ET DE L'UTILISATION DE COPEAUX DE BOIS COMME
LITIÈRE SUR LA FONCTION RESPIRATOIRE DES CHEVAUX ATTEINTS DE MALADIE
PULMONAIRE OBSTRUCTIVE CHRONIQUE

Les chevaux utilisés pour les trois expériences suivantes ont été choisis comme suit. Ces chevaux présentaient ou avaient présenté des troubles respiratoires altérant leur capacité sportive et leur fonction respiratoire. De plus, leur anamnèse présageait très fortement d'une étiologie allergique à ces altérations respiratoires chroniques. Afin de vérifier cette caractéristique, les chevaux dès leur arrivée à la Faculté de Médecine Vétérinaire ont été placés pendant deux mois en pâture. Au terme de ces deux mois, les examens cliniques et tests de fonction pulmonaire (mécanique ventilatoire et prise de sang artériel) attestaient de la normalité de tous leurs paramètres respiratoires. Une fois mis en écurie, en contact avec du foin et de la paille, tous les chevaux ont déclenché en 6 ± 4 jours (moyenne \pm déviation standard) des signes cliniques typiques des crises de MPOC, à savoir une importante dyspnée expiratoire, de la toux ainsi que pour la majorité d'entre eux une auscultation pulmonaire anormale. La réversibilité de ces symptômes a été vérifiée par l'injection intraveineuse d'atropine (0.02 mg/kg de poids vif), signant ainsi la large part que prend la bronchoconstriction, initiée par l'activation des récepteurs muscariniques, dans ces symptômes.

Par ailleurs, les différents résultats obtenus chez les chevaux souffrant de MPOC ont été comparés, dans les études 2 et 3 à des individus sains de référence. Au même titre que les chevaux atteints de MPOC, ces chevaux dont l'anamnèse ne faisait état d'aucun trouble ou pathologie respiratoire ont été placés, après un séjour en pâture, dans une écurie en présence de foin et de paille pendant une période de 6 semaines. Aucun de leurs paramètres respiratoires (examens cliniques et tests de fonction pulmonaire) n'a été modifié au terme de ces six semaines par le contact avec des poussières et des allergènes. Différentes études ayant préalablement démontré qu'aucune modification environnementale n'induit, de façon significative, de changements fonctionnels respiratoires chez les chevaux sains (Derksen *et al.*, 1985a; 1985c; Armstrong *et al.*, 1986; Broadstone *et al.*, 1988), ceux-ci n'ont fait l'objet d'investigations qu'une seule fois par étude, et ce, au terme de 6 semaines en box avec

distribution de foin deux fois par jour, et avec pour litière de la paille de bonne qualité.

2.1. EFFETS DE DIFFÉRENTS RÉGIMES ENVIRONNEMENTAUX SUR LES PARAMÈTRES DE
MÉCANIQUE VENTILATOIRE ET LES ÉCHANGES GAZEUX DES CHEVAUX ATTEINTS DE
MALADIE PULMONAIRE OBSTRUCTIVE CHRONIQUE
(ÉTUDE N° 2)

Le but de cette expérimentation était de vérifier s'il était possible de maintenir des chevaux atteints de MPOC dans un état de rémission clinique en les plaçant dans une écurie dont l'environnement était strictement contrôlé.

Pour ce faire, et utilisant les résultats obtenus lors de notre première étude, deux environnements contrôlés ont été comparés à la mise en pâture et au contact avec du foin.

Six chevaux atteints de MPOC ont été utilisés pour cette expérience (8.4 ans et 567 kg de moyenne). Ils ont été comparés à 6 chevaux sains (6.3 ans et 538 kg de moyenne). Toutes les manipulations ont été effectuées sur chevaux non tranquilisés et placés dans un travail. Les animaux étaient préalablement familiarisés avec les différentes techniques utilisées.

Outre l'examen clinique, des tests de fonction pulmonaire comprenant l'évaluation de la mécanique ventilatoire et des mesures de gaz sanguins artériels ont été effectués au terme des quatre périodes étudiées.

Le dispositif nécessaire aux mesures de mécanique ventilatoire est représenté schématiquement dans la figure 2.4. Grâce au pneumotachographe, on estime quantitativement le débit d'air entrant et sortant lors de chaque cycle respiratoire. Le pneumotachographe utilisé est de type Fleish n° 4. Il est placé de façon hermétique à l'avant du masque que porte l'animal. La calibration du pneumotachographe est effectuée avant chaque expérience grâce à une seringue de 1 litre. Une sonde placée dans l'oesophage permet la mesure des variations de pression intra-oesophagienne au cours du cycle respiratoire. Ces variations sont, dans l'espèce équine, considérées comme identiques à celles de la pression intra-pleurale (Derksen et Robinson, 1980). En pratique, cette sonde est confectionnée d'un tube souple, de 220 cm de long, en polyéthylène, percé à une extrémité d'une vingtaine d'orifices, ceux-ci étant recouvert d'un préservatif pour éviter toute obstruction. L'autre extrémité du tube est équipée d'un robinet à 3 voies qui est relié à un transducteur de pression. Le positionnement du ballonnet

dans l'oesophage doit être soigneusement standardisé (Derksen et Robinson, 1980). L'enregistrement simultané des débits aériens et des variations de pression pleurale permet de calculer, pour chaque cycle respiratoire, différents paramètres de mécanique ventilatoire. Ces calculs sont effectués automatiquement par un ordinateur, affichés et enregistrés simultanément. Une moyenne est effectuée pour chaque paramètre sur une vingtaine de cycles respiratoires.

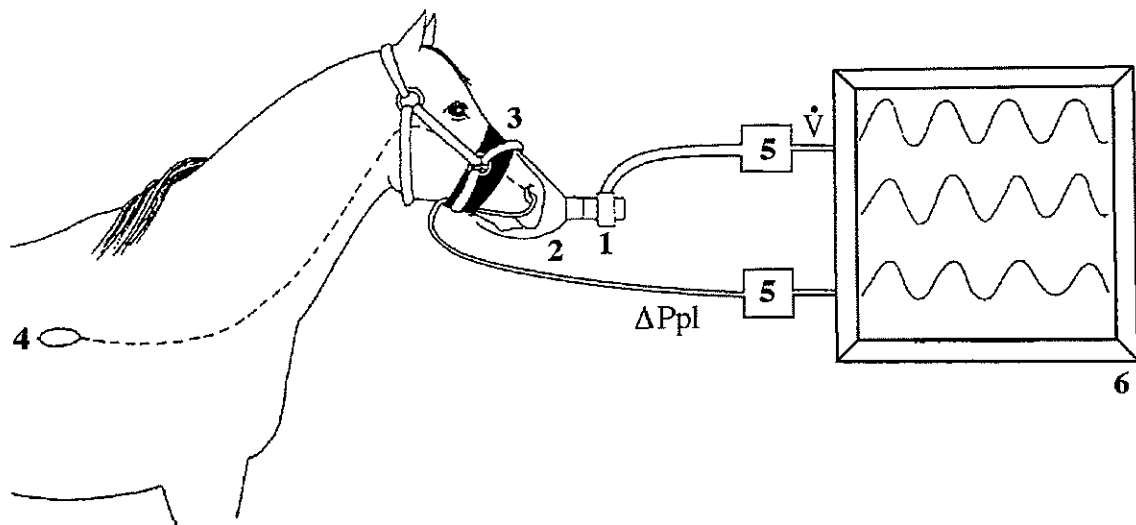


Fig. 2.4. - Dispositif expérimental permettant les mesures de mécanique ventilatoire

1 = pneumotachographe, 2 = masque rigide, 3 = partie élastique permettant l'étanchéité de la partie postérieure du masque, 4 = sonde et ballonnet oesophagiens (tiers postérieur de l'oesophage), 5 = transducteur de pression, 6 = ordinateur, \dot{V} = débit, ΔP_{pl} = variations de pression pleurale.

Les prises de sang artériel sont effectuées par ponction, à la base du poitrail, au niveau d'une des carotides, à l'aide d'une aiguille 20G et d'une seringue préalablement héparinées. L'échantillon ainsi récolté est directement analysé dans un analyseur de gaz sanguin, et les résultats corrigés pour la température rectale.

La première période (*Période A*) représente 2 mois en pâture, sans aucun contact avec du foin et/ou de la paille. Cette période sert à fournir des valeurs de référence correspondant à un état de rémission clinique, qui ne diffère pas de l'état fonctionnel pulmonaire de chevaux sains,

comme cela a été démontré lors de précédentes études (Thomson et McPherson, 1984; Derksen *et al.*, 1985a). La comparaison avec un groupe de chevaux sains a toutefois été effectuée. Au terme de ces 2 mois en pâture, les examens cliniques et les tests ont confirmé que les chevaux atteints de MPOC présentaient une fonction pulmonaire identique à celle des chevaux sains.

Les chevaux ont alors été placés dans une écurie bien ventilée, nourris pendant 6 semaines avec de l'ensilage d'herbe préfanée et mis sur copeaux de bois dépoussiérés (*Période B*). Les mêmes examens ont été effectués au terme de cette période.

La troisième période étudiée (*Période C*) correspond à 6 semaines dans la même écurie, toujours avec pour base alimentaire de l'ensilage d'herbe préfanée. Pendant cette période, les copeaux de bois ont été remplacés par de la paille de qualité identique à celle analysée dans la première étude.

La dernière période étudiée (*Période D*) consistait à remplacer l'ensilage par du foin de bonne qualité. La durée de cette quatrième étape était variable en fonction des individus. En effet, elle prenait fin pour chacun d'entre eux au moment de l'apparition de signes cliniques typiques de la MPOC. En moyenne, les signes de détresse respiratoire sont apparus 8 ± 3 jours (moyenne \pm déviation standard) après le changement de milieu. Après la prise des mesures, les chevaux étaient déplacés dans un environnement contrôlé.

Pour toutes ces périodes en écurie, le changement de litière ainsi que le nettoyage des box étaient effectués journalièrement. Les chevaux pendant l'entretien des locaux étaient sortis pendant une demi-heure en moyenne afin de leur éviter l'inhalation d'agents irritants et d'allergènes qu'induit inévitablement la manipulation des fourrages et de la litière. Les fourrages étaient distribués deux fois par jour à heure fixe, à raison d'environ 5-5.5 kilos de foin et 7 kilos d'ensilage d'herbe préfanée par jour.

Résultats et conclusions

Les résultats de cette étude ont démontré qu'il est possible de maintenir en rémission clinique des chevaux atteints de MPOC dans une écurie, et ce en contrôlant strictement l'environnement. La mise en application des résultats obtenus lors de la première étude est concluante. L'ensilage d'herbe préfanée contenant ± 50 % de matière sèche est un fourrage qui satisfait pleinement sur les plans hygiéniques et qui permet de maintenir des chevaux allergiques en état de rémission clinique. Le choix de la litière doit se faire suivant la même logique : ne rien apporter dans l'environnement du cheval qui puisse l'irriter ou induire une

réaction allergique. Cependant, l'aspect pratique nous impose des choix. Il s'est, en effet, avéré difficile de trouver de la paille de qualité constante. Bien que moins coûteuse à l'utilisation, celle-ci devient donc difficilement recommandable dans le cadre d'un contrôle strict de l'environnement. Au vu de ces résultats et constatations, notre choix s'est donc porté pour les deux études suivantes sur la combinaison ensilage d'herbe préfanée - copeaux de bois dépoussiérés.

2.2. IMPACT D'UN ENVIRONNEMENT CONTRÔLÉ (ENSILAGE D'HERBE PRÉFANÉE ET COPEAUX DE BOIS) SUR LA RÉACTIVITÉ DES VOIES RESPIRATOIRES DE CHEVAUX ATTEINTS DE MALADIE PULMONAIRE OBSTRUCTIVE CHRONIQUE (ETUDE N° 3)

Bien que les tests de fonction pulmonaire aient démontré qu'il est possible de maintenir en rémission clinique des chevaux atteints de MPOC dans une écurie (cfr. Etude n° 2), il était néanmoins légitime de penser qu'un contact permanent, de longue durée avec de faibles quantités d'allergènes et d'irritants tels que la poussière, l'ammoniac, puisse induire des modifications pulmonaires profondes, imperceptibles lors d'un examen clinique ou par des tests classiques de fonction pulmonaire. Le but de cette étude était donc d'évaluer l'impact de l'environnement contrôlé d'écurie sur la sensibilité des voies respiratoires des chevaux atteints de MPOC, et plus particulièrement sur leurs bronches. Pour ce faire, des tests de bronchoprovocation par inhalation de méthacholine ont été effectués sur cinq chevaux atteints de MPOC (âge moyen : 8.5 ans; poids moyen : 567 kg), et ce au terme de trois différentes situations environnementales. Les valeurs ainsi obtenues ont été comparées à celles obtenues pour des individus sains (n = 6; âge moyen : 10.0 ans; poids moyen : 527 kg).

Les tests de bronchoprovocation ont été réalisés au moyen d'un nébuliseur ultrasonique relié à un masque étanche (Fig. 2.5.). La taille des particules de la solution de méthacholine produites par ce nébuliseur a été préalablement évaluée dans un laboratoire¹ équipé pour ce type de mesure. Les particules respirables (dont le diamètre est compris entre 0.5 et 5 µm) produites par le nébuliseur représente 54 % des particules émises, ce qui constitue 93 % de la

¹ Consultatie Pneumologie, Akademisch Ziekenhuis, VUB, Brussels

masse totale des particules administrées. Par cette étude préliminaire, nous avons donc pu nous assurer que la méthacholine ainsi nébulisée atteignait majoritairement les parties profondes du poumon.

La provocation d'une bronchoconstriction exige des précautions : (a) de fortes réactions doivent pouvoir être coupées immédiatement à l'aide d'un antagoniste spécifique; (b) l'administration de l'agent bronchoconstricteur doit être menée de manière à limiter au maximum les risques de réactions brutales. De plus, il est nécessaire de standardiser l'importance et la durée du stimulus ainsi que la méthode d'administration, tout en sachant que, même si la taille des particules nébulisées est connue, le dépôt et la répartition d'un aérosol dans les voies aériennes dépendent de facteurs individuels et sont donc, dans une certaine proportion, imprévisibles.

La connaissance de ces différents critères nous a donc poussé à choisir soigneusement l'agent bronchoprovocateur. Traditionnellement, les expériences déjà effectuées chez les chevaux l'étaient grâce à des agents largement utilisés en médecine humaine tels que la méthacholine, l'histamine, le carbacol ou l'acide citrique. Elles ont permis de démontrer que, lors d'une crise induite par l'inhalation de poussière de foin, les chevaux atteints de MPOC présentent une sensibilité exacerbée des voies respiratoires (Derksen *et al.*, 1985a; Armstrong *et al.*, 1986; Klein et Deegen, 1986; Doucet *et al.*, 1991; Fairbain *et al.*, 1993) et que celle-ci est liée aux signes inflammatoires (Derksen *et al.*, 1985b; Fairbain *et al.*, 1993). La mise en pâture de ces chevaux permet une diminution progressive de cette hyperréactivité qui ne diffère plus de la réactivité de chevaux sains au bout d'un certain temps (Derksen *et al.*, 1985a; 1985c; Armstrong *et al.*, 1986; Fairbain *et al.*, 1993). Toutes ces études utilisaient des techniques ou des agents provocateurs différents. Dans notre étude, nous avons choisi une méthode largement recommandée en médecine humaine (Cockcroft *et al.*, 1977) que nous avons adaptée suivant nos concepts expérimentaux à savoir limiter au maximum toutes les manipulations invasives et stressantes pour l'animal ainsi que les situations pouvant mettre en danger sa vie ou sa santé.

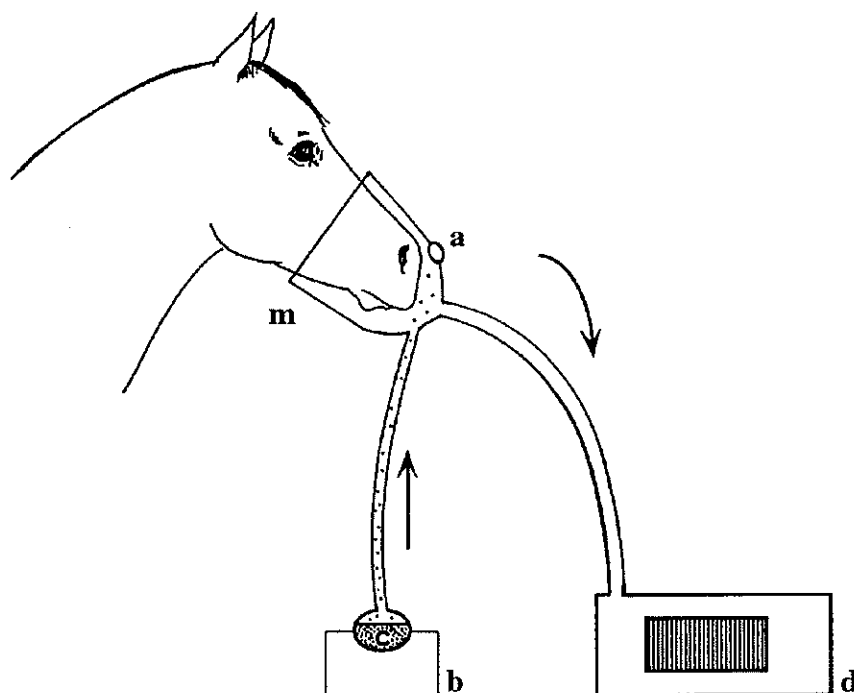


Fig. 2.5. - Dispositif expérimental utilisé dans cette étude n° 3.

a = valve unidirectionnelle inspiratoire permettant un apport supplémentaire en air ambiant suivant les besoins du cheval; b = nébuliseur ultrasonique; c = solution à nébuliser (4 ml), contenue dans une cupule; d = dispositif permettant de filtrer l'air expiré par le cheval pour éviter toute contamination de l'air ambiant.

Le choix de l'agent provocateur s'est porté sur la méthacholine pour plusieurs raisons. D'une part, il est largement démontré que le système parasympathique est le principal mécanisme bronchoconstricteur chez les mammifères, y compris le cheval (Broadstone *et al.*, 1991; LeBlanc *et al.*, 1991). De plus, cette bronchoconstriction induite par des agents parasympathicomimétiques est réversible par injection intraveineuse d'atropine (Broadstone *et al.*, 1988). Parmi les agents cholinergiques, la méthacholine (acétyl- β -méthylcholine) semble la plus adéquate pour ce type d'utilisation. En effet, l'acétylcholine est beaucoup trop rapidement hydrolysée par les acétylcholinestérases (Taylor, 1990). Le carbachol, par contre, est totalement résistant à l'hydrolyse, et ce aussi bien par les acétylcholinestérases que par des cholinestérases non spécifiques. Sa durée d'action est donc prolongée, ce qui limite son intérêt dans ce genre de test dû à l'effet cumulatif des doses. La méthacholine, quant à elle, diffère principalement de l'acétylcholine de par sa plus longue durée d'action (due à sa résistance totale à l'hydrolyse par les cholinestérases non spécifiques) et sa sélectivité. En effet, elle a très peu

d'effets, contrairement à l'acétylcholine, sur les récepteurs nicotiniques. Son action est principalement muscarinique et est donc sélectivement antagonisée par l'atropine.

Le principe de ce protocole était donc le suivant : l'administration de l'agent bronchoprovocateur s'est faite de façon standardisée. Son effet était objectivé par des tests de mécanique ventilatoire, tels que décrits précédemment. La dose de provocation était augmentée progressivement, en partant d'une dose minimale, jusqu'à atteindre les modifications fonctionnelles souhaitées, soit une chute d'environ 50 % de la valeur de départ de la compliance dynamique. Toutes les 6 minutes exactement, ces doses croissantes de méthacholine étaient nébulisées pendant 2 minutes. La concentration de méthacholine et le volume à nébuliser étaient scrupuleusement mesurés. Entre la nébulisation de chaque dose, des tests de mécanique ventilatoire étaient effectués pendant environ 3 minutes.

Par interpolation des valeurs moyennes de compliance dynamique à chaque concentration successive de méthacholine, la dose nécessaire pour induire une chute de 35 % de la compliance dynamique ($PC_{35}C_{dyn}$) a été calculée et a servi de base pour la comparaison des différentes périodes expérimentales entre elles.

Résultats et conclusions

Au vu des résultats, il apparaît qu'une stimulation allergénique et irritante de faible intensité mais pendant une longue durée (6 semaines) altère la sensibilité des voies respiratoires profondes des chevaux allergiques, alors qu'aucun signe clinique ou test de fonction pulmonaire ne le laissait présager.

Cette hypersensibilité est significativement moins importante que celle mesurée lors d'une crise aiguë. Néanmoins cette augmentation de la sensibilité des voies respiratoires signifie qu'un stimulus de plus faible intensité, qu'il soit spécifique ou non spécifique, suffira à provoquer une réaction bronchospastique. Force est donc de constater qu'un contrôle strict de l'environnement dans une écurie (ensilage d'herbe préfanée - copeaux de bois) ne permet une protection suffisante des voies respiratoires et qu'il n'est dès lors pas possible de considérer cette solution comme aussi bonne que la mise en pâture.

Cette expérience nous permet également de constater que les tests de bronchoprovocation sont plus sensibles que les tests de fonction pulmonaire pour mettre en évidence une altération des voies respiratoires profondes.

2.3. ETUDE DE LA DISTRIBUTION DE LA VENTILATION CHEZ LE CHEVAL ATTEINT DE MALADIE PULMONAIRE OBSTRUCTIVE CHRONIQUE ET INFLUENCE DU CONTRÔLE DE L'ENVIRONNEMENT SUR LA VENTILATION

(ETUDE N° 4)

Une étude précédemment menée dans notre laboratoire avait permis d'étudier la distribution spatio-temporelle de la ventilation chez des chevaux de course à l'entraînement (Rollin *et al.*, 1997). Pour la première fois, l'utilisation d'un mélange gazeux comprenant 20 % d'oxygène (O₂) et 80 % d'argon (Ar) permettait d'effectuer des rinçages de l'azote alvéolaire en respirations multiples sans déprimer la respiration, et ce sur chevaux non anesthésiés mais tranquilisés.

La même méthode expérimentale d'analyse a été appliquée dans notre étude sur 6 chevaux atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique. Les chevaux, familiarisés aux techniques de laboratoire, n'ont pas dû être tranquilisés pour l'expérience. Ce protocole a été répété à trois reprises pour chaque individu afin d'étudier l'effet de différents environnements, sur leur ventilation et sa distribution spatiale. Dans un premier temps, les chevaux ont été étudiés au terme de deux mois passés en pâture sans aucun contact avec des fourrages ou litières (*Période A*). Ensuite, ils ont été maintenus en écurie pendant deux mois, durant lesquels ils ont été nourris exclusivement avec de l'ensilage d'herbe préfanée et placés sur copeaux de bois (*Période B*). Au terme de cette période, l'expérience et les mesures ont été renouvelées. Enfin, ils ont été étudiés en état de crise aiguë, induite par la mise en box en présence de foin et de paille (*Période C*). Un examen clinique et des tests de fonction pulmonaire (mécanique ventilatoire et analyse des gaz sanguins artériels) ont été effectués avant chaque test pour chaque cheval.

Le dispositif expérimental (Fig. 2.6.) consistait en un masque facial parfaitement étanche sur lequel était adapté un pneumotachographe, nécessaire pour mesurer le débit. S'ajoutait une valve géante de Hans-Rudolph à laquelle était raccordée, du côté inspiratoire, une valve bidirectionnelle sur laquelle était fixé un ballon rempli d'un mélange gazeux contenant 20 % d'O₂ et 80 % d'Ar. Ce ballon inspiratoire était continuellement approvisionné en gaz à partir d'une bonbonne au cours de l'expérience. Du côté expiratoire de la valve de Hans-Rudolph était fixé une autre valve à trois voies prolongée d'un ballon servant à récolter les gaz expirés pendant l'expérience. La mesure de la concentration moyenne en azote dans ce ballon ainsi que du volume expiré durant la période de récolte permet le calcul de la capacité résiduelle

fonctionnelle (FRC) qui représente le volume de gaz restant dans les poumons après une expiration normale. Un capillaire placé dans le masque devant le nez du cheval et raccordé à un spectromètre de masse permet de mesurer en continu les concentrations en azote (N_2) et en Ar. Les signaux de débit et de concentration en N_2 et Ar étaient enregistrés sur un enregistreur magnétique avant d'être traités comme précédemment décrit (Rollin *et al.*, 1996).

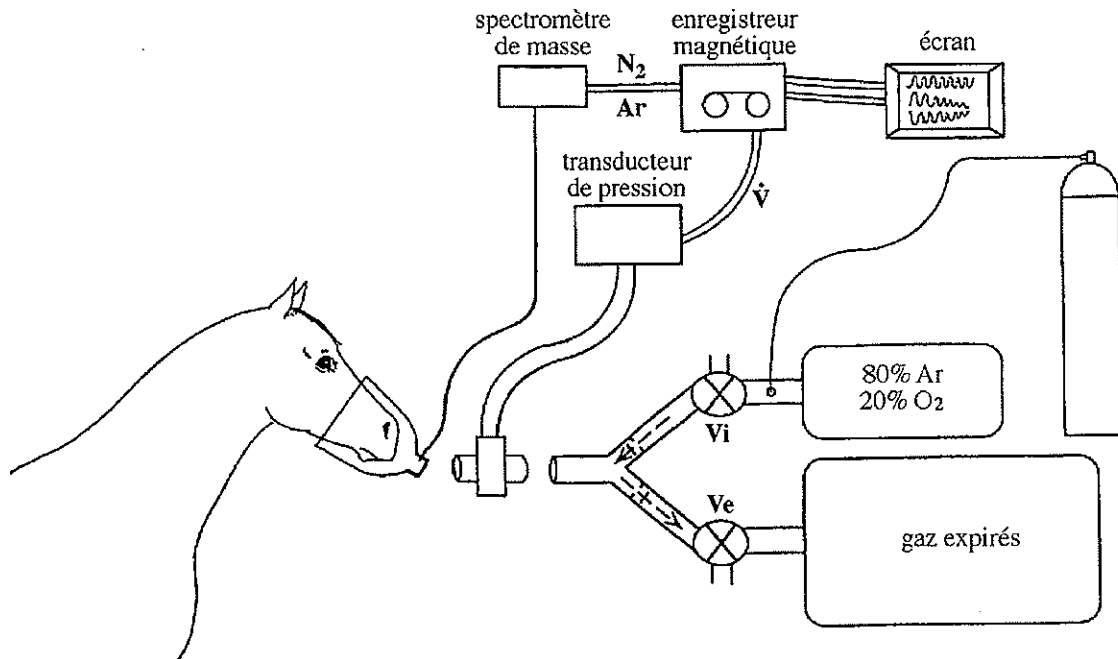


Fig. 2.6. - Dispositif expérimental utilisé dans l'étude n° 4.

Vi = valve inspiratoire; Ve = valve expiratoire; \dot{V} = débit; N_2 = azote; Ar = argon

Au cours d'une période de respiration stable et calme, la valve bidirectionnelle inspiratoire a été ouverte vers le ballon inspiratoire pendant une expiration, de manière à débiter le rinçage de l' N_2 alvéolaire (washout) lors de l'inspiration suivante. Durant cette dernière, la valve expiratoire était dirigée vers le ballon expiratoire pour collecter les gaz expirés.

Dans le but de doubler facilement la quantité d'informations disponibles, la procédure inverse (washin) était à chaque fois enregistrée après le washout.

Pour chaque expiration, la concentration en N_2 en fin d'expiration (FET_{N_2}) a été mesurée. Le logarithme de ces FET_{N_2} a été rapporté au volume expiré cumulé ($\sum VE$) afin de

calculer le *slope ratio* qui représente le rapport entre deux pentes, la première établie entre 100 et 50 % (dénominateur) et l'autre entre 50 et 10 % (numérateur) de la valeur de FET_{N_2} de la première respiration du rinçage.

La FRC a été calculée à partir de la quantité de N_2 expiré dans le ballon expiratoire divisée par la différence de concentration moyenne de N_2 expiré lors de l'expiration précédant le début du rinçage et la dernière expiration récoltée dans le ballon. L'espace mort du dispositif expérimental estimé à 1000 ml (Rollin *et al.*, 1997), a été soustrait du volume ainsi calculé. Les valeurs de FRC n'ont pas été divisées par le poids des animaux car celui-ci différerait de façon parfois importante chez le même individu entre les trois périodes étudiées. En effet, la variation de l'embonpoint n'est pas source de modifications des valeurs de la FRC en absolu. Ne peuvent donc être comparés entre eux que des animaux présentant un état d'embonpoint similaire.

Résultats et conclusions

Le fait de ne pas tranquilliser les chevaux pour cette expérience représente sans conteste une approche plus correcte de l'étude de la ventilation. Cependant, des modifications et des irrégularités de la respiration inhérentes aux manipulations en cours d'expérience (toux, apnée) nous ont contraints à ne pas prendre en compte certains résultats, ce aussi bien pour le calcul du *slope ratio* que pour le calcul de la FRC.

La mesure du *slope ratio* envisagée pour les mêmes individus dans trois situations environnementales différentes nous permet de constater qu'il n'existe pas de différence significative quant à la distribution spatiale de la ventilation entre la rémission clinique suite à la mise en pâture et un séjour en box sous environnement protégé (écurie avec ensilage d'herbe et copeaux de bois). Par contre, lors d'une crise aiguë, les bronchospasmes accompagnés des phénomènes hypersécrétoires et inflammatoires typiques de la phase aiguë de l'affection induisent une altération significative de la distribution spatiale de la ventilation.

Quant à l'information qu'apporte la mesure de la FRC, la technique du rinçage de l'azote alvéolaire en respirations multiples présente des limites qui peuvent influencer les résultats obtenus. En effet, cette méthode ne prend en compte que les gaz participant aux échanges gazeux. Lors de bronchospasmes et de phénomènes obstructifs liés à l'hypersécrétion et à l'inflammation, une partie des gaz contenus dans les poumons sont très probablement emprisonnés et ne peuvent donc participer aux échanges. Ces gaz ne sont dès lors pas pris en

compte dans les mesures et, de par ce fait, induisent des erreurs d'estimation du volume de gaz restant dans les poumons en fin d'expiration normale. Les valeurs de FRC observées dans notre étude sont, d'une part, fort changeantes suivant les individus et, d'autre part, vont à l'encontre des résultats obtenus en médecine humaine chez des patients souffrant de syndrome obstructif. En effet, lors d'asthme ou de bronchite chronique, une augmentation de la FRC est habituellement constatée. Il convient de préciser que la mesure se fait de façon plus précise et correcte, en médecine humaine, par la pléthysmographie (Dubois *et al.*, 1956). La seule mesure effectuée par pléthysmographie chez un cheval atteint de MPOC anesthésié avait également montré une augmentation de la FRC par rapport à des chevaux sains (Leith et Gillespie, 1971). La FRC est le reflet du rapport qui existe entre les forces élastiques antagonistes du thorax et des poumons eux-mêmes. Une augmentation de cette FRC reflète donc une certaine perte de la détente élastique pulmonaire.

Une autre source d'erreur potentielle dans la mesure de la FRC dans l'espèce équine est la variabilité du volume tidal, et ce même lors d'une respiration au repos. En médecine humaine, ce type de problème est éliminé par l'apprentissage préalable de chaque patient qui est contraint de respirer de façon constante, à savoir à volume constant. De plus, la particularité des équidés en ce qui concerne leur façon de respirer est également une source potentielle d'erreur de mesure de la FRC. En effet, chaque inspiration et expiration chez le cheval comportent une phase active (musculaire) et une phase passive. Suivant l'importance relative de ces deux phases l'une par rapport à l'autre, la mesure de la FRC peut être modifiée. Toutes ces particularités sont autant de sources d'imprécisions possibles qui, de toute évidence, rendent cette méthode de mesure de la FRC difficilement utilisable chez le cheval atteint de maladie pulmonaire obstructive chronique.

RÉFÉRENCES

- ARMSTRONG P.J., DERKSEN F.J., SLOCOMBE R.F., ROBINSON N.E. Airway responses to aerosolized methacholine and citric acid in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1986, **133**, 357-361.
- BROADSTONE R.V., SCOTT J.S., DERKSEN F.J., ROBINSON N.E. Effects of atropine in ponies with recurrent airway obstruction. *J. Appl. Physiol.*, 1988, **65**, 2720-2725.
- BROADSTONE R.V., LEBLANC P.H., DERKSEN F.J., ROBINSON N.E. *In vitro* responses of airway smooth muscle from horses with recurrent airway obstruction. *Pulm. Pharmacol.*, 1991, **4**, 191-202.
- CLARKE A.F. A review of environmental and host factors in relation to equine respiratory disease. *Equine vet. J.*, 1987, **19**, 435-441.
- COCKCROFT D.W., KILLIAN D.N., MELLON J.J.A., HARGREAVE F.E. Bronchial reactivity to inhaled histamine : A method and clinical survey. *Clin. Allergy*, 1977, **7**, 235-243.
- DERKSEN F.J., ROBINSON N.E. Esophageal and intrapleural pressures in the healthy conscious pony. *Am. J. Vet. Res.*, 1980, **41**, 1756-1761.
- DERKSEN F.J., ROBINSON N.E., ARMSTRONG P.J., STICK J.A., SLOCOMBE R.F. Airway reactivity in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *J. Appl. Physiol.*, 1985a, **58**, 598-604.
- DERKSEN F.J., SCOTT J.S., MILLER D.C., SLOCOMBE R.F., ROBINSON N.E. Bronchoalveolar lavage in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1985b, **132**, 1066-1070.
- DERKSEN F.J., SCOTT D., ROBINSON N.E., SLOCOMBE R.F., ARMSTRONG P.J. Intravenous histamine administration in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. J. Vet. Res.*, 1985c, **46**, 774-777.
- DOUCET M.Y., VRINS A.A., FORD-HUTCHINSON A.W. Histamine inhalation challenge in normal horses and in horses with small airway disease. *Can. J. Vet. Res.*, 1991, **55**, 285-293.
- DUBOIS A.B., BOTELHO S.Y., BEDELL G.N., MARSHALL R., COMROE J.H. A rapid plethysmographic method for measuring thoracic gas volume : a comparison with a nitrogen washout method for measuring functional residual capacity in normal subjects. *J. Clin. Invest.*, 1956, **35**, 322-326.
- ERIKSEN L. Studies on *Micropolyspora faeni* and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). In : *Lung Function and Respiratory Diseases in the Horse*, (International Symposium in Hannover, Germany, 27th-29th June 1985), Deegen E., Beadle R.E. (Eds), Calw, Germany : Hippiafrika Verlagsgesellschaft, 1986, p. 32-34.
- FAIRBAIRN S.M., LEES P., PAGE C.P., CUNNINGHAM F.M. Duration of antigen-induced

- hyperresponsiveness in horses with allergic respiratory disease and possible links with early airway obstruction. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 1993, **16**, 469-476.
- GORDON R.E., SMITH M.M. Proposed group of characters for the separation of *Streptomyces* and *Nocardia*. *J. Bacteriol.*, 1955, **69**, 147-150.
- GREGORY P.H., LACEY M.E. Mycological examination of dust from mouldy hay associated with farmer's lung disease. *J. gen. Microbiol.*, 1963, **30**, 75-88.
- KLEIN H.-J., DEEGEN E. (1986). Histamine inhalation provocation test : methods to identify nonspecific airway reactivity in equids. *Am. J. Vet. Res.*, 1986a, **47**, 1796-1800.
- KOSAKIEWICZ Z., SMITH D. Physiology of *Aspergillus*. In : *Aspergillus* [Series : Biotechnology Handbooks 7 (1994)], Smith J.E. (Ed.), New York : Plenum Press, 1994, p. 23-40.
- KURUP V.P., FINK J.N. A scheme for the identification of thermophilic actinomycetes associated with hypersensitivity pneumonitis. *J. Clin. Microbiol.*, 1975, **2**, 55-61.
- LACEY J., DUTKIEWICZ J. Methods for examining the microflora of mouldy hay. *J. Appl. Bacteriol.*, 1976, **41**, 13-27.
- LAWSON G.H.K., MCPHERSON E.A., MURPHY J.R., NICHOLSON J.M., WOODING P., BREEZE R.G., PIRIE H.M. The presence of precipitating antibodies in the sera of horses with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Equine vet. J.*, 1979, **11**, 172-176.
- LEBLANC P.H., BROADSTONE R.V., DERKSEN F.J., ROBINSON N.E. *In vitro* responses of distal airways in horses with recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.*, 1991, **52**, 999-1003.
- LEITH D., GILLESPIE J.R. Respiratory mechanics of normal horses and one with chronic obstructive lung disease. *Fed. Proc.*, 1971, **30**, 556.
- LIPPMANN M. "Respirable" dust sampling. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1970, **31**, 138-159.
- MCPHERSON E.A., LAWSON G.H.K., MURPHY J.R., NICHOLSON J.M., BREEZE R.G., PIRIE H.M. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in horses : aetiological studies: responses to intradermal and inhalation antigenic challenge. *Equine vet. J.*, 1979, **11**, 159-166.
- ROLLIN F., DESMECHT D., VERBANCK S., VAN MUYLEM A., LEKEUX P., PAIVA M. Multiple-breath washout and washin experiments in steers. *J. Appl. Physiol.*, 1996, **81**, 957-963.
- ROLLIN F., DESMECHT D., ART T., VANDENPUT S., VERBANCK S., VAN MUYLEM A., LOMBA F., LEKEUX P., PAIVA M. Multiple-breath washout and washin experiments in Standardbred horses. 1997, soumis pour publication.
- SASSE H.H.L., BOERMA S., SMOLDERS F.A.A. The relationship between pulmonary function tests and other parameters. Results of a research project into the etiology of C.O.P.D. in horses. In : *Lung Function and Respiratory Diseases in the Horse*,

(International Symposium in Hannover, Germany, 27th-29th June 1985), Deegen E., Beadle R.E. (Eds), Calw, Germany : Hippatrika Verlagsgesellschaft, 1986, p. 46-48.

TAYLOR P. Cholinergic agonists. In : *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Goodman Gilman A., Rall T.W., Nies A.S., Taylor P. (Eds), New York : Pergamon Press, Inc., 1990, p. 122-130.

THOMSON J.R., MCPHERSON E.A. Effects of environmental control on pulmonary function of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. *Equine vet. J.*, 1984, **16**, 35-38.

UNIVERSITÉ DE LIÈGE
FACULTÉ DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE
SERVICE DE PHYSIOLOGIE

EFFETS DE LA COMPOSITION EN AÉROALLERGÈNES ET EN
POUSSIÈRE RESPIRABLE DANS LES FOURRAGES ET LITIÈRES
SUR LA FONCTION PULMONAIRE DES CHEVAUX ATTEINTS DE
MALADIE PULMONAIRE OBSTRUCTIVE CHRONIQUE

SANDRINA VANDENPUT

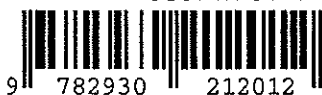
THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

ANNÉE ACADÉMIQUE 1997-1998

Presses de la Faculté de Médecine Vétérinaire
de l'Université de Liège - B-4000 Liège Belgique

D 97-0480-38

ISBN 2-930212-01-2



TROISIÈME PARTIE :
Présentation systématique des expérimentations

**AIRBORNE DUST AND AEROALLERGEN CONCENTRATIONS IN
DIFFERENT SOURCES OF FEED AND BEDDING
FOR HORSES**

VANDENPUT S.¹, ISTASSE L.², NICKS B.³ AND LEKEUX P.¹

Vet. Quart., 1997, **19**, 154-158

¹ Laboratory for Functional Investigation, Department of Physiology

² Department of Nutrition

³ Department of Hygiene and Bioclimatology

Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Liege, Belgium

SUMMARY

Standardized methods were used to make quantitative and qualitative assessments of respirable dust and aeroallergens in feed and bedding for horses. Concentrations of airborne dust were measured by using a Rion particle counter, and levels of major aeroallergens implicated in chronic obstructive pulmonary disease were measured by using an Andersen sampler. Laboratory conditions allowed comparison of the different sources of forage, supplements, and bedding without external influences such as ventilation, external temperature and horse activity affecting the result. Grass silages of approximately 50 % dry matter and alfalfa pellets appeared to be very good sources of forage with low levels of dust and aeroallergens. The studied good quality straw was significantly less dusty with fewer allergens than the wood shavings. Supplements, such as whole grains and molassed concentrates, contained many respirable particles and aeroallergens. Rolled grains were significantly more dusty than good hay.

INTRODUCTION

Breathing exposes the lungs to a complex and dynamic mixture of gaseous and particulate pollutants. The potential mechanisms of injury are diverse, as are the resulting diseases, and the adverse effects on health may be immediate or delayed. The short-term athletic ability and long-term welfare of horses are largely dependent on their respiratory well-being. Health hazards arising from the inhalation of airborne dust depend on the concentration of particles as well as on their physical, chemical, and/or biological properties (Lippmann, 1970). Correlations between concentrations of airborne dust in horse stables and pulmonary diseases have been widely studied in recent years. High concentrations of airborne dust are reported to increase the severity (Clarke *et al.*, 1987) and duration (Burrell, 1985) of subclinical lower respiratory tract inflammation (LRTI), a covert disease frequently associated with the poor performance syndrome. In particular, horses suffering from chronic obstructive pulmonary disease (COPD) require strict environmental control. For these horses, acute exacerbation of the disease is induced by contact with the stable environment and hay. This common syndrome is probably an allergic response to airborne antigens which are constituents of stable and hay dust, including *Faenia rectivirgula* [previously named *Micropolyspora faeni* (Wayne, 1986)] and *Thermoactinomyces vulgaris*, two thermophilic actinomycetes, and *Aspergillus fumigatus* (McPherson *et al.*, 1979; Derksen *et al.*, 1988; McGorum *et al.*, 1993).

Environmental management to control equine respiratory disease aims to minimize exposure to stable dust throughout the horse's life. Different studies have determined the concentrations of dust and allergens in stables (Woods *et al.*, 1993; Dunlea and Dodd, 1994; Raymond *et al.*, 1994). It is clear that airborne dust concentrations are significantly greater around the horse's nostrils (breathing zone) than in the stall (Woods *et al.*, 1993). Because ventilation does not remove the dust challenge from the horse's nostrils when the animal is eating and sniffing, changing the source material is the only way to decrease respirable dust levels (Woods *et al.*, 1993). Bearing this in mind, studying respirable dust and aeroallergen concentrations in different sources of feed and bedding seems to be the best approach to evaluate alternative materials to decrease toxic, irritant, and allergic reactions to stable conditions.

The aim of this study was therefore to report a standardized method to assess, both qualitatively and quantitatively, aerosol pollution from forage, bedding, and supplements, that

are commonly used in equine management. Respirable dust is, by definition, the fraction of airborne particles that reaches the peripheral airways (Lippmann, 1970). It is therefore considered as a good index to evaluate the health hazard of airborne dust inhalation (Lippmann, 1970). In this study, the concentration of dust liberated from samples was measured under standard conditions and the antigenic burden, represented by the three major allergens incriminated in COPD, was assessed.

MATERIAL AND METHODS

Samples analysed

The materials studied were chosen because of their frequent use in equine management. The forages studied were grass hays (both good and dusty), grass silages, and alfalfa pellets. The good quality grass hay contained approximately 84 % dry matter (D.M.) and was not dusty when shaken. Dusty hay came from the same source as good quality hay, but the bale had been moistened twice, then left for two months, after which, large areas of moisture were observed inside the bale and a dust cloud was liberated on handling. A grass silage, containing approximately 78 % D.M., was compared with three commercial grass silages, approximately 50 % D.M. (HorseHage[®], Mark Westaway and Son, Devon, England; HorseDinner[®], Jopack, Moorsele, Belgium, and Préfané Liégeois[®], Mortier, Belgium). The characteristics of these three commercial silages are shown in Table 1. Although they may have been some quantitative and qualitative differences between these three silages, they were considered as a group because they were markedly different from the other forages studied. The three commercial silages represented different qualities inherent to different production systems.

The bedding materials studied were straw, flax straw (Equilin[®], Lamerant, Leneubourg, France), and wood shavings (Plomp[®], Waarden, the Netherlands). Straw from two different sources was investigated. Both were of good quality, well stored, and not dusty when handled. The flax straw and wood shavings were commercially pre-packaged especially for horses. Each of the studied samples was collected from a different package or bale.

Three types of supplement were studied : whole grains of spelt, a mixture of rolled grains of barley (50 %) and oats (50 %), and molassed concentrates (Mélange Chevaux Extra n° 1, Ets Mathy, Remouchamps, Belgium).

Table 1 - Description of the commercial grass silages used for quantitative and qualitative measurements (Mean \pm standard deviation)

Composition	Cutting stage	Respirable dust particles/litre of air	<i>A. fumigatus</i> cfu/42.45 l of air	<i>F. rectivirgula</i> cfu/42.45 l of air	<i>T. vulgaris</i> cfu/42.45 l of air
HorseHage® rye-grass ± 49 % D.M.	growth	3556 \pm 1840 a	102 \pm 49 a	14 \pm 4 a	73 \pm 24 a
Horse Dinner® rye-grass ± 48 % D.M.	flowering	4373 \pm 1992 a	463 \pm 182 b	19 \pm 11 a	35 \pm 17 ab
Préfané Liégeois® grass ± 50 % D.M.	growth	5376 \pm 1305 b	242 \pm 49 c	11 \pm 9 a	18 \pm 5 b

Values with no common designations are significantly different ($p < 0.05$) (Mann-Whitney test); cfu = colony forming units.

Sampling technique

The liberation and sampling of airborne dust and allergen from samples was standardized as follows : for each measurement, 100 g of the sample was placed in a sample chamber (1 m high, 25 cm inside diameter) through which there was a constant flow of air (200 litres/min). The samples were taken directly from the batches and very carefully placed in the sample chamber to avoid differences due to handling. The liberated dust cloud passed into a 2 m³ hermetic chamber containing the measuring apparatus for 3 minutes before sampling started in the fourth minute. The airflow was maintained throughout the measurement period. The entire apparatus was placed in a room with a temperature of $18 \pm 2^\circ \text{C}$ and a relative humidity of $60 \pm 5 \%$.

Between samples, the chambers were cleaned with a vacuum cleaner. Thus, air was totally removed and changed. Before each study day, the residual airborne dust in the hermetic chamber was sampled to ensure a constant basal level of airborne dust. Only one type of material was studied each day to avoid cross-contamination. Dust and spore concentrations from each material were measured simultaneously.

Measurement of total respirable dust

Dust particles were counted and sized with an optical particle counter, the Rion KC-01B (Hawksley & Sons, Lancing, Sussex). Particles were identified by using a light scattering technique; there were five size ranges : 0.3 - 0.5 μm , 0.5 - 1 μm , 1 - 2 μm , 2 - 5 μm , and 5 μm and above. The counter was positioned at the centre of the 2 m³ chamber. One litre of air was sampled for each measurement. The experiment was repeated 17 to 22 times for each type of material. Only the respirable dust fraction (between 0.5 and 5 μm) was analysed. This fraction corresponds to the portion of the inspirable dust particles that are able to penetrate beyond the terminal bronchi. The Rion counter was recalibrated by Hawksley & Sons after every 1,000 hours of use, using reference particle aerosols of known size.

Determination of spore concentrations

An Andersen sampler (Andersen samplers, Inc., Atlanta, Georgia), with appropriate nutrient media, was used for determining the number of viable airborne particles, as described

below. It consists of a series of six impactor plates, each perforated with a regular pattern of 400 holes, spaced evenly above the surface of a nutrient agar medium in a Petri dish (Andersen, 1958). The holes were of uniform size within each stage, but decreased in size with each succeeding stage. Air was drawn through the device at the rate of one cubic foot per minute (28.3 l/min) for 90 seconds precisely, using a small vacuum pump. The particle-bearing air was impacted directly onto the media surface. The sampling period was chosen to prevent overloading of the plates. After a sample was drawn through the instrument, the Petri dishes were incubated at 46° C for 3 days for *A. fumigatus* and at 56° C for 5-6 days for the two actinomycetes before colonies were counted. *Aspergillus fumigatus* was isolated on 2 % malt extract agar containing 20 iu penicillin/ml, 40 iu streptomycin/ml (Gregory *et al.*, 1963) and 0.05 per cent Triton N-101 (Sigma-Aldrich Corp., USA). The non-ionic surfactant Triton N-101 was used to decrease the radial growth rate of fast-growing fungi (Madelin, 1987). The two thermophilic actinomycetes were isolated on nutrient agar supplemented with 0.2 % casein hydrolysate and with cycloheximide, at 50 µg/ml, to inhibit fungi (Lacey and Dutkiewicz, 1976b).

Identification and counting of colonies

A simple microscopic examination does not allow the specific identification of spores (Lacey and Dutkiewicz, 1976a). Culture techniques with special media and a high incubation temperature allow only a small proportion of potentially relevant species to grow (Madelin, 1989). For the two actinomycetes, in addition to cultural and microscopic morphology, each strain was subjected to an array of biochemical tests. These tests were carried out according to the methods of Kurup and Fink (1975) and included decomposition of hypoxanthine, casein, starch, and esculin. These tests allowed identification of strains of *F. rectivirgula* and *T. vulgaris* from other thermophilic species. *Aspergillus fumigatus* is known to grow at temperatures between 12 and 65° C but has optimum growth at 42° C (Lacey and Magan, 1991). To minimize the growth of other thermophilic *Aspergillus* species, we incubated plates at 46° C. The selective temperature, macroscopic colour and appearance of the colony, and a simple examination under light microscopy were sufficient to differentiate this species from others.

Statistics

Since airborne dust concentrations were not normally distributed (Ayer, 1989), the data are expressed as geometric means and non-parametric statistics were applied. The Mann-Whitney rank-sum test was used with confidence limits of 0.05.

RESULTS

Use of the standardized methods allowed comparison of the respirable dust burden and the quantities of specific allergens present in different types of feed and bedding sources. All the results are presented in Table 2.

Quantitative measurements

The number of respirable particles liberated by the dusty hay (mean $6.88 \pm 1.44 \times 10^5$ particles/litre of air) was tenfold greater than that from the good quality hay (mean $6.30 \pm 3.00 \times 10^4$ particles/litre of air). The different types of grass silage and alfalfa pellet feed all yielded significantly fewer respirable dust particles than the good hay, with grass silages of approximately 50 % D.M. yielding significantly fewer particles than all the others. Of all the beddings studied, wood shavings, even though specifically sold for horses, liberated significantly more respirable particles than many of the other materials studied. Nevertheless, wood shavings were significantly less dusty than good hay. There was no significant difference between good quality straw and flax straw.

The mixture of rolled grains of barley (50 %) and oats (50 %) was significantly more dusty than the other feed supplements and the good hay. However, the quantity of respirable particles liberated from molassed concentrates was not significantly different from that liberated from whole grains of spelt.

Table 2 - Respirable dust particles per litre of air and concentrations of viable spores (colony forming units (cfu) in 1.5 cubic foot of air) of *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*), *Faenia rectivirgula* (*F. rectivirgula*) and *Thermoactinomyces vulgaris* (*T. vulgaris*) in different types of bedding and supplement (Mean \pm standard deviation)

	Respirable dust particles/litre of air	<i>A. fumigatus</i> cfu/42.45 l of air	<i>F. rectivirgula</i> cfu/42.45 l of air	<i>T. vulgaris</i> cfu/42.45 l of air
Good hay	63038 \pm 30033 a	852 \pm 238 a	131 \pm 52 a	139 \pm 51 a
Silage 78 % D.M.	8775 \pm 2514 b	489 \pm 276 ab	73 \pm 50 a	93 \pm 30 a
Silages \pm 50 % D.M.	4488 \pm 1932 c	193 \pm 179 bc	15 \pm 9 b	49 \pm 36 b
Alfalfa pellets	9510 \pm 4404 b	110 \pm 108 c	5 \pm 2 c	18 \pm 8 c
Wood shavings	31492 \pm 12910 a	710 \pm 124 a	53 \pm 29 a	79 \pm 59 ab
Good straw	11571 \pm 4897 b	402 \pm 214 a	18 \pm 17 ab	33 \pm 17 b
Flax straw	9251 \pm 1776 b	104 \pm 23 b	10 \pm 9 b	60 \pm 13 a
Rolled grains	120321 \pm 30617 a	431 \pm 27 a	76 \pm 68 a	47 \pm 45 ab
Whole grains	4109 \pm 858 b	189 \pm 64 a	5 \pm 2 b	43 \pm 5 a
Molassed concentrates	2093 \pm 613 c	33 \pm 14 b	12 \pm 7 ab	128 \pm 78 b

Values with no common designations are significantly different ($p < 0.05$) (Mann-Whitney test); cfu = colony forming units.

Qualitative measurements

Overall, there were no significant differences between the good hay and the grass silage that contained approximately 78 % D.M. with respect to the three COPD-incriminated allergens. No difference for *A. fumigatus* could be found between grass silage of approximately 78 % D.M. and grass silages of approximately 50 % D.M. However, for the two thermophilic actinomycetes, the number of colony forming units (cfu) liberated by silages with about 50 % D.M. was significantly smaller than that of grass silage of 78 % D.M. or good hay, but was significantly greater than that for alfalfa pellets. The alfalfa pellets contained significantly less of the three studied allergens than the other feeds, except that the *A. fumigatus* content of alfalfa pellets did not differ significantly from that of grass silages with approximately 50 % D.M.

Colonies from the dusty hay could not be quantified because the Petri dishes were overloaded, even when the sampling time was decreased to 5 sec.

Values for wood shavings did not differ significantly from those for straw of good quality. Concentrations of *A. fumigatus* and *F. rectivirgula* were lower for flax straw bedding than for the other sources.

DISCUSSION

More and more practitioners and owners realise that strict control of the horse's environment is necessary to decrease the potential risk, severity, and duration of respiratory diseases. Several approaches can be taken to improve the quality of air breathed by stabled horses. Stable design and management are important for minimising the release of dust, noxious gases, and infectious agents, and for their dilution (Sainsbury, 1981; Clarke, 1987; Webster *et al.*, 1987), but attention needs to be paid to the horse's feed and bedding, which provide the principal sources of dust in stables (Webster *et al.*, 1987). In addition, around the horse's nostrils, concentrations of respirable airborne dust are significantly greater than levels measured elsewhere in the stall (Woods *et al.*, 1993). Because dust measurements *in situ* depend on many variables (Clarke *et al.*, 1987), such as previous activities, the design and ventilation of the stable, laboratory standardized conditions are necessary for qualitative and quantitative assessments of different types of feed and bedding in order to obtain an

accurate estimation of their hygienic quality. Since only the air-dispersible part of the dust contained in the different sources is of interest for respiratory health, we chose to use a constant wind speed to simulate handling and shaking. This method was chosen over manual shaking as it provided a more standardized and reproducible method of creating the dust sample. Washing the samples in water gives a higher estimate of spore numbers than shaking does (Lacey and Dutkiewicz, 1976a). Gregory and Lacey (1963) found that the majority of air-dispersible spores are liberated from a sample during the first three minutes when samples are shaken in a wind tunnel. Therefore we chose to begin measurements at the fourth minute after the start of the flow of air through the sample chamber.

The quantity, composition, and aerodynamic size of dust particles in stable air determine, the inhaled dose, the pathogenicity, and their site of deposition in the respiratory tract, respectively (Webster *et al.*, 1987). The respirable fraction of the dust is considered a good index of the respiratory hazards caused by airborne dust inhalation (Derksen and Woods, 1994) and was chosen as a measure for the quantitative comparison between samples. Respirable particles (0.5 - 5 μm aerodynamic diameter) are small enough to avoid the protective filter of the upper airways and reach the deepest parts of the lung where they are able to initiate inflammatory and/or allergic responses. Qualitative comparisons were focused on the three airborne allergens most frequently implicated in the aetiopathogenesis of COPD. Their spores are of respirable aerodynamic diameter (Lacey and Dutkiewicz, 1976a) and therefore have the potential to penetrate to the lower airways. The isolation of fungi and actinomycetes from suspensions of spores in air, using an Andersen sampler, seems the most satisfactory and reliable method to assess their numbers (Lacey and Dutkiewicz, 1976a; 1976b), but it is essential to use optimal media, inhibitors, and incubation temperatures to obtain growth in culture without large contamination (Corbaz *et al.*, 1963; Kosakiewicz and Smith, 1994).

Microbial and biochemical changes within self-heating hay (Gregory *et al.*, 1964; Festenstein *et al.*, 1965; Lacey and Dutkiewicz, 1976a), dependent on water content, lead to large increases in the number of thermophilic actinomycetes and fungi. This could explain the tenfold increase in respirable particles and the overload of colonies, which prevented qualitative measurements for the dusty hay studied, compared with the number in good quality hay from the same source. Even though the content of the respirable particles in grass silage of approximately 78 % D.M. was highly significantly lower ($p < 0.0001$) than that of good quality hay, qualitative measurements did not differ between these two types of forage. The alfalfa pellets contained fewer allergens than grass silages of ± 50 % D.M. but the use of alfalfa

pellets is not readily accepted by horses and their owners .

In the present work, straw of good quality gave rise to fewer respirable particles than wood shavings, even though the studied samples of wood shavings came from commercial dust free shavings. The dust content of wood shavings was, however, lower than that of the good quality hay. But like hay or any materials of plant origin, the microflora of straw and wood shavings can change rapidly when a high moisture content is combined with a high temperature (Corbaz *et al.*, 1963; Hoover-Litty and Hanlin, 1985; Clarke, 1987; Webster *et al.*, 1993). These factors may explain the discrepancy between our results and those previously reported by others (Clarke, 1987; 1992; Woods *et al.*, 1993).

A recent study showed that stabled horses spend 39 % of their time eating forage and concentrates. Close contact with the litter accounts for 9.5 % of the time when horses are sleep on floor and 4 % or 0.5 % when eat straw and wood shavings, respectively (Thompson, 1995). Because of the time spent eating, alternatives to hay, such as silages, are necessary to control the internal environment. The present results demonstrate that there are alternative sources of forage which are less dusty and which contain fewer aeroallergens than hay. Supplements were not an important source of dust and allergens, except when grains were rolled.

It is commonly recommended that hay and straw are excluded from the environment of horses with COPD and infectious pulmonary disease (Dixon *et al.*, 1995). While totally excluding hay, even of the best quality, is entirely justified, the choice of bedding seems to be more tricky. Indeed, commercial wood shavings are probably more constant in quality although they may sometimes be more dusty than commonly thought. The quality of straw is difficult to estimate and extremely variable, depending mainly on storage conditions. Further studies are necessary to show whether the use of good quality straw is likely to be help maintain COPD horses in clinical remission.

In summary, the present investigations (1) propose a standardized method for the assessment of the qualitative and quantitative content of dust in different feeds and bedding; (2) demonstrate that alternative materials may be used to decrease airborne dust and aeroallergen in the immediate equine environment and contribute to the improvement of horse management.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank I. Sbaï and M. Leblond for technical assistance and Dr J. Olaerts for advice on statistical analyses. We thank the departments of Pr. D.A. Hopwood (John Innes Centre, Norwich, UK) and Dr. E.M.H. Wellington (University of Warwick, Coventry, UK) for providing the *F. rectivirgula* and *T. vulgaris* cultures.

The study was generously funded by the "Ministère de la Région Wallonne".

REFERENCES

- ANDERSEN A.A. New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. *J. Bacteriol.*, 1958, **76**, 471-484.
- AYER H.E. Occupational air sampling strategies. In : *Air Sampling Instruments for Evaluation of Atmospheric Contaminants*, Hering S.V. (Ed.), 7th ed., Cincinnati : American Conference of Governmental Industrial Hygienists, 1989, p. 23.
- BURRELL M.H. Endoscopic and virological observations on respiratory disease in a group of young Thoroughbred horses in training. *Equine vet. J.*, 1985, **17**, 99-103.
- CLARKE A.F. Air hygiene and equine respiratory disease. *In Practice*, 1987, **9**, 196-204.
- CLARKE A.F., MADELIN T.M., ALLPRESS R.G. The relationship of air hygiene in stables to lower airway disease and pharyngeal lymphoid hyperplasia in two groups of Thoroughbred horses. *Equine vet. J.*, 1987, **19**, 524-530.
- CLARKE A.F. Lower respiratory tract diseases. In : *Current Therapy in Equine Medicine 3*, Robinson N.E. (Ed.), Philadelphia : W.B. Saunders Company, 1992, p. 299-336.
- CORBAZ R., GREGORY P.H., LACEY M.E. Thermophilic and mesophilic actinomycetes in mouldy hay. *J. gen. Microbiol.*, 1963, **32**, 449-455.
- DERKSEN F.J., ROBINSON N.E., SCOTT J.S., STICK J.A. Aerosolized *Micropolyspora faeni* antigen as a cause of pulmonary dysfunction in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. J. Vet. Res.*, 1988, **49**, 933-938.
- DERKSEN F.J., WOODS P.S.A. Chronic lung disease in the horse : role of aeroallergens and irritants and methods of evaluation. *Equine Pract.*, 1994, **16**, 11-13.
- DIXON P.M., RAILTON D.I., MCGORUM B.C., TOTHILL S. Equine pulmonary disease : a case control study of 300 referred cases. Part 4 : treatments and re-examination findings. *Equine vet. J.*, 1995, **27**, 436-439.
- DUNLEA A.P., DODD V.A. Measurement of respirable dust levels in horse stables. *Can. Agr. Eng.*, 1994, **37**, 205-209.
- FESTENSTEIN G.N., LACEY J., SKINNER F.A., JENKINS P.A., PEPYS J. Self-heating of hay and grain in Dewar flasks and the development of Farmer's lung antigens. *J. gen. Microbiol.*, 1965, **41**, 389-407.
- GREGORY P.H., LACEY M.E. Liberation of spores from mouldy hay. *Trans. Brit. mycol. Soc.*, 1963, **46**, 73-80.
- GREGORY P.H., LACEY M.E., FESTENSTEIN G.N., SKINNER F.A. Microbial and biochemical changes during the moulding of hay. *J. gen. Microbiol.*, 1963, **33**, 147-174.
- GREGORY P.H., FESTENSTEIN G.N., LACEY M.E., PEPYS J., JENKINS P.A. Farmer's lung disease : the development of antigens in moulding hay. *J. gen. Microbiol.*, 1964, **36**, 429-439.

- HOOVER-LITTY H., HANLIN R.T. The mycoflora of wood chips to be used as mulch. *Mycologia*, 1985, **77**, 721-731.
- KOSAKIEWICZ Z., SMITH D. Physiology of *Aspergillus*. In : *Aspergillus* [Series : Biotechnology Handbooks 7 (1994)], Smith J.E. (Ed.), New York : Plenum Press, 1994, p. 23-40.
- KURUP V.P., FINK J.N. A scheme for the identification of thermophilic actinomycetes associated with hypersensitivity pneumonitis. *J. Clin. Microbiol.*, 1975, **2**, 55-61.
- LACEY J., DUTKIEWICZ J. Methods for examining the microflora of mouldy hay. *J. Appl. Bacteriol.*, 1976a, **41**, 13-27.
- LACEY J., DUTKIEWICZ J. Isolation of actinomycetes and fungi from mouldy hay using a sedimentation chamber. *J. Appl. Bacteriol.*, 1976b, **41**, 315-319.
- LACEY J., MAGAN N. Fungi in cereal grains : their occurrence and water and temperature relationships. In : *Cereal Grain Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage*, Chelkowski J. (Ed.), Amsterdam : Elsevier, 1991, p. 77-118.
- LIPPMANN M. "Respirable" dust sampling. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1970, **31**, 138-159.
- MADELIN T.M. The effect of a surfactant in media for the enumeration growth and identification of airborne fungi. *J. Appl. Bacteriol.*, 1987, **63**, 47-52.
- MADELIN T.M. Aerosol sampling methods appropriate for stables and poultry houses. In : *Aerosol Sampling in Animal Houses*, Wathes C.M., Randall J.M. (Eds), Luxembourg : Commission of the European Communities, 1989, p. 69-74.
- MCGORUM B.C., DIXON P.M., HALLIWELL R.E.W. Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens. *Equine vet. J.*, 1993, **25**, 261-267.
- MCPHERSON E.A., LAWSON G.H.K., MURPHY J.R., NICHOLSON J.M., BREEZE R.G., PIRIE H.M. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in horses : aetiological studies: responses to intradermal and inhalation antigenic challenge. *Equine vet. J.*, 1979, **11**, 159-166.
- RAYMOND S.L., CURTIS E.F., CLARKE A.F. Comparative dust challenges faced by horses when fed alfalfa cubes or hay. *Equine Pract.*, 1994, **16**, 42-47.
- SAINSBURY D.W.B. Ventilation and environment in relation to equine respiratory disease. *Equine vet. J.*, 1981, **13**, 167-170.
- THOMPSON K.N. Alternate bedding materials for horses. *Equine Pract.*, 1995, **17**, 20-23.
- WAYNE L.G. Actions of the Judicial Commission of the International Committee on systematic bacteriology on requests for opinions published in 1983 and 1984. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1986, **36**, 357-358.
- WEBSTER A.J.F., CLARKE A.F., MADELIN T.M., WATHES C.M. Air hygiene in stables. 1 : Effects of stable design, ventilation and management on the concentration of respirable dust.

Equine vet. J., 1987, **19**, 448-453.

WOODS P.S.A., ROBINSON N.E., SWANSON M.C., REED C.E., BROADSTONE R.V.,
DERKSEN F.J. Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two
different management systems. *Equine vet. J.*, 1993, **25**, 208-213.

**ENVIRONMENTAL CONTROL TO MAINTAIN STABLED COPD
HORSES IN CLINICAL REMISSION : EFFECTS
ON PULMONARY FUNCTION**

VANDENPUT S., DUVIVIER D.H., VOTION D., ART T. AND LEKEUX P.

Equine vet. J., **29**, In press

Laboratory for Functional Investigation, Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Liege, Liege, Belgium

SUMMARY

The objective of this study was to test the hypothesis that stabled COPD horses can be maintained in clinical remission by replacing hay by grass silage and bedding firstly made of wood shavings (*Period B*) and of wheat straw (*Period C*) during 6 weeks respectively. At the end of these different periods, the pulmonary function of the horses was objectivated by mechanics of breathing and arterial blood analyses. These results were compared to those measured in clinical remission obtained after two months in pasture (*Period A*). No significant difference was observed between these three periods neither to values obtained for healthy horses placed during 6 weeks in a hay environment. For all that, COPD horses placed in contact with hay in the same barn developed within 8 ± 3 days clinical signs of heaves and significant alterations of their pulmonary function parameters.

LIST OF ABBREVIATIONS

Alphabetical order

bw	body weight
C _{dyn}	dynamic lung compliance
cfu	colony forming units
f	respiratory frequency
ID	inner diameter
max Δ P _{pl}	maximal changes in pleural pressure
OD	outer diameter
PaCO ₂	arterial carbon dioxide partial pressure
PaO ₂	arterial oxygen partial pressure
P _{pl}	pleural pressure
R _L	total respiratory resistance
SD	standard deviation
\dot{V}	respiratory airflow
VE	expired minute volume
V _T	tidal volume

INTRODUCTION

Many owners and practitioners are confronted by practical problems of management for COPD affected horses. This common respiratory disorder of horses is a hypersensitivity response, associated with exposure to inhaled antigens, particularly those found in mouldy hay (Halliwell *et al.*, 1979). In practice, horses with COPD develop clinical signs of airway inflammation and obstruction within several hours of exposure to such hay. The lower airways become obstructed as a result of bronchospasm and accumulation of mucus and exudates. Dust, ammonia and infectious agents are additional factors that are able to exacerbate the effects of allergens on COPD lungs.

This syndrome of inflammation and obstruction is recurrent and can be totally or partially reversed by changing the horse's environment, or by treatment with corticosteroids (Lapointe *et al.*, 1993) or bronchodilators (Murphy *et al.*, 1980; Robinson *et al.*, 1993). Several studies have demonstrated that a low dust environment is the treatment of choice for COPD affected horses (Cook, 1976; Thomson and McPherson, 1984). Consequently, keeping COPD horses at pasture is the easiest method to control the environment and to maintain them in clinical remission. But, unfortunately, sport horses usually need to be housed. Environmental management of stabling conditions is therefore of great concern to many horse owners. For some years, alternative methods have been used in practice to keep COPD horses in clinical remission (Thomson and McPherson, 1984; Woods *et al.*, 1993). In this respect, the usefulness of grass silage has been suggested by field observation. Moreover, in a previous *in vitro* study (Vandenput *et al.*, 1997), it has been demonstrated that this forage does not contain many aeroallergens or dust.

The objective of this study was to assess the use of different types of stable environment and more particularly to study *in vivo* the use of grass silage to maintain COPD horses in clinical remission. Therefore, pulmonary function of COPD horses in different environmental situations was compared with values from healthy horses in order to investigate the best management to maintain COPD horses indoor without acute exacerbation of the disease.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Six horses (age mean \pm SD 8.4 ± 2.2 years, weight mean \pm SD 567 ± 21 kg) with a clinical history of COPD (COPD horses) and 6 horses (age mean 6.3 ± 1.6 years, weight mean \pm SD 538 ± 53 kg) with no history of respiratory disease (controls) were used in this study. The respiratory health status of the control horses was established by clinical examination and pulmonary function tests (mechanics of breathing and blood gas analysis), as well as lack of clinical response to hay and barn challenge, performed in the 10 days prior to commencement of the study.

All the experiments were performed on unsedated horses restrained in stocks and previously well accustomed to the laboratory procedures.

Preliminary study for the selection of COPD horses

Before starting the experimental protocol, the horses were kept at pasture, without contact with hay or barn environment. This induced remission, as shown by the absence of any clinical signs of respiratory dysfunction, as well as by normal lung function and arterial blood gas tensions. Afterwards, they were exposed to a hay and barn challenge to see whether they developed characteristic clinical signs of heaves under this management. The clinical signs of respiratory distress occurred after 6 ± 4 days in COPD horses placed in the barn, with hay. Lastly, reversibility of these symptoms was verified by intravenous administration of 0.02 mg atropine/kg bw (Table 1) (Duvivier *et al.*, 1997) which indicated that a large part of the obstruction was mediated via muscarinic receptor activity (Broadstone *et al.*, 1988). This preliminary study allowed the selection of the 6 COPD horses used.

Table 1 - Maximal change in pleural pressure during tidal breathing ($\max\Delta P_{pl}$), pulmonary resistance (R_L) and dynamic compliance (C_{dyn}) in COPD horses during airway obstruction induced by contact with hay dust, 15 minutes and 60 minutes after administration of 0.02 mg atropine/kg bw (i.v.) (from Duvivier *et al.*, 1997, with permission of the authors). Means \pm standard deviation

	Crisis	15 min	60 min
$\max\Delta P_{pl}$ (cmH ₂ O)	46.9 \pm 13.2	15.9 \pm 6.4	21.8 \pm 12.2
R_L (kPa/L/sec)	0.29 \pm 0.09	0.12 \pm 0.05 ^a	0.15 \pm 0.05 ^a
C_{dyn} (L/kPa)	3.8 \pm 2.4	13.8 \pm 6.3	10.5 \pm 6.3

^a Means with the same superscript are not significantly different.

Experimental protocol

The COPD horses were first tested in clinical remission, i.e. after two months at pasture without any contact with hay or the barn environment (*Period A*). Afterwards, they were housed in a well-ventilated barn and only bedding and feeding were different according to the periods. Three types of indoor environment were successively studied. At the end of each period, pulmonary function tests and arterial blood gas analysis were performed. First, the horses were bedded for 6 weeks on wood shavings (Plomp[®], Waarden, the Netherlands) and fed the grass silage, with approximately 50 % dry matter (Préfané Liégeois[®], Mortier, Belgium) (*Period B*). Secondly, they were bedded for 6 weeks on good quality straw and fed the same quality of grass silage (*Period C*). Lastly, they were housed on good quality straw and fed good quality hay which may be considered as a normal and common method of management (*Period D*). Period D ended when they developed clinical signs of COPD and pulmonary function tests were then performed. The order of the 4 periods was the same for all horses. For each period, the horses underwent a daily clinical examination (character of respiration and respiratory frequency, cardiac and pulmonary auscultation, rectal temperature).

The number of liberated respirable particles, in standardized conditions previously described (Vandenput *et al.*, 1997), was 31,492 \pm 12,910 particles/litre of air for the wood shavings and 11,571 \pm 4,897 particles/litre of air for the wheat straw (mean \pm SD). These results were significantly different. For the number of the three major aeroallergens incriminated in the aetiology of the equine COPD, there was no significant variations between

the wood shavings and the wheat straw (respectively 710 ± 124 and 402 ± 214 colony forming units (cfu)/42.45 litres of air of viable spores of *Aspergillus fumigatus*; 53 ± 29 and 18 ± 17 cfu/42.45 litres of air of viable spores of *Faenia rectivirgula*; 79 ± 59 and 33 ± 17 cfu/42.45 litres of air of viable spores of *Thermoactinomyces vulgaris*). These measurements were performed at the beginning of the corresponding period.

The control tests were performed on healthy horses housed during 6 weeks in the same stable environment as for Period D, i.e. the hay environment.

All studies were made in the same barn with similar ambient temperature, relative humidity and ventilation rate for the different periods. Frequency and time of "mucking out" were the same during all periods. Feed was given twice daily, in the morning and late afternoon. Half an hour of exercise was performed every morning, each day of the week, during the whole experiment.

Pulmonary function measurements

Pleural pressure (Ppl) was measured by means of an oesophageal catheter (Derksen and Robinson, 1980) made from a condom sealed over the end of a semi-rigid Teflon catheter (220 cm long, ID : 4 mm, OD : 6 mm diameter, Vel, Leuven, Belgium) with holes in the part covered by the condom. The catheter was introduced into the oesophagus via a nostril and the tip of the catheter was positioned in the distal third of the oesophagus. The distance from the nose to this portion of the oesophagus was visually approximated beforehand and marked on the oesophageal catheter. The catheter was connected to a pressure transducer (Bentley Trantec, model 800, A.C.E.C., Charleroi, Belgium), which was calibrated before each study, using a water manometer.

A face mask covered the horse's mouth and nose. This mask was shaped in order to minimize dead space and to avoid nasal compression. Elastic bandage was used to make the system airtight.

A Fleisch pneumotachograph Nr. 4 and an associated pressure transducer (Validyne MP45, Valydine Engineering, Northridge, CA, USA) were used to measure respiratory airflow (\dot{V}). The pneumotachograph was mounted on the face mask and connected to the transducer with two similar polyethylene catheters (220 cm long, ID : 4 mm, OD : 6 mm).

A lung function computer (Hemodynamic Respiratory System, Medisoft, Dinant, Belgium) integrated the flow signal to determine tidal volume (V_T). The computer also

calculated dynamic lung compliance (C_{dyn}) and total respiratory resistance (R_L) from the simultaneous measurements of change in pleural pressure, respiratory flow and tidal volume. Respiratory frequency (f) and expired minute volume (VE) were also calculated.

Calibrations were performed before each experiment with a rotameter (Rotameter HN2 - Firma ROTA) for \dot{V} and by forcing known volumes of air (1 litre calibration pump, Medisoft, Dinant, Belgium) through the pneumotachograph for volume.

Arterial blood was obtained by puncture of the carotid artery at the lower third of the neck. Blood samples were collected in a 2 ml heparinized syringe before base-line mechanics of breathing measurements and were immediately analysed using a blood-gas analyser (AVL gas check analyser), for arterial oxygen tension (PaO_2), CO_2 tension ($PaCO_2$) and pH determination. These data were corrected for body temperature.

Clinical examinations performed daily during all periods consisted of assessment of the character and frequency of respiration. Tracheal, cardiac and pulmonary auscultations were systematically performed and rectal temperature was taken. Detailed results of these daily examinations are not included in the results.

Statistical analyses

Because data were not normally distributed, paired data were analysed using the Wilcoxon Rank test, assuming a significance level of 5 %. Unpaired data were studied using an other non-parametric test, the Mann-Whitney test.

Table 2 - Comparison between lung function parameters in horses suffering from COPD in different environmental situations and healthy horses. Values are mean \pm SD for 6 COPD horses

	COPD affected horses				Control horses
	Period A	Period B	Period C	Period D	
R _L (kPa/L/s)	0.049 \pm 0.013 a	0.056 \pm 0.027 a	0.065 \pm 0.008 a	0.385 \pm 0.096 b	0.055 \pm 0.008 a
C _{dyn} (L/kPa)	17 \pm 3.6 a	14.4 \pm 1.7 a	14.5 \pm 4.2 a	3.2 \pm 1.5 b	15.3 \pm 2.8 a
max Δ P _{pl} (kPa)	0.56 \pm 0.12 a	0.68 \pm 0.29 a	0.68 \pm 0.11 a	3.04 \pm 1.43 b	0.67 \pm 0.04 a
f (min ⁻¹)	13.1 \pm 6.7 a	14.5 \pm 3.3 a	12.4 \pm 4.0 a	16.1 \pm 6.7 a	15.7 \pm 4.7 a
V _T (L)	5.5 \pm 1.7 ab	5.1 \pm 2.2 ab	6.6 \pm 1.6 a	4.6 \pm 2.8 ab	4.6 \pm 0.7 b
VE (L/min)	65.6 \pm 31.8 a	74.8 \pm 33.7 a	68.3 \pm 26.9 a	61.7 \pm 16.0 a	71.8 \pm 20.8 a
PaO ₂ (mmHg)	101.1 \pm 5.2 a	96.1 \pm 6.4 a	95.6 \pm 12.1 a	75.6 \pm 6.1 b	100.4 \pm 3.5 a
PaCO ₂ (mmHg)	45.3 \pm 3.2 a	44.1 \pm 1.1 a	45.4 \pm 2.8 a	45.1 \pm 2.7 a	46.1 \pm 2.9 a

A = pasture; B = silage and wood shavings; C = silage and straw; D = acute crisis

PaO₂ = arterial oxygen partial pressure; PaCO₂ = arterial carbon dioxide partial pressure; C_{dyn} = dynamic compliance; R_L = pulmonary resistance; V_T = tidal volume; f = respiratory rate; VE = minute ventilation.

Means in each time with the same superscript are not significantly different.

RESULTS

Pulmonary function data of control and COPD horses during the whole study are given in Table 2. Controlled housing environments in Periods B and C did not trigger any clinical signs in COPD horses. Moreover, no significant variations of the pulmonary function values were observed in comparison with the same horses in pasture (*Period A*) or with control horses.

In contact with hay (*Period D*), the COPD horses developed the typical clinical symptoms of heaves within 8 ± 3 days of exposure (mean \pm SD) and had significantly increased R_L , $\max\Delta P_{pl}$ and significantly decreased C_{dyn} and PaO_2 .

There was no significant change between the 4 different periods for f , VE and $PaCO_2$ of the COPD horses and these 3 variables were not significantly different between COPD horses at any time of the protocol and the control horses.

DISCUSSION

When it is possible, removal from any source of allergens and irritants is the most effective and durable treatment for COPD affected horses. Although this evidence has been demonstrated by several studies (Eyre, 1972; Cook, 1976; McGorum *et al.*, 1993), good environmental control is frequently difficult to institute (Dixon *et al.*, 1995b). Many owners do not recognise the full effect that stabling can have on horses and can not or will not change their horse's stabling or diet for various reasons. Client education often is critical to successful management of these horses.

For several years, it has been known that removal from the barn to pasture results in clinical remission for these horses (Derksen *et al.*, 1985a; 1985b; 1987; Gray *et al.*, 1989; Robinson *et al.*, 1993) and that pulmonary function values for asymptomatic COPD horses do not differ significantly from those of healthy horses, indicating that the respiratory function changes occurring in COPD are reversible (Willoughby and McDonell, 1979; Thomson and McPherson, 1984). Our results support these previous studies concerning the value of keeping COPD horses at pasture.

The changes in lung function observed in COPD horses in the presence of hay (*Period D*) are similar to those previously reported for horses with heaves (Willoughby and McDonell,

1979; Thomson and McPherson, 1984; Derksen *et al.*, 1985a; 1985c; Broadstone *et al.*, 1988). In addition to clinical signs, there is an increase in R_L , a decrease in C_{dyn} and a hypoxemia unaccompanied by hypercapnia. Hypoxemia with lack of hypercapnia is thought to result from ventilation-perfusion inequalities caused by peripheral airway sub-obstruction (Gillespie *et al.*, 1966). No tachypnea and reduction in tidal volume were observed during acute crisis (*Period D*). This is in agreement with the results previously described by Broadstone *et al.* (1988) but not with Derksen *et al.* (1985a; 1985c). Consequently, the decrease of C_{dyn} is not attributable to a modification of the respiratory frequency, but probably to changes of the elastic properties of the lung (Willoughby and McDonell, 1979).

Several studies (Derksen *et al.*, 1985a; 1985c; Armstrong *et al.*, 1986; Broadstone *et al.*, 1988) have demonstrated that hay exposure cause no change in lung function measurements of healthy horses. These previous constatations warrant the hay challenge for the control group and the use of their pulmonary values after a period of 6 weeks as reference.

When horses must be kept inside for any reason, attention must be paid to feed and bedding, as they are the main sources of dust in stables (Clarke and Madelin, 1987; Webster *et al.*, 1987; Woods *et al.*, 1993). Replacement of hay by alternative forage and taking care about hygienic measures like ventilation and type of bedding seem to be adequate to maintain COPD horses in clinical remission (Thomson and McPherson, 1984; Clarke, 1987a; Grünig *et al.*, 1989). Equine husbandry methods undergo changes over the years, gradually new forages and beddings have been produced especially for horses. For example, McPherson *et al.* (1979) report that in a group of 84 horses studied, none was fed with grass silage in Great Britain fifteen years ago, while a recent study of Dixon *et al.* (1995a) reported that 11 % of the examined horses were fed silage. Consequently, in practice, the use of grass silage is now known to be useful for management of COPD affected horses (Clarke, 1987b; 1987c; Beech, 1989). However, up until now no scientific demonstration of this field observation has been reported. In the present study, the two controlled barn housing conditions were based on the replacement of hay by grass silage (± 50 % D.M.). The standardized pulmonary function tests, performed at the end of periods of management with both methods, demonstrated that pulmonary function of the COPD affected horses was unaffected.

Even though shredded paper, flax straw and plastic bedding have all been shown to be useful alternatives to traditional types of horse bedding material for reduction of respirable dust particles (Thompson, 1995; Vandenput *et al.*, 1997), the owner's preference goes traditionally to straw and/or wood shavings. In the present study, wood shavings and good quality straw

were successively used as bedding materials (*Periods B and C*, respectively). Results are convincing that both beddings did not influence pulmonary function of the COPD horses beforehand in clinical remission. They were maintained in the same degree of clinical remission in both barn environments as that obtained after 2 months spend at pasture. These results demonstrate that, the use of good quality straw is not, as suspected previously in an *in vitro* study (Vandenput *et al.*, 1997), a source of allergens and dust sufficient to induce pulmonary dysfunction in allergic horses. This *in vivo* observation confirms the results already reported after the *in vitro* study where quantities of respirable particles and aeroallergens liberated from good quality straw were not higher than those released from wood shavings (Vandenput *et al.*, 1997). Nevertheless, the quality of straw is very variable and difficult to estimate. In contrast, the use of commercial wood shavings should allow maintenance of a more constant quality of bedding than straw, the quality of the latter depending widely on the harvest and storage conditions.

These results support previous papers (Thomson and McPherson, 1983; Clarke and Madelin, 1987; Beech, 1989) suggesting that in many cases eliminating hay is more important than changing the type of bedding. In conclusion, this study suggests that the use of grass silage as substitution forage in combinaison with wood shavings or wheat straw as bedding allowed to maintain in clinical remission COPD affected horses, although they developed in several days clinical signs of respiratory distress and significant alterations of their pulmonary function tests when in contact with hay.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr C. Roberts for his generous linguistic help. We also thank Mrs C. Gresse for technical support and for her help in the care and handling of the horses and Mrs M. Leblond for typing the manuscript.

REFERENCES

- ARMSTRONG P.J., DERKSEN F.J., SLOCOMBE R.F., ROBINSON N.E. Airway responses to aerosolized methacholine and citric acid in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1986, **133**, 357-361.
- BEECH J. Managing horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Vet. Med.*, 1989, **84**, 620-626.
- BROADSTONE R.V., SCOTT J.S., DERKSEN F.J., ROBINSON N.E. Effects of atropine in ponies with recurrent airway obstruction. *J. Appl. Physiol.*, 1988, **65**, 2720-2725.
- CLARKE A.F. A review of environmental and host factors in relation to equine respiratory disease. *Equine vet. J.*, 1987a, **19**, 435-441.
- CLARKE A.F. Air hygiene and equine respiratory disease. *In Practice*, 1987b, **9**, 196-204.
- CLARKE A.F. Chronic Pulmonary disease - A multifaceted disease complex in the horse. *Ir. vet. J.*, 1987c, **41**, 258-264.
- CLARKE A.F., MADELIN T. Technique for assessing respiratory health hazards from hay and other source materials. *Equine vet. J.*, 1987, **19**, 442-447.
- COOK W.R. Chronic bronchitis and alveolar emphysema in the horse. *Vet. Rec.*, 1976, **99**, 448-451.
- DERKSEN F.J., ROBINSON N.E. Esophageal and intrapleural pressures in the healthy conscious pony. *Am. J. Vet. Res.*, 1980, **41**, 1756-1761.
- DERKSEN F.J., ROBINSON N.E., ARMSTRONG P.J., STICK J.A., SLOCOMBE R.F. Airway reactivity in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *J. Appl. Physiol.*, 1985a, **58**, 598-604.
- DERKSEN F.J., SCOTT J.S., MILLER D.C., SLOCOMBE R.F., ROBINSON E.N. Bronchoalveolar lavage in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1985b, **132**, 1066-1070.
- DERKSEN F.J., SCOTT D., ROBINSON N.E., SLOCOMBE R.F., ARMSTRONG P.J. Intravenous histamine administration in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. J. Vet. Res.*, 1985c, **46**, 774-777.
- DERKSEN F.J., SCOTT J.S., SLOCOMBE R.F., ROBINSON E.N. *Micropolyspora faeni* causes airway inflammation but not hyperresponsiveness in sensitized ponies. *J. Appl. Physiol.*, 1987, **62**, 1398-1404.
- DIXON P.M., RAILTON D.I., MCGORUM B.C. Equine pulmonary disease : a case control study of 300 referred cases. Part 2 : Details of animals and of historical and clinical findings. *Equine vet. J.*, 1995a, **27**, 422-427.
- DIXON P.M., RAILTON D.I., MCGORUM B.C., TOTHILL S. Equine pulmonary disease : a case control study of 300 referred cases. Part 4 : Treatments and re-examination findings.

- Equine vet. J.*, 1995b, **27**, 436-439.
- DUVIVIER D.H., VOTION D., VANDENPUT S., ART T., LEKEUX P. Technical validation of dry powder inhalation in the equine species. *Equine vet. J.*, 1997, **29**, In press.
- EYRE P. Equine pulmonary emphysema : a bronchopulmonary mould allergy. *Vet. Rec.*, 1972, **91**, 134-140.
- GILLESPIE J.R., TYLER W.S., EBERLY V.E. Pulmonary ventilation and resistance in emphysematous and control horses. *J. Appl. Physiol.*, 1966, **21**, 416-422.
- GRAY P.R., DERKSEN F.J., ROBINSON N.E., CARPENTER-DEYO L.J., JOHNSON H.G., ROTH R.A. The role of cyclooxygenase products in the acute airway obstruction and airway hyperreactivity of ponies with heaves. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1989, **140**, 154-160.
- GRÜNIG G., HERMANN M., HOWALD B., WINDER N.C., VON FELLENBERG R. Partial divergence between airway inflammation and clinical signs in equine chronic pulmonary disease. *Equine vet. J.*, 1989, **21**, 145-148.
- HALLIWELL R.E.W., FLEISCHMAN J.B., MACKAY-SMITH M., BEECH J., GUNSON D.E. The role of allergy in chronic pulmonary disease of horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1979, **174**, 277-281.
- LAPOINTE J.-M., LAVOIE J.-P., VRINS A.A. Effects of triamcinolone acetonide on pulmonary function and bronchoalveolar lavage cytologic features in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Vet. Res.*, 1993, **54**, 1310-1316.
- MCGORUM B.C., DIXON P.M., HALLIWELL R.E.W. Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens. *Equine vet. J.*, 1993, **25**, 261-267.
- MCPHERSON E.A., LAWSON G.H.K., MURPHY J.R., NICHOLSON J.M., BREEZE R.G., PIRIE H.M. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) : factors influencing the occurrence. *Equine vet. J.*, 1979, **11**, 167-171.
- MURPHY J.R., MCPHERSON E.A., DIXON P.M. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) : Effects of bronchodilator drugs on normal and affected horses. *Equine vet. J.*, 1980, **12**, 10-14.
- ROBINSON N.E., DERKSEN F.J., BERNEY C., GOOSSENS L. The airway response of horses with recurrent airway obstruction (heaves) to aerosol administration of ipratropium bromide. *Equine vet. J.*, 1993, **25**, 299-303.
- THOMSON J.R., MCPHERSON E.A. Chronic obstructive pulmonary disease in the horse. 2 : Therapy. *Equine vet. J.*, 1983, **15**, 207-210.
- THOMSON J.R., MCPHERSON E.A. Effects of environmental control on pulmonary function of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. *Equine vet. J.*, 1984, **16**, 35-38.

- THOMPSON K.N. Alternate bedding materials for horses. *Equine Pract.*, 1995, **17**, 20-23.
- VANDENPUT S., ISTASSE L., NICKS B., LEKEUX P. Airborne dust and aeroallergen concentrations in different sources of feed and bedding for horses. *Vet. Quart.*, 1997, **19**, In press.
- WEBSTER A.J.F., CLARKE A.F., MADELIN T., WATHES C.M. Air hygiene in stables. 1 : Effects of stable design, ventilation and management on the concentration of respirable dust. *Equine vet. J.*, 1987, **19**, 448-453.
- WILLOUGHBY R.A., MCDONELL W.N. Pulmonary function testing in horses. *Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract.*, 1979, **1**, 171-197.
- WOODS P.S.A., ROBINSON N.E., SWANSON M.C., REED C.E., BROADSTONE R.V., DERKSEN F.J. Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different management systems. *Equine vet. J.*, 1993, **25**, 208-213.

**EFFECT OF A SET STABLED ENVIRONMENTAL CONTROL ON
PULMONARY FUNCTION AND AIRWAY REACTIVITY
OF COPD AFFECTED HORSES**

VANDENPUT S., VOTION D., DUVIVIER D.H., VAN ERCK E., ANCIAUX N., ART T. AND LEKEUX P.

Vet. J., 153, In press

Laboratory for Functional Investigation, Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Liege, Liege, Belgium

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate respiratory function of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) maintained in a barn on wood shavings and fed grass silage for a period of six weeks. Mechanics of breathing, blood gas analysis and measurement of bronchial reactivity were performed on five COPD horses at the end of this environment-controlled period (*Period B*) and compared to values obtained after 2 months at pasture (*Period A*) as well as after the onset of clinical signs of acute crisis (*Period C*).

Results of the study showed that clinical and functional parameters were similar in healthy horses and in COPD horses placed in pasture or stabled with grass silage. Moreover, the bronchial reactivity of COPD horses in pasture was similar to the bronchial reactivity of healthy horses. COPD horses fed grass silage however presented an intermediate bronchial reactivity between those measured after Period A and Period C which should make them more susceptible to develop bronchoconstriction when in contact with inhaled irritants.

LIST OF ABBREVIATIONS

Alphabetical order

bw	body weight
C _{dyn}	dynamic lung compliance
f	respiratory frequency
MCh	methacholine
ID	inner diameter
max Δ P _{pl}	maximal changes in pleural pressure
OD	outer diameter
PaCO ₂	arterial carbon dioxide partial pressure
PaO ₂	arterial oxygen partial pressure
PC ₃₅ C _{dyn}	provoking concentration of methacholine required to decrease C _{dyn} to 65 % of its starting value
P _{pl}	pleural pressure
R _L	total respiratory resistance
SD	standard deviation
\dot{V}	respiratory airflow
V _T	tidal volume

INTRODUCTION

It is now widely recognised that an environmental approach to the prevention of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) requires closer consideration, and current proposed treatments include the total and permanent exclusion of aeroallergens and irritants from the environment. When horses must be stabled, removal of straw bedding and hay is largely recommended and alternative sources of feed and bedding are proposed. The feeding of ensiled grass has been a major change in equine husbandry introduced during the last 15 years (Dixon *et al.*, 1995a) and, the use of grass silage for feeding and wood shavings bedding is often recommended (Clarcke, 1987; Dixon *et al.*, 1995b). However, the impact of such environmental management changes on pulmonary function and bronchial reactivity of COPD horses has never been studied.

The mechanics of breathing and blood gas analysis allows an evaluation of the structural modifications of the airways and of the pulmonary gas exchange whereas the study of airway reactivity gives important information about sensitivity of the bronchi to non-specific stimuli. The abnormal response of airway smooth muscle has been used to define bronchial hyperreactivity. COPD affected horses exhibit airway hyperresponsiveness only during acute exacerbations of airway obstruction induced by stabling and exposure to hay dust (Derksen *et al.*, 1985a; Armstrong *et al.*, 1986; Klein and Deegen, 1986a; Doucet *et al.*, 1991; Fairbain *et al.*, 1993). When these horses return to pasture, airway hyperresponsiveness wanes to such an extent that it does not differ between COPD affected horses in clinical remission and healthy animals (Derksen *et al.*, 1985a; Armstrong *et al.*, 1986; Fairbain *et al.*, 1993). Conversely, in healthy horses, pulmonary function values and airway reactivity are unaffected by stabling (Derksen *et al.*, 1985a; Armstrong *et al.*, 1986; Fairbain *et al.*, 1993).

The aim of this study was to evaluate respiratory function and airway reactivity of COPD horses maintained in a barn with grass silage and bedded on wood shavings during a period of six weeks and to compare them with values obtained after two months at pasture, following the onset of clinical signs of acute crisis.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Five horses (8.5 ± 2.1 years of age and weighing 567 ± 20.8 kg, mean \pm SD) with a history of COPD were designated as the principal group. Six healthy horses (10.0 ± 2.0 years and 527.5 ± 10.6 kg) with no history of respiratory disease, and which were not affected when subjected to “natural challenge” by exposure to deep litter straw and poor quality hay in barn, were designated as the control group.

Preliminary study for the selection of COPD horses

Before starting the experimental protocol, the principal horses were kept at pasture without contact with hay or the barn environment. This induced remission was characterised by the absence of any clinical signs of respiratory dysfunction, normal pulmonary function tests and normal arterial blood gas tensions. Subsequently, the horses were exposed to a hay and barn challenge to monitor for characteristic clinical signs of COPD and signs of respiratory distress occurred within 6 ± 4 days. Reversibility of these symptoms occurred following intravenous administration of 0.02 mg atropine/kg bw (Table 1) which indicated that a large part of the obstruction was due to bronchospasm, mediated via muscarinic receptor activity (Broadstone *et al.*, 1988). This preliminary study allowed five COPD horses to be selected for inclusion in the principal group.

Pulmonary function measurements

Pleural pressure (Ppl) was measured using an oesophageal catheter (Derksen and Robinson, 1980) made from a condom sealed over the end of a semi-rigid Teflon catheter (220 cm long, ID : 4 mm, OD : 6 mm diameter, Vel, Leuven, Belgium) with holes in the part covered by the condom. The catheter was introduced into the oesophagus via a nostril and the tip of the catheter was positioned into the distal third of the oesophagus.

Table 1 - Effect of atropine (0.02 mg/kg bw i.v.) administration on pulmonary function values on COPD horses during airway obstruction induced by contact with hay dust. Means \pm standard deviation

	Crisis	15 min	60 min
max Δ Ppl (kPa)	4.8 \pm 1.3	1.5 \pm 0.7	2.0 \pm 1.3
R _L (kPa/L/s)	0.32 \pm 0.07	0.14 \pm 0.05 ^a	0.16 \pm 0.06 ^a
C _{dyn} (L/kPa)	2.9 \pm 1.1	11.2 \pm 7.7	9.2 \pm 5.3

^a Means with the same superscript are not significantly different.

max Δ Ppl = maximal changes in pleural pressure; R_L = pulmonary resistance; C_{dyn} = dynamic compliance.

The catheter was connected to a pressure transducer (Bentley Trantec, model 800, A.C.E.C., Charleroi, Belgium), which was calibrated before each study using a water manometer.

A face mask covered the horse's mouth and nose. This mask was shaped in order to minimize dead space and to avoid nasal compression. An elastic bandage was used to make the system airtight. A Fleisch pneumotachograph Nr 4 and an associated pressure transducer (Validyne MP45, Valdyne Engineering, Northridge, USA) were used to measure respiratory airflow (\dot{V}). The pneumotachograph was mounted on the face mask and connected to the transducer with two similar polyethylene catheters (220 cm long, I.D. : 4 mm, O.D. : 6 mm). A lung function computer (Hemodynamic Respiratory System, Medisoft, Dinant, Belgium) integrated the flow signal to determine tidal volume (V_T). The computer also calculated and displayed instantaneously dynamic lung compliance (C_{dyn}) and total respiratory resistance (R_L) from the simultaneous measurements of change in pleural pressure, respiratory flow and tidal volume. Respiratory frequency (f) was also calculated. Calibrations were performed before each experiment with a rotameter (FC1000, KDG flowmeters, Burgess Hill, UK) for \dot{V} and by forcing known volumes of air (1 L calibration pump, Medisoft, Dinant, Belgium) through the pneumotachograph for volume.

Arterial blood was obtained by puncture of the carotid artery in the lower third of the neck. A blood sample was collected in a 2 ml heparinized syringe before baseline mechanics of breathing measurements and immediately analysed using a blood gas analyser (AVL 995, Schaffhausen, Switzerland) for arterial oxygen (PaO₂) and CO₂ tensions (PaCO₂). These data

were corrected for body temperature.

Airway responsiveness measurements

The sequence of challenges was sterile 0.9 % NaCl followed by successive increasing concentrations (0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 3.0 and 10.0 mg/ml) of methacholine chloride (MCh) (Sigma Chemical, St Louis, Missouri, USA) in saline. The MCh solutions were prepared on the day of the test. Aerosols were generated by an ultrasonic nebulizer (DeVilbiss Ultra-neb® 2000, Springfield, Ohio, USA). A preliminary study assessing the distribution of particles (PCS2000, Palas GmbH, Karlsruhe, Germany) generated by the nebulizer showed that 54 % of the total number of emitted particles had a diameter ranging from 0.5 to 5 µm. In terms of the total mass of emitted particles, 93 % of the particles were within the range of interest. The inspiratory side of a two-way valve system (PVC tube of 15 cm diameter) was fitted to the circular opening of the aerosol face mask. Expiratory gases collected by a second tube were vented to a filtration assembly (Sofiltra®-Poelman, La Garenne-Colombes, France) where undeposited droplets were trapped.

During the test, horses were positioned in stocks without sedation. They were conditioned for several minutes to the oesophageal balloon catheter and face mask before the first measurements of pulmonary mechanics were performed. Baseline lung function values were obtained and the face mask with the pneumotachograph was then removed and exchanged for the nebulizer mask. After each two-minute period inhalation of the test solution inhalation, the nebulizer face mask was exchanged for the mask-pneumotachograph assembly and the mechanics of breathing were measured for approximately four minutes. Each challenge, including pulmonary function testing, took six minutes to perform.

Airway responsiveness to MCh was assessed by monitoring the changes in C_{dyn} (Derksen *et al.*, 1985a). Aerosol challenge was stopped when C_{dyn} decreased to approximately 50 % of its baseline value.

Experimental protocol

Measurements were made on principal horses in clinical remission, i.e. after they were kept on pasture with no exposure to hay, straw, or barn environment for two months (*Period A*), and after six weeks in a controlled environment in a well ventilated barn with wood

shavings bedding and feeding a grass silage containing approximately 50 % dry matter (Préfané Liégeois, Mortier, Belgium) (*Period B*). The same horses were investigated during an acute attack of airway obstruction precipitated by housing them in a barn with hay and straw (*Period C*). The succession of the three periods was the same for all horses. Between each period, horses were kept at least six weeks in pasture. As a result, all principal horses were in clinical remission before starting each experimental period. Control horses were studied after a period of six weeks in the same barn with hay and straw. Further experimentation did not appear useful for these control animals since previous studies had demonstrated that pulmonary function tests and measurements of bronchial reactivity were not modified by the environmental quality (Derksen *et al.*, 1985a; Armstrong *et al.*, 1986; Fairbain *et al.*, 1993).

MCh dose-response curves

Dose-response curves of C_{dyn} were plotted as a function of MCh aerosol concentration. C_{dyn} values after saline inhalation were used as reference values to calculate variation of C_{dyn} during the test. Interpolation between points on the dose-response curves allowed calculation of the provoking concentration of agonist required to decrease C_{dyn} to 65 % of its starting value ($PC_{35}C_{dyn}$ in mg/ml) (Fig. 1). Values of R_L and f for $PC_{35}C_{dyn}$ were calculated from their respective dose-response curves (Fig. 1).

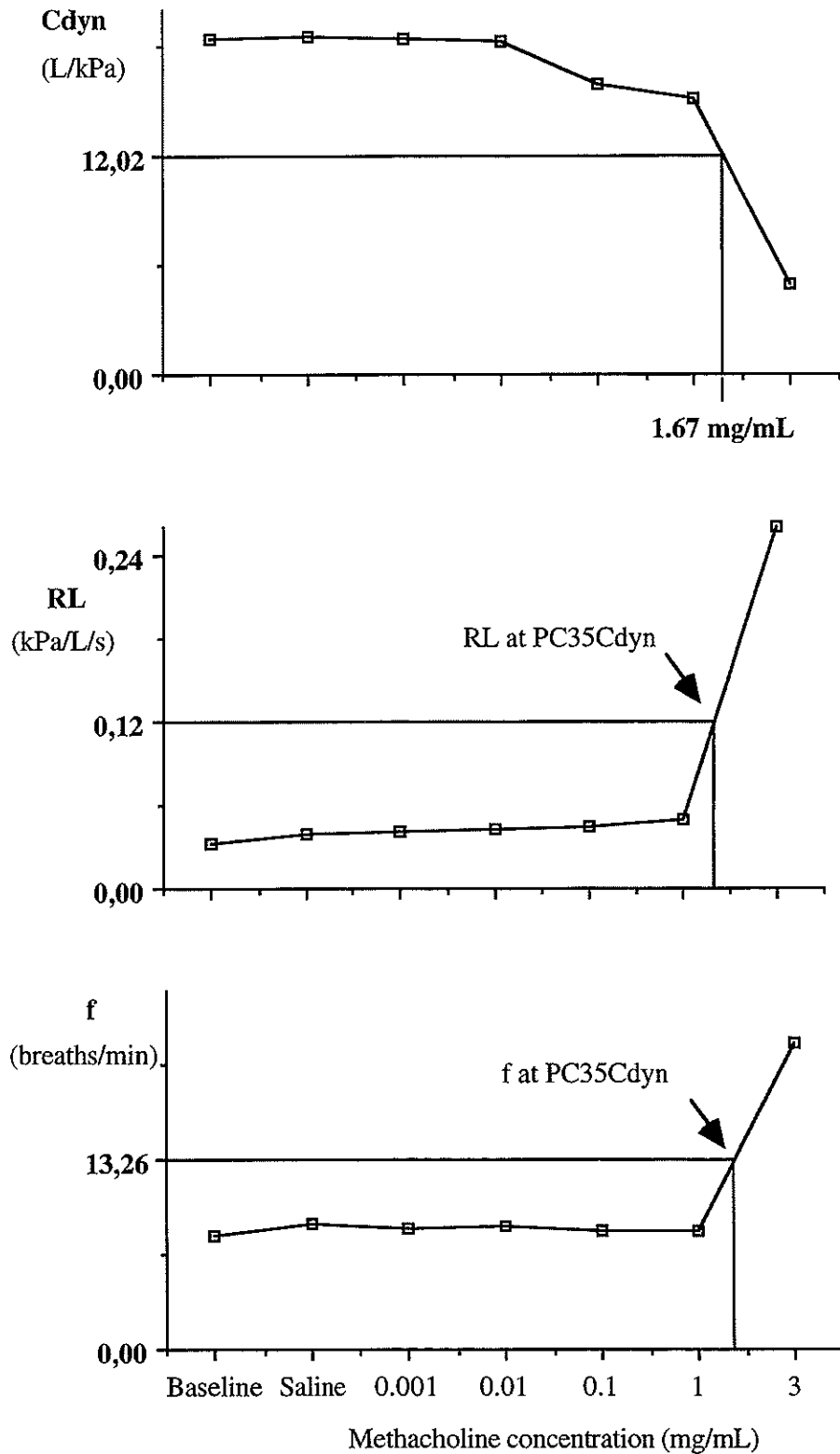


Fig. 1 - Model of calculation of pulmonary resistance (R_L) and respiratory frequency (f) at the providing concentration of methacholine required to decrease dynamic compliance (C_{dyn}) to 65 % of its starting value (PC35Cdyn in mg/ml)

Statistics

Data are presented as mean \pm SD. A nonparametric Wilcoxon test was used to compare paired data. The responses to the challenge of COPD and in control horses were compared using a nonparametric Mann-Whitney test for unpaired data and a p value ≤ 0.05 was chosen to indicate a significant difference.

Table 2 - Baseline pulmonary function data in principal horses at Periods A, B and C and in control horses. Mean \pm SD. Values with no common designations are significantly different ($p < 0.05$)

	Principal Horses			Control horses
	Period A	Period B	Period C	
C _{dyn} (L/kPa)	18.1 \pm 2.9 a	15.0 \pm 5.7 a	2.3 \pm 0.7 b	17.5 \pm 2.8 a
R _L (kPa/L/s)	0.049 \pm 0.017 a	0.061 \pm 0.017 a	0.39 \pm 0.16 b	0.040 \pm 0.009 a
V _T (L)	5.54 \pm 1.46 a	5.09 \pm 1.16 a	4.18 \pm 0.71 a	4.18 \pm 0.58 a
f (min ⁻¹)	12.6 \pm 6.1 a	13.8 \pm 4.5 a	19.0 \pm 5.9 a	15.5 \pm 3.3 a
PaO ₂ (mmHg)	104.9 \pm 9.0 a	99.4 \pm 7.5 a	73.2 \pm 4.7 b	104.2 \pm 7.3 a
PaCO ₂ (mmHg)	44.3 \pm 2.2 a	43.4 \pm 1.9 a	44.9 \pm 2.2 a	43.8 \pm 2.1 a

C_{dyn} = dynamic compliance; R_L = pulmonary resistance; V_T = tidal volume; f = respiratory frequency; PaO₂ = arterial oxygen partial pressure; PaCO₂ = arterial carbon dioxide partial pressure.

RESULTS

Lung function

Baseline pulmonary function parameters are shown in Table 2. There were no significant differences between COPD horses at *Period A*, *B* and control horses. Following exposure to hay and straw (*Period C*), COPD-affected horses developed clinical signs of heaves, with a significant decrease in PaO₂ and C_{dyn}, and a significant increase in R_L.

Response to aerosolised methacholine

The dose of MCh required to decrease C_{dyn} to 65 % of its basal value (PC₃₅C_{dyn}) calculated for each dose-response curve was not significantly different between control and principal horses during *Period A*. After six weeks in a controlled environment (*Period B*), PC₃₅C_{dyn} values were significantly lower than those measured in clinical remission induced by pasture (*Period A*) but significantly higher than that measured during acute crisis (*Period C*) (Fig. 2).

For each curve, the changes in R_L and f at PC₃₅C_{dyn} were determined (Table 3). In principal horses during *Periods A* and *B* and in control horses, R_L and f at PC₃₅C_{dyn} were significantly higher than the corresponding starting values. By contrast, during *Period C*, there was no significant variations in R_L and f at PC₃₅C_{dyn} in comparison with starting values.

In both groups of horses, inhalation of 0.9 % NaCl had no significant effect on pulmonary function data.

Table 3 - Change in dynamic compliance (C_{dyn}), pulmonary resistance (R_L) and respiratory frequency (f) from starting values to PC₃₅C_{dyn}. Mean ± SD

Parameters	Principal Horses						Control Horses							
	Period A		Period B		Period C		Period A		Period B		Period C			
	Starting value	Value at PC ₃₅ C _{dyn}	Starting value	Value at PC ₃₅ C _{dyn}	Starting value	Value at PC ₃₅ C _{dyn}	Starting value	Value at PC ₃₅ C _{dyn}	Starting value	Value at PC ₃₅ C _{dyn}	Starting value	Value at PC ₃₅ C _{dyn}		
C _{dyn} (L/kPa)	17.99 ± 6.05 a	11.69 ± 1.98 b	15.09 ± 5.71 a	9.81 ± 3.71 b	2.29 ± 0.62 a	1.48 ± 0.40 b	17.32 ± 2.98 a	11.25 ± 1.93 b	0.051 ± 0.021 a	0.114 ± 0.041 b	0.081 ± 0.052 a	0.278 ± 0.172 b	0.044 ± 0.011 a	0.085 ± 0.038 b
R _L (kPa/L/s)	12.94 ± 6.52 a	18.9 ± 9.33 b	14.21 ± 4.21 a	19.97 ± 4.59 b	19.33 ± 5.33 a	20.25 ± 3.45 a	15.76 ± 3.56 a	22.88 ± 5.29 b						

Values within the same period with no common designations are significantly different ($p < 0.05$) (Wilcoxon statistical test).

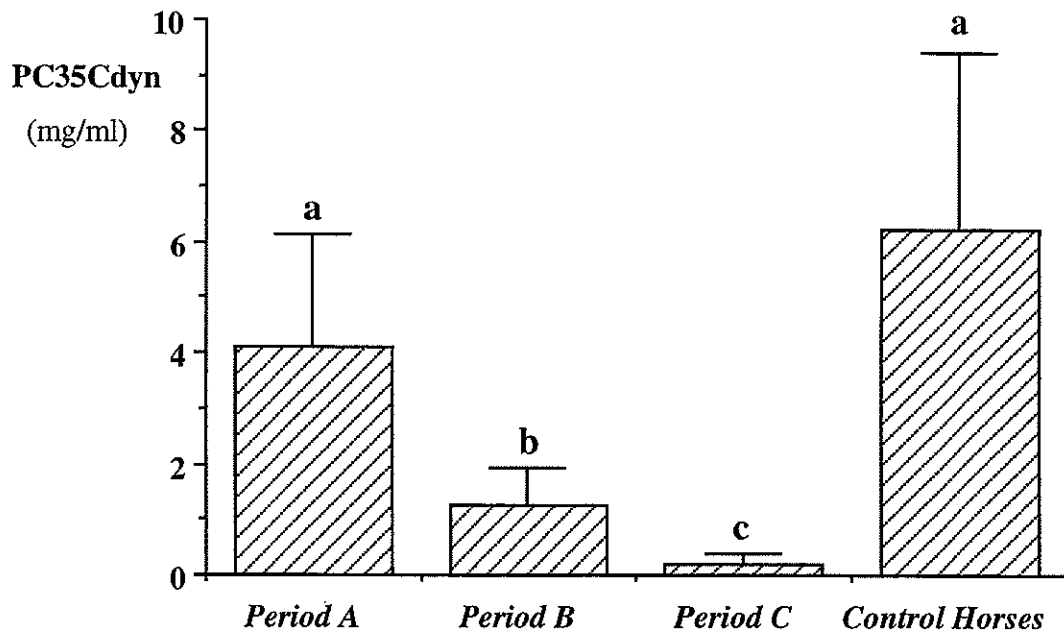


Fig. 2 - Methacholine concentration required to reduce dynamic compliance to 65 % of starting value (PC35Cdyn) in principal and control horses. Mean \pm SD

Values with no common designations are significantly different ($p < 0.05$). *Period A* = pasture for 2 months; *Period B* = barn with grass silage and bedding on wood shaving; *Period C* = acute crisis (hay).

DISCUSSION

The reactive state of the bronchi was quantified by provocation testing. The most widely accepted methods in human medicine employ aerosols of histamine or MCh as the provoking agent, administered by inhalation of increasing concentrations at regular intervals (Holgate *et al.*, 1987). In equine research, the same method with some variations has been employed for several years. Results obtained in these studies demonstrated that COPD horses in clinical remission, induced by pasture, had similar bronchial reactivity to healthy horses (Derksen *et al.*, 1985a; 1985c; Armstrong *et al.*, 1986; Fairbain *et al.*, 1993).

In this present study, we adapted a technique that has found widespread acceptance (Cockcroft *et al.*, 1977), in which increasing concentration of agonist are inhaled through a mask during two minutes of tidal breathing. With each dose increment, measurement of

pulmonary function values was made until the predetermined decrease in the chosen index of airway parameter, i.e. C_{dyn}, was obtained.

MCh was used for the following reasons. Firstly, bronchoconstriction provoked by cholinergic agonists such as MCh occurs by direct interaction of this agonist with muscarinic receptors linked to an excitation-contraction mechanism in airway smooth muscle. The airways response to histamine is more complex, being a composite of the direct receptor-mediated actions of the agonist with smooth muscle and stimulation of central and local neural reflexes (Holgate *et al.*, 1987). Secondly, atropine could have been used to reverse selectively the bronchospasm if the clinical state of the horses became too critical.

As in previous studies (Derksen *et al.*, 1985a; Armstrong *et al.*, 1986; Klein and Deegen, 1986a; Broadstone *et al.*, 1988), PC₃₅C_{dyn} was used as a measure of bronchial reactivity. This choice is justified by the fact that a decrease in C_{dyn} of 35 % exceeds the normal variability in C_{dyn} (Derksen *et al.*, 1982). Values of PC₃₅C_{dyn} could be compared to determine the sensitivity of the bronchi to various stimuli. The results of this experiment for COPD horses after two months at pasture is in agreement with those found in other studies (Derksen *et al.*, 1985a; 1985c; Armstrong *et al.*, 1986; Fairbain *et al.*, 1993).

The most significant result of this study is that COPD horses, after *Period B*, and despite similar pulmonary function tests to *Period A*, showed an intermediate airway responsiveness between *Periods A* and *C*. Consequently, in a controlled environment barn, inevitable airborne respirable irritants and allergens are likely to induce a pulmonary reaction sufficient to provoke a light hyperreactivity in COPD horses without manifestation of clinical signs. Practically, this could mean that in COPD horses in clinical remission but housed in barn with a controlled environment, a bronchoconstriction occurs with weaker stimuli than in COPD horses in clinical remission at pasture.

The mechanisms of airway hyperresponsiveness in COPD horses are unclear. Possible causes for the exaggerated smooth muscle contraction in bronchial hyperreactivity include a decrease in baseline airway calibre, an increased responsiveness of the smooth muscle itself, an abnormality in the autonomic nervous control of the smooth muscle, or an increase in the accessibility of the stimulus to the target cells. Decreased baseline airway calibre was often considered in human medicine as a cause of hyperreactivity (Moreno *et al.*, 1986). Since no alterations in pulmonary function could be matched with hyperreactivity, and in agreement with previous studies (Derksen *et al.*, 1985a; Armstrong *et al.*, 1986; Klein and Deegen, 1986a; Fairbain *et al.*, 1993), hyperreactivity has been observed in our horses with no altered baseline

airway calibre. Moreover, structural alterations of airway smooth muscle (hypertrophy and/or hyperplasia) have not been reported so far in COPD-affected horses. Consequently, an increased amount of muscle capable of developing greater tension is unlikely to be a cause of the hyperreactivity that occurs transitory in COPD horses. Airway hyperreactivity could be due to increased excitatory nervous activity (parasympathetic or α -adrenergic activity), or to decreased inhibitory nervous activity (β -adrenergic or nonadrenergic noncholinergic activity). Over the last few years, *in vitro* and *in vivo* studies have shown among other things that airway hyperresponsiveness in COPD affected horses is not the result of an exaggerated muscular response to cholinergic stimulation (Broadstone *et al.*, 1988) or a deficient β -adrenoceptor function (Scott *et al.*, 1988a). Though the density and/or activity of α -receptors in horses with COPD seem increased, the role of α_1 -adrenergic receptors in airway narrowing is minimal (Scott *et al.*, 1988b). However, the inhibitory function of the nonadrenergic noncholinergic system (iNANC) seems to be defective in the bronchi of COPD horses (Yu *et al.*, 1994).

Others possible causes for the bronchial hyperreactivity could be found in alteration or modification of the local airway structure or environment (Robinson *et al.*, 1996). It has been suggested that damage to the airway epithelium in association with inflammation might play an important role in causing airway hyperreactivity (Jeffery *et al.*, 1989). There is now considerable experimental evidence that hyperresponsiveness in COPD horses is associated with inflammation of the airways (Derksen *et al.*, 1985b; Fairbain *et al.*, 1993). Epithelial damage observed in COPD horses (Kaup *et al.*, 1990a; 1990b) may contribute to bronchial reactivity in a number of ways. Damaged epithelial cells may release proinflammatory mediators and exposure of sensory nerves may lead to activation of neural reflexes. In addition, epithelial damage may allow access of antigen and other large molecules to submucosal cells. Further studies will be necessary to determine the exact roles of inflammation. At the present time, we know that cyclooxygenase blockade of arachidonic acid metabolism by flunixin meglumine does not modify airway obstruction and hyperreactivity observed in COPD horses (Gray *et al.*, 1989). On the other hand, corticosteroid therapy has a protective effect on airway hyperreactivity (Klein and Deegen, 1986b) and induces an improvement of clinical signs (Beech, 1991) giving therefore strong evidence that inflammation could play a role in airway reactivity. Nevertheless, in the light of these results, further experiments are needed to determine whether pulmonary inflammation occurs in COPD horses after six weeks in a well-ventilated barn with grass silage.

In this study, environmentally induced variations of baseline pulmonary function

parameters were similar to the results of previous studies (Derksen *et al.*, 1985c; Broadstone *et al.*, 1988). At PC₃₅Cdyn, R_L and f were significantly higher than starting values during *Periods A* and *B* and in control horses. The lack of statistical variation in R_L and f at PC₃₅Cdyn at *Period C* was probably due to the much higher starting values of these parameters. This could also suggest that natural challenge induces bronchoconstriction of large and small airways while the pharmacological challenge with MCh probably acts mainly at the level of the small airways. The obvious discrepancy between results obtained *in vivo* in this present work and the *in vitro* results from a previous study (LeBlanc *et al.*, 1991) has been discussed elsewhere (Yu *et al.*, 1994).

In conclusion, COPD horses in remission placed in a barn with grass silage and wood shavings showed no modification of their clinical state and pulmonary function tests. The long exposure to airborne irritants and allergens resulted nevertheless in the occurrence of a bronchial hyperreactivity significantly lower in comparison with that measured during acute crisis but, none the less, significantly higher compared to the reactivity state after pasture. From a clinical point of view, this state of nonspecific airway hyperresponsiveness even though the horses seemed to be in clinical remission is important because low levels of irritants that may not affect a healthy subject or a COPD horse in remission will cause profound airway narrowing in hyperresponsive subjects (Robinson *et al.*, 1996).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to I. Sbaï and C. Gresse for their precious technical assistance, to M. Leblond for the preparation of the manuscript and to S. Verbanck, Dr A. Benamou and Dr C. Roberts for their helpful advices.

REFERENCES

- ARMSTRONG P.J., DERKSEN F.J., SLOCOMBE R.F., ROBINSON N.E. Airway responses to aerosolized methacholine and citric acid in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1986, **133**, 357-361.
- BEECH J. Chronic obstructive pulmonary disease. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, 1991, **7**, 79-91.
- BROADSTONE R.V., SCOTT J.S., DERKSEN F.J., ROBINSON N.E. Effects of atropine in ponies with recurrent airway obstruction. *J. Appl. Physiol.*, 1988, **65**, 2720-2725.
- CLARKE A.F. Chronic Pulmonary disease - A multifaceted disease complex in the horse. *Ir. vet. J.*, 1987, **41**, 258-264.
- COCKCROFT D.W., KILLIAN D.N., MELLON J.J.A., HARGREAVE F.E. Bronchial reactivity to inhaled histamine : A method and clinical survey. *Clin. Allergy*, 1977, **7**, 235-243.
- DERKSEN F.J., ROBINSON N.E. Esophageal and intrapleural pressures in the healthy conscious pony. *Am. J. Vet. Res.*, 1980, **41**, 1756-1761.
- DERKSEN F.J., ROBINSON N.E., SLOCOMBE R.F., RIEBOLD T.W., BRUNSON D.B. Pulmonary function tests in standing ponies : Reproducibility and effect of vagal blockage. *Am. J. Vet. Res.*, 1982, **43**, 598-602.
- DERKSEN F.J., ROBINSON N.E., ARMSTRONG P.J., STICK J.A., SLOCOMBE R.F. Airway reactivity in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *J. Appl. Physiol.*, 1985a, **58**, 598-604.
- DERKSEN F.J., SCOTT J.S., MILLER D.C., SLOCOMBE R.F., ROBINSON N.E. Bronchoalveolar lavage in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1985b, **132**, 1066-1070.
- DERKSEN F.J., SCOTT D., ROBINSON N.E., SLOCOMBE R.F., ARMSTRONG P.J. Intravenous histamine administration in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am. J. Vet. Res.*, 1985c, **46**, 774-777.
- DIXON P.M., RAILTON D.I., MCGORUM B.C. Equine pulmonary disease : a case control study of 300 referred cases. Part 2 : Details of animals and of historical and clinical findings. *Equine vet. J.*, 1995a, **27**, 422-427.
- DIXON P.M., RAILTON D.I., MCGORUM B.C., TOTHILL S. Equine pulmonary disease : A case control study of 300 referred cases. Part 4 : Treatments and re-examination findings. *Equine vet. J.*, 1995b, **27**, 436-439.
- DOUCET M.Y., VRINS A.A., FORD-HUTCHINSON A.W. Histamine inhalation challenge in normal horses and in horses with small airway disease. *Can. J. Vet. Res.*, 1991, **55**, 285-293.
- FAIRBAIRN S.M., LEES P., PAGE C.P., CUNNINGHAM F.M. Duration of antigen-induced

- hyperresponsiveness in horses with allergic respiratory disease and possible links with early airway obstruction. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 1993, **16**, 469-476.
- GRAY P.R., DERKSEN F.J., ROBINSON N.E., CARPENTER-DEYO L.J., JOHNSON H.G., ROTH R.A. The role of cyclooxygenase products in the acute airway obstruction and airway hyperreactivity of ponies with heaves. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1989, **140**, 154-160.
- HOLGATE S.T., BEASLEY R., TWENTYMAN O.P. The pathogenesis and significance of bronchial hyperresponsiveness in airways disease. *Clin. Sci.*, 1987, **73**, 561-572.
- JEFFERY P.K., WARDLAW A.J., NELSON F., COLLINS J.V., KAY A.B. Bronchial biopsies in asthma : an ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1989, **140**, 1745-1753.
- KAUP F.-J., DROMMER W., DEEGEN E. Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) I : Alterations of the larger conducting airways. *Equine vet. J.*, 1990a, **22**, 343-348.
- KAUP F.-J., DROMMER W., DAMSCH S., DEEGEN E. Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) II : Pathomorphological changes of the terminal airways and the alveolar region. *Equine vet. J.*, 1990b, **22**, 349-355.
- KLEIN H.-J., DEEGEN E. Histamine inhalation provocation test : methods to identify nonspecific airway reactivity in equids. *Am. J. Vet. Res.*, 1986a, **47**, 1796-1800.
- KLEIN H.-J., DEEGEN E. Non-specific airway hyperreactivity in horses and the influence of corticosteroids. In : *Lung Function and Respiratory Diseases in the Horse*, (International Symposium in Hannover, Germany, 27th-29th June 1985), Deegen E., Beadle R.E. (Eds), Calw, Germany : Hippriatrika Verlagsgesellschaft, 1986b, p. 61-64.
- LEBLANC P.H., BROADSTONE R.V., DERKSEN F.J., ROBINSON N.E. *In vitro* responses of distal airways in horses with recurrent airway obstruction. *Am. J. Vet. Res.*, 1991, **52**, 999-1003.
- MORENO R.H., HOGG J.C., PARÉ P.D. Mechanics of airway narrowing. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1986, **133**, 1171-1180.
- ROBINSON N.E., DERKSEN F.J., OLSZEWSKI M.A., BUECHNER-MAXWELL V.A. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses. *Br. vet. J.*, 1996, **152**, 283-306.
- SCOTT J.S., BROADSTONE R.V., DERKSEN F.J., ROBINSON N.E. Beta-adrenergic blockade in ponies with recurrent obstructive pulmonary disease. *J. Appl. Physiol.*, 1988a, **64**, 2324-2328.
- SCOTT J.S., GARON H., BROADSTONE R.V., DERKSEN F.J., ROBINSON N.E. Alpha-1-adrenergic-induced airway obstruction in ponies with recurrent pulmonary disease. *J. Appl. Physiol.*, 1988b, **65**, 687-692.

YU M.F., WANG Z.W., ROBINSON N.E., DERKSEN F.J. Modulation of bronchial smooth muscle function in horses with heaves. *J. Appl. Physiol.*, 1994, **77**, 2149-2154.

EFFECT OF DIFFERENT ENVIRONMENTAL CONDITIONS ON VENTILATION DISTRIBUTION IN COPD AFFECTED HORSES

VANDENPUT S.¹, ROLLIN F.², ART T.¹ AND LEKEUX P.¹

Submitted for publication

¹ Laboratory for Functional Investigation, Department of Physiology

² Department of Large Animal Internal Medicine

Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Liege, Belgium

SUMMARY

To examine effects of environment on spatial ventilation distribution and functional residual capacity (FRC) during tidal breathing, we performed nitrogen washouts (WO) and washins (WI) in six unsedated COPD affected horses following three different environmental situations.

We conclude that spatial ventilation distribution becomes more inhomogenous during acute crisis, induced by contact with allergens contained in hay. Nevertheless, use of inert gas clearance studies, such as multiple-breath N₂ washout, does not seem enough to measure FRC for COPD affected horses.

LIST OF ABBREVIATIONS

Alphabetical order

Ar	argon
C _{dyn}	dynamic lung compliance
f	respiratory frequency
\bar{F}_{N_2} (bag)	average expiratory bag N ₂ concentration of the collected WO gas
\bar{F}_{EN_2}	mean expired nitrogen concentration
F _{ETN₂}	end-tidal nitrogen concentration
FRC	functional residual capacity
N ₂	nitrogen
O ₂	oxygen
PaCO ₂	arterial carbon dioxide partial pressure
PaO ₂	arterial oxygen partial pressure
R _L	total respiratory resistance
SD	standard deviation
\dot{V}	respiratory flow
VD _i	instrumental dead space
V _{rx}	relaxation volume
V _T	tidal volume
ΣV_E	cumulative expired volume
WI	multiple-breath nitrogen washin
WO	multiple-breath nitrogen washout

INTRODUCTION

Little is known about ventilation distribution in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and no study has yet been achieved concerning the influence of their clinical state on ventilation maldistribution. Nevertheless, analysis of the distribution of ventilation is important for quantifying ventilatory abnormalities associated with lung disease.

Equine COPD is an hypersensitivity response to inhaled antigens, particularly moulds and actinomycetes that grow in hay and straw. This reaction is accompanied by inflammation, bronchospasm and excessive mucus production which probably lead to uneven distribution of ventilation.

The multiple-breath nitrogen washout (WO) technique is now largely used in human beings (1) to clarify the mechanisms of ventilation distribution in health and (2) to measure alterations of ventilation in disease. The advantages of this method that it is a non invasive test which additionally allows the functional residual capacity (FRC) to be measured representing the volume of gas in the lung after a normal expiration.

Typically, in human medicine, small airway obstruction results in delayed or otherwise impaired N₂ turnover due to impaired airway communication between incoming N₂-free gas and resident pulmonary air. These diseases are often associated with an increase in FRC.

In this study, we performed multiple-breath nitrogen WO on 6 COPD affected horses to study changes in ventilation distribution and lung volume, occurring after exposure to three different environmental conditions.

MATERIALS AND METHODS

Animals

We performed multiple-breath nitrogen WO and washin (WI) in six horses (8.8 ± 2.7 yr of age, mean \pm SD) affected with COPD. All experiments were performed on unsedated horses previously well accustomed to the laboratory procedures whilst restrained in stocks.

These COPD affected horses were chosen for the reversibility of their clinical symptoms of respiratory distress which they developed when exposed to a hay and barn environment. Reversibility of respiratory distress was obtained by placing them at pasture for 2 months or by intravenous injection of 0.02 mg atropine sulfate/kg bw. These improvements were measured

objectively by clinical examination and pulmonary function tests (mechanics of breathing and arterial blood gas analysis).

Experimental protocol

The horses were first tested in clinical remission, i.e. after two months at pasture with no exposure to hay and straw (*Period A*), and after two months in a controlled environment in a well ventilated barn with wood shavings bedding (Plomp[®], Waarden, the Netherlands), and feeding a grass silage containing approximately 50 % dry matter (Préfané Liégeois, Mortier, Belgium) (*Period B*). Finally, they were studied during an acute attack of airway obstruction precipitated by housing them in a barn with hay and straw (*Period C*). Between each period, horses were kept at pasture for at least 6 weeks. As a result, all horses were in clinical remission before starting each experimental period.

Pulmonary function measurements were performed the preceding day, and arterial blood gas analysis and weighing were performed just before the multiple-breath nitrogen WO test.

Table 1 - Baseline pulmonary function data in COPD affected horses at Periods A, B and C. Mean \pm SD

	<i>Period A</i>	<i>Period B</i>	<i>Period C</i>
C _{dyn} (L/kPa)	17.4 \pm 2.78	15.9 \pm 2.54	5.15 \pm 1.47
R _L (kPa/L/s)	0.045 \pm 0.009	0.053 \pm 0.009	0.211 \pm 0.092
V _T (L)	5.62 \pm 1.66	5.01 \pm 2.03	5.79 \pm 2.69
f (min ⁻¹)	13.8 \pm 6.4	14.2 \pm 4.8	20.3 \pm 7.1
PaO ₂ (mmHg)	102.7 \pm 10.7	95.4 \pm 6.8	78.3 \pm 4.5
PaCO ₂ (mmHg)	44.1 \pm 3.3	43.1 \pm 1.9	47.9 \pm 2.6
Weight (kg)	557.2 \pm 26.1	580.0 \pm 23.8	548.5 \pm 19.1

C_{dyn} = dynamic compliance; R_L = pulmonary resistance; V_T = tidal volume; f = respiratory frequency; PaO₂ = arterial oxygen partial pressure; PaCO₂ = arterial carbon dioxide partial pressure. Period A = pasture, period B = grass silage and wood shavings, period C = hay and straw (acute crisis).

Procedure

The multiple-breath nitrogen WO and WI were performed exactly as described previously in healthy bovines and horses (Rollin *et al.*, 1996; 1997). A face mask covered the mouth and nose of the horses. A rubber band was sealed around the posterior opening of the mask and adhesive tape was used around the end of the rubber joint to make the system air tight at the proximal end. Airtightness was easily obtained as demonstrated by the absence of N₂ contamination during the WO (Fig. 1). A heated Fleisch N° 4 pneumotachograph was placed between a giant two-way non-rebreathing valve (Hans-Rudolph, Model N° 7200, Kansas City, Mo) and the mask to measure airflow (\dot{V}). The inspiratory side of the non-rebreathing valve was connected, via a manual three-way valve, to a closed bag containing 20 % oxygen (O₂) and 80 % argon (Ar) supplied by a cylinder, allowing the horse to inspire either room air or the N₂-free gas mixture. The expiratory side of the Hans-Rudolph valve was connected via another three-way valve to a larger closed bag designed to collect expired gas during the WO. The total dead space of the mask, non-rebreathing valve and pneumotachograph was approximately 1,000 ml.

Gas concentrations were measured continuously with a respiratory mass spectrometer (MGA 2000, Case, Kent, UK) whose capillary sampled 20 ml gas/minute in an aperture made in the mask, just before the pneumotachograph. A response time of 90 msec was achieved with this capillary whose lag time was about 300 msec. Calibration procedures were performed before and after each experiment using a commercially available certified gas mixture of great accuracy (Air Liquide, Liège, Belgium).

The \dot{V} , N₂ and Ar signals were visually displayed on the screen of a rapid-writing polygraph (ES 1000, Gould, Wauthier-Braine, Belgium) and stored onto a magnetic tape recorder (model 3968A, Hewlett Packard, Brussels, Belgium) before being analysed.

All tests were achieved after the horses had been starved for 12 h to eliminate the reduction in lung volume associated with feeding (McDonnell *et al.*, 1979). After a period of quiet breathing, the inspiratory three-way valve was turned towards the inspiratory bag during expiration while the expiratory valve was turned towards the expiratory bag during the following first inspiration of the N₂-free gas mixture. The expired gas collection duration was carefully measured just as the average expiratory N₂ concentration in the bag after conscientious mixing. After the WO, the opposite procedure was used to obtain the WI curves.

Data analysis

After the experiments, the analogue signals stored on the tape recorder were digitally

converted at a sampling rate of 50 Hz (Superscope II, GW Instruments, Somerville, MA, USA) for off-line data analysis. The N₂ concentration and flow lines were synchronised according to the time lag measured before the experiment. Flow was integrated with respect to time to yield volume.

FRC was computed from the quantity of N₂ expired in the collecting bag during the WO phase, using the equation :

$$\text{FRC} = \frac{\bar{F}_{\text{N}_2}(\text{bag}) \cdot \Sigma\text{VE}}{\bar{F}_{\text{E}_{\text{N}_2}}(0) - \bar{F}_{\text{E}_{\text{N}_2}}(f)} - \text{VDi}$$

where $\bar{F}_{\text{N}_2}(\text{bag})$ is the average expiratory bag N₂ concentration of the cumulatively collected WO gases measured when emptying the collection bag; ΣVE is the cumulatively expired volume over the expiratory bag collection time; $\bar{F}_{\text{E}_{\text{N}_2}}(0) - \bar{F}_{\text{E}_{\text{N}_2}}(f)$ is the gradient of mean expired N₂ concentrations measured at the level of the face mask between the expiration just preceding the onset of the WO test and the final WO expiration collected in the expiratory bag; VDi is the instrumental dead space.

The effect of N₂ excretion from blood and tissues throughout the multiple-breath nitrogen WO test was not accounted for in the calculation of FRC.

We related end-tidal expiratory N₂ fractional concentrations ($F_{\text{ET}_{\text{N}_2}}$) as a function of ΣVE . Fig. 2 shows the resulting semilog plots of $F_{\text{ET}_{\text{N}_2}}$ vs. ΣVE . The alinearity in these plots was quantified by the ratio of the slopes of two regression lines, one between 100 and 50 % and the other between 50 and 10 % of the $F_{\text{E}_{\text{N}_2}}$ value of the first breath. The slope of the latter was divided by the former.

Statistical analysis

The changes between the environmental states were tested using nonparametric test for paired data, the Wilcoxon test. Significance was accepted at the $P < 0.05$ level, and summarised data are expressed as means \pm SD.

RESULTS

Typical tracings of N_2 , Ar concentrations and flow are shown as a function of time for a WO in Fig. 1.

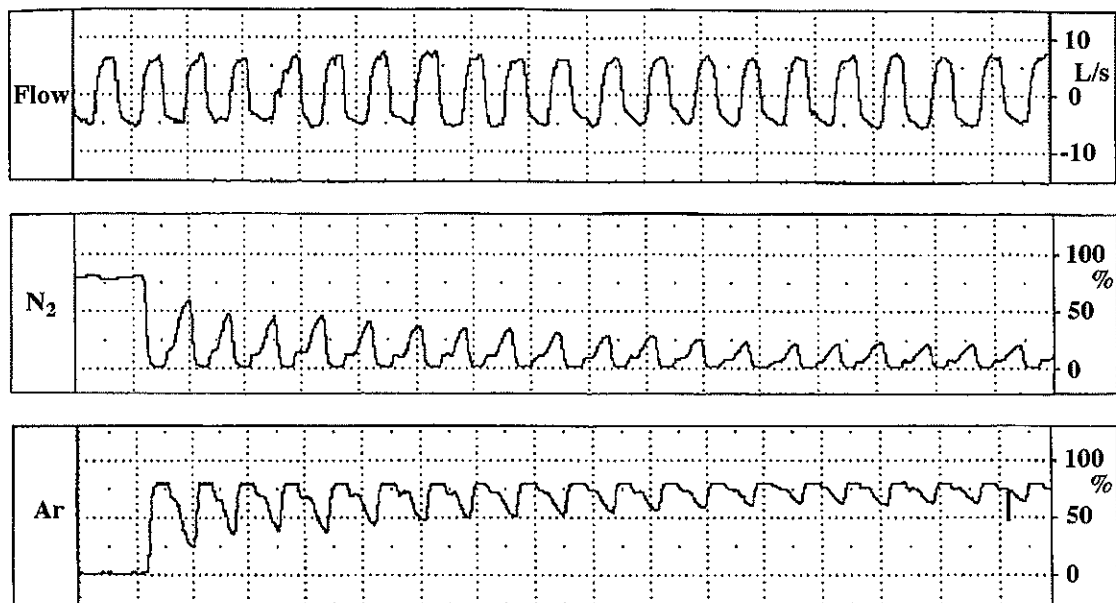


Fig. 1 - Typical set of traces during a multiple-breath nitrogen washout. N_2 and Ar concentrations (%) and \dot{V} (L/s) are plotted as a function of time.

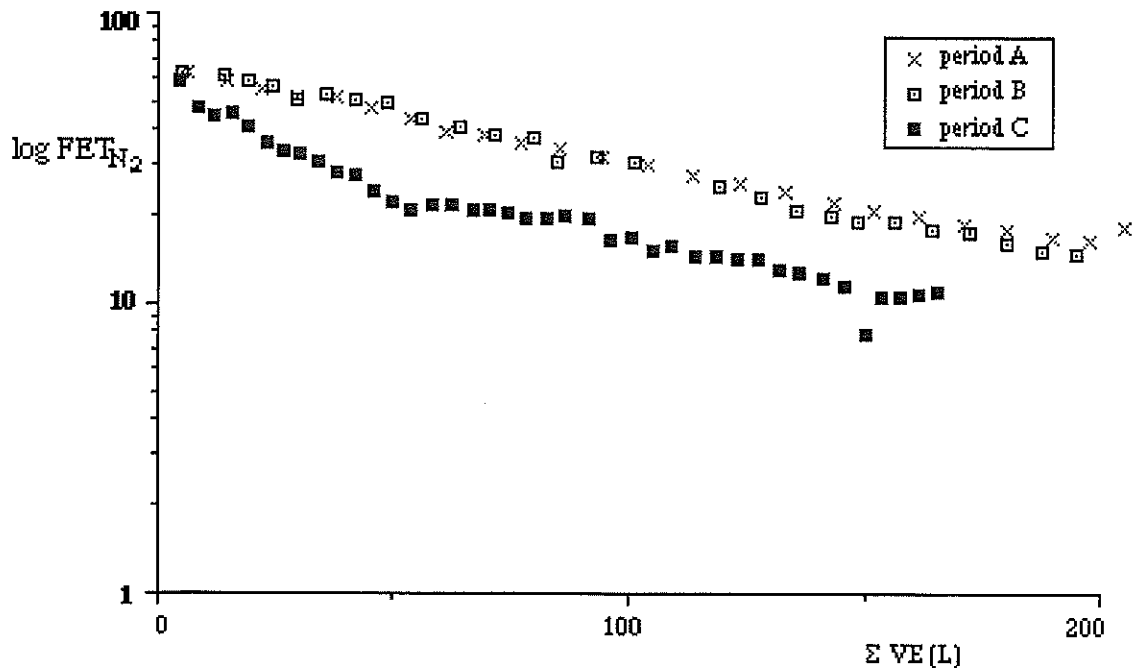


Fig. 2 - End-tidal expiratory N_2 fractional concentration (FET_{N_2}) plotted in logarithmic scale as a function of the cumulative expired volume (ΣVE) during N_2 WO performed in one horse in the three experimental conditions.

Period A = pasture, period B = grass silage and wood shavings, period C = hay and straw (acute crisis).

As data were lacking for 2 horses in Period C, only 4 horses were considered for the statistical comparison of the slope ratio between Periods C and A-B. Mean values of slope ratio and ventilatory parameters (V_T and f) for the 4 concerning horses are given in Table 2 for the three experimental periods. The average *slope ratio* measured for 4 horses after Period C was significantly less than that measured after Periods A and B. There was no significant difference between the *slope ratio* measured for Period A and for Period B.

Table 2 - *Slope ratio*, tidal volume (V_T) and respiratory frequency (f) values for the 4 horses at the three different experimental periods. Data are expressed as mean \pm SD

	<i>Period A</i>	<i>Period B</i>	<i>Period C</i>
<i>Slope ratio</i>	0.639 \pm 0.180 a	0.699 \pm 0.224 a	0.364 \pm 0.128 b
V_T (L)	7.25 \pm 4.91 a	6.96 \pm 1.90 a	5.82 \pm 2.63 a
f (min^{-1})	14.6 \pm 4.9 a	12.7 \pm 1.9 a	28.5 \pm 11.8 b

Values with no common designations are significantly different ($p < 0.05$) (Wilcoxon test)

Period A = pasture, period B = grass silage and wood shavings, period C = hay and straw (acute crisis).

Because of irregular breathing pattern during one of the three periods, one horse was excluded from the FRC measures. Mean end-expiratory lung volume values are given in Table 3 for the three different environmental conditions. The mean FRC value in crisis was significantly lower than in pasture while no statistical difference was found between Periods A and B and between Periods B and C.

Table 3 - Values of FRC, tidal volume (V_T) and respiratory frequency (f) for the 5 horses. Mean \pm SD

	<i>Period A</i>	<i>Period B</i>	<i>Period C</i>
FRC (L)	55.86 \pm 6.94 a	40.50 \pm 10.93 ab	44.11 \pm 6.37 b
V_T (L)	8.65 \pm 1.78 a	7.39 \pm 1.91 a	6.11 \pm 2.31 a
f (min^{-1})	13.9 \pm 4.5 a	12.6 \pm 4.3 a	28.4 \pm 10.2 b

Values with no common designations are significantly different ($p < 0.05$) (Wilcoxon test)

Period A = pasture, period B = grass silage and wood shavings, period C = hay and straw (acute crisis).

DISCUSSION

One method of analysis of the distribution of ventilation consist of measuring insoluble tracer gas concentrations in expired gas. In human medicine, to achieve multiple-breath nitrogen WO, pure O₂ is used as N₂-free gas. Nevertheless, to allow a more reliable feature evaluation for comparison among subjects, constraints may be needed on the ventilation manoeuvre, for example, restricted volume and flow ranges. Furthermore, voluntary constraints cannot be used with non-anaesthetised animals. For this reason, to obtain regular tidal breathing during the experiment, a 80 % Ar- 20 % O₂ mixture was chosen as the N₂-free gas, to avoid pulmonary depression due to inhalation of 100 % O₂ which alters breathing pattern (Gallivan *et al.*, 1990).

In the literature, very few papers record measurement of FRC in the equine species (Sorenson and Robinson, 1980). Moreover, measurements were made in a group of horses in different pathological states. Several techniques can be used to achieve this end result, but each presents both advantages and disadvantages. FRC may be measured by gas dilution using either the closed or open circuit method, or by the application of Boyles' law using a whole body plethysmograph. Nevertheless, body plethysmograph is difficult to use with conscious non-anaesthetised large animals. The closed circuit helium dilution method of measuring FRC has been used successfully in both conscious and anaesthetised horses (McDonell and Hall, 1974). The open circuit method to determine FRC was used by Willoughby and McDonell (1979). Using this method, no consistent alteration in FRC was measured in horses with COPD.

Nevertheless, in diseased horses, gas trapped beyond closed or plugged terminal airways may not be involved in ventilation, and as such it is not measured by the open or closed circuit methods. This is supported by the findings in one anaesthetised horse with COPD, in which FRC measured plethysmographically was markedly elevated (Leith and Gillespie, 1971). Total lung capacity was also increased in this horse. More recently, Gallivan *et al.* (1990) performed multiple-breath nitrogen WO on light horses and examined the effects in COPD affected horses of a bronchodilator on the distribution of ventilation and on FRC. Though a bronchodilator caused a decrease in FRC, the using method (100 % O₂) induced irregular breaths. The variability in V_T is potentially a source of error, indeed this variability will alter the volume of air entering the alveoli and the distribution of ventilation occurs within the lung (Crawford *et*

al., 1986). Another important potential source of error is that horse present a characteristic flow pattern. Indeed, horse at rest breathes around its relaxation volume (V_{rx}) (Koterba *et al.*, 1988), whereas all other mammalian, including human beings, breath above their V_{rx} . So, in the equine species, respiration is composed of a biphasic inspiratory and expiratory flow pattern. These active phases require activation of abdominal muscle for expiration and both diaphragmatic and intercostal muscle activation for the second phase of inspiration (Koterba *et al.*, 1988). Following the relative importance of these active parts, the breathing pattern could be very different and potentially interfere with the measure of FRC. In addition, important variability in FRC measurement probably exists in the equine species as it does in human beings. In our experiment, despite the choice of a N_2 -free gas that does not alter breathing pattern, comparisons between different states of illness were not possible with this method of analysis.

If the lung is perfectly homogeneously ventilated, the alveolar nitrogen concentration decreases exponentially with the numbers of breaths. In such cases, the slope ratio calculated as previously described is equal to 1. Any deviation from a straight line and thus from unity indicates a non-homogeneous spatial distribution of ventilation. The principles governing the spatial distribution of ventilation in the lungs of the equine species are assumed to be similar to those which appear to act in human beings (Amis *et al.*, 1984). Therefore, gravity has been assigned a pivotal role (Amis *et al.*, 1984). In our study, greatest ventilation inhomogeneity occurred in COPD horses in acute crisis. This difference observed from clinical remission should not be explained by modification of the gravity. So, in crisis, this increase in ventilation maldistribution is probably ascribable to modification of the lung's elastic properties.

We took great care in the design and testing of the equipment to minimize the potential errors in these tests. Beyond the normal care needed with calibration of the volume-measuring system and the mass spectrometer, potential sources of error are dependent on the irregular breathing. For all that, a decrease in intrasubject variability and an increase in sensitivity between the different periods were obtained by (1) analysing all of the breaths of the N_2 WO curve, and (2) scaling the data minimize the effects of breathing pattern variation.

In summary, our results suggest that multiple-breath N_2 WO may be used (1) on

unsedated horses, (2) to examine ventilation inhomogeneity. Our findings suggest that maintaining COPD affected horses in a controlled barn environment, with grass silage and wood shavings, does not alter the ventilation distribution, whilst, these same horses in acute crisis show greatest ventilation inhomogeneity. This technique will have further applications to estimate improvements due to environmental management or medical treatments. Nevertheless, this non invasive technique is probably not adequate to measure FRC in COPD affected horses.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank C. Gresse, I. Sbaï and M. Motkin for their precious technical assistance, and S. Verbanck and Prof. J. Manil for help with the data acquisition.

REFERENCES

- CRAWFORD A.B.H., MAKOWSKA M., PAIVA M., ENGEL L.A. Effect of tidal volume on ventilation maldistribution. *Respir. Physiol.*, 1986, **66**, 11-25.
- GALLIVAN G.J., VIEL L., MCDONELL W.N. An evaluation of the multiple-breath nitrogen washout as a pulmonary function test in horses. *Can. J. Vet. Res.*, 1990, **54**, 99-105.
- KOTERBA A.M., KOSCH P.C., BEECH J., WHITLOCK T. Breathing strategy of the adult horse (*Equus caballus*) at rest. *J. Appl. Physiol.*, 1988, **64**, 337-346.
- LEITH D., GILLESPIE J.R. Respiratory mechanics of normal horses and one with chronic obstructive lung disease. *Fed. Proc.*, 1971, **30**, 556.
- MCDONELL W.N., HALL L.W. Functional residual capacity in conscious and anaesthetized horses. *Brit. J. Anaesthesiol.*, 1974, **46**, 802-803.
- MCDONELL W.N., HALL L.W., JEFFCOTT L.B. Radiographic evidence of impaired pulmonary function in laterally recumbent anaesthetised horses. *Equine vet. J.*, 1979, **11**, 24-32.
- MUYLLE E., VAN DEN HENDE C., OYAERT W. Nitrogen clearance in horses as a respiratory function test. *Zbl. Vet. Med. A*, 1972, **19**, 310-317.
- ROLLIN F., DESMECHT D., VERBANCK S., VAN MUYLEM A., LEKEUX P., PAIVA M. Multiple-breath washout and washin experiments in steers. *J. Appl. Physiol.*, 1996, **81**, 957-963.
- ROLLIN F., DESMECHT D., ART T., VANDENPUT S., VERBANCK S., VAN MUYLEN A., LOMBA F., LEKEUX P., PAIVA M. Multiple-breath washout and washin experiments in Standardbred horses. 1997, submitted for publication.
- SPÖRRI H., DENAC M. Der Stickstoff-Einwaschungstest im dienste der Lungenfunktionsprüfung. *Zbl. Vet. Med. A*, 1970, **17**, 845-856.
- SORENSEN P.R., ROBINSON N.E. Postural effects on lung volumes and asynchronous ventilation in anesthetized horses. *J. Appl. Physiol.*, 1980, **48**, 97-103.
- WILLOUGHBY R.A., MCDONELL W.N. Pulmonary function testing in horses. *Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract.*, 1979, **1**, 171-197.

QUATRIÈME PARTIE :

Conclusions et perspectives

L'apport original majeur de notre travail est d'avoir étudié l'impact d'une solution alternative d'entretien en écurie sur la fonction respiratoire de chevaux souffrant de maladie pulmonaire obstructive chronique. Jusqu'à présent, seules des constatations de terrain permettaient de préconiser tel ou tel environnement afin d'induire et maintenir chez ces chevaux allergiques un état de rémission clinique.

Le nombre important de chevaux adultes présentant ce syndrome représente un problème majeur de gestion quotidienne et interpelle nombre de praticiens. Et ce d'autant plus que les traitements médicamenteux n'apportent pas de solutions à long terme s'ils ne sont pas accompagnés d'un contrôle strict de l'environnement dans lequel est maintenu le cheval.

1. CONCLUSIONS

Les objectifs de ce travail étaient de 2 ordres. Notre première étude a permis, grâce à une stricte standardisation de chaque mesure, de quantifier dans différentes sources de fourrages et de litières la charge en poussière et en allergènes. En deuxième lieu, à la lumière de ces résultats, l'impact d'une association fourrage-litière, destinée à réduire de façon significative la charge en allergènes et en poussière dans l'environnement d'écurie, a été étudié sur la fonction respiratoire de chevaux présentant une allergie à certains composants de la poussière de foin. Ces résultats ont été systématiquement comparés à ceux obtenus pour les mêmes animaux au terme d'un séjour de longueur équivalente en pâture et en état de crise aiguë induite par l'inhalation de poussière de foin.

Ainsi, ces expériences ont montré que l'association ensilage d'herbe préfanée ($\pm 50\%$ de matière sèche)-copeaux de bois permet de réduire très significativement la libération d'aéroallergènes et de poussière respirable dans le milieu ambiant. L'utilisation de ce couple fourrage-litière permet de maintenir chez des chevaux allergiques des paramètres de mécanique ventilatoire identiques à ceux mesurés chez ces mêmes individus après un séjour en pâture ou que ceux mesurés chez des individus sains. De même, la distribution de la ventilation n'est pas altérée chez ces animaux allergiques après 8 semaines dans ces conditions d'étude, en

comparaison à un séjour équivalent en pâture. Néanmoins, la mesure de la réactivité des voies respiratoires profondes de ces individus allergiques est plus élevée après un séjour de 6 semaines en box, sous ensilage d'herbe préfanée et copeaux de bois par rapport à celle mesurée pour les mêmes individus en pâture ou par rapport à des chevaux sains. Cette hyperréactivité est néanmoins moins importante que celle observée lors d'une crise aiguë, induite par l'inhalation de poussière de foin.

2. PERSPECTIVES

Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives. En effet, l'hyperréactivité bronchique au terme de 6 semaines en box dans un environnement protégé indique que les allergènes et irritants inévitablement présents, bien qu'en petite quantité, induisent des réactions inflammatoires dans les voies respiratoires profondes chez les individus allergiques. Des études de populations cellulaires dans le fluide épithélial tapissant ces voies et de marqueurs de l'inflammation apporteraient de nouveaux éclaircissements sur les modifications induites par l'inhalation d'allergènes et d'irritants chez ces chevaux. De même, il semblerait intéressant d'évaluer l'altération éventuelle qu'induirait ces modifications sur l'aptitude sportive de ces chevaux. En outre, sur base du modèle expérimental proposé, d'autres combinaisons fourrage-litière pourraient être étudiées. En effet, en fonction des régions et des disponibilités, d'autres solutions alternatives pourraient être envisagées afin de maintenir en rémission clinique les chevaux atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique. De plus des études épidémiologiques permettraient d'évaluer l'impact d'une telle protection environnementale sur l'incidence d'apparition de la maladie pulmonaire obstructive chronique chez des chevaux maintenus en box.