

Université de Montréal

Le microbiome bactérien pulmonaire dans l'asthme équin

par Gabrielle Fillion-Bertrand

Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires option sciences cliniques

Décembre 2016

© Gabrielle Fillion-Bertrand, 2016

Résumé

Le microbiome bactérien constitue l'ensemble des bactéries retrouvées au sein d'un espace. Le rôle du microbiome pulmonaire dans l'asthme est mal défini, mais il est maintenant établi que celui de patients asthmatiques diffère de celui d'individus sains. Cependant, l'influence des conditions environnementales et de la médication sur le microbiome pulmonaire est méconnue et leurs effets difficiles à contrôler chez l'humain. De plus, la stabilité du microbiome dans le temps demeure controversée. L'hypothèse de l'étude est que les microbiomes pulmonaire, nasal et oral de chevaux non-médicamentés varient avec l'environnement et que le statut asthmatique affecte principalement le microbiome pulmonaire.

Six chevaux atteints d'asthme équin sévère et 6 chevaux sains ont été gardés dans 3 environnements distincts (exposition antigénique faible, modérée et élevée). Dans chaque environnement, la fonction pulmonaire a été évaluée et des lavages bronchoalvéolaires (LBA), oraux et nasals ont été prélevés. La région V4 du gène de l'ARN ribosomal 16S a été séquencée (Illumina MiSeq 4) et analysée à l'aide du logiciel *Mothur* et du logiciel *Vegan* dans R.

Les communautés bactériennes pulmonaires, orales et nasales sont fortement regroupées par conditions environnementales et l'effet de l'environnement est plus marqué chez les chevaux sains. Le microbiome pulmonaire des chevaux asthmatiques diffère de celui des chevaux sains au niveau taxonomique de la famille, avec une tendance à une surreprésentation des Pasteurellaceae, contrairement aux microbiomes nasal et oral qui ne sont pas différents entre les deux groupes. Les familles bactériennes Neisseriaceae, Lachnospiraceae et Bacteroidaceae, dont certaines espèces sont potentiellement pathogènes, ont été seulement retrouvées dans les LBAs de chevaux asthmatiques.

Cette étude montre que les microbiomes bactériens pulmonaires des chevaux sains et asthmatiques ne recevant pas de médication sont différents et varient selon le niveau d'exposition antigénique. Cette différence étant présente principalement lorsque les chevaux asthmatiques ont une inflammation pulmonaire suggère que le microbiome pulmonaire altéré dans l'asthme n'est pas inhérent, mais coïncide avec l'inflammation pulmonaire. Le rôle du microbiome dans la perpétuation de l'inflammation reste à investiguer.

Mots-clés : Microbiome pulmonaire, asthme équin, bactérie, environnement, inflammation

Abstract

Bacterial microbiome is defined as the whole bacterial population found within a space. The role of the pulmonary microbiome in asthma is poorly defined, but it is now well established that the one of asthmatic patients differs from that of healthy individuals. However, the influence of environmental conditions and medication on pulmonary microbiome is poorly known and effects difficult to control in humans. Moreover, microbiome stability over time remains controversial. The hypothesis of this study is that the pulmonary, nasal and oral microbiomes of unmedicated horses vary with the environment and that asthmatic status does affect the pulmonary microbiome.

Six horses with severe equine asthma and 6 healthy horses were kept in 3 distinct environments (low, moderate and high antigen exposure). In each environment, pulmonary function has been evaluated and bronchoalveolar lavages (BALs), nasal and oral washes were collected. The V4 region of the 16S rRNA gene was sequenced (Illumina MiSeq 4) and analyzed using the *Mothur* software and the *Vegan* package in R.

Pulmonary, oral and nasal bacterial communities are strongly grouped by environmental conditions and the effect of the environment is more pronounced in healthy horses. The pulmonary microbiome of asthmatic horses differs from that of healthy horses at the family level of taxonomic designation, with a tendency towards an overrepresentation of Pasteurellaceae, unlike nasal and oral microbiomes which are not different between the two groups. The bacterial families Neisseriaceae, Lachnospiraceae and Bacteroidaceae with pathogenic potential were only found in the BALs of asthmatic horses. This study shows that the lung bacterial microbiomes of healthy and asthmatic horses receiving no medication are different and vary accordingly to the antigenic exposure level. This difference is present mainly when asthmatic horses have a strong pulmonary inflammation which suggest that the altered pulmonary microbiome is not inherent but coincident with pulmonary inflammation. Its role in the perpetuation of inflammation remains to be investigated.

Keywords: Pulmonary microbiome, equine asthma, bacteria, environment, inflammation

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles, symboles et abréviations.....	x
Remerciements.....	xii
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Recension de la littérature.....	3
1.1 L'asthme équin.....	3
1.1.1 Définition	3
1.1.2 Pathophysiologie.....	4
1.1.3 Le rôle de l'environnement et des poussières inhalées	4
1.1.4 L'asthme équin en recherche pulmonaire	4
1.2 Les mécaniques respiratoires	5
1.2.1 Les mécaniques conventionnelles.....	5
1.2.2 Le système d'oscillométrie par impulsion	6
1.3 Le lavage bronchoalvéolaire	9
1.3.1 Procédure	9
1.3.2 La problématique de la contamination par les voies respiratoires supérieures.....	9
1.4 Les bactéries.....	10
1.4.1 La classification morphologique.....	10
1.4.2 La pathogénicité et le commensalisme	12
1.4.3 La biologie moléculaire à la rescousse de la bactériologie.....	13
1.5 Notions de microbiome.....	14
1.5.1 Définitions et généralités	14
1.5.2 Les mesures de la diversité biologique	15
1.5.3 L'implication des bactéries dans le règne animal.....	17
1.5.4 Le microbiome oral.....	18

1.5.5 Le microbiome intestinal	19
1.5.6 Le microbiome nasal.....	20
1.5.7 Le microbiome pulmonaire.....	21
1.5.8 La reconnaissance du microbiome par le système immunitaire	23
1.6 L'analyse du microbiome bactérien.....	25
1.6.1 Le génome bactérien.....	25
1.6.2 L'ARN ribosomal bactérien 16S	25
1.6.3 Le principe général du séquençage génomique	27
1.6.4 La plateforme Illumina Miseq	29
1.6.5 Identification des espèces bactériennes et études phylogénétiques	29
1.7 Hypothèse et objectifs.....	30
Chapitre 2 : Article.....	32
2.1 Abstract	34
2.2 Introduction.....	35
2.3 Methods.....	37
2.3.1 Animals.....	37
2.3.2 Experimental design.....	37
2.3.3 Lung function.....	37
2.3.4 Nasal and oral lavages	38
2.3.5 Bronchoalveolar lavages.....	38
2.3.6 Negative and positive sequencing control specimens.....	39
2.3.7 DNA extraction.....	39
2.3.8 High throughput sequencing.....	39
2.3.9 Quantitative PCR (mixed bacterial DNA)	40
2.3.10 Data analysis	40
2.3.11 Identification of procedural contaminants	41
2.4 Results.....	42
2.4.1 Animals.....	42
2.4.2 Lung function.....	42
2.4.3 Total and differential cell counts	43
2.4.4 Reagents and bronchoscope contamination.....	44

2.4.5 Bacterial DNA burden	44
2.4.6 Sequencing results	45
2.4.7 Pulmonary versus nasal and oral microbiome	46
2.4.8 Influence of the environment on pulmonary, nasal and oral microbiome	49
2.4.9 Influence of health status on pulmonary, nasal and oral microbiome	50
2.5 Discussion	52
2.5.1 Brief summary of main results.....	52
2.5.2 Pulmonary, oral and nasal microbiomes are influenced by the environment	52
2.5.3 Pulmonary microbiome is altered in equine asthma	53
2.5.4 Pulmonary microbiome is distinct from oral and nasal microbiome	54
2.5.5 Potential pitfalls	55
2.6 Conclusion	56
2.7 Acknowledgements.....	56
2.8 References.....	57
Chapitre 3 : Discussion générale.....	60
3.1 Les microbiomes sont influencés par l’environnement	60
3.2 Les microbiomes oral et nasal sont influencés par l’environnement, mais pas par le statut asthmatique	62
3.3 Composition du microbiome bactérien pulmonaire des chevaux	63
3.4 Variabilité intra et inter-chevaux des microbiomes bactériens pulmonaires	66
3.5 La neutrophilie et la bronchoconstriction associées au microbiome bactérien pulmonaire	68
3.6 Composition des microbiomes bactériens nasals et oraux des chevaux	69
3.7 Défis et possibles biais : contamination des échantillons biologiques	73
Chapitre 4 : Conclusion et perspectives.....	83
Bibliographie.....	84
Annexe A	xiii
Annexe B	xiv
Annexe C	xvi

Liste des tableaux

Tableau I. Définitions des termes techniques utilisés pour caractériser les mécaniques respiratoires effectuées avec l'oscillométrie par impulsions.	8
Tableau II. Comparaison de la composition bactérienne pulmonaire échantillonnée par lavages bronchoalvéolaires chez des enfants sans problèmes respiratoires (contrôles) et asthmatiques. Modifié de Hilty <i>et al.</i> , 2010.....	22
Tableau III : Échantillons retirés de l'étude. LBA : Lavage bronchoalvéolaire.	78

Liste des figures

Figure 1.1. Composantes du système d'oscillométrie par impulsions.....	8
Figure 1.2. Différences morphologiques bactériennes	11
Figure 1.3. Comparaison des enveloppes de bactéries Gram-négatives (A) et Gram-positives (B).	12
Figure 1.4. Schématisation des principes de biodiversité.....	16
Figure 1.5. Modèle conceptuel des interactions entre le microbiome pulmonaire et la réponse immunitaire de l'hôte.....	24
Figure 1.6. Représentation de la structure du ribosome procaryote	26
Figure 1.7. Structure du gène bactérien 16S d'E. coli d'environ 1.5 kb, illustrant les neuf régions variables en rose et les régions conservées au cours de l'évolution en gris	27
Figure 1.8 : Séquençage génomique. A) Séquençage aléatoire global B) Séquençage clone par clone.....	28
Figure 2.1 Lung function..	42
Figure 2.2 Bronchoalveolar lavage cytology.	43
Figure 2.3 Bacterial 16S rRNA quantification by PCR.....	45
Figure 2.4 Richness and diversity. Community richness (A) and Shannon diversity indexes (B) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), nasal washes and oral washes of horses with asthma (black bars) and healthy controls (white bars) under three environmental conditions.	47
Figure 2.5 Principal component (PC) analysis of bronchoalveolar lavage fluid (BALF), nasal washes and oral washes of horses with asthma (black circles) and healthy horses (white circles).	48
Figure 2.6 Comparison of the 30 most common operational taxonomic units found in bronchoalveolar lavage fluid, oral, nasal and bronchoscope samples.	49
Figure 2.7 Principal component analysis of the pulmonary microbiome of healthy and asthmatic horses	51
Figure 2.8 Principal component analysis of the pulmonary microbiome of healthy and asthmatic horses	51

Figure 3.1. Diagrammes de Venn représentant la distribution des phylums et familles bactériennes retrouvées dans les lavages bronchoalvéolaires de chevaux sains et asthmatiques selon les conditions environnementales.....	65
Figure 3.2. Indices de dissimilitude de Bray-Curtis.	67
Figure 3.3. Corrélations entre la quantité de neutrophiles dans les lavages bronchoalvéolaires et les phylums Bacteroidetes et Proteobacteria retrouvés dans la bouche des chevaux.	69
Figure 3.4. Diagrammes de Venn représentant la distribution des phylums et familles bactériennes retrouvées dans les lavages nasals de chevaux sains et asthmatiques selon les conditions environnementales.....	71
Figure 3.5. Diagrammes de Venn représentant la distribution des phylums et familles bactériennes retrouvées dans les lavages oraux de chevaux sains et asthmatiques selon les conditions environnementales.....	72
Figure 3.6. Comparaison des 30 unités taxonomiques opérationnelles les plus abondantes dans les réactifs utilisés pour l'extraction d'acide désoxyribonucléique.	74
Figure 3.7. Comparaison des 30 unités taxonomiques opérationnelles les plus abondantes dans les réactifs utilisés pour l'extraction d'ADN et des prélèvements biologiques et endoscopiques.	76
Figure 3.8. Comparaison des 30 unités taxonomiques opérationnelles les plus abondantes dans les prélèvements endoscopiques, des lavages bronchoalvéolaires et des réactifs utilisés pour l'extraction d'ADN.	77
Figure 3.9. Nombre de séquences pour chacun des échantillons.....	79
Figure 3.10. Comparaison des 13 unités taxonomiques opérationnelles les plus abondantes dans l'air, les réactifs utilisés pour l'extraction d'ADN et les prélèvements biologiques.	80
Figure 3.11. Comparaison des 29 unités taxonomiques opérationnelles les plus abondantes dans le foin, l'air, les réactifs utilisés pour l'extraction d'ADN et les prélèvements biologiques. ..	81
Figure A1. Principe d'amplification et de séquençage de l'ADN par la méthode Illumina.	xvi

Liste des sigles, symboles et abréviations

α	Alpha
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
β	Bêta
GRP41	<i>G Protein-Coupled Receptor 41</i> , Récepteur 41 couplé aux protéines G
γ	Gamma
Hz	Hertz
IAD	<i>Inflammatory Airway Disease</i> , maladie inflammatoire des voies respiratoires, asthme équin léger
IgE	Immunoglobuline E
IOS	<i>Impulse Oscillometry System</i> , oscillométrie par impulsion
kb	Kilobase
LBA	Lavage bronchoalvéolaire
OTU	<i>Operational taxonomic unit</i> , unité taxonomique opérationnelle
pb	Paire de base
PCA	<i>Principal Components Analysis</i> , analyse des composantes principales
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , réaction de polymérase en chaîne
pH	Potentiel hydrogène
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> , réaction de polymérase en chaîne quantitative
R	Résistance
S	Svedberg (Unité de mesure du taux de sédimentation)
SD	<i>Standard Deviation</i> , déviation standard
SPAOPD	<i>Summer Pasture-Associated Obstructive Pulmonary Disease</i> , pneumopathie obstructive associée à la mise en pâture
VRS	Voies respiratoires supérieures
X	Réactance
Z	Impédance

Être sédentaire, c'est dans tête que c'est dangereux man
le corps calme l'esprit qui rame au maximum, chum
Comme Noam Chomsky sur un trip d'opium

Chu pas péripatéticien au sens propre j'me promène pas trop
j'use pas trop d'bottes chu casanier, j'peux pas l'nier
allez-y riez mon moral est d'acier
ça s'agite dans l'gîte, ça cogite
ça ricoche dans caboche c'est l'rush
toujours tout seul, tout compte fait, tout baigne
l'important c'est que pourtant j'me pogne pas l'beigne

Quand qu'ça jase de voyage chu loin d'être dans l'coup
J'ai pas vu grand-chose, dommage
mais j'en ai entendu beaucoup j'ferme mes stores
j'écoute le décor oui oui t'as compris c't'un décor sonore
pis c'est commode c'est moi l'commodore
du bateau-labo d'où j'élabore mes transports
j'fais des beats dans ma maison
pour les vacances y'a pas d'saison
ça s'passe en tout temps mais jamais vraiment
chu crevé mais j'fais jamais d'crevaïson
[...]

y'a pas d'honte à être sédentaire
la lumière est en nous avant tout
demande aux Hindous

- Maison et Idéal, Loco Locass -

Remerciements

Je me permets d'utiliser mon «écriture fleurie» afin de remercier ma directrice de recherche Dre Mathilde Leclère, qui tout au long de cette année et demie, m'a fait confiance et n'a cessé de m'encourager, de m'aiguiller et de me faire cheminer dans le processus qu'a exigé cette maîtrise. Étant sa première étudiante, je lui lève mon chapeau puisqu'elle a su avec brio établir l'équilibre entre professionnalisme et familiarité. Sa détermination et sa rigueur m'ont poussé à m'aventurer hors des sentiers battus.

Je remercie également mon co-directeur de recherche Dr Jean-Pierre Lavoie, grâce à qui tout a commencé. Un homme d'expérience indubitable et au savoir inépuisable qui sait marier tact et curiosité. Sa générosité ne fait qu'embellir le tableau d'une personne dont on ne peut nier la notoriété.

Merci au jury indispensable qui évaluera avec pragmatisme et au meilleur de sa connaissance le contenu de ce document, résultat de méninges surmenées.

Merci aussi à Roxane Boivin qui a dirigé le laboratoire avec rigueur et qui a pris part aux expérimentations.

Merci à Amandine Vargas, Michela Bullone, Mohamed Issouf, Ludovic Tanquerel, Nicolas Herteman, Juan Carlos Arango Sabogal, Maria Puerto et Adrien Levasseur qui ont participé en tant que collègues et amis à l'établissement d'un climat de travail convivial et agréable.

Merci à mon copain exceptionnel Lucien pour son support inconditionnel, accentué de «allez, un dernier *boost!*» suivi de «ce n'est pas encore fini?». Il a su contenir et désamorcer la bombe à retardement en laquelle je me métamorphosais à l'occasion. (Quelle patience!)

Un merci tout particulier à Serena Ceriotti, étudiante Italienne remarquablement intelligente devenue aujourd'hui ma grande amie et la meilleure que je n'aurai jamais.

Merci à ma sœur, qui de l'autre côté de la table détend l'atmosphère en adoptant des grimaces, ma foi, plutôt déstabilisantes!

Finalement, merci à mes parents, qui m'ont patiemment encouragée et hébergée (nourriture et café inclus!) au détriment de leurs activités.

Introduction

L'asthme est un trouble inflammatoire des voies respiratoires qui affecte environ 300 millions d'individus à travers le monde (WHO, 2007). Cette maladie combine à la fois une prédisposition génétique et des facteurs environnementaux comme l'exposition à des antigènes inhalés. Cependant, d'autres facteurs pourraient moduler les réactions immunologiques, notamment le microbiome pulmonaire, soit l'ensemble des bactéries retrouvées dans les poumons. Ces bactéries, qui représentent environ 6% du microbiome total chez l'humain, sont présentes dans les voies respiratoires inférieures même en l'absence d'infection. De par sa faible charge microbienne, l'étude du microbiome pulmonaire comporte des défis importants, mais de plus en plus de liens sont établis entre les bactéries et l'occurrence de l'asthme. Le rôle du microbiome pulmonaire est tout de même mal défini et l'influence de l'environnement ainsi que la stabilité du microbiome pulmonaire dans le temps demeurent mal connues.

L'occurrence naturelle de l'asthme équin, aussi connu sous le nom de souffle, la possibilité de modifier l'environnement dans lequel les chevaux vivent et les réponses immunitaires complexes menant à l'hyperréactivité bronchique font du cheval un modèle unique pour l'étude du microbiome pulmonaire et de son implication dans l'asthme. Le projet de recherche s'appuie sur l'hypothèse générale selon laquelle le microbiome bactérien des voies respiratoires inférieures est altéré dans l'asthme et pourrait contribuer à perpétuer l'inflammation pulmonaire.

À ce jour, seule une étude post-mortem a investigué le microbiome pulmonaire des équidés avec une méthode de séquençage massif (Hirsch *et al.*, 2015), mais à notre connaissance, aucune n'a étudié le microbiome respiratoire chez des chevaux asthmatiques. Les études chez les humains montrent qu'il y a une différence entre les microbiomes pulmonaires des patients asthmatiques et d'individus sains, mais il est très difficile de contrôler les effets de l'environnement et de la médication reçue chez ces patients. L'objectif principal de cette recherche est de décrire le microbiome bactérien pulmonaire de chevaux asthmatiques ne recevant pas de médication, et de le comparer avec celui de chevaux exempts de maladie respiratoire, gardés dans le même environnement. Nous avons aussi tenté d'associer les données microbiennes avec l'inflammation et la fonction pulmonaire des sujets. Notre étude

longitudinale pourrait améliorer nos connaissances sur la variabilité du microbiome pulmonaire équin dans différents environnements, sur son lien avec les maladies de type allergique et pourrait permettre de comprendre l'effet de l'inflammation pulmonaire de type allergique sur le microbiome pulmonaire équin.

Chapitre 1 : Recension de la littérature

1.1 L'asthme équin

1.1.1 Définition

Plusieurs syndromes inflammatoires respiratoires sont décrits chez les équidés, dont le souffle, la maladie inflammatoire des voies respiratoires (IAD) et la pneumopathie obstructive associée à la mise en pâture en saison estivale (SPAOPD). Ces maladies pulmonaires chroniques et non infectieuses sont maintenant regroupées sous le terme d'«asthme équin» (Bullone and Lavoie, 2015). La forme la plus sévère d'asthme équin affecte généralement les chevaux d'au moins 7 ans et est caractérisée par une inflammation et une obstruction des voies respiratoires inférieures, une toux, un effort respiratoire au repos et une intolérance à l'exercice (Couetil *et al.*, 2016). Pour sa part, l'asthme léger (anciennement IAD) atteint les chevaux de tous âges et ses signes cliniques, plus subtils, comprennent de la toux, du jetage nasal et une performance diminuée au travail. On retrouve dans l'asthme équin léger ou sévère une accumulation de mucus dans les voies respiratoires, une inflammation et une obstruction des voies respiratoires inférieures (Lavoie *et al.*, 2008; Bullone and Lavoie, 2015; Couëttil *et al.*, 2016). L'obstruction des voies respiratoires est aussi causée par un remodelage tissulaire (Robinson *et al.*, 1993), caractérisé par une augmentation de la masse du muscle lisse péribronchique (Leclere *et al.*, 2011). Chez les chevaux de sport, l'obstruction des voies respiratoires, même légère, entraîne une hypoxémie à l'effort (Sanchez *et al.*, 2005) et limite les performances, faisant de cette maladie un enjeu économique. Bien que l'asthme soit une maladie permanente, le bronchospasme est réversible (Lowell, 1964) et les épisodes de difficulté respiratoire sont récurrents (Robinson, 2001). Dans ce mémoire, les termes «voies respiratoires inférieures», «voies respiratoires périphériques» et «voies respiratoires distales» sont utilisées comme synonymes pour signifier les voies respiratoires profondes. De même, les termes «voies respiratoires supérieures», «voies respiratoires centrales» et «voies respiratoires proximales» sont utilisés comme équivalents pour mentionner les voies respiratoires situées anatomiquement plus près de la bouche de l'animal.

1.1.2 Pathophysiologie

L'asthme équin sévère est une maladie de type allergique dont les signes cliniques sont déclenchés chez l'animal vulnérable par l'exposition à des antigènes inhalés contenus principalement dans le foin. L'inflammation neutrophilique des voies respiratoires inférieures persiste tout au long de cette exposition, conséquence d'une réaction désordonnée du système immunitaire inné et acquis (*résumé par* (Leclere *et al.*, 2011; Bullone and Lavoie, 2015)). De plus, bien que l'asthme équin ne soit pas une maladie infectieuse, certaines études chez les jeunes chevaux de course ont établi un lien entre la charge bactérienne retrouvée au niveau de la trachée et l'intolérance à l'exercice, la toux ainsi que l'inflammation des voies respiratoires (Wood *et al.*, 1993).

1.1.3 Le rôle de l'environnement et des poussières inhalées

Les voies respiratoires inférieures sont vulnérables aux polluants et contaminants inhalés (McDonough *et al.*, 2011; Mitzner, 2011). Les composés inorganiques, les mites de foin, les mycètes ainsi que les virus et les endotoxines bactériennes retrouvés dans l'air jouent un rôle dans le développement, l'exacerbation et la sévérité de l'asthme équin chez les sujets sensibles (Halliwell *et al.*, 1993; Hotchkiss *et al.*, 2007; Leclere *et al.*, 2011; Couetil *et al.*, 2016). Les chevaux demeurant à l'intérieur d'une écurie, milieu réputé pour être poussiéreux, sont plus à risque de développer des signes cliniques liés à l'asthme équin comparativement aux chevaux gardés au pâturage, ou y passant la majorité de leur temps (Jackson *et al.*, 2000; Robinson, 2001). Les chevaux sont particulièrement affectés par les poussières et antigènes du foin, car la majorité des particules sont inhalées lorsque l'animal se nourrit (Woods *et al.*, 1993), d'où l'importance de lui offrir une nourriture de qualité.

1.1.4 L'asthme équin en recherche pulmonaire

En plus de son importance pour l'amélioration du bien-être animal, la recherche sur l'asthme équin peut également bénéficier à l'avancement des connaissances sur l'asthme humain. Il est intéressant de constater les nombreuses ressemblances physiologiques et anatomiques entre ces espèces (Leclere *et al.*, 2011). Par exemple, l'arbre respiratoire des chevaux et des humains partage des particularités anatomiques semblables, soit une artère bronchiale développée (Magno, 1990), une plèvre épaisse et des bronchioles terminales

(McLaughlin *et al.*, 1961). L'occurrence naturelle de l'asthme chez le cheval, les réponses immunitaires complexes et la longue espérance de vie des chevaux font de cette maladie un modèle pour l'asthme humain (Leclere *et al.*, 2011). De plus, la recherche bénéficie de conditions contrôlées telles des régies similaires et l'administration ou non d'un traitement, paramètres que l'on ne peut envisager contrôler lors d'études chez l'humain. Un autre avantage permettant d'étudier l'asthme équin est qu'il peut être facilement manipulable, tant pour l'exacerbation ou la réversibilité des signes cliniques, avec un simple changement de régie (Jackson *et al.*, 2000; Leclere *et al.*, 2011). De surcroît, la docilité du cheval et la réversibilité des symptômes permettent la récolte d'échantillons de manière répétée à différents stades de la maladie, par exemple lors de l'exacerbation ou de la rémission des signes cliniques.

1.2 Les mécaniques respiratoires

Lors d'exacerbation d'asthme équin, un bronchospasme et une inflammation des voies respiratoires inférieures s'installent, provoquant une obstruction de ces voies. Cette obstruction se reflète par des signes extérieurs tels un effort abdominal et une dilatation des naseaux. L'examen de la fonction pulmonaire chez les équins atteints de maladies inflammatoires chroniques peut servir à mesurer le degré d'obstruction bronchique, à suivre l'évolution de la maladie (Robinson, 2001; Nieto *et al.*, 2006), à monitorer la réversibilité des signes cliniques (Vandenput *et al.*, 1998; Bullone *et al.*, 2014) et l'effet de la thérapie. Les deux outils les plus couramment utilisés chez les équins sont la mécanique respiratoire standard et l'oscillométrie forcée. Les autres méthodes comme la pléthysmographie et le volume expiratoire forcé ne seront pas détaillés dans le présent mémoire.

1.2.1 Les mécaniques conventionnelles

Les mécaniques respiratoires conventionnelles consistent à mesurer le débit d'air inspiré et expiré à l'aide d'un pneumotachographe ainsi que la pression nécessaire pour engendrer ce débit (Derksen and Robinson, 1980; Lanctot Setlakwe, 2011). Celle-ci est mesurée indirectement à l'aide d'un ballonnet œsophagien (Derksen and Robinson, 1980;

Lanctot Setlakwe, 2011). Lors de l'intubation à l'aveugle, il arrive à l'occasion que le ballonnet passe de façon transitoire dans la trachée et la contamine ainsi avec des bactéries retrouvées dans les voies respiratoires supérieures (VRS) et le pharynx. Pour cette raison, les mécaniques respiratoires par impulsions oscillatoires forcées ont été préconisées dans cette étude sur le microbiome pulmonaire.

1.2.2 Le système d'oscillométrie par impulsion

Le système d'oscillométrie par impulsion (IOS) est une technique d'oscillométrie forcée utilisée majoritairement chez des patients ne pouvant pas effectuer des manœuvres respiratoires forcées. Chez l'humain, il permet une détection sensible des signes d'obstruction des voies respiratoires centrales et périphériques, comparativement aux mécaniques conventionnelles (Reinhold *et al.*, 1996; Diaz *et al.*, 2000; Nieto *et al.*, 2006), notamment chez les patients asthmatiques (Kanda *et al.*, 2010). À cause de certaines contraintes techniques et à la superposition des respirations spontanées de basse fréquence, cette sensibilité accrue n'a pas toujours été observée chez les chevaux (Klein *et al.*, 2006; Van Erck *et al.*, 2006). Un avantage non négligeable chez les chevaux reste toutefois que ce type de mécanique respiratoire ne demande qu'une courte période d'enregistrement et ne nécessite pas l'intubation de l'animal avec un ballonnet œsophagien (Klein *et al.*, 2006). L'impulsion d'ondes de type rectangulaire à différentes fréquences et amplitudes est effectuée par un haut-parleur relié à un pneumotachographe par un tube flexible et à un transducteur de pression par un câble électrique. Le pneumotachographe est maintenu sur un masque facial ajusté au cheval afin de prévenir toute fuite d'air (Figure 1.1) (Reinhold *et al.*, 1998). Un haut-parleur produit alternativement des pressions négatives et positives par le mouvement de son diaphragme interne (Klein and Reinhold, 2001). D'un point de vue physique, les oscillations forcées à haute fréquence sondent les voies aériennes proximales (Grimby *et al.*, 1968; Goldman *et al.*, 2005), alors que les oscillations à basse fréquence sont transmises plus profondément dans le poumon (Garcia *et al.*, 2009). Grâce à la relation entre la pression exercée de part et d'autre de la membrane du pneumotachographe, le transducteur de pression peut d'abord mesurer le débit d'air perturbé par les impulsions puis mesurer l'impédance (Z) du système respiratoire (Reinhold *et al.*, 1998). L'impédance est un paramètre complexe consistant en une partie

réelle, la résistance (R), et une partie imaginaire calculée, la réactance (X) (voir Tableau I pour définitions) (Reinhold *et al.*, 1998; Klein and Reinhold, 2001; Klein *et al.*, 2006). Alors que R reflète directement les propriétés de résistance des voies respiratoires, X est déterminée par les capacités d'inertie (inertance) et d'élastance du système respiratoire (Reinhold *et al.*, 1998). À partir de la mesure de Z, une transformation mathématique de Fourier permet de déterminer les résistances et les réactances pulmonaires totales (Reinhold *et al.*, 1998; Klein and Reinhold, 2001; Van Erck *et al.*, 2003). R à basse fréquence et X sont des paramètres importants, car ils reflètent en partie le degré d'obstruction des voies aériennes inférieures, un site qui participe à la pathophysiologie de l'asthme (Wagner *et al.*, 1990; Minshall *et al.*, 1998).

Comme mentionné précédemment, l'IOS utilise différentes fréquences pour sonder les voies respiratoires. Cette propriété est importante puisque les mesures de résistance et d'élastance des poumons sont dépendantes des fréquences utilisées. En effet, chez les sujets sains, plus les fréquences appliquées sont hautes, plus la mesure de la réactance diminue et la mesure de l'élastance augmente (van Erck *et al.*, 2004; Sly *et al.*, 2005; Brashier and Salvi, 2015). Chez le cheval, les mesures de résistance s'avèrent être plus cohérentes à basse fréquence, soit entre 5 Hz et 10 Hz (van Erck *et al.*, 2004; Klein *et al.*, 2006; Van Erck *et al.*, 2006), c'est pourquoi nous rapportons ces données en exprimant un ratio de la résistance mesurée à 5 Hz sur la résistance mesurée à 10 Hz (R5/R10). Ce ratio reflète une pente positive ou négative ($>$ ou $<$ que 1) et a précédemment été décrit chez le cheval afin de monitorer la condition des voies respiratoires inférieures. On mesure généralement chez les chevaux sains une résistance pulmonaire plus élevée à 10 Hz qu'à 5 Hz (et donc un ratio inférieur à 1). Une augmentation de ce ratio R5/R10 au-dessus de 1 indique une pente inversée et une augmentation de l'obstruction des voies respiratoires inférieures (Bullone *et al.*, 2014).



Figure 1.1. Composantes du système d'oscillométrie par impulsions. Haut-parleur (tête de flèche noire) relié par un tuyau flexible au pneumotachographe (flèche noire), lui-même connecté au masque (flèche blanche) porté par l'animal. En parallèle, le transducteur de pression (tête de flèche blanche) est connecté au haut-parleur et permet de mesurer les différences de pression et le débit d'air.

Tableau I. Définitions des termes techniques utilisés pour caractériser les mécaniques respiratoires effectuées avec l'oscillométrie par impulsions.

Terme	Description
Impédance	Mesure de la résistance opposée au mouvement des ondes acoustiques envoyées
Résistance	Capacité à résister à une contrainte physique
Élastance	Pression due à l'élasticité des tissus
Inertance	Pression liée à l'accélération de l'écoulement de l'air
Réactance	Addition de l'élastance et de l'inertance

1.3 Le lavage bronchoalvéolaire

1.3.1 Procédure

Le LBA est une procédure sécuritaire se faisant sur un cheval debout et tranquilisé. Elle peut être faite à l'aveugle ou à l'aide d'un endoscope flexible. Cette dernière méthode a été privilégiée lors de notre étude afin de minimiser les risques de contamination du microbiome pulmonaire de faible biomasse par une contamination du tube ayant été en contact avec l'œsophage par inadvertance. Un vidéoendoscope flexible est ainsi introduit dans la narine du cheval et dirigé vers la trachée en passant par le pharynx, physiquement séparé de la cavité orale par un voile du palais complet. Le vidéoendoscope est introduit jusqu'aux voies respiratoires inférieures puis de la saline isotonique est instillée par le canal de l'endoscope et récupérée à l'aide d'une succion. La saline aspirée contient des cellules, du mucus, et autres particules. Les cellules proviennent de l'espace bronchique et alvéolaire et incluent principalement des cellules du système immunitaire, quelques cellules structurelles ainsi que bactériennes, végétales ou fongiques (McGorum *et al.*, 1993).

1.3.2 La problématique de la contamination par les voies respiratoires supérieures

Dans une étude portant sur le microbiome bactérien pulmonaire, un environnement avec une faible densité de bactéries, la contamination des prélèvements par les bactéries du nez et du pharynx, un environnement avec une forte densité de bactéries, doit être évitée. Le passage de l'endoscope dans les voies respiratoires supérieures mène inévitablement à la contamination physique de l'embout et du canal de succion de l'endoscope (Bartlett *et al.*, 1976; Haas *et al.*, 1977; Reynolds, 1987; Hoffman *et al.*, 1991). Une étude a décrit une technique consistant à protéger l'embout de l'endoscope lors de son passage dans les voies respiratoires supérieures avec une feuille de cellulose transparente (Hoffman *et al.*, 1991), mais pour des raisons de contamination lors du retrait de la pellicule, cette option n'a pas été retenue. Nous avons donc développé une technique consistant à passer un endoscope stérile dans une gaine protectrice, également stérile, avancée jusqu'au tiers de la trachée,

permettant ainsi d'éviter le contact avec les VRS et ainsi réduire considérablement cette contamination.

1.4 Les bactéries

La bactériologie a connu ses débuts vers le XVIII^e siècle, siècle pendant lequel Antoni van Leeuwenhoek développa les balbutiements de la microscopie et observe les premières germes. Au XIX^e siècle, Jean Pasteur est le premier à réfuter la théorie de la génération spontanée et soutient que les microorganismes proviennent de germes qu'il parvint à isoler. S'ensuit la découverte de maladies causées par ces germes dont le choléra, la fièvre typhoïde et la dysenterie. Vers 1865, Lister avance l'idée de la septicémie et conçoit des pansements pour couvrir les plaies (Kiener, 1891). Ainsi, le XX^e siècle débute avec des notions de vaccination, d'hygiène, d'infection ainsi que de croissance et d'observation des microorganismes, qui mèneront aux sciences de l'évolution, puis de la cladistique (classifications du vivant) dans les années 1950.

1.4.1 La classification morphologique

Traditionnellement, les bactéries ont été étudiées grâce à des méthodes de culture. Elles étaient notamment classifiées selon leur milieu de culture, leur consommation d'oxygène, leur morphologie, la couleur des colonies formées ainsi que selon leurs facteurs de virulence. Cette classification basée sur les propriétés physiques des bactéries est toujours utilisée aujourd'hui, bien que le développement de la génétique ait permis de développer la phylogénie et d'étudier les relations de parenté génétique entre les organismes. Comme l'étude du microbiome est basée sur l'analyse génétique, cette classification sera plus détaillée dans le présent mémoire (section 1.6).

a) Les morphologies et flagelles

Les bactéries, bien qu'unicellulaires et microscopiques (0,1 à 10 microns), arborent plusieurs morphologies (Figure 1.2) qui aident à la classification traditionnelle (Pebret, 2003). Typiquement, le nom du genre taxonomique donné à une bactérie reflète la forme qu'elle arbore. Par exemple, les Streptocoques ont une forme de coque et les Lactobacilles ont une forme en bacille.

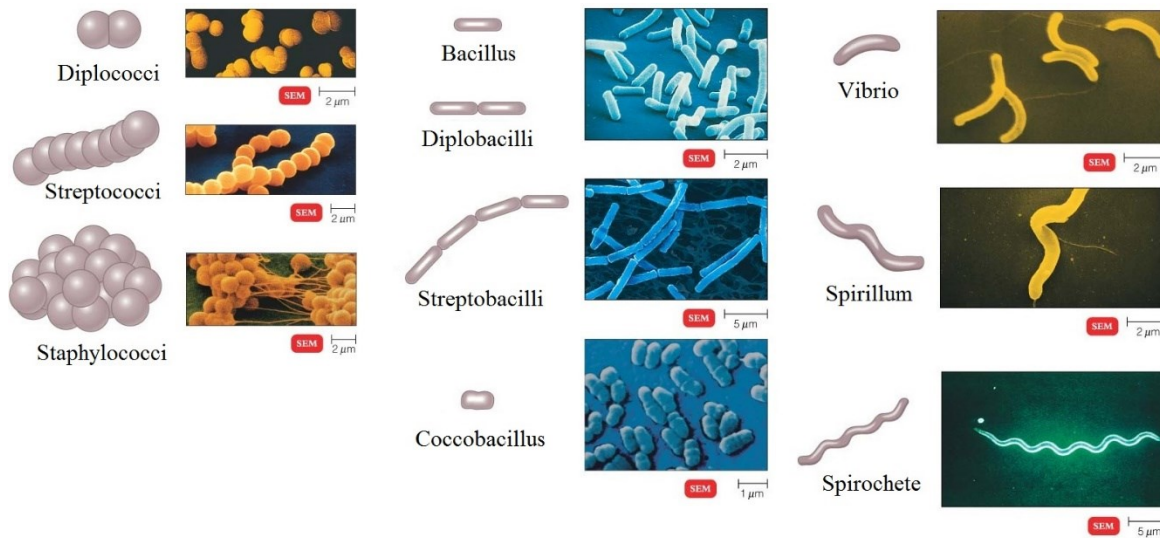


Figure 1.2. Différences morphologiques bactériennes. Adapté et modifié de <http://classes.midlandstech.edu/carterp/courses/bio225/chap04/lecture2.htm>

En plus de leur morphologie générale, la motilité de certaines bactéries est assurée par des flagelles d'environ 20 nanomètres de diamètre et de 15 à 20 microns de long (Prescott *et al.*, 2010). Selon la disposition de ceux-ci, les bactéries peuvent être classées en :

- Monotriche (un seul flagelle)
- Amphitriche (deux flagelles, un à chaque extrémité)
- Lophotriche (un groupe de flagelles à une ou aux deux extrémités)
- Péritriche (plusieurs flagelles distribués uniformément)

b) La paroi

Une paroi rigide enveloppe la membrane cytoplasmique des bactéries. Elle doit sa rigidité au peptidoglycane composé de chaînes de glucides assemblés en treillis (Pebret, 2003). Il existe deux types de parois bactériennes mises en évidence par la coloration de Gram et la microscopie. Les bactéries dont la coloration est positive à Gram possèdent une paroi épaisse de peptidoglycane, alors que la paroi de peptidoglycane des bactéries dont la coloration est négative à Gram est mince et recouverte d'une membrane de lipopolysaccharides, qui contribue au pouvoir pathogène de la bactérie

(Figure 1.3) (Prescott *et al.*, 2010). Dans la classification génomique, un genre bactérien contient typiquement des bactéries, soit Gram-positives, soit Gram-négatives.

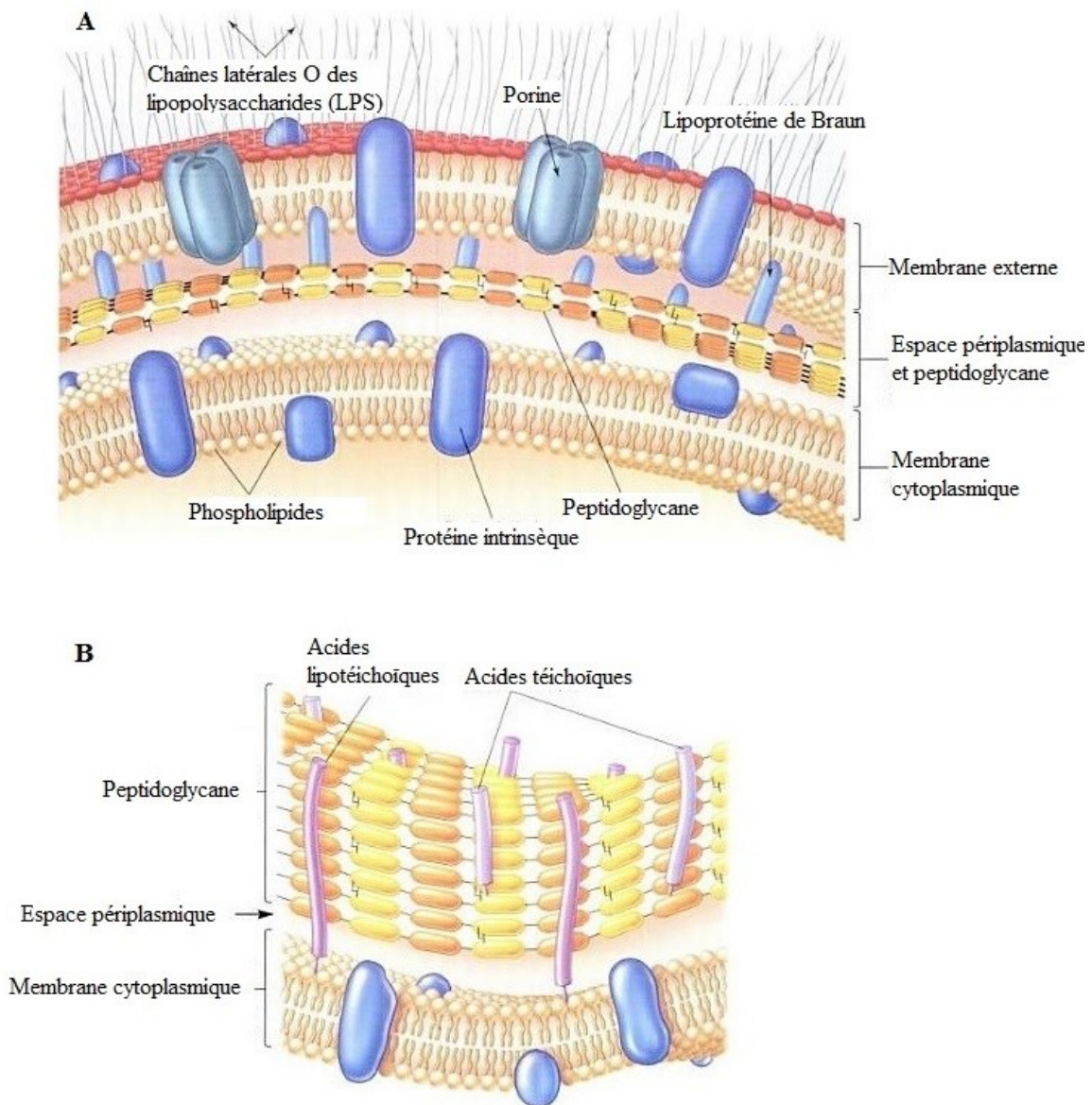


Figure 1.3. Comparaison des enveloppes de bactéries Gram-négatives (A) et Gram-positives (B). Modifié de Prescott et al., 2010.

1.4.2 La pathogénicité et le commensalisme

Initialement, les bactéries étaient considérées comme des agents pathogènes. Elles possèdent en effet plusieurs molécules appelées facteurs de virulence leur permettant d'envahir un hôte à l'aide de diverses stratégies comme franchir une barrière cutanée pour

atteindre les ganglions lymphatiques. Certaines bactéries peuvent aussi produire des toxines. Deux principaux types peuvent être produits dans le règne des eubactéries: les exotoxines sécrétées par les bactéries Gram-positives et les endotoxines élaborées par les lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries Gram-négatives. Par exemple, les toxines provoquant le botulisme sont produites par les bactéries Gram-positives du genre *Clostridium*. Aussi, la fièvre typhoïde est provoquée par les toxines de certaines bactéries du genre *Salmonella* (Pebret, 2003). La bactérie possède aussi plusieurs moyens d'éviter sa destruction. En effet, la capsule glucidique des pneumocoques (Knecht *et al.*, 1970) et la protéine A de *Staphylococcus aureus* (Peterson *et al.*, 1977) ont le potentiel d'inhiber la phagocytose. De plus, certaines bactéries telles *Mycobacterium tuberculosis* peuvent inhiber la digestion des phagosomes (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994).

Toutefois, les bactéries peuvent aussi être bénéfiques et essentielles, par exemple dans l'intestin des herbivores ou lors de la fermentation des fromages et des yaourts. Elles peuvent aussi être symbiotes avec un hôte, c'est-à-dire que la bactérie apporte un avantage à l'hôte et vice versa. Par exemple, *Rhizobium*, une bactérie du sol infecte les racines des légumineuses se nourrissant de leurs sucres et en retour, la bactérie fixe l'azote pour l'utilisation par la plante. La symbiose est le type d'interaction le plus fréquemment observé dans un microbiome et sera discuté plus en détail dans la section 1.5.3.

1.4.3 La biologie moléculaire à la rescousse de la bactériologie

Jusqu'à récemment, les connaissances sur les bactéries reposaient sur la culture en laboratoire. Les différentes méthodes et milieux de culture permettent de caractériser et d'étudier par microscopie les bactéries selon la forme des colonies, leur couleur, leur odeur, leur texture, etc. Ce n'est qu'en 1950 que la structure de l'acide désoxyribonucléique (ADN) est découverte. En 1983, l'idée de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est introduite et développée par Kary Mullis qui gagnera le prix Nobel de chimie en 1993 (Bartlett and Stirling, 2003). En 2005, les technologies de séquençage massif se basant sur le principe de la PCR sont rendues disponibles et permettent une identification moins coûteuse, plus rapide, plus efficace et plus précise des espèces bactériennes (Schuster, 2008). L'avènement de ces technologies fait exploser les recherches et les publications dans le domaine microbien et lance les scientifiques dans une course pour le séquençage

environnemental et la découverte de nouvelles espèces bactériennes. Le séquençage génomique est abordé dans la section 1.6.

1.5 Notions de microbiome

1.5.1 Définitions et généralités

Les différentes surfaces et tissus d'un corps agissent comme demeure pour les communautés microbiennes qui s'agglutinent sur celles-ci (Gill *et al.*, 2006). Le microbiote constitue tous les microbes retrouvés dans un habitat (anciennement microflore) (Segal *et al.*, 2014). Pour sa part, le terme microbiome est utilisé généralement en référence à la totalité des microbes et leur génome représentant une communauté écologique commensale et symbiotique, ainsi que le milieu dans lequel ils interagissent (Lederberg and McCray, 2001; Segal *et al.*, 2014). Le présent mémoire s'intéresse au microbiome bactérien pulmonaire équin et à sa relation avec le microbiome bactérien oral et nasal.

Les méthodes traditionnelles d'analyse bactériologique ne permettaient pas de détecter un microbiome de faible biomasse comme celui du poumon ni les bactéries pathogènes dans des cultures de LBA (Hoffman *et al.*, 1991). Cet organe était donc considéré stérile jusqu'à récemment et a même été d'abord exclu du *Human Microbiome Project*, projet débuté en 2008, visant à cataloguer tous les microorganismes en association avec le corps humain (Turnbaugh *et al.*, 2007). Aujourd'hui, les bactéries pulmonaires résidentes sont entre autres collectées grâce à des lavages bronchoalvéolaires et des brosses endobronchiques. Les bactéries sont aussi détectables par hybridation *in situ* en fluorescence (Yun *et al.*, 2014). Par contre, pour des raisons éthiques, les études disponibles chez les patients asthmatiques se font généralement en présence de médication pouvant affecter le microbiome pulmonaire, que ce soit des bronchodilatateurs ou des corticostéroïdes. Notre étude tente de pallier à cette lacune en décrivant les microbiomes pulmonaires alors que les chevaux ne sont pas médicamenteux. De plus, la stabilité temporelle et la variabilité dans divers environnements sont très peu étudiées.

1.5.2 Les mesures de la diversité biologique

La biodiversité est la variation biologique totale s'appliquant tant au niveau génétique du vivant qu'au niveau des écosystèmes. Puisque la biodiversité ne peut être caractérisée par une seule valeur, il existe des indicateurs de biodiversité pour mesurer certaines facettes de ce concept (Whittaker, 1972; Van Dyke, 2008).

- a) La **charge bactérienne** représente la quantité de bactéries retrouvées dans un milieu, toutes espèces confondues. Dans le contexte de la mesure par PCR, la charge est représentée par la quantité d'ADN bactérien. Dans le présent mémoire, la quantité d'acide ribonucléique (ARN) 16S bactérien a été mesurée par qPCR (voir section 1.6.2).
- b) L'**abondance relative** est la quantité d'individus relative à chaque espèce par unité de volume ou de surface, par rapport à la quantité d'individus totale (abondance absolue), toutes espèces confondues.
- c) La **richesse** est la quantité de taxa (catégorie issue de la cladistique regroupant tous les êtres vivants possédant les mêmes critères taxonomiques) représentés dans un milieu donné.
- d) L'«**uniformité**» ou *evenness* est l'égalité numérique entre les différentes espèces retrouvées dans un milieu. La valeur de l'index d'uniformité augmente lorsque le nombre d'espèces augmente et que les espèces deviennent plus égales en abondance. La communauté est qualifiée de pauvre si l'indice *d'evenness* tend vers 0. Par exemple, dans la figure 1.4, la communauté A a une meilleure *evenness* (tracé noir) que la communauté B. L'abondance relative de chacune des espèces est similaire, contrairement à ce qu'on retrouve dans la communauté B.
- e) La **diversité totale** d'un milieu (Diversité γ) représente le nombre d'espèces différentes qui composent les communautés de ce milieu et implique deux composantes : la diversité α et la diversité β . La diversité α illustre la diversité des espèces à l'échelle locale, dans une communauté et est calculée soit par l'indice de diversité de Shannon, soit par l'indice de diversité de Simpson, alors que la diversité β correspond à la diversité des espèces entre les communautés et est calculée par l'indice de divergence Jensen-Shannon. En d'autres termes, la diversité tient en compte la richesse et l'uniformité d'une communauté. Par exemple, la figure 1.4

illustre la diversité de deux communautés. La communauté A possède une meilleure uniformité et sera considérée, à richesse égale (quantité d'espèces, ici 9), plus diversifiée que la communauté B. Donc, $Diversité_A > Diversité_B$.

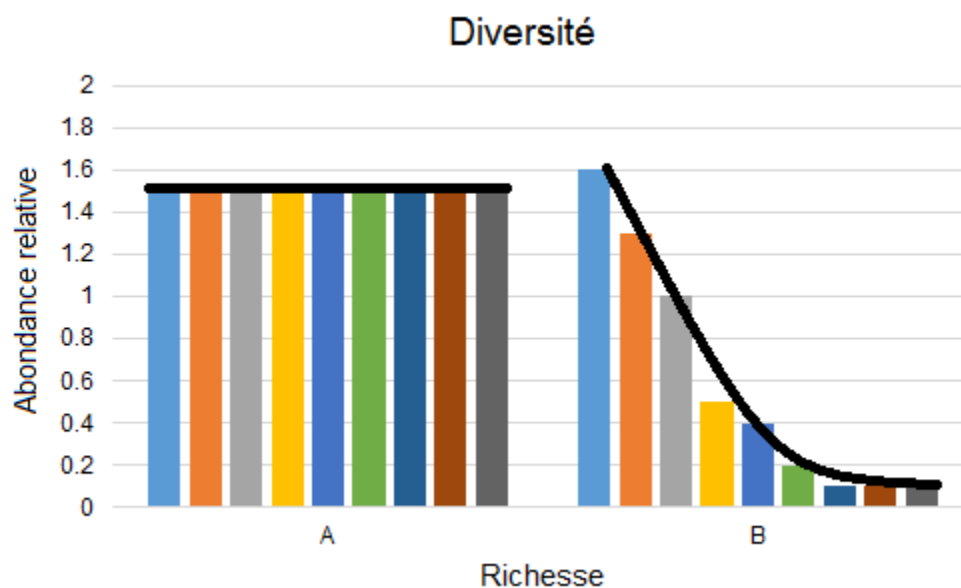


Figure 1.4. Schématisation des principes de biodiversité. Les communautés A (à gauche) et B (à droite) ont une richesse similaire, soit 9 espèces bactériennes. L'abondance relative de chacune des espèces de la communauté A est similaire, faisant en sorte que l'«uniformité» ou l'*evenness* de cette communauté est élevée, comparativement à la communauté B dont l'abondance relative des espèces est inégale et décroissante. À richesse égale, comme dans le cas présent, l'uniformité de la communauté détermine la valeur de sa diversité. Dans cet exemple, la communauté A est considérée comme ayant une diversité supérieure à celle de la communauté B.

L'analyse des composantes principales appliquée dans le domaine d'étude du microbiome pulmonaire est une méthode utilisée pour représenter les liens et interactions entre les différents prélèvements (voir figure 2.5 de l'article). Il s'agit d'une analyse multidimensionnelle permettant de simplifier et de condenser un vaste jeu de données de séquençage dans une figure comportant deux ou trois axes au maximum. Les analyses statistiques effectuées sur les données sont des *anovas* non paramétriques permutées. Plus les points représentant les échantillons sont rapprochés, plus les microbiomes contenus

dans ces prélèvements sont similaires. De cette manière, il est relativement facile d'observer à quel point les différents échantillons sont semblables ou non.

1.5.3 L'implication des bactéries dans le règne animal

Il existe plusieurs types d'interactions entre les organismes vivants. Voici les interactions les plus communes :

- Parasitisme : un seul parti possède des avantages alors que l'autre parti ne reçoit que des inconvénients.
- Commensalisme : un seul des deux partis tire un bénéfice de l'interaction, avec ou sans désavantage pour l'autre parti.
- Mutualisme : les deux partis tirent un avantage de l'interaction.
- Neutralisme : aucun des partis ne bénéficie ou ne pâtit de l'interaction.
- Symbiose : relation obligatoire et bénéfique pour les deux partis.

Nous nous intéresserons davantage à la symbiose, interaction la plus fréquemment rencontrée dans un microbiome. Par exemple, chez l'humain, les bactéries du genre *Escherichia* contenues dans l'intestin se nourrissent des aliments ingérés par l'hôte et synthétisent la vitamine K (Suvarna *et al.*, 1998), essentielle entre autres au métabolisme des os et des tissus (Price *et al.*, 1981).

Le développement de relations particulières avec les procaryotes est essentiel à la santé des individus et des changements dans cette symbiose peuvent résulter en une maladie (Dethlefsen *et al.*, 2007). En effet, lorsqu'un déséquilibre se produit, les bactéries symbiotes peuvent contribuer par exemple au développement d'une infection. Certaines maladies telles les maladies auto-immunes, métaboliques, inflammatoires, allergiques et neurologiques peuvent être influencées par des altérations du microbiome (Erturk-Hasdemir and Kasper, 2013). Par exemple, chez la souris, l'exposition à un stress psychologique chronique (anxiété) fait varier l'abondance relative des *Bacteroides spp.*, ainsi que des *Clostridium spp.* dans le caecum, résultant en une activation du système immunitaire (Bailey *et al.*, 2011). De plus, les niveaux d'interleukines 6 et de chimiokines CCL2 produits par la souris sont corrélés avec des changements dans les communautés des genres bactériens *Coprococcus spp.*, *Pseudobutyrvibrio spp.* et *Dorea spp.* (Bailey *et al.*,

2011). Ces genres bactériens étant récemment décrits dans le microbiome intestinal humain, leur relation avec la physiologie de l'hôte est encore mal comprise (Bailey *et al.*, 2011). Il est d'ailleurs difficile de décrire comment le microbiome peut moduler une réponse immunitaire de type allergique, mais il a été mis en évidence que ces maladies sont corrélées avec des changements divers dans le microbiome (Wang *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011).

Autre fait intéressant, les différentes bactéries d'un microbiome peuvent se «réguler» entre elles. Par exemple, *Bacteroides fragilis* prévient la colite (inflammation du colon) induite par *Helicobacter hepaticus* (Mazmanian *et al.*, 2008). De plus, beaucoup d'entre elles peuvent sécréter des substances aux propriétés antibiotiques dites bactériocines leur permettant d'éliminer leurs compétitrices pour les ressources nutritives (Lievin *et al.*, 2000).

1.5.4 Le microbiome oral

Le microbiome oral chez l'humain est composé de bactéries, mais aussi de virus, de mycètes et d'archées. Il est le deuxième plus riche en matière d'espèces bactériennes, derrière le microbiome intestinal et a notamment été étudié pour son rôle dans le développement de maladies parodontales et des caries dentaires (*révisé par* (Wade, 2013)). Il peut sembler difficile d'identifier le microbiome oral «résident» puisque la bouche entre en contact avec l'environnement à maintes reprises au cours d'une même journée, notamment lors de l'alimentation. Toutefois, une étude sur la salive d'individus provenant de 12 régions du monde a identifié 101 genres bactériens parmi lesquels se trouvent *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Rothia*, *Serratia* et *Enterobacter* (Nasidze *et al.*, 2009), contenus dans les phylums *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteries* et *Actinobacteria*, aussi identifiés par un autre laboratoire comme étant les taxa représentant 96 % du microbiome oral (Dewhirst *et al.*, 2010). De façon surprenante, les microbiomes bactériens oraux n'étaient pas associés aux différentes régions géographiques (Nasidze *et al.*, 2009), ce qui suggère que l'environnement n'influencerait pas ou peu le microbiome oral et qu'il serait potentiellement stable dans le temps, conclusion à laquelle une autre étude se range (David *et al.*, 2014).

1.5.5 Le microbiome intestinal

Le microbiome intestinal est le microbiome le plus étudié et s'avère être le plus important du point de vue de la quantité de cellules, étant composé d'environ 10 fois plus de cellules que le corps humain (Bengmark, 1998; Gill *et al.*, 2006). Pendant les trois premières années de vie d'un enfant, le microbiome intestinal s'implante puis demeure relativement stable pour le restant de sa vie (Koenig *et al.*, 2011; Yatsunencko *et al.*, 2012). L'avancement des recherches sur le microbiome intestinal chez l'humain a dévoilé des distinctions significatives dans la composition des communautés bactériennes entre différents adultes sains, différences qui pourraient contribuer aux variations de la physiologie normale ou à la prédisposition à certaines maladies (Gill *et al.*, 2006).

Bien que beaucoup de bactéries restent à décrire, l'utilité de la diversité bactérienne dans l'intestin demeure indéniable. Les bactéries anaérobies strictes (qui ne tolèrent pas la présence d'oxygène) dominent la flore intestinale des mammifères, composée principalement de *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Megasphaera elsdenii*, *Sarcina ventriculi*, *Veillonella* et *Acidaminococcus*, alors que les bactéries anaérobies facultatives telles *Streptococcus*, *Escherichia*, *Lactobacillus* et autres sont présentes en moins grande quantité (Salminen *et al.*, 1998).

Chez les humains, les *Bacteroides*, plus précisément les espèces *B. vulgatus* et *B. stercoris*, ainsi que le genre *Clostridium* sont souvent associés à une plus forte prévalence du cancer du côlon, alors que *Lactobacillus acidiphilus*, *Lactobacillus S06*, *Eubacterium aerofaciens* et *Bifidobacteria* préviendraient la formation de tumeurs (Moore and Moore, 1995).

Un déséquilibre entre les bactéries commensales potentiellement pathogènes et les bactéries symbiotes dans le microbiome intestinal est reconnu comme étant un paramètre dans les maladies inflammatoires intestinales chez les humains, notamment dans la maladie de Crohn et dans les colites ulcéreuses (Mazmanian *et al.*, 2005; Mazmanian *et al.*, 2008). Chez la souris, *Bacteroides fragilis* protège des colites ulcéreuses causées par *Helicobacter hepaticus* qui induit l'activation des cytokines inflammatoires. Cet exemple souligne le rôle de pathogène opportuniste de *H. hepaticus* malgré sa présence normale dans l'intestin.

Le rôle de protection exercé par *B. fragilis* est rendu possible grâce au polysaccharide A qu'elle fabrique (Mazmanian *et al.*, 2008).

Le rôle du microbiome intestinal ne semble pas être limité au maintien de l'homéostasie gastro-intestinale, mais semble aussi jouer un rôle indirect sur les autres organes, notamment les poumons. Médiées par les métabolites systémiques, il existerait des interactions entre le microbiome intestinal et la régulation immunitaire dans les poumons de souris (Trompette *et al.*, 2014). La teneur en fibres fermentescibles du régime alimentaire modifierait la flore bactérienne intestinale et pulmonaire en modifiant le ratio Firmicutes / Bacteroidetes, ce qui augmenterait la concentration circulante de courtes chaînes d'acides gras, tel le propionate, qui lié au récepteur GPR41 conduit à des modifications de l'hématopoïèse dans la moelle osseuse. Selon ces auteurs, ces modifications permettent l'amélioration de la capacité phagocytaire des macrophages et des cellules dendritiques et auraient un effet protecteur contre l'inflammation allergique des voies respiratoires. Inversement, une diète pauvre en fibres diminuerait la concentration circulante de courtes chaînes d'acides gras et augmenterait la prédisposition aux maladies allergiques des voies respiratoires (Trompette *et al.*, 2014).

Somme toute, le microbiome intestinal semble influencer de nombreuses fonctions physiologiques et le degré d'importance de certaines maladies dans les tissus périphériques tels les poumons.

1.5.6 Le microbiome nasal

Le microbiome bactérien nasal humain est principalement composé des phylums Actinobacteria, notamment les genres *Corynebacterium* et *Propionibacterium* et Firmicutes, dont *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Veillonella* et *Lactobacillus* (Frank *et al.*, 2010; Hilty *et al.*, 2010; Human Microbiome Project, 2012). Les Protéobactéries *Moraxella* et *Haemophilus* ainsi que les Bacteroidetes notamment *Prevotella* ont été aussi associées au microbiome nasal commensal (Frank *et al.*, 2010; Human Microbiome Project, 2012; Biswas *et al.*, 2015). Une étude chez des individus sains et atteints de rhinosinusite chronique a montré que le microbiome nasal des sujets malades était plus variable, moins diversifié, mais d'abondance similaire à celui des individus sains (Biswas *et al.*, 2015).

Finalement, une étude de 2014 met l'accent sur la dissimilitude des microbiomes nasal et buccal d'individus en santé (Bassis *et al.*, 2014).

1.5.7 Le microbiome pulmonaire

Comme discuté précédemment, le microbiome pulmonaire a longtemps été ignoré. Cependant, tous les tissus et surfaces d'un corps arborent un microbiote et les poumons, organes possédant la plus grande aire de surface (Bengmark, 1998), ne font pas exception à la règle. Chez l'humain, les voies respiratoires représentent environ 6 % du microbiome total (Zakharkina *et al.*, 2013). Un poumon sain présente une faible charge bactérienne et son microbiome serait enrichi par la diversité bactérienne des voies respiratoires supérieures, notamment la bouche, par des microaspirations (Segal *et al.*, 2013). Les humains sains démontrent une quantité importante du genre bactérien *Prevotella spp.*, une bactérie Gram-négative anaérobie, reconnue notamment pour faire partie d'une flore orale et vaginale normale (Hilty *et al.*, 2010). Il est possible dans le cas des individus sains que *Prevotella spp.* empêche directement la croissance d'autres bactéries (Murray and Rosenblatt, 1976). Le microbiote pulmonaire commensal pourrait prévenir l'hyperréactivité à un aéroallergène s'il est composé d'une bonne abondance de Bacteroidetes (Gollwitzer *et al.*, 2014).

Le microbiome pulmonaire, tout comme le microbiome intestinal, se développe et se diversifie après la naissance de l'individu. Il est d'abord composé de Firmicutes et de Protéobactéries, alors que la population de Bacteroidetes croît avec l'âge (Gollwitzer *et al.*, 2014). Le microbiome pulmonaire immature d'un nouveau-né pourrait être un bon marqueur de prédiction pour le développement des allergies et de la susceptibilité à l'asthme (Huang *et al.*, 2011). Les altérations que pourrait subir le microbiome pulmonaire en développement pourraient l'affecter de manière irréversible et avoir une influence subséquente, elle aussi irréparable, sur l'immunité (Huang *et al.*, 2011). De surcroît, la réponse des asthmatiques aux antibiotiques suggère un rôle possible de la colonisation bactérienne générale dans la pathogénicité de l'asthme (Blasi and Johnston, 2007). Ainsi, le microbiome semble être essentiel à la tenue d'un poumon sain, mais semble aussi impliqué dans le développement de maladies respiratoires. La composition du microbiome bactérien pulmonaire d'enfants sains et asthmatiques est comparée dans le tableau II.

Tableau II. Comparaison de la composition bactérienne pulmonaire échantillonnée par lavages bronchoalvéolaires chez des enfants sans problèmes respiratoires (contrôles) et asthmatiques. Modifié de Hilty *et al.*, 2010.

PHYLA	Control	Asthma	P* Asthma vs. Controls
Proteobacteria	83	331	6.45E-14
Bacteroidetes	282	239	1.13E-17
Firmicutes	218	454	
Fusobacteria	69	70	
Actinobacteria	18	27	
GENERA			
Bacteroidetes/Prevotella	247	137	3.23E-31
Other Bacteroidetes	35	102	
Firmicutes/Staphylococcus	13	74	7.16E-03
Firmicutes/Streptococcus	98	242	
Firmicutes/Veillonella	69	90	
Other Firmicutes	38	48	
Proteobacteria/Haemophilus	17	154	1.44E-13
Proteobacteria/Neisseria	53	77	
Other Proteobacteria	13	100	1.01E-06
Fusobacteria	69	70	

The numbers of sequences are shown for each split level.
 *Only significant P values are shown. The significance levels have been Bonferroni corrected for multiple comparisons.
 doi:10.1371/journal.pone.0008578.t005

Une grande abondance relative de bactéries dans les poumons serait associée à leur inflammation (Segal *et al.*, 2013) et la colonisation bactérienne des voies respiratoires constituerait un facteur contribuant à la progression des maladies pulmonaires. Par exemple, la présence de Protéobactéries, dont *Haemophilus spp.* a été corrélée avec plusieurs maladies respiratoires ainsi que l’inflammation chronique des voies respiratoires (Hilty *et al.*, 2010). Une autre étude montre une corrélation positive entre le développement de l’asthme et l’augmentation de la quantité de bactéries *Chlamydothryx pneumoniae* (Hahn *et al.*, 1991). Ces bactéries pourraient donc jouer un rôle dans la pathogénicité des maladies et dans l’inflammation chronique de l’arbre bronchique. Cependant, la présence de pathogènes dans les voies respiratoires de patients asthmatiques pourrait être secondaire aux altérations des muqueuses (Hilty *et al.*, 2010). Ces informations restent toutefois à clarifier puisque ce champ d’études est relativement jeune et que ces deux dernières études n’ont pas encore été répliquées.

À ce jour, une seule étude a analysé le microbiome pulmonaire de chevaux en utilisant une technique de séquençage massif. Les résultats des prélèvements post-mortem de 8 chevaux adultes sains ont montré que l'arbre respiratoire contient un microbiome relativement homogène, mais qui varie dans la structure des communautés bactériennes entre les voies respiratoires supérieures et inférieures. Les Firmicutes et les Protéobactéries domineraient le microbiome pulmonaire. Aussi, le microbiome nasal serait composé d'une plus grande quantité de bactéries que le microbiome pulmonaire et les genres *Staphylococcus* et *Anoxybacillus* y seraient présents en plus grande quantité (Hirsch *et al.*, 2015).

1.5.8 La reconnaissance du microbiome par le système immunitaire

La surface externe de la majorité des bactéries contient des glycanes, soit des chaînes de sucres liées aux protéines. Ces glycanes agissent comme antigènes et peuvent déclencher une réponse immunitaire lorsqu'ils sont reconnus par des récepteurs spécifiques du système immunitaire, particulièrement abondants sur les macrophages et les lymphocytes (Trompette *et al.*, 2014). Fait intéressant, *Bacteroides fragilis* a la capacité de modifier sa surface antigénique en produisant différents polysaccharides capsulaires. La diversité de sa surface semble permettre à cette bactérie d'échapper au système immunitaire, ce qui lui permet de maintenir une niche écologique stable dans l'intestin (Krinov *et al.*, 2001). Cependant, l'hôte peut lui aussi s'adapter aux changements et peut ainsi garder un contrôle actif sur la croissance bactérienne (Figure 1.5).

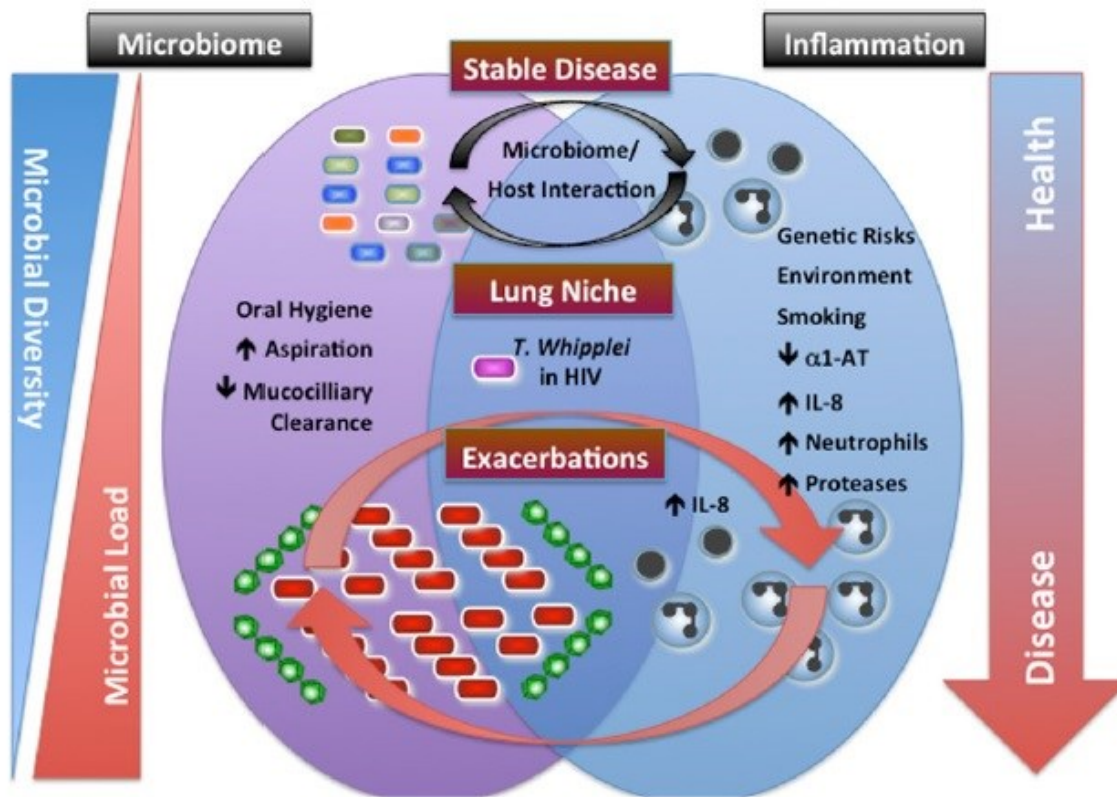


Figure 1.5. Modèle conceptuel des interactions entre le microbiome pulmonaire et la réponse immunitaire de l'hôte. Tiré de Segal et al., 2014.

Les maladies pulmonaires chroniques sont caractérisées entre autres par le recrutement de cellules phagocytaires dans les voies aériennes distales (Hogg *et al.*, 2004), indicateurs d'une infection bactérienne (Sethi, 2014). Dans le modèle murin, les cellules immunitaires dites *natural killer* se trouvent en plus grande quantité dans les poumons d'une souris élevée dans un milieu sans germes (et donc sans microbiome), démontrant que le système immunitaire déploie plus d'efforts pour défendre l'individu non exposé aux bactéries (Dickson *et al.*, 2014). De plus, ces souris développent une inflammation exagérée des voies respiratoires (Linnane *et al.*, 2008) telle que reflétée par un taux élevé d'immunoglobulines E (IgE), marqueur allergique et atopique (Ulrich *et al.*, 1998; Worlitzsch *et al.*, 2002). Cette étude appuie «l'hypothèse de l'hygiène», d'abord proposée par le physiologiste britannique David Strachan en 1989 (Rook, 2009). Cette hypothèse suggère que la stimulation bactérienne précoce réduirait la susceptibilité à l'asthme et aux rhinites allergiques en aidant le système immunitaire à développer une tolérance à vie à des

antigènes inoffensifs (Atarashi *et al.*, 2011; Ege *et al.*, 2011; Herbst *et al.*, 2011). La stimulation et l'activation du système immunitaire préviendraient donc le développement déséquilibré du microbiome, conservant cet équilibre fragile entre les différents organismes le composant. Un microbiome diversifié semble nécessaire afin d'exprimer une régulation immune appropriée tout au long de la vie (Cahenzli *et al.*, 2013).

1.6 L'analyse du microbiome bactérien

1.6.1 Le génome bactérien

L'information génétique est nécessaire à toute cellule vivante afin de commander ses fonctions métaboliques. Le génome agit en tant que système de communication et représente une information définissant l'espèce. Les eubactéries (vraies bactéries), contrairement aux eucaryotes, ne possèdent pas de compartiment nucléaire protégeant le génome, facilitant la gymnastique mécanique de la réplication, de la transcription et de la traduction des quelque 1000 à 6000 gènes (Alberts *et al.*, 2011). Cet obstacle en moins, ces organismes sont plus enclins à échanger du matériel génétique entre eux, notamment par transferts horizontaux. Ces transferts de gènes ou de parties de gènes jouent un rôle important dans l'évolution des procaryotes, notamment dans l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques ou de virulence. L'accumulation de mutations sur une longue période de temps dans les génomes bactériens est responsable de la diversité bactérienne retrouvée aujourd'hui et ces mutations sont exploitées dans les méthodes de séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S (voir section 1.6.2). Par ailleurs, il est estimé que 18% des gènes d'*Escherichia coli* ont été acquis par transferts horizontaux (Alberts *et al.*, 2011).

1.6.2 L'ARN ribosomal bactérien 16S

L'absence de membrane nucléaire chez les bactéries leur permet une traduction rapide des ARN messagers (composés de nucléotides) en protéines (formées d'acides aminés) par les ribosomes. Ces derniers sont érigés par une cinquantaine de protéines différentes et trois ARN ribosomaux : 5S et 23S faisant partie de la grande sous-unité (appelée 50S) et 16S composant la petite sous unité (appelée 30S) du ribosome (Figure 1.6)

(Alberts *et al.*, 2011). Certaines sections du gène 16S des bactéries ont été hautement conservées au cours de l'évolution et sont présentes dans toutes les espèces bactériennes (Gill *et al.*, 2006). Cette caractéristique permet notamment de quantifier l'ADN bactérien sans avoir besoin d'identifier les espèces présentes. Ceci reste par contre une approximation, car chaque bactérie peut renfermer plus d'une copie du gène 16S. D'autres régions de ce même gène s'avèrent variables entre les espèces (résultant d'une accumulation de mutations), d'où leurs noms de régions variables (Figure 1.7), rendant possible l'identification par séquençage. Les régions V4, V5 et V6 sont les plus couramment utilisées lors de ces analyses puisque leur sensibilité accrue permet l'obtention de résultats phylogénétiques plus exacts par rapport aux autres régions variables moins sensibles (Yang *et al.*, 2016).

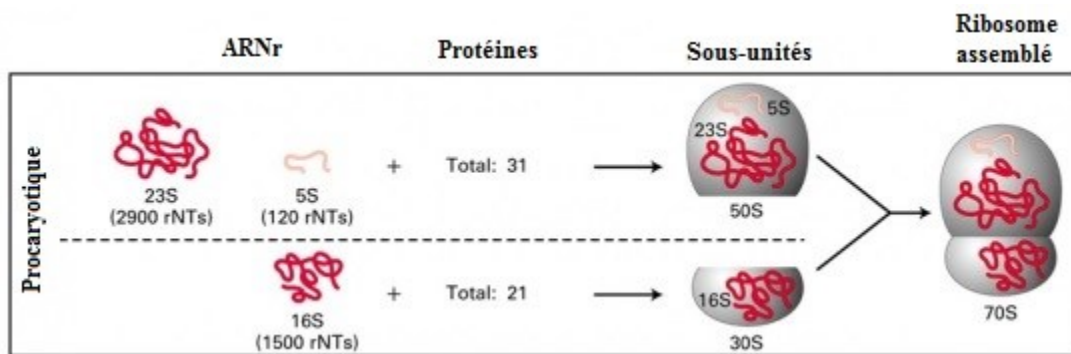


Figure 1.6. Représentation de la structure du ribosome procaryote. Adapté et modifié de <http://www.vdsciences.com/pages/sciences-biologiques/biologie-moleculaire/bio-moleculaire-5.html>

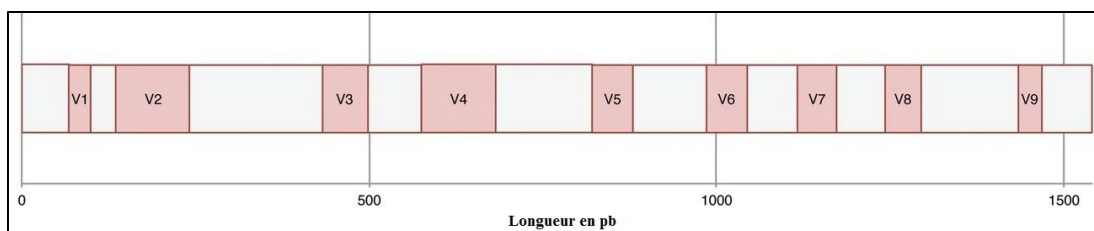


Figure 1.7. Structure du gène bactérien 16S d'E. coli d'environ 1.5 kb, illustrant les neuf régions variables en rose et les régions conservées au cours de l'évolution en gris. Adapté de <http://www.lcsciences.com/16s-rrna-gene-sequencing/16s-rrna-gene-sequencing-application-note/16s-rrna-gene-sequencing-for-identification-classification-and-quantitation-of-microbes/>

1.6.3 Le principe général du séquençage génomique

Il existe couramment deux techniques de séquençage génomique, le séquençage aléatoire global (appelé aussi *whole genom shotgun*) et le séquençage clone par clone (ou *shotgun* hiérarchique) (Figure 1.8). Ces deux techniques de séquençage permettent la lecture de quelques milliers de paires de bases de manière consécutive, ce qui est largement insuffisant pour séquencer l'entièreté d'un génome. Ainsi, on devra adopter certaines stratégies afin de reconstituer un gène ou un génome à partir de séquençage partiel. Pour le séquençage aléatoire global (Figure 1.8 A), le génome initial est sectionné de manière physique ou chimique en petits fragments aléatoires qui sont séquencés puis réassemblés de manière numérique grâce aux zones de chevauchement des séquences (contigs). L'avantage de cette technique est qu'elle est rapide et peu onéreuse. Cependant, l'assemblage des séquences nécessite une bonne puissance de calcul et les séquences répétées dans un génome peuvent causer un assemblage erroné. Pour sa part, le séquençage clone par clone, appelé aussi *shotgun* hiérarchique (Figure 1.8 B), est plus long, moins économique et nécessite une étape supplémentaire, soit celle d'établir une librairie de clones agissant comme carte physique du génome. La librairie permet d'avoir des repères dans l'ADN initial et est conçue en insérant les fragments de génome dans un vecteur, lui-même inséré dans une cellule, le plus souvent une bactérie ou une levure à des fins de reproduction. Une fois la carte physique (ou librairie) complétée, on effectue un séquençage *shotgun* aléatoire comme expliqué précédemment. L'avantage de cette

technique est que le génome est souvent mieux couvert par les contigs. Ces techniques permettent non seulement de séquencer le génome de bactéries ne pouvant croître sur gélose, mais aussi de séquencer des solutions contenant divers gènes. Ainsi, plusieurs gènes différents provenant de plusieurs espèces bactériennes n'ont pas besoin d'être isolés les uns des autres pour être séquencés.

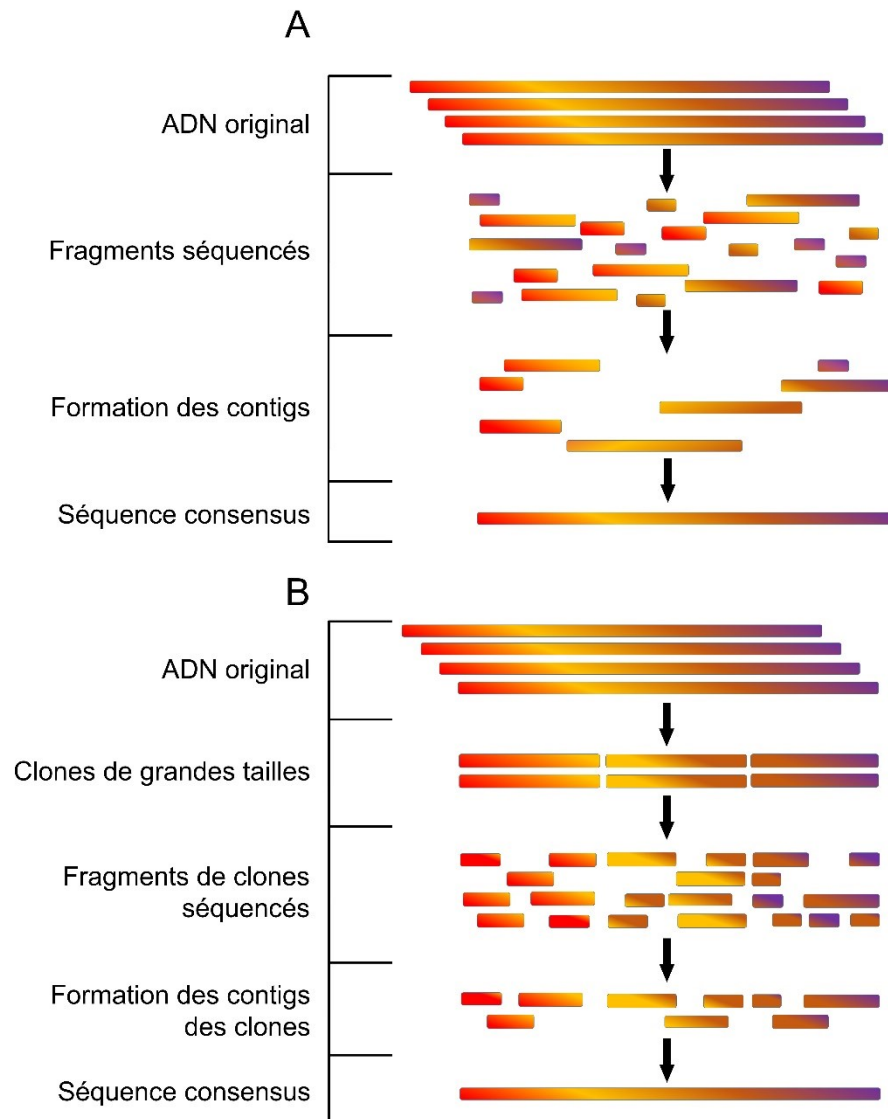


Figure 1.8 : Séquençage génomique. A) Séquençage aléatoire global B) Séquençage clone par clone. (Voir paragraphe précédent pour l'explication des étapes de séquençage.)

1.6.4 La plateforme Illumina Miseq

Technique de séquençage dite de nouvelle génération, la plateforme Illumina Miseq peut exécuter selon les besoins un séquençage aléatoire global ou clone par clone. Elle est assez sensible pour permettre une reconstitution des communautés bactériennes avec un bas taux d'erreur (environ 0.1%) et une quantité de matériel génétique limitée (Gloor *et al.*, 2010). Le séquençage par la technologie Illumina permet, par la lecture de nucléotides fluorescents et l'assemblage par chevauchement de petits fragments d'ADN d'environ 36 à 175 paires de bases (pb) (Reis-Filho, 2009), de recomposer les divers gènes bactériens (Quail *et al.*, 2008; Meyer and Kircher, 2010). À coûts modiques et dans des délais de quelques jours à quelques semaines, Illumina séquence des dizaines de millions de copies d'ADN (Meyer and Kircher, 2010). Notons qu'avec les anciennes technologies de séquençage, le *Human genome Sequencing Consortium* ayant débuté en 1990 a abouti au séquençage de 2.85 milliards de nucléotides, soit 99 % du génome humain, en 13 ans pour un coût total de 3 milliards de dollars américains (International Human Genome Sequencing, 2004; Reis-Filho, 2009) alors qu'aujourd'hui, pour un investissement de quelques jours et de quelques milliers de dollars, nous avons accès à des plateformes comme celle d'Illumina.

1.6.5 Identification des espèces bactériennes et études phylogénétiques

Le génome est sujet à de nombreux changements aléatoires s'accumulant sur de longues périodes de temps (Alberts *et al.*, 2011). Son analyse avec des logiciels tels *Mothur* est un moyen relativement simple et puissant pour étudier les relations entre les différentes espèces au cours de l'évolution (Schloss *et al.*, 2009). Lorsqu'amplifiés et séquencés, les gènes 16S des différentes espèces bactériennes peuvent être différenciés grâce à leurs régions variables, comme vu précédemment. Puisque certaines régions de ce gène s'avèrent être hautement conservées pendant l'évolution, il est possible d'utiliser les différences entre les différentes séquences d'ADN comme marqueur de la distance évolutive afin de construire des arbres phylogénétiques (Weisburg *et al.*, 1991; Gill *et al.*, 2006). Les arbres phylogénétiques ainsi construits par comparaison des séquences moléculaires permettent l'élaboration d'une «horloge moléculaire», indiquant le moment où un génome a divergé en deux espèces distinctes (Hasegawa *et al.*, 1985).

Brièvement, des séquences d'ADN inconnues sont comparées aux séquences connues contenues dans diverses banques de données informatiques publiques et la concordance avec certains résultats est évaluée. La plateforme informatique mothur, relativement récente (première version en février 2009), permet l'utilisation d'algorithmes pour calculer entre autres des diversités α et β ainsi que des distances évolutives entre différents organismes (Schloss *et al.*, 2009). Ce logiciel peut aussi générer des analyses phylogénétiques avec l'utilisation d'unités taxonomiques opérationnelles (en anglais Operational Taxonomic Unit ou OTU) (Schloss *et al.*, 2009). En supposant que tous les gènes 16S évoluent à la même vitesse, ces unités standardisées regroupent des génomes semblables à plus de 97%, ce qui permet de quantifier le nombre d'espèces bactériennes et d'établir des relations d'un point de vue phylogénétique, même si certaines espèces ne peuvent être identifiées (Schloss and Westcott, 2011). Bien que la liste soit peu exhaustive, les limitations majeures du logiciel mothur résident en la distance phylogénétique maximale pouvant être analysée, soit 2^{64} et la disponibilité de la mémoire vive de l'ordinateur à partir duquel sont analysées les séquences (Schloss *et al.*, 2009).

1.7 Hypothèse et objectifs

À la lumière des informations contenues dans cette recension de littérature, nous nous intéressons à la modulation du microbiome bactérien pulmonaire, nasal et oral chez des chevaux sains et asthmatiques. Nous savons actuellement que les microbiomes pulmonaires d'humains sains et asthmatiques diffèrent et bien qu'ils soient décrits, la prise de médication par les patients asthmatiques constitue un biais non négligeable sachant que ces traitements influencent fort probablement la composition du microbiome. Nous tenterons ainsi de combler cette lacune dans la littérature en caractérisant des échantillons de microbiome chez ces deux groupes de chevaux sains et asthmatiques ne recevant pas de traitement pharmacologique. Puisque certaines études stipulent que le microbiome bactérien pulmonaire provient en partie du microbiome des voies respiratoires supérieures, nous prélèverons les voies respiratoires inférieures en évitant les contacts avec le microbiome des VRS, et nous comparerons ce microbiome pulmonaire avec les microbiomes nasal et oral. Finalement, à cause de la complexité d'exécution dans les études

humaines, aucun lien n'a jusqu'à présent été établi entre les conditions environnementales dans lesquelles vivent les individus et le microbiome pulmonaire. C'est pourquoi le microbiome pulmonaire de nos sujets sera étudié dans trois types d'environnement dans lesquels les chevaux seront hébergés. Nous nous attendons à observer une différence entre les microbiomes de chevaux sains et asthmatiques exposés aux différents environnements.

Chapitre 2 : Article

Présentation sous forme d'article

Article en préparation pour soumission à l'American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine

Contribution significative de l'étudiante pour l'acquisition, l'analyse et l'interprétation des données et des échantillons biologiques ainsi que pour la majorité de l'écriture et de la mise en forme de l'article et des figures.

Article révisé le

LUNG MICROBIOME IS INFLUENCED BY THE ENVIRONMENT AND ASTHMATIC STATUS IN AN EQUINE MODEL OF ASTHMA

Gabrielle Fillion-Bertrand¹, Robert Dickson², Roxane Boivin¹, Jean-Pierre Lavoie¹, Gary Huffnagle², Mathilde Leclere¹

¹ Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St-Hyacinthe, Qc, Canada;

² Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, USA

In preparation for submission to the American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine (Research article)

This work was made possible with support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC)

Corresponding author:
Dre Mathilde Leclere
Department of Clinical sciences
Faculty of veterinary medicine
Université de Montréal
CP 5000 Saint-Hyacinthe
Quebec, Canada, J2S 7C6

2.1 Abstract

RATIONALE: There is evidence that lung microbiome differs between asthmatic and healthy people, but the effect of environmental conditions and medication is unknown and difficult to study. Equine asthma is a naturally occurring chronic airway disease characterized by reversible airway inflammation and bronchoconstriction upon exposure to inhaled antigens. We hypothesized that environmental conditions influence pulmonary, nasal and oral bacterial microbiota, and that disease status would primarily affect the lung microbiota.

METHODS: Six asthmatic and 6 healthy horses were studied while at pasture (“Low antigen exposure”), when being housed indoors and fed good quality hay (“Moderate antigen exposure”) and poor quality hay (“High antigen exposure”). At each time point, lung function was recorded, bronchoalveolar lavage, oral and nasal rinses were collected and 16S rRNA gene sequencing performed.

RESULTS: Asthmatic horses developed airway obstruction and inflammation in “moderate” and “high antigen exposure” conditions, while non-asthmatic horses showed mild inflammation under “high antigen exposure” without bronchoconstriction. Lung, oral and nasal communities clustered by environmental conditions, but only lung communities at the family level of taxonomic designation were different between healthy and asthmatic horses. The association between asthma and lung microbiome was strongest in horses in “moderate antigen exposure”.

CONCLUSIONS: Pulmonary, oral and nasal microbiota are influenced by environmental conditions, but only the pulmonary microbiota differs between horses with and without asthma. The difference, mainly present when airway inflammation was present in horses with asthma but not in controls, suggests that the altered lung microbiome in asthma is not inherent but coincident with inflammation.

Keywords: 16s rRNA gene, microbiota, asthma, horses, pulmonary disease

2.2 Introduction

The term “microbiome” refers to all the microbes (bacteria, virus, fungi) found in a particular habitat (Segal *et al.*, 2014). While the skin or gastrointestinal tract are well known to harbor trillions of bacteria, it was only with the development of culture-independent techniques that the lung, long considered a sterile organ, was found to have a diverse, yet low-biomass microbiome (Laurenzi *et al.*, 1961; Dickson and Huffnagle, 2015). Out of the known bacterial phyla, three of them (Proteobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes) make up the majority of the communities found in the healthy lung (Hilty *et al.*, 2010; Beck *et al.*, 2012; Erb Downward *et al.*, 2013; Goleva *et al.*, 2013; Dickson *et al.*, 2014a; Bassis *et al.*, 2015; Denner *et al.*, 2016). It is speculated that these bacteria participate in maintaining a healthy environment by limiting the expansion of pathogens and by modulating the innate immune system (Segal *et al.*, 2014; Durack *et al.*, 2016). The lung microbiome of patients with asthma has been shown to differ in its diversity and composition (Hilty *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Goleva *et al.*, 2013; Denner *et al.*, 2016), and in one study, its bacterial load (Huang *et al.*, 2011) when compared with that of healthy individuals. Bacterial diversity has been associated with airway hyperresponsiveness (Huang *et al.*, 2011) and airflow limitation (Denner *et al.*, 2016). Both diversity and community composition also differ between asthmatic patients showing a positive response to clarithromycin (Huang *et al.*, 2011) or oral corticosteroids (Goleva *et al.*, 2013), and those who do not. This supports the hypothesis that the pulmonary microbiome contributes to asthma pathophysiology and could explain in part the different phenotypes of asthma, including response to treatment. However, in these studies, between 50 and 100 % of the patients were receiving corticosteroids (inhaled, oral or both) (Hilty *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Goleva *et al.*, 2013; Denner *et al.*, 2016), which is an important confounding factor, especially since oral, and to a lesser extent inhaled, corticosteroids affects the lung microbiota (Denner *et al.*, 2016). Other unresolved questions include the effect of the environment on the healthy and unhealthy pulmonary microbiome, as well as the interactions between the oral, nasal and pulmonary bacterial communities of asthmatic patients, in the absence of medication. These issues cannot be easily answered in people due to ethical considerations, making the control of environmental conditions difficult and the intake of medication inevitable.

Equine asthma is a naturally occurring disease of horses affecting approximately 15 % of the adult population in the northern hemisphere (Hotchkiss *et al.*, 2007a). It is characterized by reversible bronchospasm and airway inflammation when exposed to inhaled antigens (Leclere *et al.*, 2011; Lavoie, 2015). The use of an equine model of asthma has the advantages of allowing for multiple lung sampling in standing animals who can be kept in the same environments as healthy controls for longitudinal studies (Bullone and Lavoie, 2015).

We hypothesize that the pulmonary bacterial microbiome is influenced by the surrounding environment and differs between healthy and untreated asthmatic horses. The aims of this study were to compare the bacterial pulmonary microbiome of healthy and asthma-affected horses in three distinct environments, and to compare the pulmonary microbiome with the oral and nasal microbiome in those same environments.

2.3 Methods

2.3.1 Animals

Twelve adult horses of mixed breeds including 10 mares and 2 geldings were studied. Horses with equine asthma ($n = 6$, 523.67 ± 76.65 kg, 16.67 ± 5.43 years (mean \pm SD)) had a well-characterized history of reversible episodes of airway obstruction and inflammation upon stabling and hay exposure. Control horses ($n=6$, 509.33 ± 27.17 kg, 12.83 ± 3.06 years, mean \pm SD) had no history of respiratory obstruction with stabling and hay feeding. Horses were deemed otherwise healthy, based on physical examination, complete blood count, and biochemistry profile. They did not receive antimicrobials or corticosteroids during the study, and for at least 4 weeks prior to enrollment. All experimental procedures were performed in accordance with the Canadian Council for Animal Care guidelines and were approved by the Animal Care Committee for the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal (# 15Rech1760).

2.3.2 Experimental design

Healthy horses and horses with equine asthma were housed together on pasture for at least 3 weeks before lung function was recorded and BALF collected (“Low antigen exposure”). They were then exposed to indoor allergens by being housed in a barn and fed first quality hay for 3 weeks (“Moderate antigen exposure”) or poor quality hay for another 3 weeks (“High Antigen exposure”), in a crossover design.

2.3.3 Lung function

Lung function was measured on standing, unsedated horses, using an impulse oscillometry system (IOS), as previously described (van Erck *et al.*, 2004a). Pulsated electrical waves from 0.5 Hz to 10 Hz were applied for 30 seconds to the respiratory system with a loud speaker. A mask was sealed on the horses’ nose and they breathed through a heated pneumotachograph (Bullone *et al.*, 2014). Pressure and flow signals measured were processed by fast Fourier transformation and used to calculate resistance, reactance and impedance. Lung function was reported as the resistance at 5 Hz over the resistance at 10 Hz (R5/R10 ratio), used as a proxy for the positive frequency dependence observed in

healthy horses over 5 Hz, which is lost in exacerbated equine asthma (van Erck *et al.*, 2004a).

2.3.4 Nasal and oral lavages

Once the horses were sedated, nasal and oral cavities were sequentially rinsed with 50 ml of sterile isotonic saline. Saline was collected via a sterilized funnel in a conical tube and immediately placed on ice and processed within 2 hours of collection. 5 mL aliquot was used for DNA extraction and the rest was frozen at - 80°C.

2.3.5 Bronchoalveolar lavages

Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected on standing, sedated horses using a 2.5 m videoendoscope (Olympus Medical System Corp., Tokyo, Japan). To avoid upper airway contamination, the bronchoscope was first advanced in a protective sheath passed in the nasal passages and down to the trachea. Then the bronchoscope was advanced out of the sheath and in the right main bronchi until it lodged in a 10 mm of diameter bronchi. Two 250 ml boluses of warm isotonic saline were instilled and aspirated as previously described (Lapointe *et al.*, 1993). Between each horse, the bronchoscope and the protective sheath were disinfected with multi-enzymatic solution, immersed for 10 minutes in a 1% concentrated 21.4% W/W Potassium monopersulfate solution (Virkon®, 02125021, Vétoquinol N.-A. inc. Lavaltrie, Qc, Canada), and rinsed with ultra-pure injectable pharmaceutical grade water. BALF was immediately placed on ice and processed within 2 hours of collection. 5 mL aliquots were used for immediate DNA extraction, and 15 mL were frozen at -80°C. Fresh BALF cells were washed twice in PBS and total cell count was determined (ADAM automatic Cell Counter, Montreal-Biotech Inc., Montreal, QC, CA). Thin-layer cells from remaining BALF were prepared with a cytocentrifuge (Cytospin 2, Shandon, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 1000 rpm, 5 minutes) and stained with a modified Wright-Giemsa (DiffQuick, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Differential cell counts were obtained from a count of 400 cells.

2.3.6 Negative and positive sequencing control specimens

Prior to each BALF collection, 50 mL of sterile saline were instilled through the main channel of the bronchoscope, collected in sterile tubes, and processed as the other samples above (scope rinse specimens). An additional 20 reagent control specimens were sequenced, representing sterile water and buffers used in DNA extraction and sequencing. A mock community of known bacterial DNA composition was used to evaluate run-to-run variation and DNA from a known *Actinobacillus suis* colony was also sequenced.

2.3.7 DNA extraction

Total DNA was extracted from 5 mL of each sample using QIAGEN DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Toronto, ON, CA) following manufacturer's instructions with minor modifications. Briefly, samples were centrifuged at $16,000 \times g$ for 30 min and 360 μ l of lysis buffer were added to cell pellets and transferred to 0.7 mm garnet bead tubes (VWR, Radnor, PA, USA). Samples were bead beaten for 1 min at the homogenize setting of a Mini-BeadBeater-8 (Biospec, Bartlesville, OK, ^[1]USA) and centrifuged for 1 min at $16,000 \times g$. Samples were incubated 1h at 55°C with proteinase K and 30 min at 70°C with a guanidine hydrochloride buffer provided with the kit. We then continued with the DNeasy® Blood & Tissue Kit protocol (Qiagen) starting with step 3 (DNA precipitation with ethanol).

2.3.8 High throughput sequencing

Sequencing was performed using the Illumina MiSeq IEMFileVersion 4 platform, using a MiSeq Reagent Kit V2 (500 cycles), according to the manufacturer's instructions with modifications for low biomass samples. The V4 region of the bacterial 16S rRNA gene was amplified using published primers (Caporaso *et al.*, 2011b) and the dual-indexing sequencing strategy developed and described by (Kozich *et al.*, 2013). Briefly, Accuprime High Fidelity Taq was used in place of Accuprime Pfx SuperMix. Primary PCR cycling conditions were 95°C for two minutes, followed by 20 cycles of touchdown PCR (95°C 20 seconds, 60°C 20 seconds and decreasing 0.3 degrees each cycle, 72°C 5 minutes), then 20 cycles of standard PCR (95°C for 20 seconds, 55°C for 15 seconds, and 72°C for 5 minutes), and finished with 72°C for 10 minutes.

2.3.9 Quantitative PCR (mixed bacterial DNA)

Relative bacterial load was estimated by quantifying bacterial DNA using qPCR. QuantiTect SYBR Green PCR Kit #204143 (Qiagen, Toronto, ON, CA) was used with modified universal primers for bacterial DNA region (Forward: 5'-ACACGGCCCAGACTCCTAC-3' and Reverse: 5'-TATTACCGCGGCTGCTGGC-3') and with specific primers for *A. suis* (Forward: 5'-GAAGAGCCTGTTAGTGATAGCAGTA-3' and Reverse: 5'-ATGGTCCCCCATCTTCAA-3'). Two microliter of DNA was added to obtain a final reaction volume of 20 μ L containing 0.5 μ M of each primer. Amplification of the DNA was performed in a Rotor-Gene RG3000 (Corbett Research, Sydney, AS). The parameters used for quantifying the mixed 16S rRNA gene were as follows: 95°C for 10 min, followed by 50 cycles at 95°C for 10 s, 59°C for 15 s and 72°C for 20 s. Parameters used for *A. suis* 16S rRNA gene were as follows: 95°C for 10 min, followed by 45 cycles at 95°C for 10 s, 56°C for 15 s and 72°C for 15 s. Copy number of 16S in each sample was calculated relatively to a standard curve.

2.3.10 Data analysis

Sequence data were processed and analyzed using the software mothur v.1.27.0 according to the Standard Operating Procedure for MiSeq sequence data using a minimum sequence length of 250 base pairs (Schloss, 2015). Sequences are available via the NCBI Sequence Read Archive (accession number PRJNA361129). For each experiment and sequencing run, a shared community file and a phylotyped (genus-level grouping) file were generated using operational taxonomic units (OTUs) binned at 97% identity generated using the `dist.seqs`, `cluster`, `make.shared` and `classify.otu` commands in mothur. OTU numbers were arbitrarily assigned in the binning process and are referred to throughout the manuscript in association with their most specified level of taxonomy. Classification of OTUs was carried out using the mothur implementation of the Ribosomal Database Project (RDP) Classifier and the RDP taxonomy training set 9 (fasta reference = `trainset9_032012.pds.fasta`, taxonomy reference = `trainset9_032012.pds.tax`), available on the mothur website.

We performed microbial ecology analysis using the vegan package 2.0-4 (Oksanen JF *et al.*, 2012) in R (version 3.2.3 (2015-12-10) -- "Wooden Christmas-Tree". Copyright (C) 2015 The R Foundation for Statistical Computing. Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)) (Wang *et al.*, 2012). For relative abundance and ordination analysis, samples were normalized to the percent of total reads and we restricted analysis to OTUs that were present at greater than 1% of the sample population; all OTUs were included in diversity analysis. Direct community similarity comparisons were performed using the Bray-Curtis similarity index. We performed ordinations using Principal Component Analysis on Hellinger-transformed normalized OTU tables generated using Euclidean distances (Legendre and Gallagher, 2001). We determined significance of differences in community composition using PERMANOVA (*adonis*) with 10000 permutations using a Euclidean distance matrix.

Weights and ages were analyzed by unpaired two-tailed t-tests. Lung function, BALF differentials, 16S quantification by qPCR, and community diversity and richness data were analyzed by repeated measures linear model with a sequential Benjamini-Hochberg correction. Normality was assessed by visual inspection of the data and Kolmogorov-Smirnov tests. Data were log-transformed when indicated. Spearman correlations were done between sequencing and qPCR quantification. Unless mentioned otherwise, standard deviation (\pm SD) is reported.

2.3.11 Identification of procedural contaminants

Reagents used in DNA isolation and library preparation contain bacterial DNA that can contaminate sequence-based studies of microbial communities (Salter BMC Biology 2014). As detailed above, we collected and sequenced 36 scope rinse specimens and 20 reagent control specimens to identify the influence of procedural contamination. Specimens were processed in a randomized order to minimize the risk of false pattern formation due to reagent contamination. We compared the bacterial taxa detected in control specimens using PERMANOVA (*adonis*).

2.4 Results

2.4.1 Animals

There was no significant difference between groups for age and weight ($P > 0.1$). As expected, horses with equine asthma developed clinical signs with antigen exposure (cough and increased respiratory efforts).

2.4.2 Lung function

Asthmatic horses under “Moderate antigen exposure” and “High antigen exposure” developed airway obstruction while healthy horses did not (Figure 2.1).

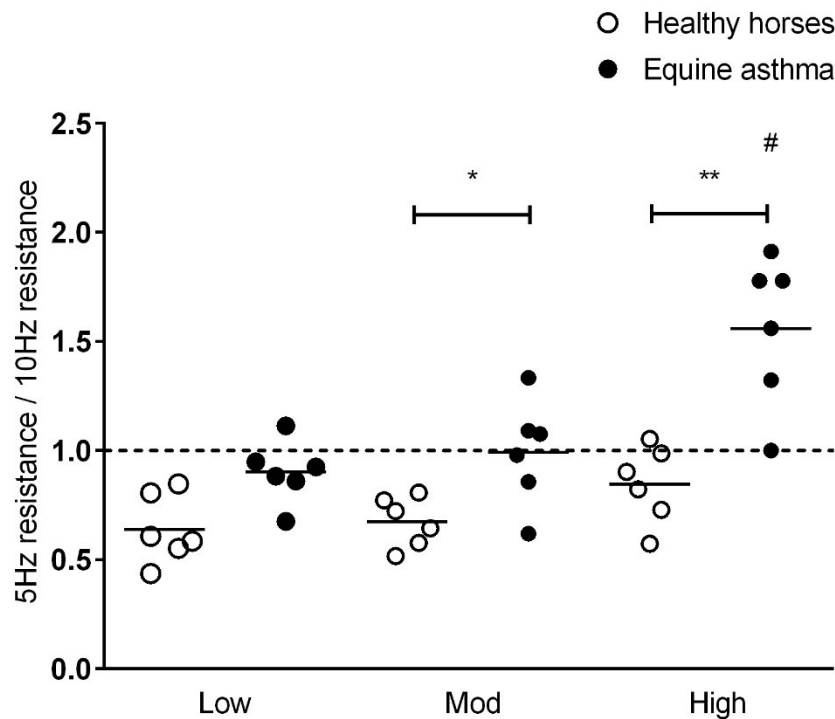


Figure 2.1 Lung function. Resistance at 5 Hz over resistance at 10 Hz (R5/R10 ratio) in horses with asthma (black circles) and healthy horses (white circles) under three environmental conditions. Mean \pm SD. A ratio superior to 1 (dotted line) is considered abnormal and reflects pulmonary obstruction. *: difference between groups ($P = 0.01$); **: difference between groups ($P < 0.0001$); #: different from pasture ($P < 0.0001$). Low: Low antigen exposure; Mod: Moderate antigen exposure; High: High antigen exposure.

2.4.3 Total and differential cell counts

As expected, horses with equine asthma developed airway neutrophilia with significantly higher neutrophil percentages in their BALF under “Moderate antigen exposure” and “High Antigen exposure” compared to healthy horses in the same conditions, and compared to “Low antigen exposure” (Figure 2.2).

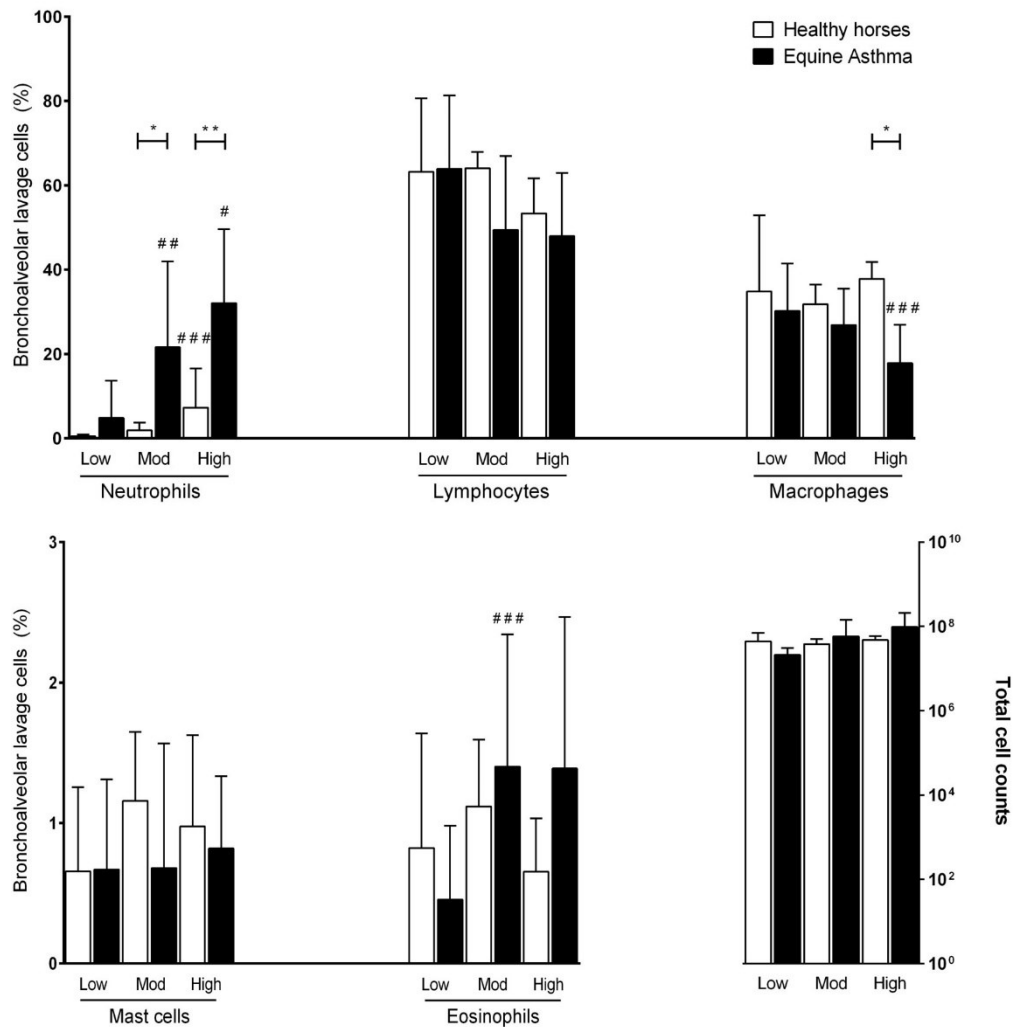


Figure 2.2 Bronchoalveolar lavage cytology. Bronchoalveolar lavage cell differentials and total cell counts in horses with asthma (black bars) and healthy horses (white bars) under three environmental conditions. Mean \pm SD. *: different between groups ($P = 0.0007$); **: different between groups ($P = 0.001$); #: different from pasture ($P < 0.0001$);

#: different from pasture ($P = 0.0008$); # # #: different from pasture ($P \leq 0.02$). Low: Low antigen exposure; Mod: Moderate antigen exposure; High: High antigen exposure.

2.4.4 Reagents and bronchoscope contamination

Bacterial DNA is detectable even in sterile reagents, and sequencing contamination of low-biomass microbiome studies is a major technical challenge. Taxa detected in bronchoscope rinse specimens were indistinguishable from those detected in reagent control specimens ($P = 0.685$), indicating no appreciable contaminating signal introduced via the bronchoscope. By contrast, taxa detected in scope rinse specimens were significantly distinct from those detected in BALF specimens ($P = 0.007$) and oral and nasal specimens ($P = 0.001$). Similarly, taxa detected in reagent control specimens were distinct from those detected in BALF, oral and nasal specimens ($P \leq 0.001$ for all). The five most abundant OTUs detected in scope rinse specimens, comprising 11.9% of all sequences, were classified as *Planctomycetaceae* (OTU303), *Bacteroides* (OTU029), *Enterobacteriaceae* (OTU006), unclassified Alphaproteobacteria (OTU617), and Anaerolineaceae (OTU087). Collectively, these OTUs comprised only 1.6% of sequences detected in BALF specimens. The five most abundant OTUs detected in reagent control specimens, comprising 23.1% of all sequences, were classified as *Bacteroides* (OTU029), *Prevotella* (OTU315), *Acinetobacter* (OTU190), *Saprospiraceae* (OTU787) and *Porticoccus* (OTU350). Collectively, these OTUs comprised only 0.49% of sequences in BALF specimens, 0.13% of sequences in oral specimens, and 0.23% of sequences in nasal specimens. We thus found minimal evidence of sequencing contamination in our experimental specimens. No OTUs were excluded from analysis of BALF, oral or nasal specimens.

2.4.5 Bacterial DNA burden

There was significantly more bacterial DNA, as measured using quantitative PCR of the 16SrRNA gene, in oral than in nasal samples. Both oral and nasal samples contained more bacterial DNA than BALF. There were no significant differences between groups or environmental conditions (Figure 2.3).

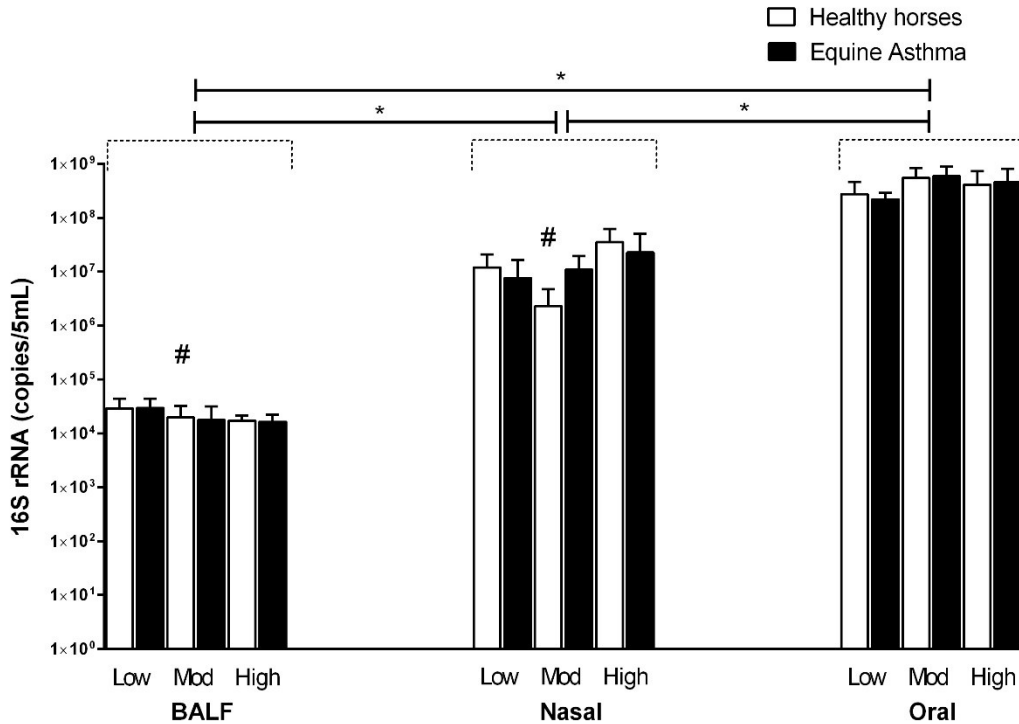


Figure 2.3 Bacterial 16S rRNA quantification by PCR. 16S rRNA gene quantification by PCR in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), nasal washes and oral washes of horses with asthma (black bars) and healthy horses (white bars) under three environmental conditions. Mean \pm SD. *: difference between dotted brackets ($P \leq 0.01$); #: No significant difference between these groups. No significant difference in 16S quantification between asthmatic and controls in all environments for each of the three sites. BALF: Bronchoalveolar lavage fluid; Low: Low antigen exposure; Mod: Moderate antigen exposure; High: High antigen exposure.

2.4.6 Sequencing results

A mean of 45561, 46170, 9449 high-quality reads were obtained for oral, nasal, and BALF specimens, respectively. Five samples had less than 500 sequences and were excluded from the analysis. These represented one scope rinse, two BALF from controls in the “Low antigen exposure” environment, and two BALF from asthmatic horses in the “High antigen exposure”.

2.4.7 Pulmonary versus nasal and oral microbiome

Oral and nasal communities had greater richness (number of detectable OTUs) than BALF community ($P < 0.0001$). Shannon diversity indexes (taking in account richness and evenness across the community) also showed greater diversity in oral and nasal specimens than in BALF samples ($P < 0.0001$), (Figure 2.4). BALF specimens had significantly greater richness and diversity than videoendoscope rinse specimens ($P = 0.03$ and 0.002 , respectively). Sequences derived from oral, nasal and BALF specimens represented 871 different OTUs from at least 23 families. Bacterial taxa were first studied by anatomic sites. Pulmonary, oral and nasal specimens contained distinct microbiome, independent of environmental conditions at the time of bronchoscopy ($P < 0.0001$ for all comparisons) (Figure 2.5). This site-specificity of respiratory microbiota remained significant when analysis was restricted to either healthy or asthmatic horses ($P < 0.01$ for all comparisons), and even when restricted by groups and environments ($P < 0.05$ for all comparisons with the single exception of nasal vs BALF microbiome in asthmatic horses in the “Low antigen exposure” environment ($P = 0.16$)).

BiPlot and mvabund analysis both identified a *Pasteurella*-classified OTU (001) as relatively enriched in nasal specimens. This OTU, which was aligned with 100% coverage and identity via NCBI BLAST with *Pasteurella multocida*, comprised $39.5\% \pm 2.7\%$ of sequences in nasal specimens. By contrast, the same techniques identified an *Actinobacillus*-classified OTU (002) as relatively enriched in oral rinse specimens ($23.2\% \pm 11.3\%$ of sequences). Both of these site-defining OTUs were detected in BALF specimens, but comprised only $3.0\% \pm 13.1\%$ and $1.9\% \pm 5.8\%$ of BALF sequences, respectively. BALF communities were composed of a large number of low-abundance sequences and were not dominated by any specific site-defining OTU. The most abundant taxa detected in BALF specimens, compared to their representation in other specimens, are shown in Figure 2.6.

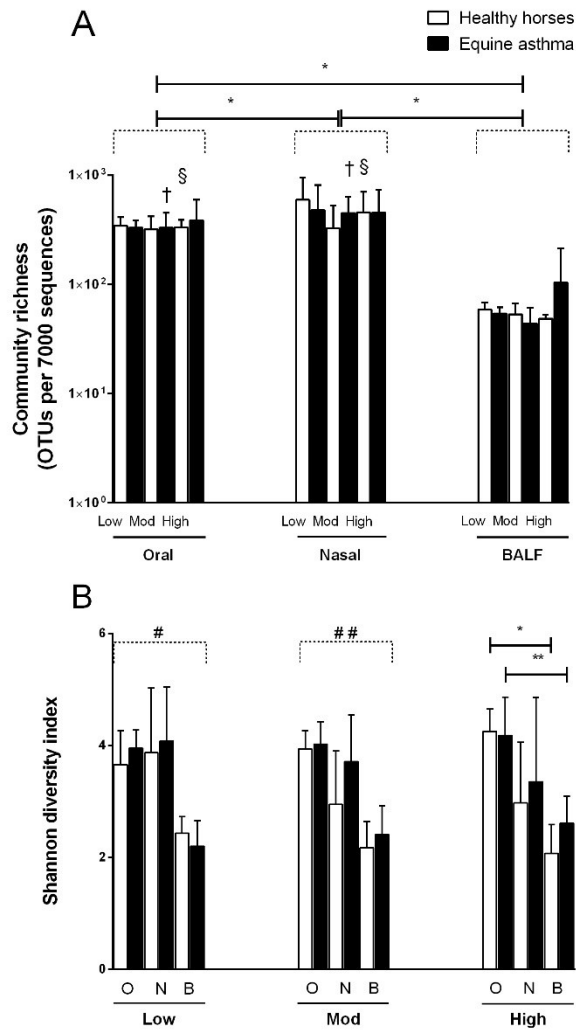


Figure 2.4 Richness and diversity. Community richness (A) and Shannon diversity indexes (B) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), nasal washes and oral washes of horses with asthma (black bars) and healthy controls (white bars) under three environmental conditions. Bronchoscope: bronchoscope rinses collected before each bronchoalveolar lavage. Mean \pm SD. *: difference between groups ($P \leq 0.0003$); **: difference between groups ($P = 0.01$); †: no significant difference between these groups; §: no significant difference between these groups; #: for all comparisons ($P \leq 0.002$); # #: for all comparisons safe Oral-Nasal for equine asthma and Nasal-BALF for healthy horses. BALF: Bronchoalveolar lavage fluid; Low: Low antigen exposure; Mod: Moderate antigen exposure; High: High antigen exposure.

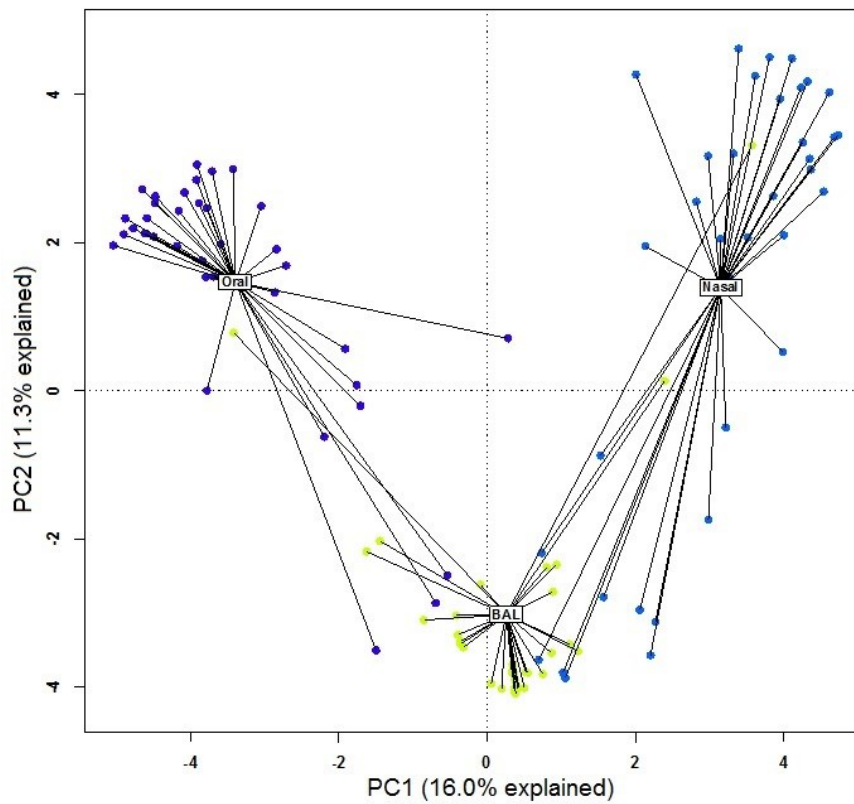


Figure 2.5 Principal component (PC) analysis of bronchoalveolar lavage fluid (BALF), nasal washes and oral washes of horses with asthma (black circles) and healthy horses (white circles). Specimens from the three environmental conditions (Low antigen exposure, Moderate antigen exposure and High antigen exposure) are represented at the family level of taxonomic designation. $P < 0.0001$ for all comparisons.

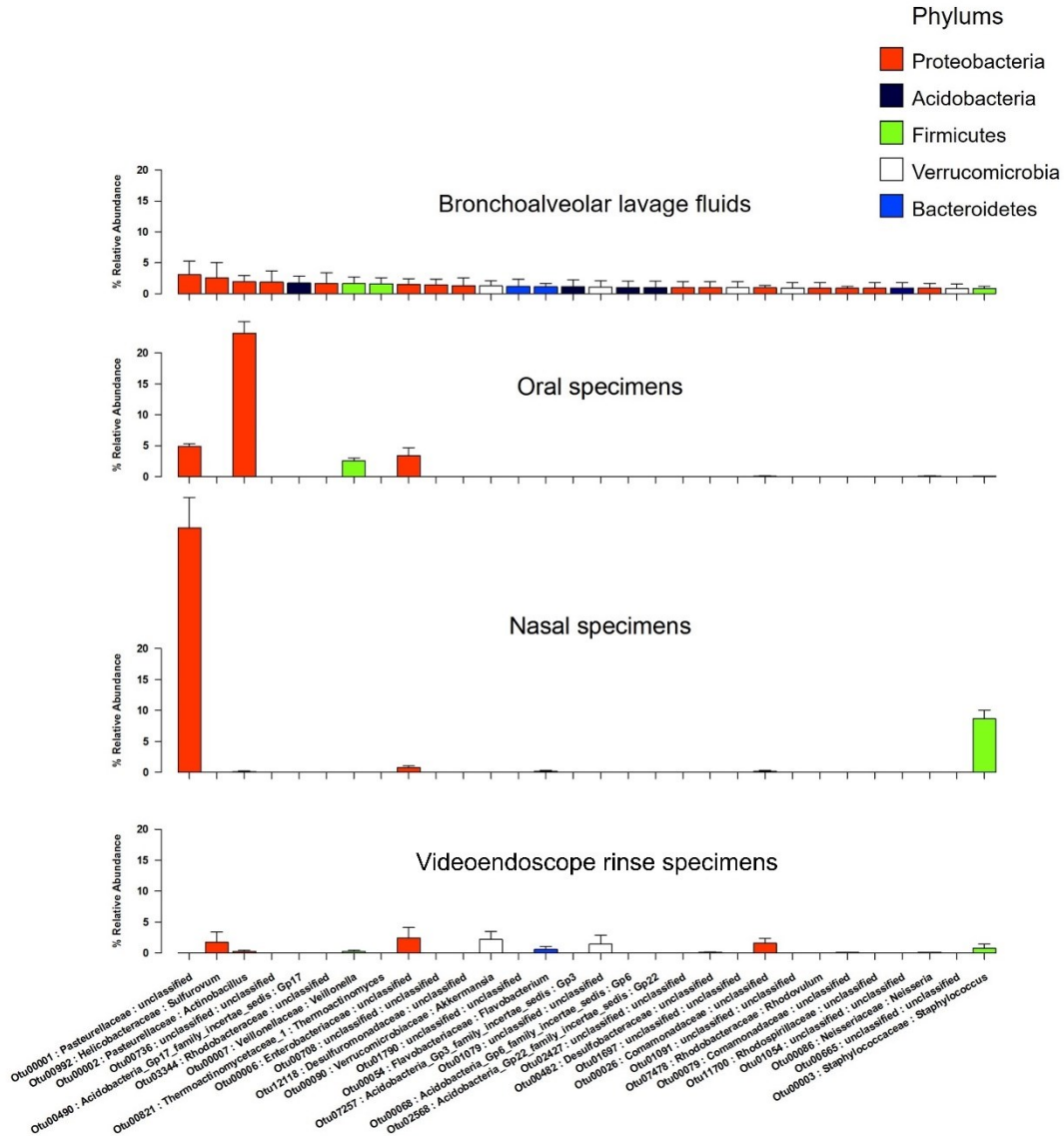


Figure 2.6 Comparison of the 30 most common operational taxonomic units found in bronchoalveolar lavage fluid, oral, nasal and bronchoscope samples.

2.4.8 Influence of the environment on pulmonary, nasal and oral microbiome

Richness and Shannon diversity index of pulmonary, nasal and oral microbiome did not vary significantly with environmental conditions. Only an increase in richness was observed for the bronchoscope specimens sampled under “Moderate” and “High antigen exposure” (Figure 2.4). In a given horse, there was little temporal stability of the pulmonary microbiome over time in the 3 different environments. Lung communities clustered

strongly by environmental conditions (PERMANOVA, $P = 0.004$), but did not cluster by individual horse ($P = 0.75$). In a direct comparison of Bray-Curtis community dissimilarity, lung communities were more similar in horses in the same environment than across environments (Bray-Curtis indices comparison, $P < 0.01$). Importantly, this clustering by environmental conditions was not present in the taxa detected in scope rinse specimens ($P = 0.58$), confirming that clustering by environment was not attributable to batch processing or procedural bias. No OTUs in BALF specimens were identified via BiPlot or mvabund as specific to an environmental condition, but a trend was found for decreased Gammaproteobacteria among “High Antigen Exposure” specimens ($P = 0.07$). Oral and nasal communities were also clustering by environmental conditions ($P < 0.0001$ and $P = 0.02$ respectively). The effect of environment on lung microbiome was more significant in healthy ($P = 0.004$) than in asthmatic horses ($P = 0.035$).

2.4.9 Influence of health status on pulmonary, nasal and oral microbiome

No difference in richness or Shannon index diversity was observed between microbiota detected in the lung, mouth or nose of healthy and asthmatic horses (Figure 2.4). Pulmonary communities of healthy and asthmatic horses were significantly different at the family level of taxonomic designation (PERMANOVA, $P = 0.006$) but not at the OTU level of taxonomy (Figure 2.7). No specific bacterial family drove this difference, but there was a trend for an overrepresentation of the Pasteurellaceae family in asthmatic horses ($P = 0.06$). Interestingly, when restricting analysis by environment, the difference between asthmatic and healthy lung’s microbiome was significant only in the “Moderate antigen exposure” environment ($P = 0.015$) (Figure 2.8). Oral and nasal microbiota were not significantly different between healthy and asthmatic horses (*adonis* function, $P = 0.68$ and $P = 0.23$, respectively), regardless of the environmental conditions.

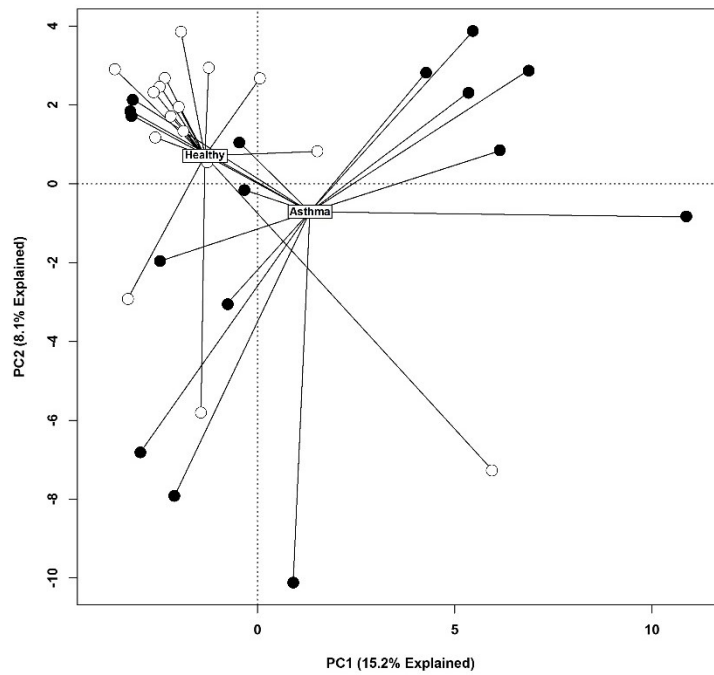


Figure 2.7 Principal component analysis of the pulmonary microbiome of healthy and asthmatic horses. Pooled data.

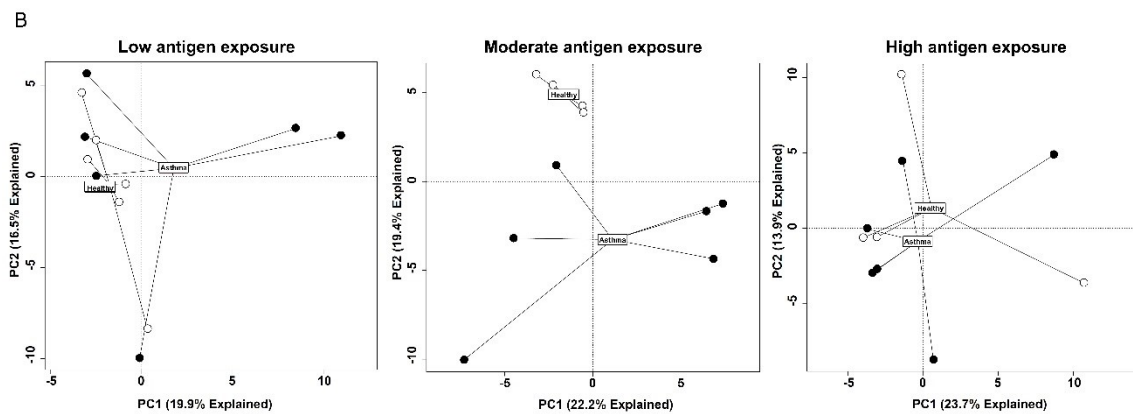


Figure 2.8 Principal component analysis of the pulmonary microbiome of healthy and asthmatic horses. Horses separated by environments.

2.5 Discussion

2.5.1 Brief summary of main results

To our knowledge, this is the first report of sequential analysis of pulmonary bacterial microbiota in sick and healthy individuals housed in different environments. Because the level of antigenic exposure has different effects on horses with and without equine asthma (airway inflammation and obstruction with low level of antigenic exposure in horses with asthma versus mild inflammation without obstruction with high level of antigenic exposure in healthy individuals), this study offers a unique opportunity to look at the effect of the environment with or without concurrent inflammation on the lung microbiome. The main findings of this study are that the pulmonary microbiome A) is influenced by environmental conditions, more so in health than in asthma and B) differs between horses with and without asthma, but mainly when horses with asthma have antigen-induced airway inflammation and obstruction. In addition to this, oral and nasal microbiota are influenced by the surrounding environment but not by disease state. Finally, in horses, the oral, nasal and pulmonary microbiomes are distinct from one another, regardless of the environmental conditions or disease status.

2.5.2 Pulmonary, oral and nasal microbiomes are influenced by the environment

Oral, nasal and pulmonary communities are clustering by environments and not by individuals or order of sampling. Since “environment” here involves a change in both housing and forage, variation in the oral microbiome was expected. In people, variation of the oral microbiome over time was reported in some (Caporaso *et al.*, 2011a), but not all studies (Lazarevic *et al.*, 2010; David *et al.*, 2014), and even when stability was observed, drastic external change such as living abroad had repercussions on the oral microbiome (David *et al.*, 2014). The clustering of pulmonary communities by environment was less expected and the fact that short-term changes in housing and forage type can alter the pulmonary bacterial microbiome of mature, healthy animals could have important consequences on future experiments. Of note, the indoor environmental conditions chosen in this experiment were known to have the potential of inducing pulmonary inflammation

(severe in horses with asthma, mild and transient in healthy horses (Leclere *et al.*, 2011)) but were also representative of normal housing conditions of horses. It is therefore difficult to separate the effect of environment in itself (exposure to different bacteria via inhalation and microaspirations) from changes in microbial populations secondary to the host developing airway inflammation. The fact that variation with environmental conditions is more significant in healthy horses indirectly supports a direct role of the environment, but the fact that group discrimination is only present when there is the largest difference in BALF inflammation supports a prominent role of inflammation. For this reason, we suggest that future studies on airway microbiota include healthy controls living in similar environmental conditions to limit unintended bias.

2.5.3 Pulmonary microbiome is altered in equine asthma

The pulmonary microbiome of asthma-affected horses is distinct from that of healthy horses in relative abundance of bacterial families, while the oral and nasal microbiomes are not. This is in agreement with the differences observed in patients with asthma (Hilty *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Denner *et al.*, 2016), but because corticosteroids can influence the diversity of lung communities (Denner *et al.*, 2016), at least some of the differences observed in other studies could be secondary to corticosteroids exposure. Here we show that the altered microbiome observed in chronic pulmonary inflammatory conditions can be present even in animals receiving no inhaled or oral corticosteroids, and living in the same environment as their controls. In agreement with previous findings, we found differences in relative abundance (Hilty *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Denner *et al.*, 2016) but unlike other, we did not observe differences in overall diversity (Hilty *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Denner *et al.*, 2016) or bacterial burden (Huang *et al.*, 2011). Despite the variations between groups and environments, the most commonly represented phylum in healthy and asthmatic lungs was Proteobacteria, followed by Bacteroidetes and Firmicutes, three phylum commonly found in previous studies in human and animals (Hilty *et al.*, 2010; Beck *et al.*, 2012; Denner *et al.*, 2016; Glendinning *et al.*, 2016).

As mentioned above, it is difficult to separate the effect of the environment and the effect of the inflammation induced by inhaled antigens, since both could have an effect on

the local environment of the lungs. Since the difference between groups is mainly driven by the “Moderate antigen exposure” environment, where inflammation is present in asthmatic horses only, it suggests that the induced inflammation changes the microenvironment of the bronchoalveolar space, creating new niches for bacterial growth (Dickson *et al.*, 2014b). This could explain similarities in the lung microbiome of healthy and asthma-affected horses in the “High antigen exposure” environment (while healthy horses also have some degree of pulmonary inflammation) and suggests that the role of the immune system is important in regulating the lung microbiome. Bacterial dysbiosis could then induce a disproportionate reaction of the immune system, leading into an inflammatory loop in which primed inflammatory cells of the lungs disturb the bacterial population by secreting inflammatory cytokines (Dickson *et al.*, 2014b), to which bacteria may have the potential to adapt (Kanangat *et al.*, 1999). Alternately, the communities inhaled in this environment could themselves drive in part the inflammation. Finally, it is also possible that the variation observed in healthy horses reflects the normal adaptability of a healthy lung to adverse conditions.

2.5.4 Pulmonary microbiome is distinct from oral and nasal microbiome

Microbiomes of the mouth, nose and lungs are distinct in horses. The dissimilarity between nasal and lung communities indicates that the method of sampling effectively limited contamination by the nasal passages, and avoided significant carryover from the upper airways, a concern raised previously (Charlson *et al.*, 2011). Nevertheless, a greater similarity could have been expected for biological reasons such as the large minute ventilation (60 L/min at rest) of these obligate nasal breathers (Robinson, 2007). It also supports the concept that the lung microbiome is its own ecological niche with distinct ecologic pressures (Dickson and Huffnagle, 2015), and not merely a diluted version of the upper airways bacterial content (Bassis *et al.*, 2015). The oral and pulmonary communities appear to cluster more in people than horses (Hilty *et al.*, 2010; Charlson *et al.*, 2011; Segal *et al.*, 2013; Bassis *et al.*, 2015), possibly because microaspirations played a lesser role in populating the lower airways of horses due to their long velum separating the oropharynx from the nasopharynx, as well as their eating and sleeping behaviors.

2.5.5 Potential pitfalls

Contamination of the samples by irrelevant bacterial DNA is a major concern in studies sequencing low biomass microbiome. As expected, numerous bacterial DNA sequences were found in all reagents and scope rinses samples, but since they were different from the biological samples and did not cluster by environment, they played a minor role in the overall biological samples analysis. Also, the sequencing depth did not allow for all OTUs to be identified at the species level and for some OTUs, the identification could have been limited by the fact that databases are in large part based on bacteria found in human.

2.6 Conclusion

This study shows that in these untreated animals housed together, pulmonary, oral and nasal microbiome is influenced by environmental conditions but that only pulmonary microbiome differs between horses with and without asthma. The difference between asthmatic and healthy horses was mainly present when airway inflammation was present in horses with asthma but not in controls, suggesting that the altered lung microbiome observed in asthma is not inherent but secondary to inflammation. Further studies will determine if this altered lung microbiome contributes to persistent inflammation in equine and human asthma.

2.7 Acknowledgements

The authors thank Nicole Falkowski and Ludovic Tanquerel for their help in study execution and Guy Beauchamp for statistical analysis.

2.8 References

- Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, Beck JM, Curtis JL, Huffnagle GB. 2015. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *mBio* 6:e00037.
- Beck JM, Young VB, Huffnagle GB. 2012. The microbiome of the lung. *J Lab Clin Med* 160:258-266.
- Bullone M, Chevigny M, Allano M, Martin JG, Lavoie JP. 2014. Technical and physiological determinants of airway smooth muscle mass in endobronchial biopsy samples of asthmatic horses. *J Appl Physiol* 117:806-815.
- Bullone M, Lavoie JP. 2015. Asthma "of horses and men"--how can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences? *Mol Immunol* 66:97-105.
- Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK, Berg-Lyons D, Gonzalez A, Stombaugh J, Knights D, Gajer P, Ravel J, Fierer N, Gordon JI, Knight R. 2011a. Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biol* 12:R50.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R. 2011b. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1:4516-4522.
- Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, Bushman FD, Collman RG. 2011. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Resp Crit Care* 184:957-963.
- David LA, Materna AC, Friedman J, Campos-Baptista MI, Blackburn MC, Perrotta A, Erdman SE, Alm EJ. 2014. Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biol* 15:R89.
- Denner DR, Sangwan N, Becker JB, Hogarth DK, Oldham J, Castillo J, Sperling AI, Solway J, Naureckas ET, Gilbert JA, White SR. 2016. Corticosteroid therapy and airflow obstruction influence the bronchial microbiome, which is distinct from that of bronchoalveolar lavage in asthmatic airways. *Journal Allergy Clin Immunol* 137:1398-1405 e1393.
- Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, Walker N, Scales BS, Beck JM, Martinez FJ, Curtis JL, Lama VN, Huffnagle GB. 2014a. Changes in the lung microbiome following lung transplantation include the emergence of two distinct *Pseudomonas* species with distinct clinical associations. *PloS one* 9:e97214.
- Dickson RP, Huffnagle GB. 2015. The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease. *PLoS pathogens* 11:e1004923.
- Dickson RP, Martinez FJ, Huffnagle GB. 2014b. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *Lancet* 384:691-702.
- Durack J, Boushey HA, Lynch SV. 2016. Airway Microbiota and the Implications of Dysbiosis in Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 16:52.
- Erb Downward JR, Falkowski NR, Mason KL, Muraglia R, Huffnagle GB. 2013. Modulation of post-antibiotic bacterial community reassembly and host response by *Candida albicans*. *Sci Rep* 3:2191.

- Glendinning L, Wright S, Pollock J, Tennant P, Collie D, McLachlan G. 2016. Variability of the Sheep Lung Microbiota. *Appl Environ Microbiol* 82:3225-3238.
- Goleva E, Jackson LP, Harris JK, Robertson CE, Sutherland ER, Hall CF, Good JT, Jr., Gelfand EW, Martin RJ, Leung DY. 2013. The effects of airway microbiome on corticosteroid responsiveness in asthma. *Am J Resp Crit Care* 188:1193-1201.
- Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, Davies J, Ervine A, Poulter L, Pachter L, Moffatt MF, Cookson WO. 2010. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PloS one* 5:e8578.
- Hotchkiss JW, Reid SW, Christley RM. 2007a. A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: Risk factors for recurrent airway obstruction. *Equine Vet J* 39:301-308.
- Huang YJ, Nelson CE, Brodie EL, Desantis TZ, Baek MS, Liu J, Woyke T, Allgaier M, Bristow J, Wiener-Kronish JP, Sutherland ER, King TS, Icitovic N, Martin RJ, Calhoun WJ, Castro M, Denlinger LC, Dimango E, Kraft M, Peters SP, Wasserman SI, Wechsler ME, Boushey HA, Lynch SV, National Heart L, Blood Institute's Asthma Clinical Research N. 2011. Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol* 127:372-381 e371-373.
- Kanangat S, Meduri GU, Tolley EA, Patterson DR, Meduri CU, Pak C, Griffin JP, Bronze MS, Schaberg DR. 1999. Effects of cytokines and endotoxin on the intracellular growth of bacteria. *Infect Immun* 67:2834-2840.
- Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 79:5112-5120.
- Lapointe JM, Lavoie JP, Vrans AA. 1993. Effects of triamcinolone acetonide on pulmonary function and bronchoalveolar lavage cytologic features in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res* 54:1310-1316.
- Laurenzi GA, Potter RT, Kass EH. 1961. Bacteriologic flora of the lower respiratory tract. *New Engl J Med* 265:1273-1278.
- Lavoie JP. 2015. Is the time primed for equine asthma? *Equine Vet Educ* 27:225-226.
- Lazarevic V, Whiteson K, Hernandez D, Francois P, Schrenzel J. 2010. Study of inter- and intra-individual variations in the salivary microbiota. *BMC genomics* 11:523.
- Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP. 2011. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology* 16:1027-1046.
- Legendre P, Gallagher ED. 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia* 129:271-280.
- Oksanen JF, Blanchet G, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, H W. 2012. *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.0-4. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>. In, 2.0-4 ed.
- Robinson NE. 2007. How Horses Breathe: the Respiratory Muscles and the Airways. In: McGorum BC, Dixon PM, Robinson NE, Schumacher J, editors. *Equine Respiratory Medicine and Surgery*: Saunders Elsevier. p 19-31.
- Schloss PD. 2015. MiSeq SOP - mothur.
- Segal LN, Alekseyenko AV, Clemente JC, Kulkarni R, Wu B, Gao Z, Chen H, Berger KI, Goldring RM, Rom WN, Blaser MJ, Weiden MD. 2013. Enrichment of lung

- microbiome with supraglottic taxa is associated with increased pulmonary inflammation. *Microbiome* 1:19.
- Segal LN, Rom WN, Weiden MD. 2014. Lung microbiome for clinicians. New discoveries about bugs in healthy and diseased lungs. *AnnalsATS* 11:108-116.
- van Erck E, Votion D, Art T, Lekeux P. 2004a. Measurement of respiratory function by impulse oscillometry in horses. *Equine Vet J* 36:21-28.
- van Erck E, Votion DM, Kirschvink N, Art T, Lekeux P. 2003a. Use of the impulse oscillometry system for testing pulmonary function during methacholine bronchoprovocation in horses. *Am J Vet Res* 64:1414-1420.
- Wang Y, Naumann U, Wright ST, Warton DI. 2012. mvabund- an R package for model-based analysis of multivariate abundance data *Methods in Ecology and Evolution* Volume 3, Issue 3. *Methods Ecol Evol* 3:471-474.

Chapitre 3 : Discussion générale

Les conclusions principales de l'étude centrale à ce mémoire sont que les microbiomes bactériens pulmonaire, oral et nasal sont influencés par les conditions environnementales, mais que seules les communautés bactériennes pulmonaires diffèrent entre les chevaux sains et asthmatiques non médicamenteux. La différence entre ces microbiomes pulmonaires est particulièrement appréciable lorsque les poumons des chevaux asthmatiques présentent de l'inflammation, mais que les chevaux sains n'en présentent pas. Ceci suggère que le microbiome pulmonaire altéré des chevaux asthmatiques pourrait ne pas être intrinsèque à ceux-ci, mais possiblement secondaire à l'inflammation pulmonaire. Les communautés pulmonaires, orales et nasales sont fortement regroupées par conditions environnementales. Finalement, les communautés orales et nasales sont distinctes des communautés pulmonaires et possèdent une plus grande diversité et une plus grande richesse.

Comme mentionné en introduction, le poumon était par le passé un organe considéré stérile sauf en cas d'infection, jusqu'au développement récent d'outils suffisamment puissants pour détecter de faibles quantités d'ADN bactérien. Initialement exclu du *Human Microbiome Project* initié en 2008, le champ d'étude sur le microbiome pulmonaire a accumulé quelques années de retard par rapport aux études s'intéressant au microbiome gastro-intestinal ou urogénital par exemple. Cette étude apporte donc des informations sur la constitution du microbiome pulmonaire qui vont au-delà des différences entre les poumons asthmatiques et les poumons sains. Notamment, nous avons montré que l'environnement et l'inflammation neutrophilique qui y est associée affectent le microbiome pulmonaire même chez les sujets sains. Cette discussion générale abordera des points qui n'ont pas été approfondis dans l'article présenté au chapitre 2.

3.1 Les microbiomes sont influencés par l'environnement

Tel que discuté dans l'article, les communautés microbiennes des poumons, de la bouche et du nez sont influencées par l'environnement immédiat. Il est plutôt facile de comprendre que les microbiomes oral et nasal, en contact direct avec le microbiome et les antigènes

environnementaux, sont influencés par ce dernier. Il est toutefois plus difficile de concevoir que le microbiome pulmonaire, moins accessible, soit lui aussi modulé par les conditions environnementales. Depuis plusieurs années, il est accepté dans le domaine de l'asthme équin que les antigènes inhalés de l'environnement induisent une inflammation pulmonaire, d'où la difficulté dans cette étude à ségréger l'effet environnemental de l'effet inflammatoire. Il a été observé que la mise en pâture des chevaux asthmatiques permet de réduire la fréquence d'apparition des signes cliniques de la maladie ou bien même d'être évitée. Ceci me laisse croire que les cellules immunitaires phagocytaires recrutées lors d'une réaction inflammatoire pulmonaire interagiraient avec les cellules microbiennes contenues dans les poumons, d'où les changements dans les communautés microbiennes locales.

De manière intéressante, les chevaux sains sont davantage affectés par l'effet environnemental que les chevaux asthmatiques. Ceci suggère qu'un microbiome sain est équilibré entre les différentes espèces bactériennes qui le composent, mais aussi qu'il a la capacité de s'adapter lorsque les conditions locales fluctuent afin de récupérer et conserver son homéostasie (concept biologique représentant un état d'équilibre atteint grâce à un mécanisme de régulation). La nature tend à chercher cet état d'homéostasie, mais le microbiome bactérien pulmonaire des chevaux asthmatiques ne parvient peut-être pas à atteindre ce statut d'équilibre lorsque la quantité d'antigènes inhalés augmente et modifie, par le biais d'une réaction immunitaire, les conditions pulmonaires locales. Suivant ce raisonnement, les propriétaires de chevaux asthmatiques auraient intérêt à contrôler la qualité de l'environnement dans lequel leurs animaux sont hébergés et d'éviter l'exposition prolongée aux antigènes présents dans les écuries. Ceci permettrait de conserver un écosystème et un microbiome pulmonaires constants et d'éviter le développement des signes cliniques de la maladie.

3.2 Les microbiomes oral et nasal sont influencés par l'environnement, mais pas par le statut asthmatique

Nous avons démontré que les microbiomes oral et nasal sont variables selon le degré d'exposition antigénique, mais qu'ils ne sont pas influencés par le fait que les animaux sont atteints ou non d'asthme équin. En d'autres termes, les microbiomes oral et nasal sont variables,

mais ne sont pas différents entre les chevaux sains et asthmatiques. Nous avons précédemment émis l'hypothèse que les cellules immunitaires recrutées lors du processus inflammatoire chez les chevaux asthmatiques interagissent avec les cellules bactériennes et modifieraient le microbiome. Le processus inflammatoire étant vraisemblablement présent uniquement dans les poumons, les microbiomes oral et nasal ne seraient pas victimes de cette influence et conserveraient leur patron microbien. Ainsi pourrait-on expliquer la similitude des microbiomes oral et nasal, de même que la dissimilitude des microbiomes pulmonaires entre les chevaux sains et asthmatiques.

3.3 Composition du microbiome bactérien pulmonaire des chevaux

Les familles bactériennes retrouvées dans les LBAs ont été représentées en diagrammes de Venn (Figure 3.8) afin de mieux visualiser la distribution de ces dernières selon les groupes et les environnements dans lesquels on les retrouve. La famille bactérienne Neisseriaceae a été retrouvée dans toutes les conditions seulement chez les chevaux asthmatiques. Le genre *Neisseria*, commune chez l'humain, est responsable de pathologies telles la méningite et la gonorrhée (Mellin and Hill, 2010). Les familles Lachnospiraceae et Bacteroidaceae sont aussi uniquement présentes chez les chevaux asthmatiques. Les Lachnospiraceae, contenant entre autres le genre *Clostridium* sont retrouvées uniquement dans la condition antigénique élevée (foin de mauvaise qualité) et sont retrouvées en grande quantité dans le microbiome intestinal humain et équin (Salminen *et al.*, 1998; Cotta and Forster, 2006; Daly *et al.*, 2012). Elles sont aussi souvent associées au rumen des animaux s'alimentant de forages difficilement digestes (Thorley *et al.*, 1968). Les Bacteroidaceae pour leur part ont seulement été retrouvées alors que les chevaux asthmatiques consommaient du foin de première qualité (environnement antigénique modéré). Il n'est pas étonnant de retrouver ces bactéries strictement anaérobiques chez les chevaux puisque quelques-unes de ses espèces dégradent la cellulose (Lecointre and Le Guyader, 2006). Ceci n'expliquerait toutefois pas pourquoi nous les avons retrouvées que dans les poumons de chevaux asthmatiques alors qu'elles sont généralement associées à un microbiome pulmonaire en santé chez l'humain (Hilty *et al.*, 2010). Aucune association spécifique n'est décrite entre cette famille bactérienne et l'asthme dans la littérature.

Acidobacteria, une bactérie acidophile peu étudiée jusqu'alors, a été observée que chez les chevaux sains nourris avec du foin de mauvaise qualité (environnement antigénique élevé). Un pH de 3.0 à 6.0 favorise sa croissance (Thrash and Coates, 2011). Son absence chez les chevaux asthmatiques dans les mêmes conditions pourrait éventuellement être une piste à investiguer comme un potentiel facteur protecteur lors d'inflammation.

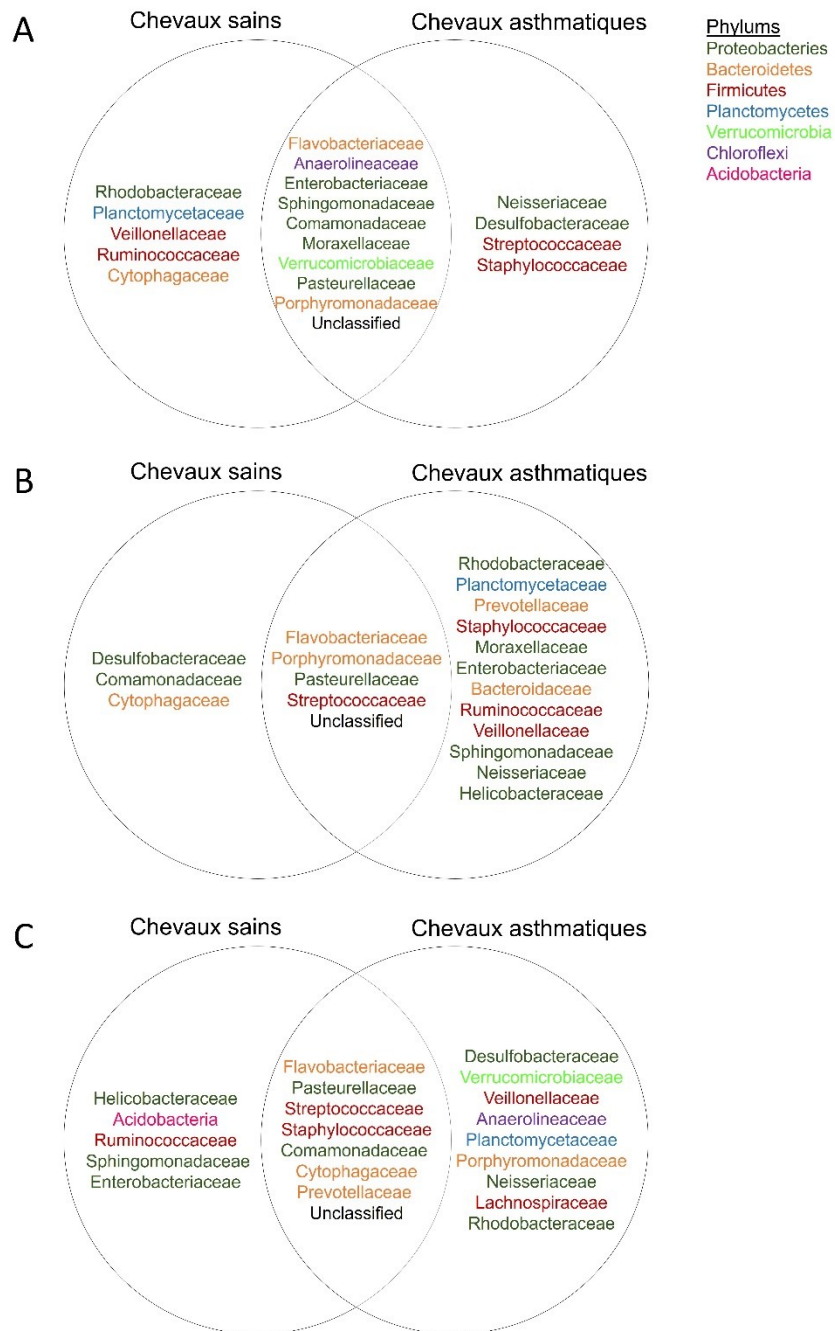


Figure 3.1. Diagrammes de Venn représentant la distribution des phylums et familles bactériennes retrouvées dans les lavages bronchoalvéolaires de chevaux sains et asthmatiques selon les conditions environnementales. A) Condition à faible exposition antigénique. B) Condition à exposition antigénique modérée. C) Condition à exposition antigénique élevée.

3.4 Variabilité intra et inter-chevaux des microbiomes bactériens pulmonaires

Notre étude a montré que le microbiome bactérien pulmonaire est variable selon les conditions environnementales et le statut asthmatique, mais il est aussi variable entre les individus. Assurément, si on regarde la figure 3.7 suivante, bien que la dissimilitude (ou variabilité) du microbiome pulmonaire d'un même individu entre les conditions environnementales prédomine (colonne de gauche), la variabilité des microbiomes des différents individus dans un même environnement (colonne centrale) ainsi que dans des environnements différents (colonne de droite) est aussi présente. Des indices de dissemblance de Bray-Curtis de 0.981 (colonne centrale) et 0.989 (colonne de droite) nous indiquent que dans les deux situations, les microbiomes bactériens pulmonaires sont bien différents. Lorsqu'on regarde la variabilité inter chevaux, les microbiomes pulmonaires sont plus semblables entre eux dans la situation où les chevaux se retrouvent dans les mêmes conditions environnementales plutôt que dans des environnements différents ($P < 0.01$).

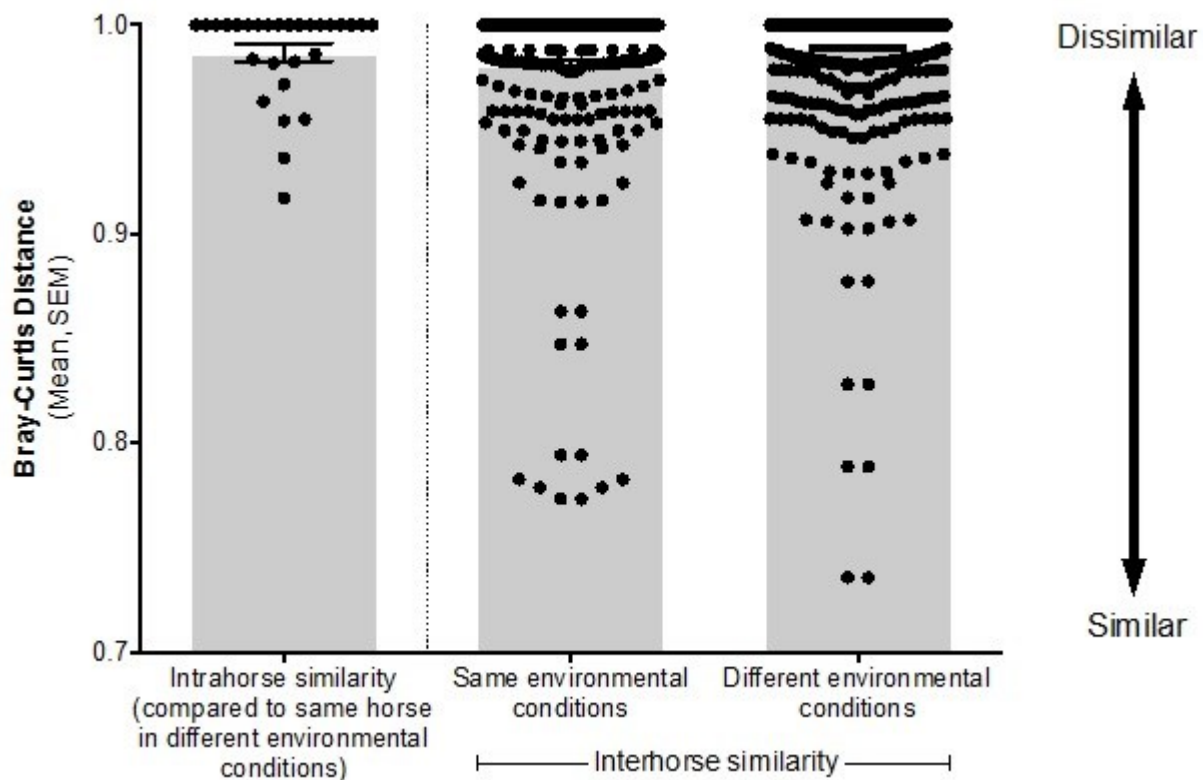


Figure 3.2. Indices de dissimilitude de Bray-Curtis. SEM: Standard Error of Mean. Des populations identiques afficheraient un indice de 0.

Ainsi, aucun microbiome pulmonaire ne semble avoir exactement la même empreinte bactériologique, ce qui semble d’ailleurs statistiquement improbable, quoiqu’un patron général semble se tracer. Effectivement, les chevaux sains tendent à arborer un microbiome bactérien composé principalement des Helicobacteraceae et des Flavobacteriaceae alors que les chevaux asthmatiques ont une tendance pour une surreprésentation des Pasteurellaceae et des Rhodobacteraceae.

3.5 La neutrophilie et la bronchoconstriction associées au microbiome bactérien pulmonaire

Les conditions environnementales de cette étude n'étaient pas choisies au hasard. En effet, nous savions que l'hébergement dans l'écurie provoquerait une inflammation des voies respiratoires chez les chevaux asthmatiques, détectable par une hausse de la quantité de neutrophiles dans les LBAs et que l'exposition à du foin poussiéreux accentuerait cet état d'inflammation (*révisé par* (Leclere *et al.*, 2011)). Nous avons donc documenté la neutrophilie de chacun des chevaux (sains et asthmatiques) dans tous les environnements et observé la réponse du microbiome à cette perturbation. La figure 3.11 représente des corrélations faites entre la quantité de neutrophiles dans les LBAs et certains taxa bactériens de la cavité buccale. De manière intéressante, les Bactéroidetes de la bouche sont hautement associées à une neutrophilie pulmonaire élevée alors que les Protéobactéries sont négativement corrélées avec la neutrophilie pulmonaire. Comme mentionné dans l'article joint à ce mémoire, les chevaux asthmatiques présentant une neutrophilie pulmonaire ont tendance à arborer plus de bactéries appartenant à la famille des Pasteurellaceae dans leur microbiome pulmonaire et il semblerait que cette tendance ne se maintienne pas au niveau buccal. Ces résultats ne concordent pas avec une étude précédente effectuée chez des humains atteints d'asthme. Effectivement, les Protéobactéries seraient associées à l'inflammation alors que les Bactéroidetes seraient associées à un microbiome sain (Hilty *et al.*, 2010). Toutefois, comme plusieurs études chez l'humain, les patients mentionnés dans cette étude étaient tous sous corticostéroïdes inhalés au moment des prélèvements, ce qui ne permet pas de dissocier l'effet «maladie» de l'effet induit sur le microbiome par la prise de cette médication.

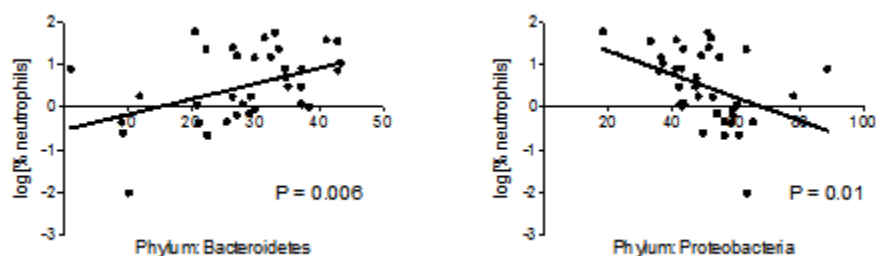


Figure 3.3. Corrélations entre la quantité de neutrophiles dans les lavages bronchoalvéolaires et les phylums Bacteroidetes et Proteobacteria retrouvés dans la bouche des chevaux.

Chez les chevaux asthmatiques, l'exposition antigénique entraîne à la fois une neutrophilie pulmonaire tel que discuté précédemment, mais aussi une bronchoconstriction. Il n'est donc pas surprenant qu'une association significative entre la composition des microbiomes et les mécaniques respiratoires ait été observée ($P = 0.03$). L'hétérogénéité de la ventilation pourrait être un facteur affectant la topographie du microbiome sachant que certaines bactéries retrouvées dans les poumons sont aérobies, alors que d'autres sont anaérobies. Ainsi, non seulement l'effet environnemental et la neutrophilie aurait une incidence sur le microbiome, mais aussi l'efficacité de la ventilation, aussi suggéré par (Dickson *et al.*, 2014). Notre étude ne permet pas de discriminer avec certitude les effets de l'inflammation et de la bronchoconstriction, mais le fait que la différence la plus importante ait été observée entre les microbiomes pulmonaires des chevaux asthmatiques présentant une inflammation pulmonaire et les chevaux sains sans inflammation laisse supposer que l'inflammation pourrait influencer de façon prédominante le microbiome dans l'asthme, du moins lors d'exacerbations de courtes durées.

3.6 Composition des microbiomes bactériens nasals et oraux des chevaux

Les familles bactériennes retrouvées dans les lavages nasals et oraux sont représentées dans les figures 3.9 et 3.10. Contrairement au microbiome pulmonaire, les microbiomes nasals

et oraux ne sont pas statistiquement différents entre les deux groupes de chevaux. Ceci se reflète par une majorité de familles bactériennes retrouvées dans la portion commune des diagrammes de Venn. Dans ces microbiomes, on retrouve une plus grande abondance de Pasteurellaceae, Staphylococcaceae, Moraxellaceae, Prevotellaceae, Sphingomonadaceae, Neisseriaceae et Cytophagaceae, ce qui correspond à ce qui est retrouvé chez l'humain.

Les microbiomes nasals et oraux sont aussi fortement associés à l'environnement ($P = 0.02$ et $P < 0.001$, respectivement), ce qui est, dans le cas de la bouche, en contradiction avec la littérature existante chez l'humain (Nasidze *et al.*, 2009; David *et al.*, 2014). En milieu peu antigénique et, seulement chez les chevaux sains, on retrouve les Planctomycetaceae, bactéries retrouvées dans l'eau, et Acidobacteria. Aussi, on retrouve uniquement Ruminococcaceae, une bactérie entérique chez l'humain et les animaux (Ballou *et al.*, 2016) chez les chevaux asthmatiques en milieu antigénique élevé. Ruminococcaceae est une bactérie strictement anaérobique qui fermente les glucides pour croître (Rainey, 2011). Il n'est pas étonnant de retrouver la famille Porphyromonadaceae dans la bouche. Il s'agit d'une famille bactérienne contenant l'espèce *Porphyromonas gingivalis* impliquée des pathologies parodontales (Zhou, 2006).

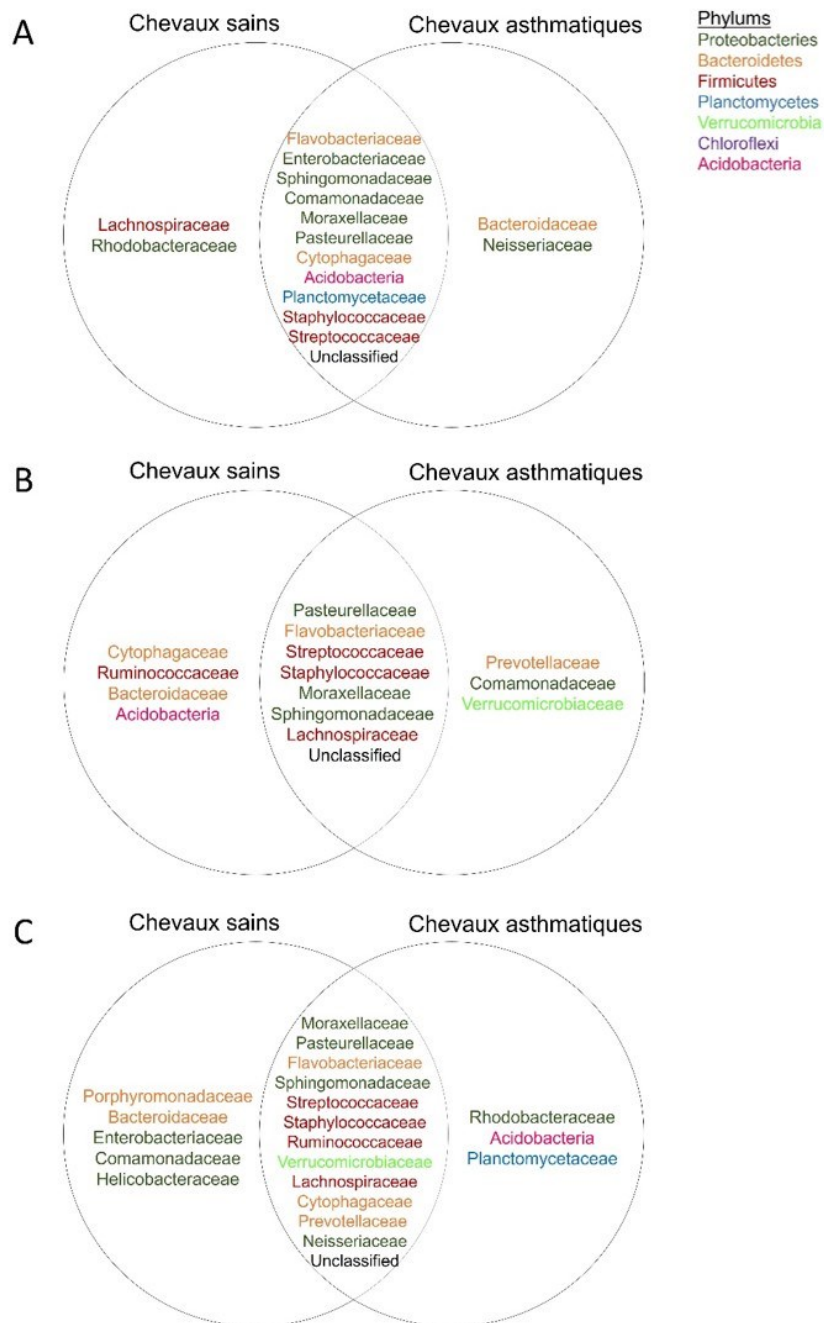


Figure 3.4. Diagrammes de Venn représentant la distribution des phylums et familles bactériennes retrouvées dans les lavages nasals de chevaux sains et asthmatiques selon les conditions environnementales. A) Condition à faible exposition antigénique. B) Condition à exposition antigénique modérée. C) Condition à exposition antigénique élevée.

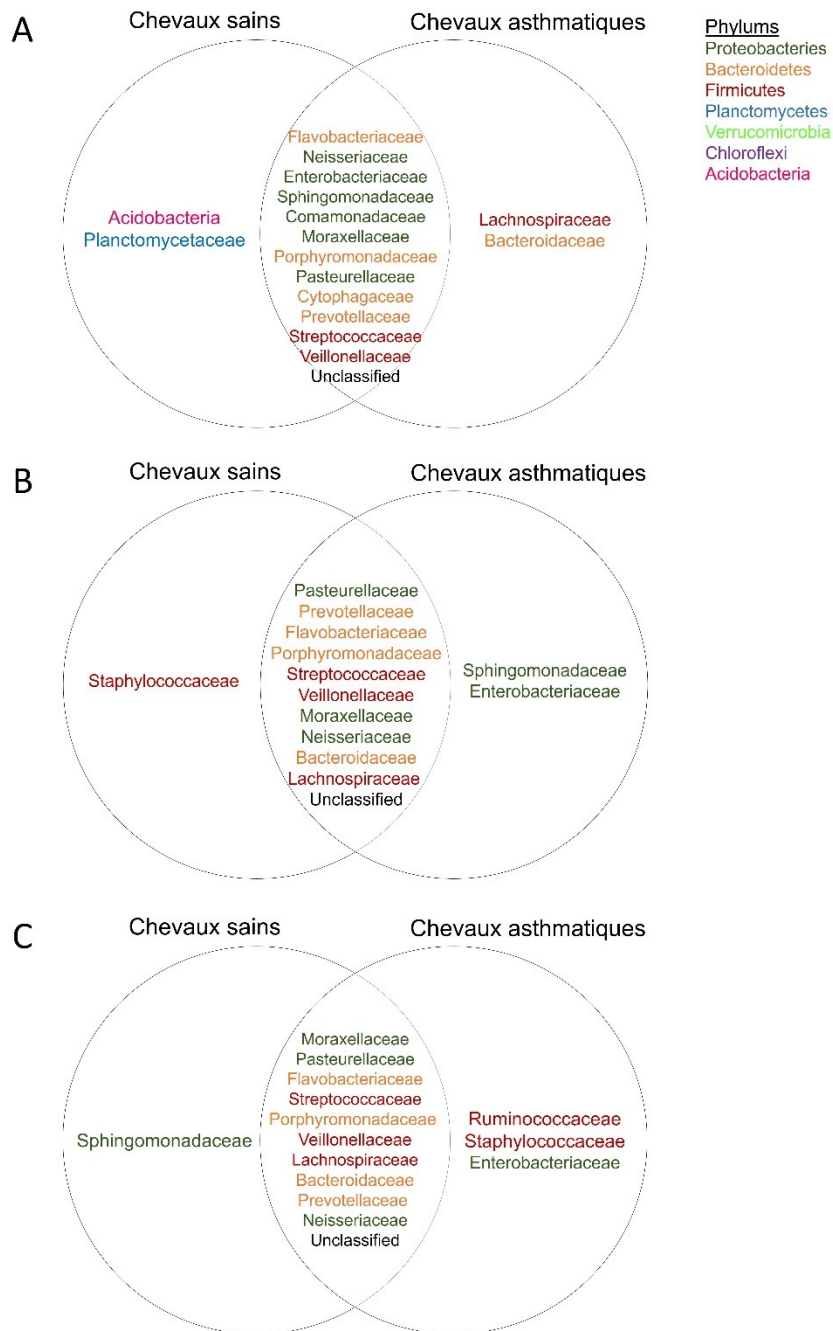


Figure 3.5. Diagrammes de Venn représentant la distribution des phylums et familles bactériennes retrouvées dans les lavages oraux de chevaux sains et asthmatiques selon les conditions environnementales. A) Condition à faible exposition antigénique. B) Condition à exposition antigénique modérée. C) Condition à exposition antigénique élevée.

3.7 Défis et possibles biais : contamination des échantillons biologiques

Le microbiome de faible biomasse est hautement vulnérable à la moindre contamination lors des prélèvements et du traitement des échantillons. Ceci est amplifié par le fait que le séquençage ne nécessite pas la présence de bactéries entières et viables pour détecter un signal. L'amplification de fragments d'ADN bactérien peut donc facilement induire des signaux d'arrière-plan indésirables (*background*), et ce, d'autant plus lorsque la quantité de bactéries dans un milieu est faible. C'est pourquoi nous avons développé une technique de prélèvement des LBAs qui limite la contamination par les VRS et stérilisé tout le matériel utilisé entre chaque prélèvement. La contamination par l'ADN bactérien présent dans l'air et même les réactifs de laboratoire est toutefois inévitable. Par conséquent, chaque prélèvement biologique (lavages oraux, nasals et pulmonaires) était accompagné de prélèvements contrôles de ces réactifs (Figure 3.1).

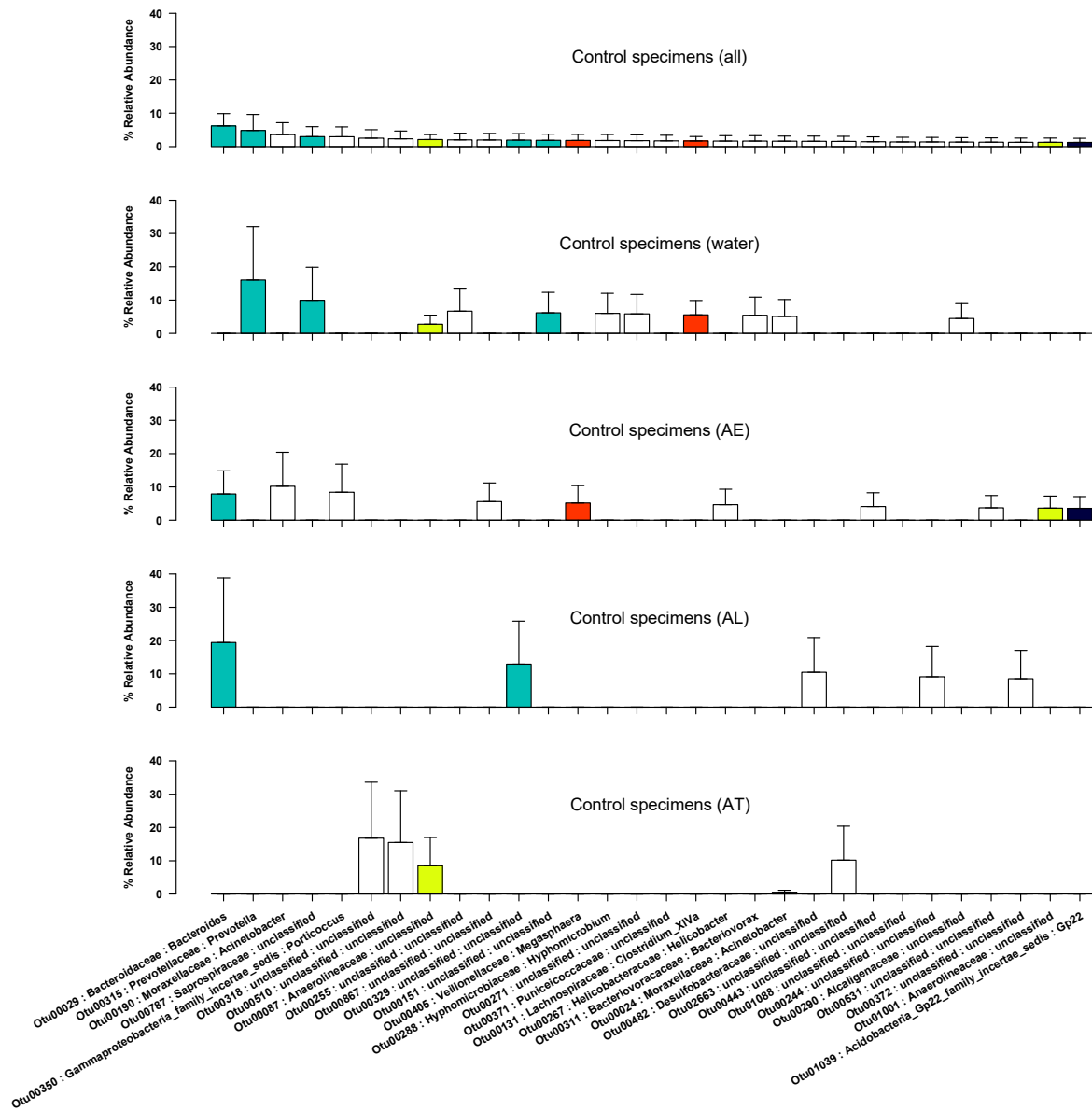


Figure 3.6. Comparaison des 30 unités taxonomiques opérationnelles les plus abondantes dans les réactifs utilisés pour l'extraction d'acide désoxyribonucléique. Water : Eau commerciale stérilisée utilisée au laboratoire; AE: Réactif pour l'élution finale; AL: Réactif pour la lyse cellulaire; AT: Réactif pour la lyse des tissus et la purification des acides nucléiques.

Visiblement, les réactifs et l'eau utilisés en laboratoire contiennent de l'ADN bactérien. Néanmoins, lorsque nous comparons les OTUs retrouvées dans les réactifs et dans les prélèvements d'air de l'écurie et du laboratoire avec celles retrouvées dans nos prélèvements (Figure 3.2), on s'aperçoit qu'ils sont différents des LBAs ($P < 0.001$), des échantillons buccaux ($P < 0.001$) ainsi que des échantillons nasals ($P < 0.001$). Il n'y a toutefois pas de différence entre les réactifs et les prélèvements d'endoscope pré-LBA ($P = 0.685$). De plus, les prélèvements de l'endoscope ne sont pas différents entre les différentes conditions environnementales ($P = 0.58$). Ceci montre qu'une portion de l'ADN séquencé dans nos échantillons biologiques provient des réactifs, mais que les populations sont suffisamment différentes pour ne pas être la source principale des différences observées.

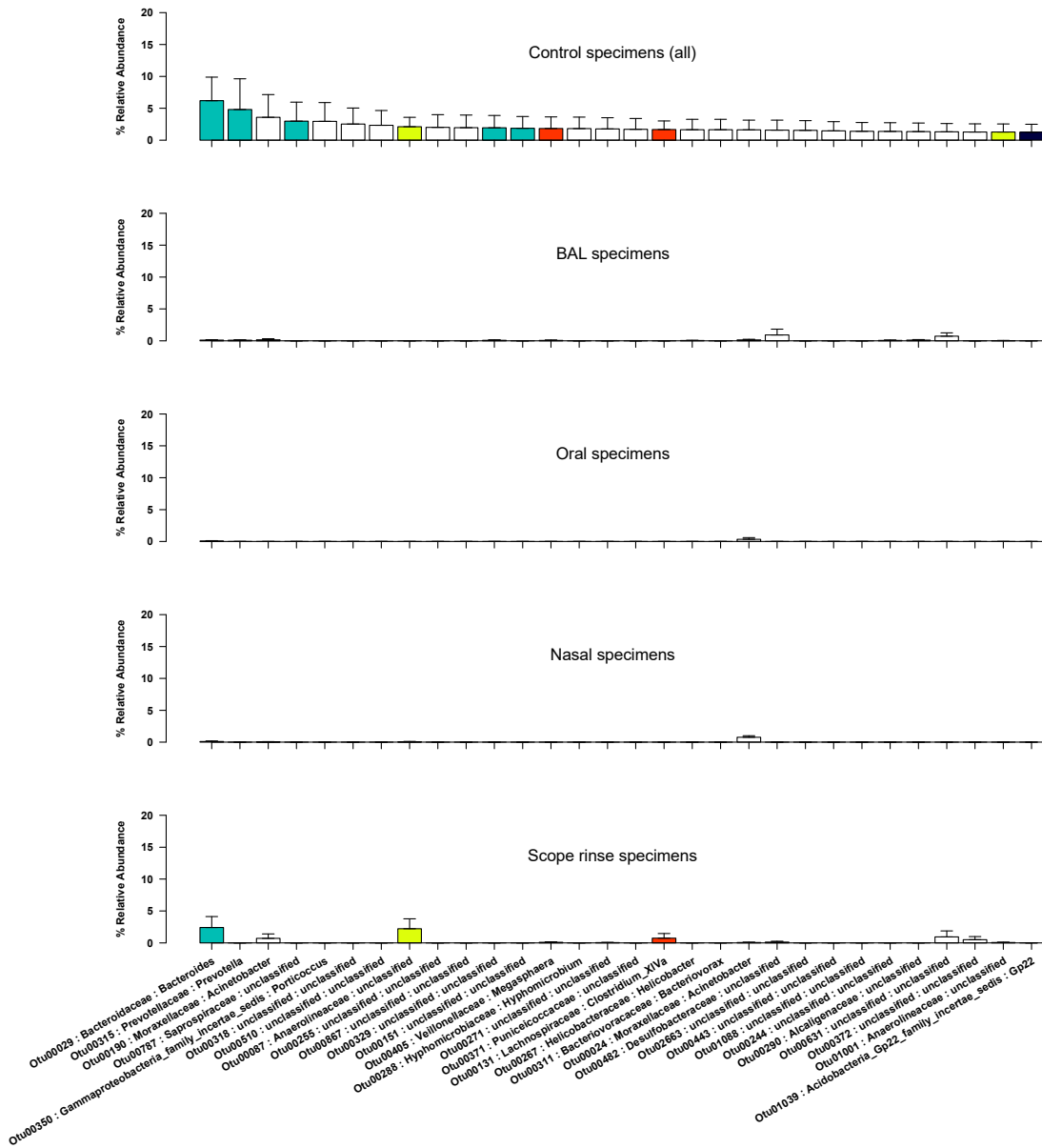


Figure 3.7. Comparaison des 30 unités taxonomiques opérationnelles les plus abondantes dans les réactifs utilisés pour l'extraction d'ADN et des prélèvements biologiques et endoscopiques.

Afin d'échantillonner le microbiome de faible biomasse des poumons par une technique de LBA, il nous faut passer l'endoscope au travers des VRS, qui ont un microbiome bactérien beaucoup plus important. Il a donc fallu développer une technique d'évitement du contact de

l'endoscope avec ces VRS à l'aide d'une gaine protectrice désinfectée entre chaque usage qui permet de protéger l'endoscope et de ne le sortir de sa gaine qu'une fois arrivé au tiers supérieur de la trachée. Pour s'assurer que nous séquençons bien le microbiome pulmonaire et non une dilution de ce que l'on retrouve dans l'endoscope, des lavages d'endoscopes sont effectués avant chaque prélèvement et sont comparés aux échantillons de LBA (Figure 3.3).

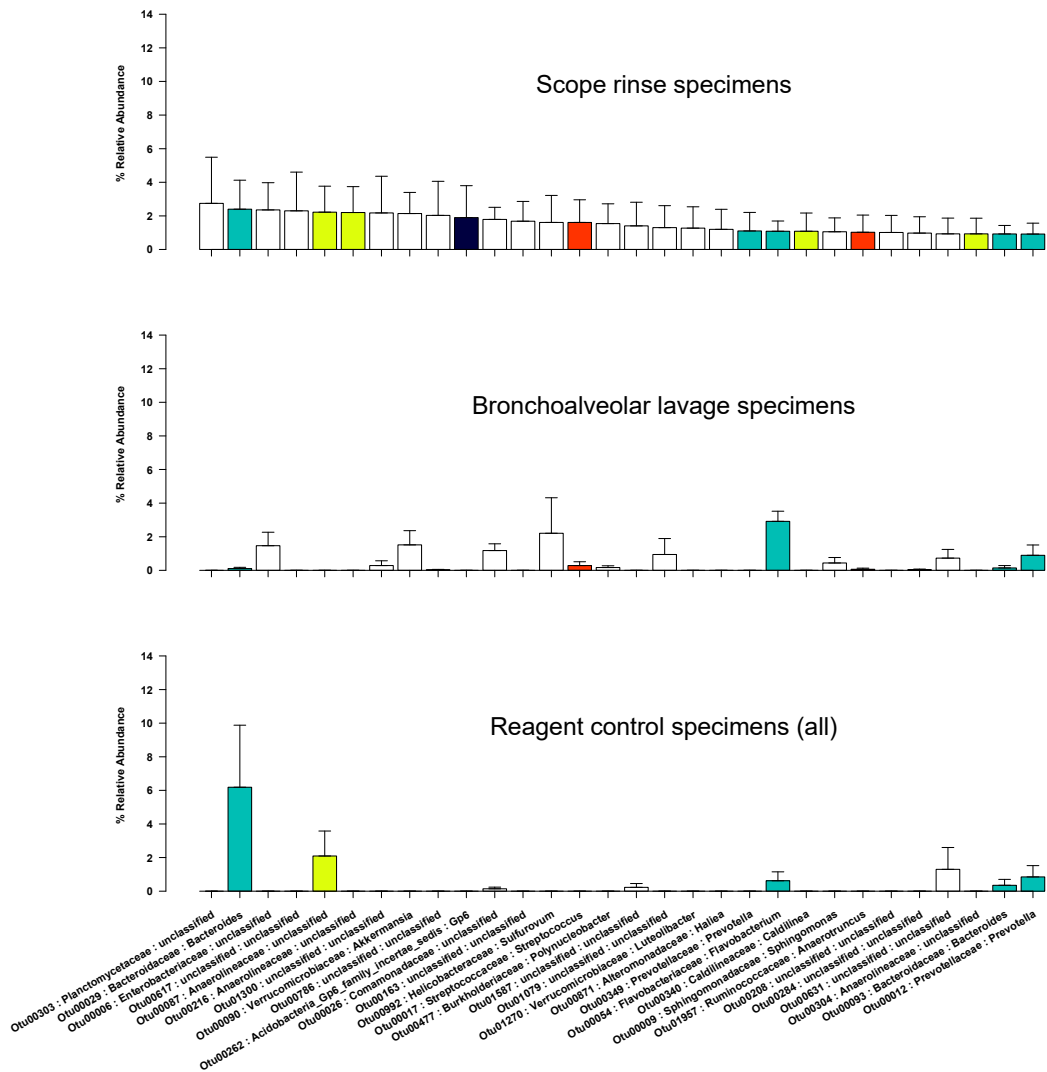


Figure 3.8. Comparaison des 30 unités taxonomiques opérationnelles les plus abondantes dans les prélèvements endoscopiques, des lavages bronchoalvéolaires et des réactifs utilisés pour l'extraction d'ADN.

On retrouve, tel qu'attendu, une certaine contamination du canal de l'endoscope qui n'est pas alarmant puisque statistiquement, ces prélèvements sont différents de ceux des lavages bronchoalvéolaires ($P < 0.007$), alors qu'ils ne sont pas différents des prélèvements des réactifs ($P = 0.685$). Ainsi, l'ADN bactérien résiduel suite au processus de lavage et de désinfection ne semble pas induire un signal important dans nos prélèvements biologiques.

Un autre défi des analyses de faible biomasse est de comparer des populations en se basant sur une faible quantité de séquence. Dans notre étude, 5 échantillons ont dû être exclus des analyses, car ils contenaient moins de 500 séquences d'ARN ribosomal 16S (Tableau III). Une quantité aussi faible de séquence limite l'interprétation biologique de la composition des populations étudiées. La figure 3.4 montre les quantités d'ARN ribosomal 16S séquencées dans chaque échantillon.

Tableau III : Échantillons retirés de l'étude. LBA : Lavage bronchoalvéolaire.

Échantillons	Nombre de séquences
Endoscope, jument saine #332, condition antigénique modérée	80.35
LBA, jument saine #684, condition antigénique modérée	165.3
LBA, jument saine #117, condition antigénique modérée	165.9
LBA, jument asthmatique #407, condition antigénique élevée	407.2
LBA, jument asthmatique #417, condition antigénique élevée	475.9

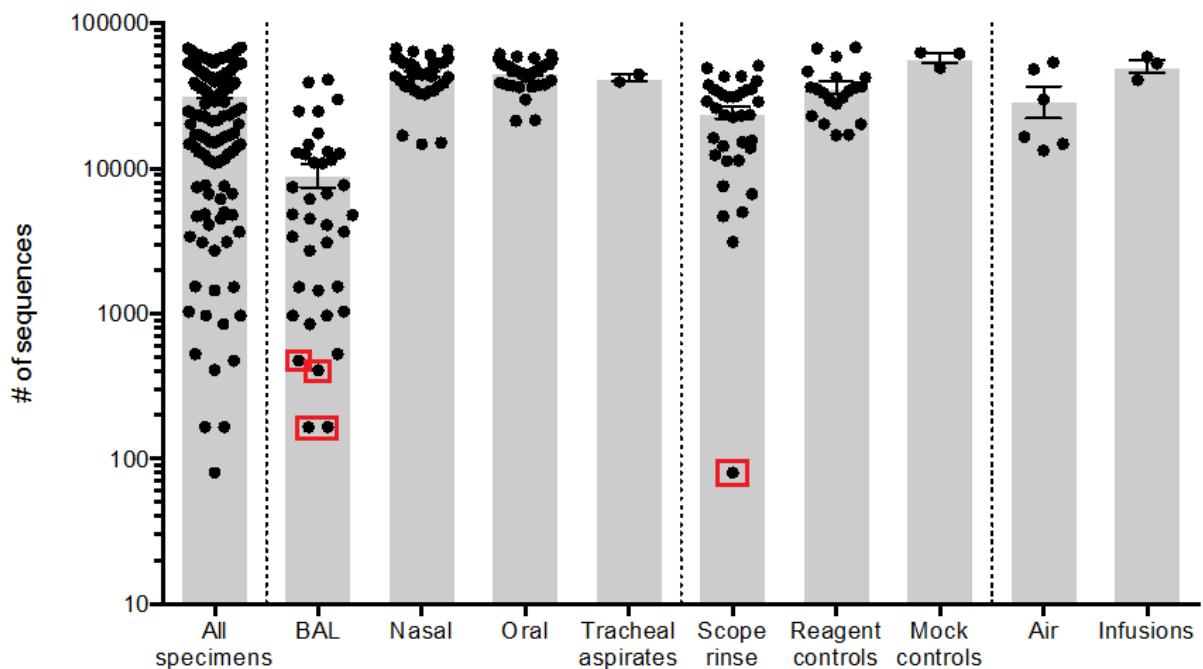


Figure 3.9. Nombre de séquences pour chacun des échantillons. En rouge, les échantillons retirés de l'étude et cités dans le tableau III ci-haut. # : Nombre de séquences.

Puisque ce document témoigne de l'effet environnemental sur les microbiomes pulmonaires, nasals et oraux, nous nous devons d'effectuer des prélèvements environnementaux tels l'air et le foin consommé (Figure 3.5 et 3.6). L'air de l'écurie et du laboratoire a été échantillonné de façon systématique avec une pompe munie d'un filtre lors de chaque manipulation, alors que le foin a été échantillonné de façon sporadique.

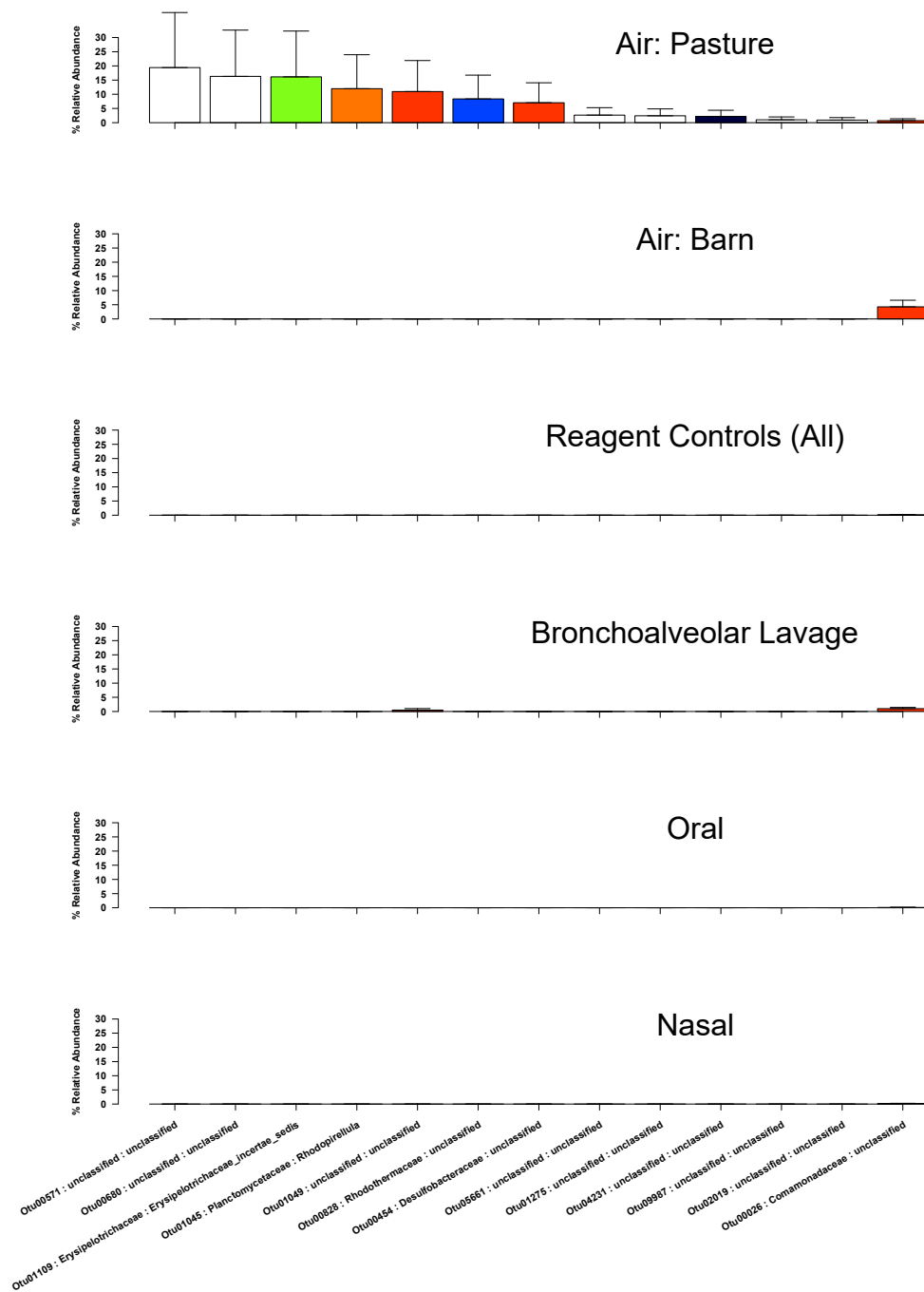


Figure 3.10. Comparaison des 13 unités taxonomiques opérationnelles les plus abondantes dans l'air, les réactifs utilisés pour l'extraction d'ADN et les prélèvements biologiques.

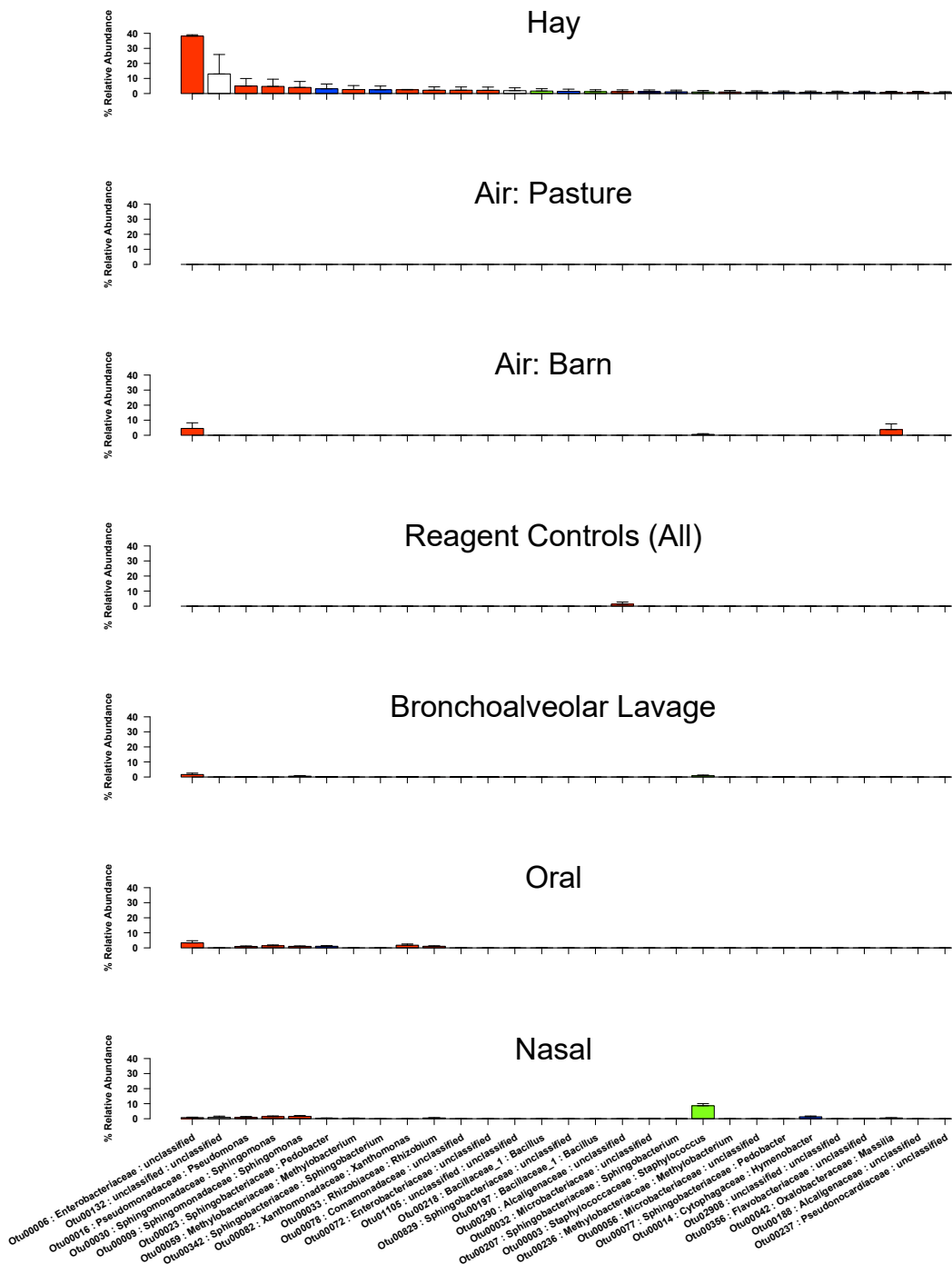


Figure 3.11. Comparaison des 29 unités taxonomiques opérationnelles les plus abondantes dans le foin, l'air, les réactifs utilisés pour l'extraction d'ADN et les prélèvements biologiques.

Lorsqu'on regarde les OTUs les plus abondamment retrouvées dans l'air et le foin, on constate qu'ils ne correspondent pas aux OTUs observées dans les prélèvements biologiques, même pas ceux du nez ou de la bouche. Seul l'OTU 00006 correspondant à un Enterobacteriaceae se retrouve à la fois dans l'air, le foin, les LBAs et les prélèvements buccaux. Ceci supporte la présence de populations bactériennes résidentes dans le nez et la bouche.

Afin d'identifier les microorganismes d'un microbiome, nous devons comparer nos séquences d'ADN avec des séquences d'ADN contenues dans des bases de données publiques. Il arrive parfois qu'aucune séquence connue ne corresponde et dans ce cas, la séquence est enregistrée et nommée inconnue. De cette manière, les bases de données se bâtissent et ne cessent d'accumuler de nouvelles informations. Les études sur le microbiome étant plus largement répandues chez l'humain impliquent que les microorganismes liés à l'humain sont mieux documentés et composent la majorité des bases de données. Pour cette raison, il est possible que nous n'ayons pas pu identifier certaines bactéries plus spécifiques à l'espèce équine étudiée. Aussi, ces séquences non identifiées ont été regroupées dans les analyses statistiques, alors qu'il est fort probable qu'elles ne représentent pas toutes le même taxon bactérien. Puisque ces séquences inconnues sont largement présentes dans tous les échantillons, ce biais pourrait avoir influencé nos données de manière à réduire l'importance des différences entre les microbiomes.

En résumé, l'analyse du microbiome pulmonaire apporte des défis propres aux microbiomes de faible biomasse, mais les résultats présentés et les différences obtenues entre les populations bactériennes pulmonaires des chevaux sains et asthmatiques semblent réelles et non pas dues à un biais de contamination.

Chapitre 4 : Conclusion et perspectives

En somme, le microbiome pulmonaire des chevaux est variable selon les conditions environnementales et selon les individus. À notre connaissance, cette étude est la première à décrire le microbiome bactérien pulmonaire, oral et nasal de chevaux vivants à l'aide d'une technique de séquençage massif, indépendante de la culture cellulaire traditionnelle. Nous avons décrit une variation de ces trois microbiomes avec l'environnement, et ce, tant chez les chevaux sains que chez les chevaux asthmatiques, mais c'est seulement au niveau pulmonaire que les microbiomes bactériens diffèrent entre les deux groupes de chevaux. Nous avons aussi montré une ségrégation des microbiomes oral, nasal et pulmonaire chez les chevaux. Puisque le niveau d'exposition antigénique entraîne une neutrophilie et un bronchospasme chez les chevaux asthmatiques, la contribution de ces deux aspects de la maladie est difficile à départager. Une prochaine étape pour ce projet serait d'induire localement l'inflammation pulmonaire en la dissociant du bronchospasme, par exemple en étudiant le microbiome pulmonaire chez des chevaux sains et asthmatiques recevant des bronchodilatateurs. Une autre avenue serait d'investiguer l'effet potentiellement protecteur de certaines bactéries, comme *Acidobacteria*, retrouvées uniquement chez les chevaux sains sous exposition antigénique. Ceci pourrait ouvrir la porte à une approche utilisant des probiotiques ou prébiotiques afin de limiter les altérations du microbiome pulmonaire dans les différentes phases de la maladie asthmatique.

Bibliographie

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Mowszowicz I, Raff MC. 2011. Biologie moléculaire de la cellule, 5 ed: Médecine Sciences Publications.
- Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov, II, Umesaki Y, Itoh K, Honda K. 2011. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 331:337-341.
- Bailey MT, Dowd SE, Galley JD, Hufnagle AR, Allen RG, Lyte M. 2011. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain, behavior, and immunity* 25:397-407.
- Ballou AL, Ali RA, Mendoza MA, Ellis JC, Hassan HM, Croom WJ, Koci MD. 2016. Development of the Chick Microbiome: How Early Exposure Influences Future Microbial Diversity. *Frontiers in veterinary science* 3:2.
- Bartlett JG, Alexander J, Mayhew J, Sullivansigler N, Gorbach SL. 1976. Should Fiberoptic Bronchoscopy Aspirates Be Cultured. *Am Rev Respir Dis* 114:73-78.
- Bartlett JM, Stirling D. 2003. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol* 226:3-6.
- Bassis CM, Tang AL, Young VB, Pynnonen MA. 2014. The nasal cavity microbiota of healthy adults. *Microbiome* 2:27.
- Bengmark S. 1998. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* 42:2-7.
- Biswas K, Hoggard M, Jain R, Taylor MW, Douglas RG. 2015. The nasal microbiota in health and disease: variation within and between subjects. *Frontiers in microbiology* 9:134.
- Blasi F, Johnston SL. 2007. The role of antibiotics in asthma. *Int J Antimicrob Ag* 29:485-493.
- Brashier B, Salvi S. 2015. Measuring lung function using sound waves: role of the forced oscillation technique and impulse oscillometry system. *Breathe* 11:57-65.
- Bullone M, Chevigny M, Allano M, Martin JG, Lavoie JP. 2014. Technical and physiological determinants of airway smooth muscle mass in endobronchial biopsy samples of asthmatic horses. *J Appl Physiol* 117:806-815.
- Bullone M, Lavoie JP. 2015. Asthma "of horses and men"--how can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences? *Mol Immunol* 66:97-105.
- Cahenzli J, Koller Y, Wyss M, Geuking MB, McCoy KD. 2013. Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels. *Cell host & microbe* 14:559-570.
- Cotta M, Forster R. 2006. The Family Lachnospiraceae, Including the Genera *Butyrivibrio*, *Lachnospira* and *Roseburia*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, editors. *Prokaryotes*, 3rd ed. New York: Springer US. p 1002-1021.
- Couetil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Leguillette R, Richard EA. 2016. Inflammatory Airway Disease of Horses--Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med* 30:503-515.
- Couëtill LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Léguillette R, Richard EA. 2016. Inflammatory Airway Disease of Horses. -Revised Consensus Statement *Journal of Veterinary Internal*

- Medicine Volume 30, Issue 2. *J Vet Intern Med* 30:503-515.
- Daly K, Proudman CJ, Duncan SH, Flint HJ, Dyer J, Shirazi-Beechey SP. 2012. Alterations in microbiota and fermentation products in equine large intestine in response to dietary variation and intestinal disease. *Br J Nut* 107:989-995.
- David LA, Materna AC, Friedman J, Campos-Baptista MI, Blackburn MC, Perrotta A, Erdman SE, Alm EJ. 2014. Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biol* 15:R89.
- Derksen FJ, Robinson NE. 1980. Esophageal and intrapleural pressures in the healthy conscious pony. *Am J Vet Res* 41:1756-1761.
- Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. 2007. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* 449:811-818.
- Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. 2010. The human oral microbiome. *J Bacteriol* 192:5002-5017.
- Diaz O, Villafranca C, Ghezzi H, Borzone G, Leiva A, Milic-Emil J, Lisboa C. 2000. Role of inspiratory capacity on exercise tolerance in COPD patients with and without tidal expiratory flow limitation at rest. *Eur Respir J* 16:269-275.
- Dickson RP, Martinez FJ, Huffnagle GB. 2014. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *Lancet* 384:691-702.
- Ege MJ, Mayer M, Normand AC, Genuneit J, Cookson WO, Braun-Fahrlander C, Heederik D, Piarroux R, von Mutius E, Group GTS. 2011. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *New Engl J Med* 364:701-709.
- Erturk-Hasdemir D, Kasper DL. 2013. Resident commensals shaping immunity. *Curr Opin Immunol* 25:450-455.
- Frank DN, Feazel LM, Bessesen MT, Price CS, Janoff EN, Pace NR. 2010. The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. *PloS one* 5:e10598.
- Garcia G, Perez T, Mahut B. 2009. Épreuves fonctionnelles respiratoires et évaluation des voies aériennes distales dans l'asthme. *Rev Mal Respir* 26:395-406.
- Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312:1355-1359.
- Gloor GB, Hummelen R, Macklaim JM, Dickson RJ, Fernandes AD, MacPhee R, Reid G. 2010. Microbiome profiling by illumina sequencing of combinatorial sequence-tagged PCR products. *PloS one* 5:e15406.
- Goldman MD, Saadeh C, Ross D. 2005. Clinical applications of forced oscillation to assess peripheral airway function. *Resp Physiol Neurobi* 148:179-194.
- Gollwitzer ES, Saglani S, Trompette A, Yadava K, Sherburn R, McCoy KD, Nicod LP, Lloyd CM, Marsland BJ. 2014. Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nat Med* 20:642-647.
- Grimby G, Takishima T, Graham W, Macklem P, Mead J. 1968. Frequency dependence of flow resistance in patients with obstructive lung disease. *J Clin Invest* 47:1455-1465.
- Haas H, Morris JF, Samson S, Kilbourn JP, Kim PJ. 1977. Bacterial-Flora of Respiratory-Tract in Chronic-Bronchitis - Comparison of Transtracheal, Fiber-Bronchoscopic, and Oropharyngeal Sampling Methods. *American Rev Respir Dis* 116:41-47.
- Hahn DL, Dodge RW, Golubjatnikov R. 1991. Association of *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma. *J Amer Med Assoc* 266:225-230.

- Halliwell RE, McGorum BC, Irving P, Dixon PM. 1993. Local and systemic antibody production in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. *Vet Immunol Immunop* 38:201-215.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 22:160-174.
- Herbst T, Sichelstiel A, Schar C, Yadava K, Burki K, Cahenzli J, McCoy K, Marsland BJ, Harris NL. 2011. Dysregulation of allergic airway inflammation in the absence of microbial colonization. *Am J Resp Crit Care* 184:198-205.
- Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, Davies J, Ervine A, Poulter L, Pachter L, Moffatt MF, Cookson WO. 2010. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PloS one* 5:e8578.
- Hirsch G, Staempfli HR, Costa MC, Arroyo LG, Weese JS. 2015. Characterization of the respiratory tract microbiota of healthy horses. In: University of Guelph, Guelph, ON, Canada, Universidade Estadual de Londrina, PR, Brazil.
- Hoffman AM, Viel L, Muckle CA, Tesarowski DB. 1991. Evaluation of a guarded bronchoscopic method for microbial sampling of the lower airways in foals. *Can J Vet Res* 55:325-331.
- Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Pare PD. 2004. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *New Engl J Med* 350:2645-2653.
- Hotchkiss JW, Reid SWJ, Christley RM. 2007. A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 1 Horse demographic characteristics and management, *Equine Vet J* Volume 39, Issue 4. *Equine Vet J* 39:294-300.
- Huang YJ, Nelson CE, Brodie EL, Desantis TZ, Baek MS, Liu J, Woyke T, Allgaier M, Bristow J, Wiener-Kronish JP, Sutherland ER, King TS, Icitovic N, Martin RJ, Calhoun WJ, Castro M, Denlinger LC, Dimango E, Kraft M, Peters SP, Wasserman SI, Wechsler ME, Boushey HA, Lynch SV, National Heart L, Blood Institute's Asthma Clinical Research N. 2011. Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. *J Allergy Clin Immun* 127:372-381.
- Human Microbiome Project C. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486:207-214.
- International Human Genome Sequencing C. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431:931-945.
- Jackson CA, Berney C, Jefcoat AM, Robinson NE. 2000. Environment and prednisone interactions in the treatment of recurrent airway obstruction (heaves). *Equine Vet J* 32:432-438.
- Kanda S, Fujimoto K, Komatsu Y, Yasuo M, Hanaoka M, Kubo K. 2010. Evaluation of respiratory impedance in asthma and COPD by an impulse oscillation system. *Internal Med* 49:23-30.
- Kiener LA. 1891. *La bactériologie au XVIIIe siècle et aujourd'hui*. Montpellier, France: Boehm.
- Klein C, Reinhold P. 2001. Analysis of respiratory mechanics by impulse oscillometry in non-sedated and diazepam-sedated swine. *Res Vet Sci* 70:181-189.
- Klein C, Smith HJ, Reinhold P. 2006. The use of impulse oscillometry for separate analysis of inspiratory and expiratory impedance parameters in horses: Effects of sedation with xylazine. *Res Vet Sci* 80:201-208.

- Knecht JC, Schiffman G, Austrian R. 1970. Some biological properties of Pneumococcus type 37 and the chemistry of its capsular polysaccharide. *J Exp Med* 132:475-487.
- Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *P Natl Acad Sci USA* 108 4578-4585.
- Krinos CM, Coyne MJ, Weinacht KG, Tzianabos AO, Kasper DL, Comstock LE. 2001. Extensive surface diversity of a commensal microorganism by multiple DNA inversions. *Nature* 414:555-558.
- Lanctot Setlakwe E. 2011. Subepithelial collagen content in the peripheral airways of heaves-affected and control horses. In: *Sciences cliniques*. Saint-Hyacinthe: Université de Montréal. p 69.
- Lavoie J-P, Hinchcliff KW, Brown CM. 2008. *Blackwell's five-minute veterinary consult : equine*, 2nd ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP. 2011. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology* 16:1027-1046.
- Lecointre G, Le Guyader H. 2006. Eubacteria. In: Lecointre G, Le Guyader H, editors. *The Tree of Life, A Phylogenetic Classification*. USA: Harvard University Press
- Lederberg J, McCray AT. 2001. 'Ome sweet 'omics - A genealogical treasury of words. *Scientist* 15:8-8.
- Lievin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. 2000. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 47:646-652.
- Linnane BM, Hall GL, Nolan G, Brennan S, Stick SM, Sly PD, Robertson CF, Robinson PJ, Franklin PJ, Turner SW, Ranganathan SC, Arest CF. 2008. Lung function in infants with cystic fibrosis diagnosed by newborn screening. *Am J Resp Crit Care* 178:1238-1244.
- Lowell FC. 1964. Observations on heaves. An asthma-like syndrome in the horse. *Allergy proc* 11:147-150.
- Magno M. 1990. Comparative anatomy of the tracheobronchial circulation. *Eur Respir J* 12:557-563.
- Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. 2005. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 122:107-118.
- Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. 2008. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 453:620-625.
- McDonough JE, Yuan R, Suzuki M, Seyednejad N, Elliott WM, Sanchez PG, Wright AC, Geffer WB, Litzky L, Coxson HO, Pare PD, Sin DD, Pierce RA, Woods JC, McWilliams AM, Mayo JR, Lam SC, Cooper JD, Hogg JC. 2011. Small-airway obstruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease. *New Engl J Med* 365:1567-1575.
- McGorum BC, Dixon PM, Halliwell REW, Irving P. 1993. Comparison of cellular and molecular components of bronchoalveolar lavage fluid harvested from different segments of the equine lung. *Res vet Sci* 55:57-59.
- McLaughlin RF, Tyler WS, Canada RO. 1961. A study of the subgross pulmonary anatomy in various mammals *American Journal of Anatomy* Volume 108, Issue 2. *Am J Anat* 108:149-165.
- Mellin JR, Hill S. 2010. Gene Expression Strategies of the Pathogenic Neisseria. In: Genco CA, Wetzler L, editors. *Neisseria, Molecular Mechanisms of Pathogenesis*. Boston, MA USA: Caister Academic Press.

- Meyer M, Kircher M. 2010. Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harbor protocols* 2010:1-10.
- Minshall EM, Hogg JC, Hamid QA. 1998. Cytokine mRNA expression in asthma is not restricted to the large airways. *J Allergy Clin Immunol* 101:386-390.
- Mitzner W. 2011. Emphysema-a disease of small airways or lung parenchyma? *New Engl J Med* 365:1637-1639.
- Moore WEC, Moore LH. 1995. Intestinal Floras of Populations That Have a High-Risk of Colon-Cancer. *Appl Environ Microb* 61:3202-3207.
- Murray PR, Rosenblatt JE. 1976. Bacterial interference by oropharyngeal and clinical isolates of anaerobic bacteria. *J Infect Dis* 134:281-285.
- Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. 2009. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res* 19:636-643.
- Nieto A, Pamies R, Oliver F, Medina A, Caballero L, Mazon A. 2006. Montelukast improves pulmonary function measured by impulse oscillometry in children with asthma (Mio study). *Resp Med* 100:1180-1185.
- Pebret F. 2003. Maladies infectieuses: toutes les pathologies des programmes officiels des études médicales ou paramédicales: Heures de France.
- Peterson PK, Verhoef J, Sabath LD, Quie PG. 1977. Effect of protein A on staphylococcal opsonization. *Infect Immun* 15:760-764.
- Prescott LM, Sherwood LM, Woolverton CJ, Dusart J. 2010. *Microbiologie: De Boeck Supérieur*.
- Price PA, Williamson MK, Lothringer JW. 1981. Origin of the vitamin K-dependent bone protein found in plasma and its clearance by kidney and bone. *J Biol Chem* 256:12760-12766.
- Quail MA, Kozarewa I, Smith F, Scally A, Stephens PJ, Durbin R, Swerdlow H, Turner DJ. 2008. A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system. *Nat Methods* 5:1005-1010.
- Rainey FA. 2011. Family VIII. Ruminococcaceae fam. nov. In: Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman W, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. New York: Springer. p 1016-1037.
- Reinhold P, Macleod D, Lekeux P. 1996. Comparative evaluation of impulse oscillometry and a monofrequency forced oscillation technique in clinically healthy calves undergoing bronchochallenges. *Res Vet Sci* 61:206-213.
- Reinhold P, Smith HJ, Langenberg A, Lekeux P. 1998. Measurement of respiratory impedance in healthy calves using the impulse oscillation technique--physiological and methodological aspects. *Vet J* 155:27-38.
- Reis-Filho JS. 2009. Next-generation sequencing. *Breast cancer research : BCR* 11 1-7.
- Reynolds HY. 1987. Bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 135:250-263.
- Robinson NE. 2001. International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. *Equine Vet J* 33:5-19.
- Robinson NE, Derksen FJ, Berney C, Goossens L. 1993. The airway response of horses with recurrent airway obstruction (heaves) to aerosol administration of ipratropium bromide. *Equine Vet J* 25:299-303.
- Rook G. 2009. *The Hygiene Hypothesis and Darwinian Medicine*: Birkhäuser Basel.

- Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Brit J Nutr* 80 147-171.
- Sanchez A, Couetil LL, Ward MP, Clark SP. 2005. Effect of airway disease on blood gas exchange in racehorses. *J Vet Intern Med* 19:87-92.
- Schloss PD, Westcott SL. 2011. Assessing and Improving Methods Used in Operational Taxonomic Unit-Based Approaches for 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *Appl Environ Microb* 77:3219-3226.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microb* 75:7537-7541.
- Schuster SC. 2008. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods* 5:16-18.
- Segal LN, Alekseyenko AV, Clemente JC, Kulkarni R, Wu B, Gao Z, Chen H, Berger KI, Goldring RM, Rom WN, Blaser MJ, Weiden MD. 2013. Enrichment of lung microbiome with supraglottic taxa is associated with increased pulmonary inflammation. *Microbiome* 1:19.
- Segal LN, Rom WN, Weiden MD. 2014. Lung microbiome for clinicians. New discoveries about bugs in healthy and diseased lungs. *Ann Am Thorac Soc* 11:108-116.
- Sethi S. 2014. Chronic obstructive pulmonary disease and infection. Disruption of the microbiome? *Ann Am Thorac Soc* 11 43-47.
- Sly PD, Flack FS, Hantos Z. 2005. Respiratory mechanics in infants and children. In: Hamid QA, Shannon J, Martin J, editors. *Physiologic basis of Respiratory disease*. Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker. p 50-54.
- Smith BP. 2015. *Large animal internal medicine*, Fifth edition. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Mosby.
- Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG. 1994. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263:678-681.
- Suvarna K, Stevenson D, Meganathan R, Hudspeth ME. 1998. Menaquinone (vitamin K2) biosynthesis: localization and characterization of the menA gene from Escherichia coli. *J Bacteriol* 180:2782-2787.
- Thorley CM, Sharpe ME, Bryant MP. 1968. Modification of the Rumen Bacterial Flora by Feeding Cattle Ground and Pelleted Roughage as Determined with Culture Media with and Without Rumen Fluid. *J Dairy Sci* 51:1811-1816.
- Thrash JC, Coates JD. 2011. Phylum XVII. Acidobacteria phyl. nov. In: Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. New York, USA: Springer. p 725-734.
- Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, Sichelstiel AK, Sprenger N, Ngom-Bru C, Blanchard C, Junt T, Nicod LP, Harris NL, Marsland BJ. 2014. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med* 20:159-166.

- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. 2007. The human microbiome project. *Nature* 449:804-810.
- Ulrich M, Herbert S, Berger J, Bellon G, Louis D, Munker G, Doring G. 1998. Localization of *Staphylococcus aureus* in infected airways of patients with cystic fibrosis and in a cell culture model of *S. aureus* adherence. *Am J Resp Cell Mol* 19:83-91.
- Van Dyke F. 2008. *Conservation Biology: Foundations, Concepts, Applications*: Springer Netherlands.
- van Erck E, Votion D, Art T, Lekeux P. 2004. Measurement of respiratory function by impulse oscillometry in horses *Equine Vet J* Volume 36, Issue 1. *Equine Vet J* 36:21-28.
- van Erck E, Votion D, Art T, Lekeux P. 2006. Qualitative and quantitative evaluation of equine respiratory mechanics by impulse oscillometry. *Equine Vet J* 38:52-58.
- van Erck E, Votion DM, Kirschvink N, Art T, Lekeux P. 2003. Use of the impulse oscillometry system for testing pulmonary function during methacholine bronchoprovocation in horses. *Am J Vet Res* 64:1414-1420.
- Vandenput S, Votion D, Duvivier DH, Van Erck E, Anciaux N, Art T, Lekeux P. 1998. Effect of a set stabled environmental control on pulmonary function and airway reactivity of COPD affected horses. *Vet J* 155:189-195.
- Wade WG. 2013. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res* 69:137-143.
- Wagner EM, Liu MC, Weinmann GG, Permutt S, Bleecker ER. 1990. Peripheral lung resistance in normal and asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 141:584-548.
- Wang M, Karlsson C, Olsson C, Adlerberth I, Wold AE, Strachan DP, Martricardi PM, Aberg N, Perkin MR, Tripodi S, Coates AR, Hesselmar B, Saalman R, Molin G, Ahrne S. 2008. Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants with atopic eczema. *J Allergy Clin Immun* 121:129-134.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697-703.
- Whittaker RH. 1972. Evolution and Measurement of Species Diversity. *Taxon* 21:213-251.
- WHO. 2007. Chronic respiratory diseases - Chronic disease epidemics. In: Bousquet J, Khaltaev N, editors. *Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases*. Geneva, Switzerland: World Health Organization. p 12-36.
- Wood JL, Burrell MH, Roberts CA, Chanter N, Shaw Y. 1993. *Streptococci* and *Pasteurella* spp. associated with disease of the equine lower respiratory tract. *Equine Vet J* 25:314-318.
- Woods PSA, Robinson NE, Swanson MC, Reed CE, Broadstone RV, Derksen FJ. 1993. Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different management systems *Equine Vet J* Volume 25, Issue 3. *Equine Vet J* 25:208-213.
- Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellon G, Berger J, Weiss T, Botzenhart K, Yankaskas JR, Randell S, Boucher RC, Doring G. 2002. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 109:317-325.
- Yang B, Wang Y, Qian PY. 2016. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC bioinformatics* 17:135.
- Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R, Gordon JI. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486:222-227.

- Yun Y, Srinivas G, Kuenzel S, Linnenbrink M, Alnahas S, Bruce KD, Steinhoff U, Baines JF, Schaible UE. 2014. Environmentally determined differences in the murine lung microbiota and their relation to alveolar architecture. *PloS one* 9:e113466.
- Zakharkina T, Heinzel E, Koczulla RA, Greulich T, Rentz K, Pauling JK, Baumbach J, Herrmann M, Grunewald C, Dienemann H, von Muller L, Bals R. 2013. Analysis of the airway microbiota of healthy individuals and patients with chronic obstructive pulmonary disease by T-RFLP and clone sequencing. *PloS one* 8:e68302.
- Zhou J. 2006. *Porphyromonas Gingivalis* affects the collagen degrading ability of gingival fibroblast. In. Indiana, USA: School of Dentistry, Indiana University. p 151.

Annexe A

Protocole de nettoyage et de désinfection des endoscopes

1. Installer l'étanchéité pour les composantes électroniques sur le module principal de l'endoscope ainsi que les boutons étanches.
2. Rincer l'extérieur de l'endoscope et de la gaine avec une gaze imbibée de nettoyant multi enzymatique. Veiller à ne pas en échapper sur le module principal de l'endoscope.
3. Imbiber une gaze de nettoyant multi enzymatique et s'en servir pour entourer le bout de l'endoscope pour 2 minutes.
4. Rincer les deux canaux internes de l'endoscope et l'intérieur de la gaine avec le nettoyant multi enzymatique à l'aide de seringues de 60 ml pendant 2 minutes.
5. Rincer l'extérieur et l'intérieur de la gaine et de l'endoscope avec de l'eau stérile.
6. Tremper la gaine de plastique et le bout de l'endoscope dans le Virkon 1% pendant 10 minutes et s'assurer qu'il n'y ait plus d'air à l'intérieur de la gaine.
7. Remplir deux seringues de 60 ml avec tubulure de Virkon et les placer dans les trous de l'endoscope. Pousser sur les seringues pour faire sortir l'air des canaux.
8. Lorsqu'il n'y a plus d'air, laisser tremper 10 minutes.
9. Rincer l'endoscope une dernière fois avec de l'eau stérile et ranger l'endoscope dans un bac.

Annexe B

Protocole d'endoscopie avec gaine protectrice, de lavages nasal et oral

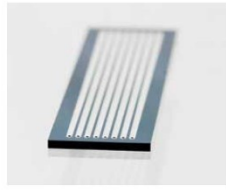
Note : Toutes les manipulations se font dans le travail.

1. Placer les poches de saline 0.9% dans la chaudière d'eau chaude.
2. Injecter la quantité adéquate de Dormosedan[®] ou de xylazine pour l'anesthésie et la dose adéquate de butorphanol.
3. Placer deux poches de saline dans un brassard muni d'une poire et d'un indicateur de pression puis accrocher en hauteur. Ces poches de saline sont reliées à l'endoscope avec des tubulures à l'aide d'une valve à trois voies.
4. Allumer le moniteur et les appareils Olympus Exera II.
5. Essuyer les narines du cheval de manière à enlever les débris et le mucus s'il y a lieu.
6. Alors que l'animal a la tête penchée vers l'avant, effectuer un lavage nasal et un lavage buccal à l'aide des seringues de 60 ml de saline et récolter la saline souillée dans un tube de 50 ml à l'aide d'un entonnoir stérile.
7. Lubrifier l'embout de l'endoscope de 2,5 mètres et le passer dans la gaine de plastique stérile, jusqu'à la graduation 80.
8. Enfoncer la gaine et l'endoscope dans la narine du cheval. Après quelques centimètres, on entre dans le larynx puis dans la trachée.
9. Pousser l'endoscope hors de la gaine.
10. Évaluer la quantité de mucus dans la trachée, selon l'échelle Gerber allant de zéro à cinq, un étant la quantité minimale et cinq la quantité maximale.
11. Anesthésier l'entrée des bronches principales avec la lidocaïne, un anesthésique local.
12. Faire progresser l'endoscope maintenant sorti de la gaine dans les bronches tout en continuant de déverser la lidocaïne.
13. Noter dans quelle bronche principale, gauche ou droite, le LBA est effectué. Les biopsies devront être faites de l'autre côté.
14. Pousser l'endoscope le plus loin possible, et vider la première poche de saline dans le poumon.

15. Aspirer le contenu avec la pompe à vide dans la bouteille identifiée au numéro du cheval.
Lorsque l'aspiration semble terminée, la procédure est répétée avec la deuxième poche de saline.
16. Si la quantité de liquide n'est pas suffisante, un troisième sac de saline est déversé puis aspiré.
17. Les LBA sont identifiés et conservés sur glace moins de deux heures jusqu'à l'arrivée au laboratoire.
18. Retirer l'endoscope et la gaine de la narine du cheval.

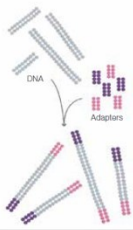
Annexe C

Figure 1: Illumina Flow Cell



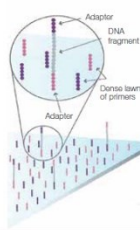
Several samples can be loaded onto the eight-lane flow cell for simultaneous analysis on an Illumina Sequencing System.

Figure 2: Prepare Genomic DNA Sample



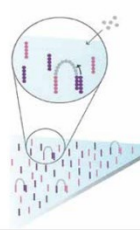
Randomly fragment genomic DNA and ligate adapters to both ends of the fragments.

Figure 3: Attach DNA to Surface



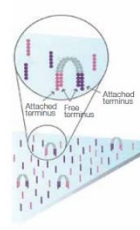
Bind single-stranded fragments randomly to the inside surface of the flow cell channels.

Figure 4: Bridge Amplification



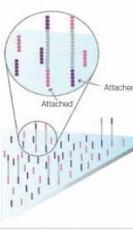
Add unlabelled nucleotides and enzyme to initiate solid-phase bridge amplification.

Figure 5: Fragments Become Double Stranded



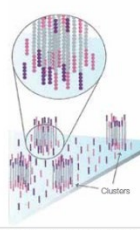
The enzyme incorporates nucleotides to build double-stranded bridges on the solid-phase substrate.

Figure 6: Denature the Double-Stranded Molecules



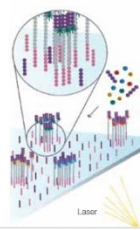
Denaturation leaves single-stranded templates anchored to the substrate.

Figure 7: Complete Amplification



Several million dense clusters of double-stranded DNA are generated in each channel of the flow cell.

Figure 8: Determine First Base



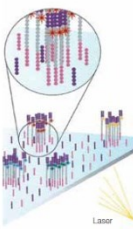
The first sequencing cycle begins by adding four labeled reversible terminators, primers, and DNA polymerase.

Figure 9: Image First Base



After laser excitation, the emitted fluorescence from each cluster is captured and the first base is identified.

Figure 10: Determine Second Base



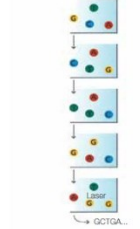
The next cycle repeats the incorporation of four labeled reversible terminators, primers, and DNA polymerase.

Figure 11: Image Second Chemistry Cycle



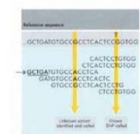
After laser excitation, the image is captured as before, and the identity of the second base is recorded.

Figure 12: Sequencing Over Multiple Chemistry Cycles



The sequencing cycles are repeated to determine the sequence of bases in a fragment, one base at a time.

Figure 13: Align Data



The data are aligned and compared to a reference, and sequencing differences are identified.

Figure A1. Principe d'amplification et de séquençage de l'ADN par la méthode Illumina.