

Université de Montréal

Les *Pasteurellaceae* dans l'asthme équin

Par

Flavie Payette

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

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

Août 2021

© Flavie Payette, 2021

Université de Montréal
Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

Les *Pasteurellaceae* dans l'asthme équin

Présenté par

Flavie Payette

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Marie-Lou Gauthier

Présidente-rapporteuse

Mathilde Leclère

Directrice de recherche

Jean-Pierre Lavoie

Membre du jury

Résumé

L'asthme équin, une maladie inflammatoire considérée non infectieuse, est néanmoins associé avec la présence de certains streptocoques et *Pasteurellaceae*. La similarité entre les espèces de *Pasteurellaceae* complexifie toutefois leur différenciation. L'objectif de cette étude est d'évaluer la présence de différents *Pasteurellaceae* dans les voies respiratoires de chevaux atteints d'asthme.

Des amorces qPCR ont été optimisées pour [*Pasteurella*] *caballi*, *Nicoletella semolina*, *Pasteurella multocida* et *Haemophilus influenzae*, mais plusieurs espèces d'intérêt (notamment *Actinobacillus* spp.) n'ont pas pu être étudiées faute d'amorces spécifiques. Des lavages nasaux, oraux et bronchoalvéolaires de douze chevaux (six sains, six asthmatiques) gardés dans différents environnements ont été analysés. Pour *N. semolina*, les analyses ont été approfondies chez dix chevaux asthmatiques (phase II : lavages nasaux et bronchoalvéolaires), et chez dix chevaux sains (phase III : lavages nasaux).

N. semolina a été identifié dans 0 à 66 % des échantillons et était retrouvé en plus forte quantité dans le nez de chevaux gardés à l'intérieur et nourris avec du foin. Dans les phases II et III, *N. semolina* a été identifié dans 90 à 100 % des échantillons nasaux, et dans six lavages bronchoalvéolaires. [*P.*] *caballi* a été identifié dans la cavité orale de 83 % des chevaux, indépendamment du statut de santé. *H. influenzae* et *P. multocida* n'ont pas été détectés.

Aucun *Pasteurellaceae* analysé n'était associé à l'asthme équin sévère. *N. semolina* était fréquemment retrouvé dans les voies respiratoires et sa charge nasale était influencée par l'environnement. Les amorces synthétisées faciliteront de futures études sur les *Pasteurellaceae*.

Mots-clés : Asthme équin, bactéries, microbiote pulmonaire, *Nicoletella semolina*, *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Pasteurellaceae*

Abstract

Equine asthma, an inflammatory disease considered non-infectious, is associated with the presence of certain streptococci and *Pasteurellaceae*. Strong similarities between *Pasteurellaceae* species prevent specific differentiation. The objective of the study was to evaluate the presence of different *Pasteurellaceae* in the airways of horses with severe asthma.

Quantitative PCR primers were optimized for [*Pasteurella*] *caballi*, *Nicoletella semolina*, *Pasteurella multocida* and *Haemophilus influenzae*. Several species of interest (in particular *Actinobacillus* spp.) could not be studied due to a lack in primer specificity. Nasal, oral and bronchoalveolar lavages from twelve horses (six healthy, six asthmatics) kept in different environments were analyzed. For *N. semolina*, further investigation was pursued through inclusion of ten asthmatic horses (phase II: nasal washes and bronchoalveolar lavages), and ten healthy horses (phase III: nasal washes).

N. semolina was identified in 0 to 66 % of samples and was found in larger loads in the nose of horses kept inside and fed hay. In phases II and III, *N. semolina* was identified in 90 to 100 % of nasal samples and in six bronchoalveolar lavages. [*P.*] *caballi* was only identified in the oral cavity, with 83 % of positive horses regardless of health status. *H. influenzae* and *P. multocida* were not detected.

No specific *Pasteurellaceae* studied here were associated with severe equine asthma. *N. semolina* was identified frequently in respiratory samples and its nasal load was influenced by the horse's environment. The optimized primers will facilitate future studies on *Pasteurellaceae*.

Keywords: Equine asthma, bacteria, pulmonary microbiota, *Nicoletella semolina*, *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Pasteurellaceae*

Table des matières

RÉSUMÉ	3
ABSTRACT	4
TABLE DES MATIÈRES	5
LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	11
REMERCIEMENTS	13
INTRODUCTION	15
CHAPITRE 1 – ASTHME ÉQUIN	17
1.1 DESCRIPTION DE LA CONDITION	17
1.2 ÉTIOLOGIE	18
1.2.1 Environnement	18
1.2.2 Bactéries et leurs composantes (lipopolysaccharides)	19
1.2.3 Fongi et leurs composantes (β -glucans)	20
1.2.4 Virus respiratoires	21
1.2.5 Autres	22
1.3 CHANGEMENTS PATHOLOGIQUES (NON APPROFONDI)	22
1.3.1 Inflammation pulmonaire	22
1.3.2 Fonctions pulmonaires	23
1.3.3 Voies de signalisation potentiellement impliquées	23
1.4 DIAGNOSTIC	24
1.5 TRAITEMENTS	26
1.5.1 Modification environnementale	27
1.5.1.1 Les différentes sources de foin et de litière	29
1.5.1.2 Les effets de l'activité dans l'écurie sur la remise en suspension des particules	31
1.5.1.3 La dairance des particules dans l'air	32
1.5.2 Médication	32
1.5.2.1 Corticostéroïdes	32
1.5.2.2 Bronchodilatateurs	34
1.5.2.3 Antibiotiques	34
CHAPITRE 2 – MICROBIOTE/ MICROBIOME	36
2.1 NOTIONS GÉNÉRALES SUR LE MICROBIOTE ET LE MICROBIOME	36
2.2 NOTIONS GÉNÉRALES SUR LE MICROBIOTE RESPIRATOIRE	37
2.3 MICROBIOTE BACTÉRIEN RESPIRATOIRE ET L'ASTHME ÉQUIN	39
2.4 MICROBIOTE BACTÉRIEN RESPIRATOIRE ET L'ASTHME CHEZ L'HUMAIN	41
2.4.1 Les antibiotiques dans le traitement de l'asthme chez les humains	43
2.5 DYSBIOSE BACTÉRIENNE DANS L'ASTHME : RÉSUMÉ	44
CHAPITRE 3 – PASTEURACEAE	47
3.1 CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES	47
3.2 TAXONOMIE	47
3.3 IDENTIFICATION ET DIFFÉRENCIATION DES PASTEURACEAE	48

3.3.1 Culture et isolement des <i>Pasteurellaceae</i>	48
3.3.2 Difficultés d'identification des <i>Pasteurellaceae</i>	49
3.3.3 Le matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry	50
3.3.4 Réaction de polymérase en chaîne (PCR)	50
3.4 CARACTÉRISTIQUES INTÉRESSANTES	51
3.4.1 Spécificité d'espèce	51
3.4.2 Facteurs de virulence	51
3.4.2.1 Toxines RTX	51
3.4.2.2 Lipopolysaccharides (LPS) et lipooligosaccharides (LOS)	53
3.4.2.3 Autres facteurs de virulence	54
3.5 GENRES ET ESPÈCES D'INTÉRÊT	54
3.5.1 Les <i>Pasteurellaceae</i> dans les pathologies respiratoires infectieuses équinnes	54
3.5.2 Les <i>Pasteurellaceae</i> et l'asthme équin	55
3.5.3 [<i>Pasteurella</i>] <i>caballi</i>	56
3.5.4 <i>Nicoletella semolina</i>	57
3.5.5 <i>Actinobacillus spp.</i>	60
3.5.6 <i>Haemophilus influenzae</i>	62
3.5.7 Autres <i>Pasteurellaceae</i> isolés chez les chevaux	63
3.5.8 Résumé : <i>Pasteurellaceae</i> dans les voies respiratoires d'équidés	63
CHAPITRE 4 – OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES	66
4.1 OBJECTIFS	66
4.2 HYPOTHÈSES	66
CHAPITRE 5 – ARTICLE	67
5.1 ABSTRACT	68
5.2 INTRODUCTION	69
5.3 METHODS	70
5.3.1 Study design	70
5.3.2 Sample collection and DNA extraction	70
5.3.3 Initial <i>N. semolina</i> strain	71
5.3.4 Quantitative PCR	71
5.3.5 Statistical analysis	72
5.4 RESULTS	73
5.4.1 Horses, lung function and BALF cytology	73
5.4.2 Phase I: Control and asthmatic horses	73
5.4.3 Phase II: Asthmatic horses	75
5.4.4 Phase III: Healthy horses from a different barn	76
5.5 DISCUSSION	77
5.5.1 Higher prevalence than previously reported	78
5.5.2 Effect of housing	79
5.5.3 <i>Nicoletella semolina</i> in bronchoalveolar lavage fluid	79
5.5.4 Potential role of <i>N. semolina</i> in the airways	80
5.5.5 Limitations	80
5.6 CONCLUSION	81
5.7 REFERENCES	81
CHAPITRE 6 – MÉTHODOLOGIE SUPPLÉMENTAIRE (NON DÉCRITE DANS L'ARTICLE)	85
6.1 LAVAGES ORAUX, NASAUX, TRACHÉAUX ET BRONCHOALVÉOLAIRES	85

6.1.1	<i>Résumé des procédures</i>	85
6.1.2	<i>Extraction d'ADN</i>	85
6.2	SUPPLÉMENT SUR <i>N. SEMOLINA</i>	86
6.3	AMORCES QPCR <i>PASTEURELLACEAE</i> SYNTHÉTISÉES ET TESTÉES	87
6.4	RÉACTION DE POLYMÉRASE EN CHAÎNE QUANTITATIVE (QPCR)	87
6.4	ANALYSES STATISTIQUES NON DÉTAILLÉES DANS L'ARTICLE	88
6.4.1	<i>Bactéries pour lesquelles des amorces ont été optimisées</i>	88
6.4.2	<i>Lavages trachéaux de cas cliniques</i>	88
CHAPITRE 7	– RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES (NON DÉCRITS DANS L'ARTICLE)	89
7.1	AMORCES QPCR	89
7.2	[<i>PASTEURELLA</i>] <i>CABALLI</i>	93
7.3	<i>PASTEURELLA MULTOCIDA</i>	94
7.4	<i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i>	94
7.5	<i>NICOLETELLA SEMOLINA</i>	95
7.5.1	<i>N. semolina</i> identifié par culture et MALDI-TOF	95
7.5.2	<i>N. semolina</i> chez des chevaux présentés pour consultation respiratoire	96
7.5.3	Suppléments pour l'article sur <i>N. semolina</i>	99
7.5.3.1	Comparaison des charges orales et nasales entre le pâturage et l'écurie sur foin (phase I)	99
7.5.3.2	Évaluation du statut de porteur de <i>N. semolina</i> dans le temps (phase III)	99
CHAPITRE 8	– DISCUSSION	101
8.1	ABONDANCE RELATIVE DES <i>PASTEURELLACEAE</i> ET TAXA RELIÉS	101
8.2	[<i>PASTEURELLA</i>] <i>CABALLI</i>	102
8.3	<i>PASTEURELLA MULTOCIDA</i>	103
8.4	<i>NICOLETELLA SEMOLINA</i>	104
8.4.1	<i>N. semolina</i> identifié par culture et MALDI-TOF dans des lavages trachéaux et de poches gutturales ..	104
8.4.2	<i>N. semolina</i> dans des lavages trachéaux de chevaux présentés pour consultation respiratoire	106
8.4.3	Suppléments pour l'article sur <i>N. semolina</i>	106
8.4.3.1	Plus grande charge nasale chez les chevaux dans un environnement hautement antigénique	106
8.4.3.2	Commentaires sur la qualité de l'échantillonnage nasal pour la phase III	109
8.4.3.3	Dynamisme du statut de porteur de <i>N. semolina</i> dans le temps (phase III)	110
8.4.4	Résumé du pourcentage de chevaux positifs pour <i>N. semolina</i>	111
8.5	INTÉGRATION DES DONNÉES QPCR DE <i>P. MULTOCIDA</i> , <i>N. SEMOLINA</i> ET [<i>P.</i>] <i>CABALLI</i> AVEC LES DONNÉES D'ABONDANCES RELATIVES DES <i>PASTEURELLACEAE</i>	111
8.5.1	Retour sur les OTUs prédominantes dans les voies respiratoires	111
8.5.2	Lien entre les voies respiratoires supérieures et la cavité orale et les voies respiratoires inférieures en ce qui concerne les <i>Pasteurella ceae</i>	113
8.6	LES <i>PASTEURELLACEAE</i> DANS L'ASTHME ÉQUIN	114
8.7	LES DÉFIS DES <i>PASTEURELLACEAE</i> POUR LA SYNTHÈSE D'AMORCES QPCR	115
8.8	AVENUES FUTURES	116
CONCLUSION	118
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	119
ANNEXE A	131
ANNEXE B	133
ANNEXE C	135
ANNEXE D	138

Liste des tableaux

TABLEAU 1. VALEURS SEUILS POUR LA CYTOLOGIE SUR LAVAGE BRONCHOALVÉOLAIRE.....	25
TABLEAU 2. VALEURS SEUILS POUR LES FONCTIONS PULMONAIRES.....	26
TABLEAU 3. POUR ET CONTRE L'IMPLICATION DES BACTÉRIES DANS L'ASTHME.....	45
TABLEAU 4. TOXINES RTX RETROUVÉES CHEZ DIFFÉRENTS PASTEURELLACEAE.	52
TABLEAU 5. RÉSUMÉ DE LA LITTÉRATURE SUR LES PASTEURELLACEAE DANS LA CAVITÉ ORALE ET LES VOIES RESPIRATOIRES.	63
TABLEAU 6. BACTÉRIES UTILISÉES POUR VÉRIFIER LA SPÉCIFICITÉ DES AMORCES.	86
TABLEAU 7. AMORCES PASTEURELLACEAE SYNTHÉTISÉES ET TESTÉES.	91
TABLEAU 8. CHEVAUX POSITIFS À N. SEMOLINA AU CHUV (IDENTIFICATION PAR CULTURE ET MALDI-TOF OU SÉQUENÇAGE OU PCR QUANTITATIF).....	98
TABLEAU 9. RÉSUMÉ DES DIFFÉRENCES SIGNIFICATIVES CONCERNANT LES ABONDANCES RELATIVES DES PASTEURELLACEAE.	102
TABLEAU 10. COMPARAISON DES CHARGES NASALES DE N. SEMOLINA ENTRE LES TROIS PHASES DU PROJET.	110
TABLEAU 11. CONDITIONS À RESPECTER POUR LA SYNTHÈSE D'AMORCES QPCR.	136

Liste des figures

FIGURE 1. INFLAMMATION NEUTROPHILIQUE SUR LAVAGE BRONCHOALVÉOLAIRE.....	23
FIGURE 2. MÉCANIQUES RESPIRATOIRES.....	26
FIGURE 3. DEVENIR DES PARTICULES DANS L'ARBRE BRONCHIQUE EN FONCTION DE LEUR TAILLE.	28
FIGURE 4. CERCLE VICIEUX IMPLIQUANT L'INFLAMMATION ET LA DYSBIOSE DES VOIES RESPIRATOIRES INFÉRIEURES.....	38
FIGURE 5. INTÉGRATION DES DIFFÉRENTS TRAITEMENTS DE L'ASTHME.....	44
FIGURE 6. HIÉRARCHIE TAXONOMIQUE DES PASTEURELLACEAE.	48
FIGURE 7. ASPECT MACROSCOPIQUE DE COLONIES DE N. SEMOLINA EN CULTURE PURE SUR GÉLOSE SANG.....	58
FIGURE 8. PRÉVALENCE DE N. SEMOLINA DANS LE NEZ ET LA TRACHÉE DE CHEVAUX.....	60
FIGURE 9. NICOLETELLA SEMOLINA LOADS IN PHASE I.....	74
FIGURE 10. NICOLETELLA SEMOLINA LOADS IN PHASE II.....	76
FIGURE 11. NICOLETELLA SEMOLINA IN PHASE III.....	77
FIGURE 12. ÉVOLUTION DES AMORCES SYNTHÉTISÉE POUR LE PROJET ACTUEL.	89
FIGURE 13. [PASTEURELLA] CABALLI DANS LES VOIES RESPIRATOIRES DE CHEVAUX.....	93
FIGURE 14. PASTEURELLA MULTOCIDA DANS LES VOIES RESPIRATOIRES DE CHEVAUX.....	94
FIGURE 15. HAEMOPHILUS INFLUENZAE DANS LES VOIES RESPIRATOIRES DE CHEVAUX.....	94
FIGURE 16. EXEMPLE DE RÉSULTAT DE CULTURE POUR UN CHEVAL POSITIF À N. SEMOLINA AU MALDI-TOF.	96
FIGURE 17. COMPARAISON ENTRE LA CHARGE DE N. SEMOLINA AU PÂTURAGE ET DANS L'ÉCURIE SUR FOIN DANS LE NEZ ET DANS LA BOUCHE.	99
FIGURE 18. ÉVALUATION BINAIRE DU STATUT DE PORTEUR LORS DE DEUX À TROIS PRÉLÈVEMENTS À PLUS D'UN AN D'INTERVALLE DU CAS INDEX DE N. SEMOLINA ET DE LA MÈRE DU CHEVAL.	100
FIGURE 19. HYPOTHÈSES EXPLIQUANT LA PLUS HAUTE CHARGE NASALE DE N. SEMOLINA DANS UN ENVIRONNEMENT HAUTEMENT ANTIGÉNIQUE.	108
FIGURE 20. PRÉLÈVEMENT DES LAVAGES NASAUX – DIFFÉRENCES ENTRE LES PHASES.	109
FIGURE 21. POURCENTAGE DE CHEVAUX POSITIFS À N. SEMOLINA DANS LES TROIS PHASES DU PROJET ET AU CHUV, ET COMPARAISON AVEC LA LITTÉRATURE.....	111
FIGURE 22. EXEMPLE D'ALIGNEMENT DU GÈNE AR NR 16S DANS LE LOGICIEL GENEIOUS PRIME.....	116
FIGURE 23. RÉSUMÉ DES ÉTAPES DE LA SYNTHÈSE JUSQU'À L'UTILISATION D'AMORCES PCR.....	136
FIGURE 24. ABONDANCE RELATIVE DES PASTEURELLACEAE ET TAXA RELIÉS AU NIVEAU NASAL.....	142
FIGURE 25. ABONDANCE RELATIVE DES PASTEURELLACEAE ET TAXA RELIÉS AU NIVEAU ORAL.	144
FIGURE 26. ABONDANCE RELATIVE DES PASTEURELLACEAE ET TAXA RELIÉS AU NIVEAU PULMONAIRE.	146
FIGURE 27. CORRÉLATIONS ENTRE LES ABONDANCES RELATIVES NASALES/ORALES ET PULMONAIRES DES PASTEURELLACEAE DANS L'ENVIRONNEMENT MAUVAIS FOIN.	148

Liste des sigles et abréviations

A.	<i>Actinobacillus</i> (pour <i>A. equuli</i> , <i>A. lignieresii</i> , <i>A. pleuropneumoniae</i> , <i>A. porcitonillarum</i> , <i>A. rossii</i> et <i>A. suis</i>) ou <i>Aggregatibacter</i> (pour <i>A. actinomycetemcomitans</i>)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
Axe HHS	Axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien
CDEVQ	Complexe de diagnostic et d'épidémiosurveillance vétérinaires du Québec du Centre de diagnostic vétérinaire de l'Université de Montréal et du Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation
CHUV	Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire de l'Université de Montréal
EIPH	Hémorragies pulmonaires induites à l'exercice
H.	<i>Haemophilus</i> (pour <i>H. influenzae</i>) ou <i>Histophilus</i> (pour <i>H. somni</i>)
IAD	<i>Inflammatory airway disease</i>
IL	Interleukine
LBA	Lavage bronchoalvéolaire
LOS	Lipooligosaccharide
LPS	Lipopolysaccharide
M.	<i>Mannheimia</i> (pour <i>M. haemolytica</i>) ou <i>Moraxella</i> (pour <i>M. catarrhalis</i>)
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
MPOC	Maladie pulmonaire obstructive chronique (<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> , COPD)
N.	<i>Nicoletella</i>
NGS	<i>Next-generation sequencing</i> (séquençage de nouvelle génération)
OTU	<i>Operational taxonomic unit</i>
P.	<i>Pasteurella</i>
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> , réaction de polymérase en chaîne quantitative
R.	<i>Rhodococcus</i>
RA	Abondance relative
RAO	<i>Recurrent airway obstruction</i>
S.	<i>Streptococcus</i>

Subsp.	<i>Subspecies</i> (sous-espèce)
VRI	Voies respiratoires inférieures
VRS	Voies respiratoires supérieures

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier ma directrice de recherche, Dre Mathilde Leclère, pour l'excellence de son enseignement, sa grande disponibilité, ses précieux conseils, ainsi que pour m'avoir permis de développer plusieurs de mes nouvelles compétences. Cela n'aura définitivement pas été une maîtrise trouvée dans une boîte de céréales, comme elle m'a dit un jour, et je suis reconnaissante pour tout ce que j'ai appris depuis plus de 2 ans et demi dans son laboratoire. Sans elle, je ne serais pas où je suis à ce jour, autant au niveau académique que professionnel.

Un immense merci à Audrey Charlebois, sans qui ce projet n'aurait jamais été possible, pour m'avoir transmis tout son savoir, en plus d'avoir fait de moi une mini experte en synthèse d'amorces autonome et outillée. Ton aide m'a été très précieuse!

Merci à Dr Jean-Pierre Lavoie et à l'équipe de son laboratoire pour m'avoir permis d'utiliser la machine qPCR, pour m'avoir donné accès aux échantillons de la Bio-banque de tissus respiratoires équins et pour l'accès à ses chevaux de recherche pour les phases I et II du projet.

Merci à Dre Julie-Hélène Fairbrother et à Dre Marie-Lou Gauthier pour leurs réponses à mes nombreuses questions reliées à la bactériologie, et au CVEDQ pour m'avoir fourni plusieurs géloses pour mes extractions.

Merci à Guy Beauchamp pour sa précieuse aide dans la réalisation des analyses statistiques.

Merci à amies et collègues de laboratoire, Valérie Dubuc, Roxane Westerfeld et Estelle Manguin pour leur formidable patience et support moral.

Merci à Florence Dupuis-Dowd, sans qui la recherche n'aurait jamais été aussi drôle et sans qui je n'aurais probablement pas survécu au programme combiné maîtrise et médecine vétérinaire.

À ma famille, plus particulièrement mes parents et Léanne, et à mes amies, Marylène Moisan, Elizabeth Théoret, Jessica Bouchard, Tara Lanciault, Sarah-Lizabeth Paquette et Rosalie Fortin, pour m'avoir supportée (et endurée!) tout au long de cette aventure. Et merci à mes deux boules de poils, Charlot et Zola, pour les distractions.

Merci au Conseil de recherches en sciences naturelles et génie (CRSNG) pour leur soutien financier.

Merci à Mme Dominique Michel pour m'avoir permis de prélever des échantillons sur ses chevaux dans la cadre de la phase III du projet sur *N. semolina*.

Merci à Christine Blondin pour son support et sa disponibilité à répondre à toutes mes questions concernant la maîtrise et la rédaction du mémoire.

Finalement, merci au jury d'évaluation – Dre Marie-Lou Gauthier, Dre Mathilde Leclère et Dr Jean-Pierre Lavoie – d'avoir pris le temps d'évaluer le fruit de mon travail.

Introduction

L'asthme équin est une condition respiratoire affectant environ 15 % des chevaux adultes dans sa forme la plus sévère (1), et plus du double dans ses formes légères à modérées (2). Cette condition est caractérisée par de l'inflammation pulmonaire, une bronchoconstriction inappropriée et une production excessive de mucus. Chez les chevaux asthmatiques sévères, l'inhalation d'antigènes environnementaux, principalement contenus dans le foin, induit des exacerbations cliniques. Les facteurs déclencheurs sont moins bien documentés pour les chevaux atteints des formes légères à modérées (3).

La surcroissance de certaines espèces bactériennes dans les voies respiratoires pourrait agir comme un facteur favorisant le développement d'exacerbations d'asthme. En plus des streptocoques (4, 5), deux membres de la famille *Pasteurellaceae*, *Pasteurella* spp. et *Actinobacillus* spp., sont associés à l'inflammation trachéale (6-8), au mucus (8, 9), et à la toux (5, 10) chez les chevaux de sport. Toutefois, la culture bactérienne, employée dans la plupart de ces études, présente certaines limites. En effet, certaines bactéries d'importance pourraient être manquées à cause d'une croissance fastidieuse ou à un manque de précision provenant d'une identification basée seulement sur la morphologie et les caractéristiques biochimiques des bactéries isolées, ce qui est le cas pour les *Pasteurellaceae*. Une récente étude effectuée par séquençage massif dans notre laboratoire a montré une tendance à la surreprésentation des *Pasteurellaceae* dans le microbiote pulmonaire de chevaux atteints d'asthme sévère (11). Un parallèle peut d'ailleurs être fait avec l'asthme chez les humains, où l'utilisation de techniques indépendantes de la culture a permis d'identifier une plus forte abondance de Protéobactéries (12-14), plus particulièrement *Haemophilus influenzae* (un *Pasteurellaceae*) (15). Le rôle de la dysbiose respiratoire dans l'asthme, une pathologie à la base considérée non infectieuse, demeure toutefois incertain. Cette modification du microbiote pulmonaire pourrait être secondaire à la formation d'un microenvironnement occasionné par l'inflammation et le remodelage tissulaire. Par contre, cette dysbiose pourrait également contribuer au développement et la progression de la condition en entretenant l'inflammation pulmonaire.

L'hypothèse de ce projet est que les *Pasteurellaceae* sont présents en plus grande quantité chez les chevaux asthmatiques, surtout lors de l'exacerbation, et entretiennent l'inflammation pulmonaire.

Notre objectif est de quantifier différents *Pasteurellaceae* d'intérêt dans le microbiote respiratoire de chevaux afin de déterminer si certaines espèces de cette famille sont associées avec l'asthme équin sévère. À la lumière des résultats obtenus, un deuxième objectif a été ajouté : de quantifier *Nicoletella*

semolina dans la cavité orale et les voies respiratoires de chevaux, sains comme atteints d'asthme, gardés dans différents environnements. Ces résultats sont présentés dans l'article joint à ce mémoire.

Chapitre 1 – Asthme équin

Cette section n'est pas une revue extensive mais sert plutôt à fournir les informations nécessaires afin de comprendre ce projet sur les *Pasteurellaceae* dans l'asthme équin. L'emphase est donc mise sur les sections étiologie et traitements, alors que les autres sections sont plus succinctes. Pour de plus amples informations au sujet de cette condition, un consensus d'experts sur l'inflammation des voies respiratoires inférieures de l'*American College of Veterinary Internal Medicine* (ACVIM) a été publié en 2016 (3), et une revue de l'asthme sévère a été publiée en 2014 (16).

1.1 Description de la condition

L'asthme est une maladie respiratoire obstructive résultant d'une combinaison de différents degrés d'inflammation pulmonaire, d'hyperréactivité bronchique, d'hypersécrétion de mucus et de remodelage pulmonaire. Un cheval atteint d'asthme sévère en exacerbation montre des signes de détresse respiratoire au repos avec de la toux (16). Cette difficulté respiratoire est notable par une dilatation des naseaux ainsi qu'un effort abdominal expiratoire. Les signes cliniques montrés par un cheval atteint des formes légères à modérées sont plus subtils, allant de l'intolérance à l'exercice et une diminution des performances à du jetage nasal et de la toux intermittente (3, 17). La forme sévère se distingue par des signes cliniques évidents au repos, mais la distinction entre les formes légères et modérées reste à mieux définir. Il ne sera pas question de l'asthme induite au pâturage (*summer pasture-associated obstructive pulmonary disease*, SPAOPD) dans le présent mémoire.

La forme sévère de la condition affecte principalement des chevaux âgés d'au moins 7 ans et touche environ 15 % des chevaux adultes, toutes races confondues, dans les régions tempérées (1, 18). L'asthme léger à modéré affecte probablement au moins le double de chevaux (2), voire plus (17, 19).

La terminologie entourant l'asthme équin a été sujette à plusieurs modifications. Les termes souffle, *heaves*, *lower airway inflammation*, *inflammatory airway disease* (IAD), *chronic obstructive pulmonary disease* (COPD) et *recurrent airway obstruction* (RAO), anciennement utilisés, sont maintenant remplacés par les termes asthme léger à modéré et asthme sévère étant donné les ressemblances entre la pathologie et l'asthme chez les humains (3). L'asthme équin n'est pas toujours un continuum : un cheval atteint d'asthme léger à modéré ne développera pas nécessairement la forme sévère. Plusieurs chevaux, à un moment dans leur vie, ont au moins un épisode de toux temporaire probablement relié à de l'asthme léger à modéré (8). Il est encore incompris pourquoi certains chevaux évoluent éventuellement vers la forme sévère.

1.2 Étiologie

L'étiologie de l'asthme, c'est-à-dire ce qui fait qu'un cheval est susceptible de développer des exacerbations cliniques, est suspectée d'être à la fois génétique (familiale) et environnementale (16, 20, 21). Le mode d'hérédité est complexe, mais certains marqueurs génétiques, par exemple le gène codant pour le récepteur de l'interleukine 4 (IL-4R), ont été associés avec les formes sévères de la condition (22). Il est possible aussi qu'une exposition en jeune âge à certains antigènes, bactéries, virus ou même aux antibiotiques jouent un rôle dans le développement de la condition, mais cela demeure spéculatif. Les facteurs induisant les exacerbations cliniques sont quant à eux mieux compris et seront abordés dans les sections suivantes.

1.2.1 Environnement

L'introduction d'un cheval atteint d'asthme sévère dans un environnement hautement poussiéreux, par exemple dans une écurie ou seulement le fait d'être nourri avec du foin, induit une exacerbation clinique (16). La causalité est assez bien démontrée, toutefois des questions subsistent sur quelles composantes du foin sont responsables des exacerbations (23). Les chevaux nourris de foin sont sept fois plus à risque de présenter de l'inflammation des voies respiratoires inférieures (18). La poussière de foin comprend plusieurs constituants : spores, endotoxines, fungi, protéases, débris de mites, poussière inorganique et fragments de plantes (24). Lorsque le foin est fractionné en ses différentes composantes (soit les particules elles-mêmes, les endotoxines ainsi que les spores fongiques) et que ces composantes sont inhalées sous une forme individuelle ou sous une forme reconstituée, une réponse inflammatoire intermédiaire et non maximale est obtenue en comparaison à la réponse observée suite à l'inhalation de poussière de foin entière (25, 26). On peut donc déduire que chaque composante de la poussière est importante dans l'induction de la maladie et que leur combinaison naturelle est synergique plutôt qu'additive (26). Chez les chevaux atteints des formes légères à modérées d'asthme, les facteurs déclencheurs demeurent incertains, mais une étiologie similaire aux formes sévères est suspectée (3). La présence d'inflammation des voies respiratoires inférieures est associée à une arrivée plus récente à l'entraînement, indépendamment de l'âge du cheval, suggérant le développement d'une immunité ou d'une tolérance avec le temps (27).

Considérant l'importance de l'environnement et de la régie dans l'induction de cette condition chez les chevaux, il n'est pas surprenant qu'une grande partie du contrôle de la maladie repose sur un changement de régie (voir section [1.5 Traitements](#)).

1.2.2 Bactéries et leurs composantes (lipopolysaccharides)

Malgré que l'asthme soit une maladie non infectieuse, la culture réalisée sur des lavages trachéaux de chevaux atteints d'inflammation des voies respiratoires inférieures révèle fréquemment la présence de bactéries spécifiques. L'implication des bactéries dans l'asthme demeure toutefois incertaine. Le [Chapitre 2](#) revient plus en détail sur le microbiote respiratoire et sur les bactéries dans l'asthme.

La paroi des bactéries à Gram négatif, dont les *Pasteurellaceae*, est composée de lipopolysaccharides (LPS). Les termes « lipopolysaccharide » et « endotoxine » sont fréquemment utilisés de manière interchangeable. Les LPS sont formés de 3 sections : le lipide A, le corps oligosaccharide et l'antigène O. C'est le lipide A qui est responsable de la majeure partie de l'effet endotoxique. L'antigène O varie en taille et peut également varier entre les différentes souches d'une même espèce bactérienne. Il est exprimé vers l'extérieur de la cellule bactérienne et est donc reconnu par le système immunitaire. Les lipopolysaccharides sont reconnus de manière non spécifique par les *Toll-like receptors* (TLR) sur les phagocytes, et déclenchent la libération de cytokines pro-inflammatoires du système immunitaire inné (28).

Chez les chevaux, l'inhalation d'endotoxines par nébulisation induit une inflammation pulmonaire neutrophilique (29). La réponse inflammatoire est non seulement dose-dépendante, mais semble aussi dépendre du statut de santé des chevaux, les chevaux atteints d'asthme sévère étant plus sensibles que les chevaux sains. La dose d'endotoxines purifiées nécessaire pour induire une neutrophilie pulmonaire et une dysfonction respiratoire chez des chevaux atteints d'asthme sévère est supérieure à la dose retrouvée dans le foin et la paille, alors que ces derniers induisent une réponse inflammatoire plus importante (29). L'exposition de chevaux atteints d'asthme sévère à une suspension de poussière de foin dans laquelle les endotoxines ont été partiellement retirées (diminuée de plus de 50 %) mène à une neutrophilie pulmonaire partielle (26). À la lumière de ces résultats, il semble que les endotoxines jouent un rôle contributif plutôt que primaire dans le développement de l'inflammation et de l'exacerbation. De manière surprenante toutefois, l'exposition naturelle aux endotoxines dans la zone respiratoire des chevaux n'est pas corrélée à l'inflammation pulmonaire neutrophilique, et pourrait même avoir un effet protecteur sur celle-ci (19).

Dans un petit échantillon tiré d'une étude chez les humains, les endotoxines tendent à être retrouvées en plus grande quantité dans le sputum d'individus atteints d'asthme neutrophilique (n = 7) en comparaison aux autres phénotypes inflammatoires (éosinophilique ou paucigranulocytaire) (30). D'ailleurs, la quantité d'endotoxines serait positivement associée au pourcentage de neutrophiles et à la quantité

d'interleukine 8 (IL-8) dans le sputum. Cette association suggère une potentielle implication des endotoxines dans la pathophysiologie du développement et de la perpétuation de la neutrophilie pulmonaire, toutefois il demeure incertain si cette exposition provient de la présence d'endotoxines dans l'environnement ou d'une colonisation bactérienne chronique des voies respiratoires inférieures.

1.2.3 Fongi et leurs composantes (β -glucans)

Au même titre que les endotoxines et les bactéries, les fongi pourraient avoir un rôle dans la pathogénie de l'asthme équin. Les travaux de Pirie *et al.* suggèrent que les particules de foin, comprenant entre autres des spores fongiques et β -glucans, ont un effet synergique avec les endotoxines dans l'induction de l'exacerbation chez les chevaux atteints d'asthme sévère et jouent un rôle contributeur dans cette maladie (23, 25, 26). Tout comme pour les endotoxines, la neutrophilie pulmonaire induite par la nébulisation d'une suspension de poussière de foin partielle, contenant en majorité des β -glucans et spores fongiques, est moindre par rapport à la nébulisation de la poussière de foin entière (25). Toutefois, les chevaux atteints d'asthme sévère exposés à du foin et de la paille qui contient plus de β -glucans, en comparaison à plus d'endotoxines, tendent à développer une neutrophilie pulmonaire plus importante (26). L'inhalation d'extraits d'*Aspergillus fumigatus* induit aussi une neutrophilie pulmonaire chez les chevaux atteints d'asthme sévère, suggérant une implication dans la pathogénie potentiellement via une réaction d'hypersensibilité (31). De plus, la proportion de mastocytes dans les lavages bronchoalvéolaires de chevaux de course augmente significativement avec l'exposition aux β -glucans (17). L'exposition aux β -glucans semble prédisposer au phénotype inflammatoire mastocytaire chez les chevaux atteints d'asthme léger à modéré, et induire une inflammation neutrophilique chez les asthmatiques sévères. L'observation de particules fongiques (spores, conidies, conidiospores, hyphes, etc.) à la cytologie du lavage trachéal augmente de 2,1 fois le risque d'être atteint d'asthme chez les chevaux de sport (32). La mycologie permet l'identification de *Penicillium* spp. et *Aspergillus* spp. dans plus de la moitié des cas. Ces fongi peuvent être retrouvés dans l'environnement d'une écurie. Il s'avère toutefois pertinent de garder en tête que le séquençage haut débit a permis de mettre en évidence la présence de fongi dans les lavages trachéaux de tous chevaux, indépendamment du statut de santé (33, 34). Ainsi, tout comme pour les bactéries, peut-être que la présence de fongi spécifiques ou la quantité de ceux-ci s'avèrent aussi d'importance, et non seulement leur présence. Toutefois, il est possible qu'une clairance mucociliaire altérée pourrait, comme pour les bactéries, mener à une accumulation de ces fongi dans les voies respiratoires.

1.2.4 Virus respiratoires

L'implication des virus dans l'asthme équin demeure incertaine. Nombreuses sont les recherches faites à ce sujet, de manière générale toutefois, il semblerait que les virus respiratoires ne soient pas associés à l'asthme équin léger à modéré (3, 5, 8, 10, 35-38). Les évidences suggérant un rôle contributeur ou causal des virus respiratoires dans l'asthme chez les chevaux sont clairsemées et impliquent différents virus, surtout les herpèsvirus équin (EHV) et les virus de la rhinite équine (ERV).

L'infection à EHV est associée au jetage nasal, toutefois la séroconversion n'est pas associée aux épisodes d'inflammation des voies respiratoires inférieures (38), ou est observée dans le mois suivant ces épisodes (8). Par contre, les études basées sur la sérologie évaluent parfois les chevaux à un seul temps, empêchant la détection de la séroconversion. L'excrétion nasale de l'herpèsvirus équin type 2 (EHV-2) a été associée à l'asthme léger à modéré dans un petit échantillon de chevaux (39). EHV-2 est d'ailleurs plus fréquemment détecté par qPCR dans la trachée de chevaux présentant une baisse de performances ou d'autres signes compatibles avec l'asthme équin, et est associé à la neutrophilie trachéale, mais pas à l'inflammation pulmonaire (40). De manière surprenante, la détection et la charge de EHV-2 par qPCR au niveau du nasopharynx sont inversement corrélées à la proportion de mastocytes dans les LBA, mais cette corrélation n'est plus significative quand on contrôle pour l'exposition aux β -glucans (35). Quant à l'EHV-5, sa détection et sa charge au niveau de la trachée sont associées à la neutrophilie pulmonaire, mais une corrélation inverse est plutôt observée avec les lavages bronchoalvéolaires (35).

Pour les virus de la rhinite équine, la séroprévalence et les titres d'anticorps contre le virus de la rhinite équine type A (ERAV) sont plus élevés chez les chevaux atteints d'asthme que chez les chevaux sains (39). La détection et la charge du virus de la rhinite équine type B (ERBV) au niveau du nasopharynx sont significativement associées à la neutrophilie pulmonaire, mais cette corrélation est fortement influencée par la poussière respirable (35). Il faut toutefois interpréter avec précaution des associations faites entre l'inflammation pulmonaire et la détection de virus dans les voies respiratoires supérieures ou la trachée, étant donné la différence anatomique entre les sections analysées. En résumé, il manque d'évidences franches et répétables montrant une association entre l'asthme équin et les virus respiratoires. Il est possible que des exacerbations post-virales aient lieu comme chez les humains atteints d'asthme (résumé par (41)). Des études longitudinales à plus grande échelle seraient toutefois nécessaires pour le démontrer.

1.2.5 Autres

Le foin comprend non seulement des endotoxines, des fungi et des spores, mais aussi des particules de poussière comme des antigènes de mites. Les travaux de Pirie *et al.* ont montré que ces particules jouent un rôle important dans le développement d'inflammation pulmonaire neutrophilique et l'induction de l'exacerbation chez les chevaux atteints d'asthme sévère et qu'elles agissent de manière synergique avec les endotoxines (25, 26). Le mécanisme par lequel ces particules induisent une réponse chez les individus prédisposés est incertain, mais il a été proposé qu'elles agissent comme un vecteur pour les autres antigènes contenus dans le foin (19). L'exposition aux particules de foin respirables autour des naseaux des chevaux a été associée à l'éosinophilie pulmonaire chez les Thoroughbred en début d'entraînement, pouvant suggérer une réaction d'hypersensibilité (19), et la concentration en poussières respirables a aussi été associée à la neutrophilie pulmonaire (17). Une corrélation entre les poussières totales et respirables dans l'environnement du cheval et la proportion de mastocytes dans les LBA a aussi été identifiée, cette fois chez des chevaux Haflinger adultes apparemment sains (42). D'autres antigènes comme les pollens, l'ammoniac, la pollution, les acariens, les protéases, etc. pourraient également être impliqués dans l'étiologie. Il est probable que l'exposition à différents antigènes environnementaux, combiné à une prédisposition du cheval, mène à différents phénotypes inflammatoires d'asthme (17).

1.3 Changements pathologiques (non approfondi)

1.3.1 Inflammation pulmonaire

Une inflammation pulmonaire neutrophilique, éosinophilique ou mastocytaire peut être observée sur les lavages bronchoalvéolaires de chevaux atteints d'asthme léger à modéré alors qu'une inflammation neutrophilique importante est observée dans les formes sévères de la maladie (Figure 1) (3). Les signes cliniques présentés chez les sujets atteints des formes moins sévères semblent différer selon le phénotype inflammatoire observé, la neutrophilie étant associée à de la toux et une baisse de performances, et l'éosinophilie et une élévation des mastocytes, à une baisse de performances et de l'hyperréactivité bronchique (17, 43). Une plus haute proportion de neutrophiles est aussi associée à une diminution des performances, mais n'a pas un aussi grand impact que la proportion de mastocytes (17, 44). Dans les lavages trachéaux, l'accumulation de mucus plutôt que la neutrophilie serait associée à une baisse de performances (45). Des corrélations sont observées entre le différentiel cellulaire sur lavage bronchoalvéolaire et la fonction pulmonaire, l'hyperréactivité bronchique et la clinique des chevaux atteints d'asthme, mais celles-ci sont faibles (46). Il demeure incertain ce qui cause l'influx et la persistance de cellules inflammatoires au niveau des poumons des chevaux atteint d'asthme. Un système immunitaire inné défectueux ou ne pouvant pas être régulé à la baisse fait partie des hypothèses (47). L'inflammation

neutrophilique ne semble toutefois pas directement reliée au remodelage pulmonaire ou à l'obstruction respiratoire (47).

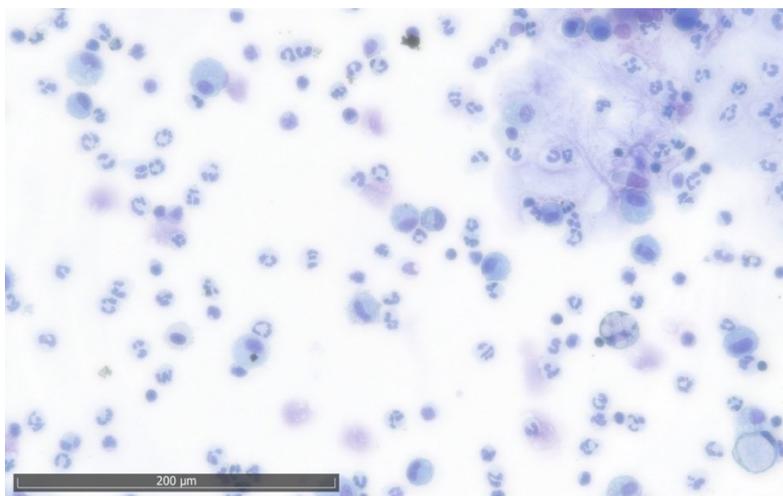


Figure 1. Inflammation neutrophilique sur lavage bronchoalvéolaire.

Inflammation pulmonaire neutrophilique sur lavage bronchoalvéolaire d'un cheval atteint d'asthme sévère. Courtoise de Dre M. Leclère.

1.3.2 Fonctions pulmonaires

Les chevaux atteints d'asthme sévère en exacerbation présentent une obstruction respiratoire qui se mesure par une augmentation de la différence maximale de pression pleurale, de la résistance et de l'élastance pulmonaires, ainsi que par une hypoxémie (16, 48). Les chevaux présentent aussi de l'hyperréactivité bronchique, une hypersécrétion de mucus et du remodelage pulmonaire, contribuant à l'obstruction respiratoire. Même durant les périodes de rémission d'asthme, de l'inflammation et une obstruction respiratoire subcliniques persistent, secondairement au remodelage pulmonaire entre autres (16, 47).

Les chevaux atteints d'asthme léger à modéré présentent aussi une obstruction des voies respiratoires, mais cette obstruction est moins importante que dans les formes sévères, et n'est habituellement pas détectée à l'aide des mécaniques standard (3). Ils présentent aussi de l'hyperréactivité bronchique, associée surtout à la proportion de mastocytes et d'éosinophiles dans les lavages bronchoalvéolaires (49, 50). Les chevaux présentant de la toux n'ont pas nécessairement des fonctions pulmonaires altérées ni de l'hyperréactivité bronchique (51).

1.3.3 Voies de signalisation potentiellement impliquées

L'exposition de chevaux prédisposés à certains antigènes environnementaux engendre une réponse immunitaire spécifique. Toutefois, cette réponse n'est pas immédiate comme lors d'une réaction

allergique de type I et, malgré une certaine implication des IgE, ceux-ci ne jouent pas un rôle primaire dans l'induction de l'exacerbation (21, 28). Aussi, la désensibilisation et les antihistaminiques s'avèrent inefficaces dans le traitement de la condition (28). La détermination des voies de signalisation impliquées est compliquée, mais la voie Th2 semble prédominante, impliquant des cytokines telles que l'interleukine 4 (IL-4) et l'IL-5 (52), alors que les voies Th1 et Th17 pourraient aussi être impliquées (28, 53). Les systèmes immunitaires acquis et innés sont aussi impliqués dans le développement et la perpétuation de la condition, via l'exposition à des antigènes spécifiques ou non spécifiques (28). Il est possible que le système immunitaire inné de ces chevaux soit défectueux, répondant de manière inappropriée et démesurée aux stimuli normaux ou ne pouvant pas être régulé à la baisse (47).

En ce qui concerne les formes légères à modérées, il est probable que différentes voies de signalisation soient impliquées dans le développement des différents phénotypes inflammatoires (43). Comme pour les formes sévères, la voie de signalisation Th2 semble jouer un rôle dans la pathogénie du phénotype mastocytaire (43, 54), mais cette association n'est pas rapportée dans toutes les études (55). L'étiologie menant aux formes moins sévères de la condition est à élucider. L'environnement semble jouer un rôle comme dans les formes sévères, mais une composante infectieuse pourrait favoriser le développement en jeune âge, et les exacerbations plus tard dans la vie du cheval.

1.4 Diagnostic

Le diagnostic d'asthme doit être basé sur la présence de signes cliniques pouvant être associés à la condition (toux, diminution de performances, jetage nasal, mucus trachéal), la cytologie sur lavage bronchoalvéolaire et, si disponible, les fonctions pulmonaires du cheval (3, 39, 56). Une infection respiratoire ou systémique ou toutes autres causes d'intolérance à l'exercice (musculaire, cardiovasculaire) doivent être exclues. Comme mentionné précédemment, on fait la différence entre un cheval atteint d'asthme léger à modéré d'un cheval atteint d'asthme sévère par l'observation de signes respiratoires au repos (tirage nasal, pousse abdominale, toux fréquente) chez ce dernier (3).

Pour des raisons pratiques, le diagnostic d'asthme est encore souvent basé sur l'observation de mucus trachéal à l'endoscopie et sur la cytologie du lavage trachéal. Toutefois, la trachée ne représente pas nécessairement l'environnement inflammatoire retrouvé dans les poumons, d'ailleurs lorsque la cytologie sur lavage trachéal est comparée à la cytologie sur lavage bronchoalvéolaire, les deux techniques sont peu corrélées et un diagnostic divergent est obtenu chez 37 % des chevaux (46, 57, 58). Ainsi, il est recommandé d'effectuer le différentiel cytologique sur lavage bronchoalvéolaire, et l'observation de mucus trachéal n'est pas un critère obligatoire (3).

Hoffman *et al.* en 2008 ont publié une revue sur les lavages bronchoalvéolaires et ils y décrivent la procédure, comment préparer les échantillons pour la cytologie et comment interpréter cette dernière (46). Il est recommandé d'instiller un volume de 250 à 500 mL de saline isotonique stérile pour éviter une surreprésentation artéfactuelle de certaines populations cellulaires lorsqu'un plus petit volume est utilisé et afin de permettre la comparaison des proportions cellulaires obtenues à la cytologie avec les seuils de référence (46, 56). Les seuils proposés dans le plus récent consensus d'experts de l'ACVIM sur la condition sont présentés dans le tableau ci-dessous (3). Un récent article suggère qu'une neutrophilie supérieure à 6.2 % ou une inflammation mastocytaire supérieure à 2.6 % sont associées à de plus faibles chances de gagner chez les chevaux de course (17). La neutrophilie pulmonaire chez les chevaux atteints d'asthme sévère est habituellement supérieure à 25 % (3, 16).

Tableau 1. Valeurs seuils pour la cytologie sur lavage bronchoalvéolaire.

Type cellulaire	Proportion sur lavage bronchoalvéolaire	
	Seuil chevaux sains	Seuil compatible avec un asthme léger à modéré
Neutrophile	≤ 5 %	> 10 %
Mastocyte	≤ 2 %	> 5 %
Éosinophile	≤ 1 %	> 5 %

Adapté du consensus d'experts sur l'inflammation des voies respiratoires inférieures de l'American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) publié en 2016 (3). Ces seuils s'avèrent partiellement arbitraires et peuvent varier selon la localisation géographique des chevaux. Dans plusieurs publications et contextes cliniques, des seuils de > 2% et > 1 % sont utilisés pour les asthmes mastocytaires et éosinophiliques, respectivement.

La fonction respiratoire des chevaux peut être évaluée entre autres par les mécaniques standard ou par l'oscillométrie (16). L'évaluation de la fonction respiratoire n'est pas un test obligatoire dans le diagnostic de l'asthme chez les chevaux puisque le matériel nécessaire n'est pas facilement accessible, et il faut développer des intervalles de référence pour les asthmatiques légers à modéré. Les mécaniques conventionnelles permettent de mesurer directement le débit d'air à l'aide d'un pneumotachographe et de la pression pleurale indirecte à l'aide d'un cathéter œsophagien (59). La résistance et l'élastance sont calculées à partir de ces données. L'oscillométrie utilise différentes fréquences afin de mesurer l'impédance, qui est une mesure indirecte de la résistance et de la réactance (60). La sensibilité de l'oscillométrie est théoriquement supérieure à celle des mécaniques standard (3, 16). Il y a une forte association entre une proportion élevée de neutrophiles ou de mastocytes au lavage bronchoalvéolaire et des fonctions pulmonaires anormales (39).

Tableau 2. Valeurs seuils pour les fonctions pulmonaires.

Paramètre	Seuil identifiant un cheval atteint d'asthme	
	Mécaniques standard	Oscillométrie
Résistance	> 1 cm H ₂ O/L/s	
Élastance	> 1 cm H ₂ O/L	
Pression pleurale	> 15 cm H ₂ O	
Ratio résistance à 5 Hz sur résistance à 10 Hz (R5/R10)		> 1

Les intervalles anormaux de résistance et d'élastance pour les mécaniques standard sont basés sur les intervalles normaux tirés de Jean et al., 1999 (59). Le ratio R5/R10 est tiré de Bullone et al., 2014 (61).

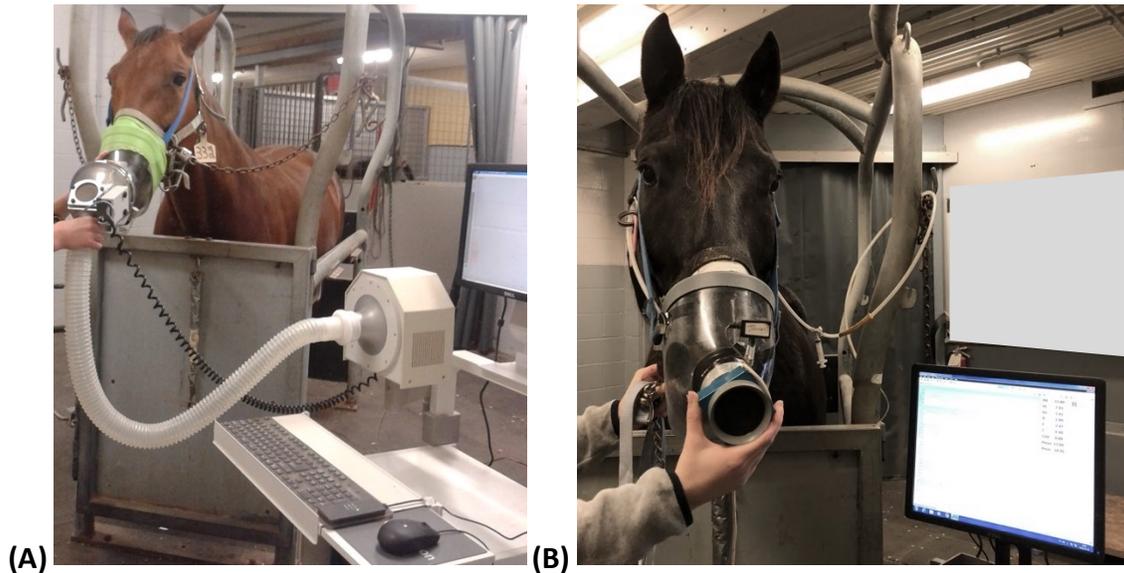


Figure 2. Mécaniques respiratoires.

Évaluation de la fonction respiratoire par l'oscillométrie par impulsion (A) et par les mécaniques standard (B). Courtoisie de Dre M. Leclère.

1.5 Traitements

Les traitements visent surtout à moduler la réponse inflammatoire des voies respiratoires et à améliorer les fonctions pulmonaires et les signes cliniques des chevaux atteints d'asthme. Les recherches sur les traitements de l'asthme équin ciblent majoritairement les chevaux atteints d'asthme sévère mais les résultats sont également extrapolés aux chevaux atteints d'asthme léger à modéré (3). La modification de l'environnement et de la régée sont essentiels (62, 63). L'ajout de corticostéroïdes ainsi que de bronchodilatateurs permettent un contrôle de la maladie lors des crises d'exacerbation et sont souvent utilisés en support jusqu'à l'atteinte de la rémission clinique par le changement environnemental. Plusieurs autres avenues thérapeutiques sont également explorées. Éventuellement, lorsque la

pathogénie de l'asthme sera mieux comprise, des thérapies ciblées pourront potentiellement être mises en place.

1.5.1 Modification environnementale

La modification de l'environnement dans l'optique de diminuer l'exposition antigénique (poussières et antigènes) constitue en le meilleur moyen d'améliorer la condition respiratoire (signes cliniques, fonctions et inflammation). Les chevaux gardés à l'intérieur sont exposés à des particules fongiques, des spores, des bactéries, des endotoxines, des virus, des gaz délétères tel l'ammoniac, des particules organiques ainsi qu'à des acariens (mites de foin notamment) (64, 65). Garder un cheval atteint d'asthme au pâturage sans accès à du foin permet d'atteindre une rémission clinique (18, 62, 63, 66-70). Ceci n'est toutefois pas possible pendant toute l'année dans plusieurs régions, c'est donc pourquoi plusieurs études ont exploré des alternatives moins poussiéreuses. Les trois méthodes principales pour diminuer les particules en suspension sont 1) de diminuer l'apport en contaminants en modifiant les litières et aliments utilisés; 2) de diminuer la relâche de particules dans l'air; et 3) d'augmenter le taux de clairance des particules en améliorant la ventilation (71). Puisque le foin et la litière constituent les principales sources de poussière, de spores fongiques et d'actinomyètes dans les écuries (64, 72), différents types de régies environnementales et alimentaires ont été évaluées. D'autres facteurs, par exemple la régie des chevaux dans les boxes adjacents, sont aussi à prendre en compte (73). Les prochaines sections aborderont ces alternatives permettant de réduire les poussières dans l'environnement.

Commençons par s'attarder à ce qu'il advient des particules se trouvant dans l'air. Les particules inhalables sont les particules de toutes tailles pouvant se rendre aux voies respiratoires. Les particules respirables sont des particules inhalables, mais qui ont la capacité de se rendre aux voies respiratoires périphériques. Cette capacité dépend en majeure partie de la taille des particules, comme dicté par la Loi de Stokes. Les particules de petite taille ($< 5 \mu\text{m}$) peuvent suivre le flux d'air pour atteindre les bronchioles terminales et les alvéoles et s'y déposer par sédimentation ou en suivant un mouvement brownien (64). Les particules de plus grande taille, quant à elles, ne peuvent pas changer de direction aussi rapidement et aisément pour suivre le flux d'air et se heurtent plutôt sur les parois du nez, de la trachée ou des bronches centrales (Figure 3). Extrapolé de la littérature chez les humains, les particules de taille inférieure ou égale à $5 \mu\text{m}$ peuvent se rendre aux voies périphériques des chevaux. Ce sont les particules de la fraction respirable qui s'avèrent être les plus pertinentes pour la santé (17). De plus, les particules de petites tailles restent suspendues dans l'air plus longtemps (65), par exemple un spore d'actinomyète nécessite plus de 24 h pour descendre de 1 mètre en absence de mouvements d'air importants (74). Il

n'est donc pas surprenant d'apprendre que l'air d'une écurie est dominée par la présence de particules respirables (75). Un cheval atteint de maladie pulmonaire chronique présentant une bronchoconstriction, de l'inflammation pulmonaire et une production excessive de mucus a une déposition de particules plus importante dans les voies respiratoires centrales par rapport aux voies périphériques (64). Ces mécanismes de protection sont également présents chez les chevaux sains, mais sont exagérés chez les chevaux atteints de maladie respiratoire, et pourtant n'empêchent pas le développement de signes cliniques.

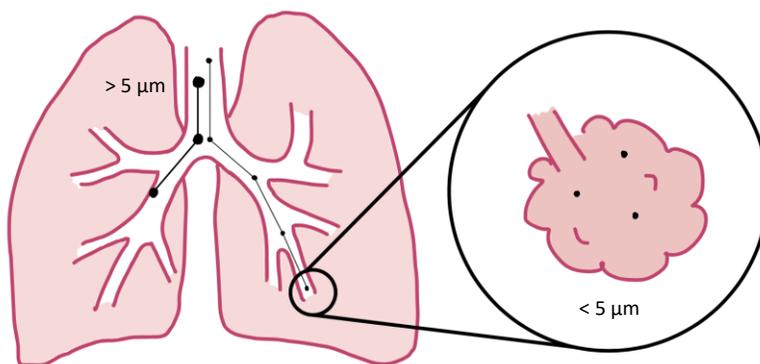


Figure 3. Devenir des particules dans l'arbre bronchique en fonction de leur taille.

Les particules inhalables de taille supérieure à 5 µm ne suivent pas aisément les changements de direction du flux d'air et se heurtent sur les parois des voies respiratoires supérieures ou inférieures centrales. Les particules de taille inférieure à 5 µm (particules respirables), quant à elles, suivent le flux d'air et peuvent atteindre les voies respiratoires périphériques, y compris les alvéoles. Adapté de Clarke et al., 1987 dans Horse Management (64).

Le concept de « rétention » décrit la quantité d'agents pathogènes actifs inhalés présentes à un temps x dans les voies respiratoires (74). Bien que toutes les particules ne soient pas nécessairement pathogènes, ce concept pourrait s'appliquer à toutes les particules inhalées lorsqu'il est question d'un cheval présentant de l'hyperréactivité bronchique. Nécessairement, plus la concentration en particules inhalées est élevée, plus cette rétention est importante. L'apport en particules inhalées est également influencé par le flux d'air respiré, le volume courant, les pauses respiratoires ainsi que les variations régionales des fonctions pulmonaires. Ce concept simple s'avère important lorsque qu'il est question de la régie d'un cheval prédisposé aux affections respiratoires chroniques telles que l'asthme.

Ce sont les concentrations en particules dans l'aire respiratoire autour des naseaux, en comparaison à l'environnement du box, qui sont les plus importantes à considérer (17, 19). La neutrophilie pulmonaire est positivement corrélée à la quantité de poussières respirables dans l'aire respiratoire du cheval (17). Lorsque la ventilation dans l'écurie est adéquate, la mesure de la concentration en poussières au niveau

du box sous-estime la concentration dans l'aire respiratoire, surtout en présence d'un environnement hautement antigénique (71). Il a d'ailleurs été montré que la concentration en particules respirables était supérieure dans l'aire respiratoire qu'ailleurs dans l'écurie (76). Quoi qu'il en soit, la concentration en poussières respirables dans l'aire respiratoire est sujette à une variation individuelle, fort probablement reliée au comportement (76). On ne peut donc pas assumer que cette concentration sera similaire pour différents chevaux maintenus dans un même environnement.

1.5.1.1 Les différentes sources de foin et de litière

Plusieurs études se sont attardées à la comparaison de différentes régies sur les signes cliniques, la fonction et l'inflammation pulmonaires chez les chevaux. La quantité de poussière à laquelle un cheval est exposé en étant logé à l'intérieur sur paille avec du foin est suffisante pour causer une inflammation pulmonaire neutrophilique transitoire chez les chevaux sains, sans signes cliniques associés (77). Le pâturage demeure la meilleure option pour les chevaux atteints d'asthme sévère. Non seulement cet environnement procure la moins forte concentration en particules respirables (78) et en endotoxines (78, 79), mais il permet également une amélioration ou une normalisation des mécaniques respiratoires (62, 63, 66-70, 80), élimine l'hyperréactivité bronchique (67) et améliore les signes cliniques observés chez les chevaux asthmatiques sévères (18). L'inflammation pulmonaire tend à se normaliser mais l'effet varie selon les études et la durée de l'exposition. Quelques études ont obtenu un pourcentage de neutrophiles pulmonaires environnant les 5% suivant trois (70, 80) ou six mois (63) de maintien au pâturage, toutefois plusieurs autres études ont montré une diminution de l'inflammation pulmonaire sans toutefois que la neutrophilie ne descende sous 5 ou 10% (68, 69, 81). Une obstruction périphérique des voies respiratoires perdure toutefois malgré un maintien prolongé, en terme d'années, au pâturage sans accès au foin (68). Cette obstruction pourrait entre autres être secondaire à un bronchospasme résiduel, au remodelage péribronchique et à un certain degré d'inflammation persistante (16, 63, 70).

C'est la nourriture qui a la plus grande influence sur la quantité de poussières respirables à laquelle le cheval est exposé autour de ses naseaux (82-84). De manière générale, les études s'entendent pour dire que le foin, surtout de mauvaise qualité, dégage plus de poussière totale et respirable, et devrait être remplacé par des substituts moins poussiéreux (71, 78, 82, 83). En effet, un foin de mauvaise qualité produit environ 10 fois plus de poussières respirables qu'un foin de bonne qualité, et ce dernier demeure tout de même plus poussiéreux que les pellets de luzerne et l'ensilage d'herbe (*grass silage*) (83). L'évaluation visuelle du foin n'est pas suffisante car même un foin semblant être de bonne qualité contiendra des moisissures et des bactéries (85, 86). Quant aux litières, les copeaux de bois sont

généralement moins poussiéreux que la paille (71, 78, 82), mais il existe une grande variabilité entre les différents lots de litière (42, 83). D'autres alternatives aux copeaux de bois sont la litière de carton et de papier (38, 69).

In vivo, une amélioration de la fonction pulmonaire, à ne pas confondre avec une normalisation, et des signes cliniques des chevaux atteints d'asthme est observée avec des copeaux de bois et des pellets (62, 87), et avec de la litière papier et de la moulée cubée (88). Les pellets permettent également une amélioration de la neutrophilie pulmonaire dès 65 jours d'exposition (87). Pour les chevaux en rémission d'asthme, les copeaux de bois et l'ensilage de foin ou la litière de carton et l'ensilage d'herbe permettent de maintenir la rémission (66, 67, 69).

Les alternatives au foin et à la paille permettent aussi de réduire les endotoxines dans l'environnement, d'ailleurs la concentration en endotoxines est corrélée avec la concentration en poussières totales au tour des naseaux (19, 78, 84). Les endotoxines dans l'aire respiratoire sont environ huit fois plus concentrées dans un box avec paille et foin par rapport au pâturage (79). Un système de régie moins poussiéreux (box bien ventilé, copeaux de bois et ensilage de foin) procure une concentration en endotoxines similaire à celle retrouvée au pâturage (78). La concentration en endotoxines est majoritairement influencée par le type de fourrage, mais aussi par le type de litière (84).

L'utilisation d'un filet à foin augmente significativement les concentrations en particules inhalables et respirables et en endotoxines dans l'aire respiratoire par rapport à un cheval nourri au sol, et favorise le développement d'inflammation pulmonaire éosinophilique (19, 76). Des résultats divergents quant à la fraction respirable et à la concentration en endotoxines ont par contre été obtenus dans une autre étude (17). Toutefois, dans cette dernière étude, les filets à foin étaient suspendus à l'extérieur du box des chevaux, ce qui pourrait entre autres diminuer la proximité entre les naseaux et le foin.

Le trempage du foin est une pratique fréquemment utilisée par les propriétaires afin d'augmenter les propriétés hygiéniques de celui-ci. Ce procédé permet de réduire de plus de 90% le nombre de particules de taille inférieure à 5 µm (respirables) dans le foin après un trempage de 10 ou 30 minutes (65, 86, 89), et tend à réduire sa concentration en endotoxines et en moisissures respirables (84, 85, 89). *In vivo*, le trempage du foin permet de réduire de plus de la moitié cette concentration en poussières respirables autour des naseaux (73). Toutefois, le procédé de trempage cause une perte de nutriments dans le foin après seulement 30 minutes de trempage (65) et mène à une augmentation de la charge bactérienne du foin (85, 89). Malgré ces effets qui diminuent potentiellement la qualité hygiénique du foin, offrir du foin

trempe pour 45 minutes à des chevaux atteints d'asthme sévère permet une amélioration des scores cliniques et des mécaniques respiratoires (Westerfeld *et al.*, Effects of soaked hay on lung function and inflammation in horses with severe asthma, Veterinary Comparative Respiratory Society, décembre 2020).

Le procédé de pasteurisation du foin (*hay steaming*) permet d'augmenter la qualité hygiénique du foin en réduisant la quantité de bactéries viables et de moisissures (81, 85, 86, 89, 90), les concentrations en endotoxines dans l'aire respiratoire des chevaux (81) et les particules respirables se dégageant du foin (65, 86, 89). Le foin pasteurisé a l'avantage de conserver les nutriments contenus dans le foin par rapport au foin trempé (65, 86). Orard *et al.* remettent en doute l'efficacité de ce traitement en montrant que sa concentration en poussières respirables n'est pas différente de celle du foin sec et en montrant que le foin pasteurisé induit une inflammation pulmonaire neutrophilique chez les chevaux atteints d'asthme sévère (81). Un autre procédé de transformation permettant théoriquement de diminuer la poussière et les spores se dégageant du foin est le système Nutri-Foin[®], qui mélange de l'huile de soya au foin. Le Nutri-Foin[®] a une efficacité similaire aux pellets de luzerne chez des chevaux atteints d'asthme sévère, permettant une amélioration des fonctions pulmonaires, de la neutrophilie pulmonaire et des scores de mucus trachéaux (87). Malgré l'amélioration de ces paramètres, peu se sont normalisés après trois mois de traitement (Nutri-Foin[®] ou pellets).

1.5.1.2 Les effets de l'activité dans l'écurie sur la remise en suspension des particules

Il s'avère pertinent de garder un cheval asthmatique à distance des aires plus mouvementées de l'écurie, tout en s'assurant que ce box soit bien ventilé et soit localisé à distance des réserves de foin et de litière. Il est recommandé de sortir le cheval de son box lorsque ce dernier est nettoyé et que de la nouvelle litière est ajoutée (64, 72, 73, 75). En effet, la concentration en poussières inhalables dans l'air peut augmenter de trois à six fois la concentration normale dans ces conditions (72). Il a été montré que le nettoyage d'un box influence la concentration en particules respirables dans les boxes adjacents (73), suggérant qu'il faut également faire attention au choix de litière et de fourrage des autres chevaux de l'écurie, et non seulement de ceux atteints d'asthme. D'ailleurs, les concentrations en particules totales sont positivement corrélées avec le nombre de chevaux logés dans l'écurie durant l'hiver (91). Une étude a toutefois montré que le changement de régie seulement pour le box du cheval prédisposé est suffisant pour améliorer la fonction pulmonaire (62), par contre il est probablement juste de dire que l'amélioration de la fonction sera d'autant plus favorisée si l'environnement global de l'écurie est moins poussiéreux.

1.5.1.3 La clairance des particules dans l'air

La clairance de particules dans l'air est influencée par plusieurs facteurs dont la sédimentation des particules et la respiration du cheval, mais la majeure partie de cette clairance est fournie par la ventilation dans le box et dans l'écurie (74). Comme mentionné précédemment, les particules de petite taille comme les spores et les bactéries prennent beaucoup de temps à sédimenter dans des conditions calmes. La ventilation constitue ainsi le meilleur moyen d'éliminer ces particules de l'air de l'écurie (72, 74). La ventilation dépend beaucoup de la conception de l'écurie, mais, en règle générale, il faudrait viser un minimum de quatre changements d'air par heure (72). Cependant, le type de construction influence plus la concentration en particules inhalables que respirables (17). Une ventilation trop faible, en plus de diminuer la clairance des antigènes en suspension, mène à la stagnation de l'air, augmente la température ambiante ainsi que l'humidité et la condensation et favorise ainsi la prolifération de moisissures et de bactéries (64). Maintenir les portes de l'écurie ouvertes permet de diminuer la concentration en particules dans l'air de l'écurie (76, 91).

1.5.2 Médication

Cette section aborde les deux traitements médicaux les plus fréquemment instaurés chez les chevaux atteints d'asthme, soit les corticostéroïdes et les bronchodilatateurs. Les antibiotiques seront aussi abordés en raison de leur utilisation fréquente en première ligne avant qu'un diagnostic d'asthme soit posé.

1.5.2.1 Corticostéroïdes

Les glucocorticostéroïdes sont utilisés afin d'accélérer l'amélioration des signes cliniques et de l'obstruction pulmonaire. Ces anti-inflammatoires stéroïdiens diminuent l'expression de cytokines et autres facteurs inflammatoires, et augmentent l'expression de médiateurs anti-inflammatoires (92). Il sera ici seulement question des molécules les plus fréquemment utilisées. Pour de plus amples informations, une synthèse sur l'utilisation de glucocorticoïdes chez les chevaux atteints d'asthme a été publiée récemment (93).

La possibilité que les corticostéroïdes causent des effets adverses systémiques est évaluée par la suppression de l'axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien (axe HHS), mesurée en dosant le cortisol ou l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) sériques ou en évaluant la réponse à une administration d'ACTH. Ces effets, malgré que rarement rapportés, comprennent une prédisposition aux infections, de la fourbure (surtout chez les individus déjà prédisposés), de la polyurie et polydipsie, une guérison retardée, de l'hyperglycémie, une hépatopathie, une fonte musculaire, etc. (92). Pour les corticostéroïdes administrés

par voie systémique, le plus efficace est souvent celui qui a le potentiel de causer le plus d'effets adverses alors que celui qui montre peu de suppression de l'axe HHS est souvent aussi moins efficace.

Il est recommandé d'utiliser, lorsque possible, des corticostéroïdes à action locale plutôt que systémique afin de limiter leurs potentiels effets adverses (92). Dans le cas de chevaux atteints d'asthme, c'est la voie par inhalation qui permet une action plus locale. La ciclésionide (via l'Aservo EquiHaler[®]), une pro-drogue homologuée pour le traitement de l'asthme équin, permet une amélioration des fonctions pulmonaires et du score clinique des chevaux atteints d'asthme sévère gardés dans un environnement hautement antigénique en 7 jours (94). Un grand avantage de la ciclésionide est qu'elle ne cause pas de suppression de l'axe HHS et serait donc associée à peu d'effets adverses. La ciclésionide s'est aussi avérée efficace sur le terrain, permettant une amélioration de la clinique chez la plupart des chevaux traités, surtout ceux présentant initialement des signes sévères (95). La fluticasone, le budésônide et la béclo méthasone inhalés permettent une amélioration des fonctions pulmonaires, mais causent une suppression de l'axe HHS (63, 80, 92, 96-100). La dexaméthasone nébulisée n'est pas efficace pour améliorer les fonctions pulmonaires et supprime tout de même l'axe HHS chez les chevaux asthmatiques (101, 102).

Chez les chevaux ne répondant pas aux corticostéroïdes inhalés, ou pour une raison budgétaire, des corticostéroïdes systémiques sont souvent administrés. Ces derniers permettent une amélioration habituellement plus importante et plus rapide que les corticostéroïdes inhalés (93). La dexaméthasone est très puissante et son administration orale permet une amélioration rapide des fonctions pulmonaires et de la clinique des chevaux, même sans changement environnemental en parallèle (< 3-7 jours) (94, 103). La dexaméthasone engendre toutefois une suppression de l'axe HHS. La prednisone n'améliore pas les mécaniques pulmonaires de chevaux atteints d'asthme sévère et n'accélère pas leur normalisation (62), possiblement dû à sa biodisponibilité orale limitée et sa faible biotransformation en prednisolone chez cette espèce (92). La dexaméthasone est plus efficace que la prednisolone orale et ces deux traitements causent une suppression de l'axe HHS (103).

Combiner l'administration de corticostéroïdes à un changement de régime permet d'accélérer l'amélioration des fonctions et du remodelage pulmonaires (63). Les corticostéroïdes n'ont cependant peu ou pas d'effet sur la neutrophilie pulmonaire (3, 93). Chez les humains, les individus atteints d'asthme neutrophilique nécessitent souvent de plus fortes doses de glucocorticoïdes que les ceux présentant d'autres phénotypes inflammatoires. Hirsch *et al.* ont toutefois montré que les neutrophiles, humains comme équins, sont sensibles aux corticostéroïdes (104).

1.5.2.2 Bronchodilatateurs

Les bronchodilatateurs sont utilisés comme drogue de secours lors des crises d'exacerbation, pour augmenter la déposition pulmonaire des corticostéroïdes inhalés et pour indirectement faciliter la clairance mucociliaire (3, 16). De manière générale, les bronchodilatateurs agissent rapidement mais pour une courte durée. Ils ne devraient pas être utilisés comme monothérapie et sont plus efficaces lorsque combinés à un corticostéroïde (3).

Deux types de bronchodilatateurs sont plus fréquemment utilisés : les agonistes β_2 adrénergiques et les agents parasympatholytiques/anticholinergiques (16). L'albutérol, le salmétérol et le clenbutérol sont des agonistes β_2 adrénergiques. Le clenbutérol est le seul bronchodilatateur homologué pour le traitement de l'asthme équin (16). L'administration d'albutérol (salbutamol, Ventolin[®]) en inhalable permet une amélioration des fonctions pulmonaires des chevaux en exacerbation (105). Le salmétérol, un agoniste β_2 adrénergique à longue action, administré seul par nébulisation permet une amélioration temporaire des fonctions pulmonaires, mais sa combinaison avec un corticostéroïde est nécessaire pour éviter la régulation à la baisse des récepteurs β_2 adrénergiques (80). La combinaison fluticasone/salmétérol (Advair[®]) en inhalable permet une normalisation de la résistance et de l'élastance pulmonaires en une semaine de traitement, et permet une diminution de la neutrophilie pulmonaire en huit semaines chez les chevaux atteints d'asthme sévère initialement en exacerbation (80).

L'atropine et le butylscopolamine (Buscopan[®]) sont des agents parasympatholytiques qui permettent une amélioration rapide et de courte durée des fonctions pulmonaires des chevaux en exacerbation (48, 106, 107). L'atropine peut toutefois causer des effets adverses tel l'iléus, alors que l'utilisation du butylscopolamine est plus sécuritaire (48). Le butylscopolamine et l'atropine sont surtout utilisés dans le contexte de la recherche afin de documenter la réversibilité de l'obstruction respiratoire et afin d'évaluer la présence d'un bronchospasme résiduel chez les chevaux atteints d'asthme.

1.5.2.3 Antibiotiques

Malgré l'étiologie non infectieuse de l'asthme, tant équin qu'humain, l'identification d'une dysbiose chez les individus atteints ([Chapitre 2](#)) suggère que l'ajout d'un antibiotique au plan de traitement pourrait s'avérer bénéfique. Les études s'avèrent minime sur ce sujet chez les chevaux, et de plus amples recherches s'avèrent nécessaires avant de se positionner sur l'utilité de l'ajout d'un tel traitement aux traitements médicaux conventionnels. L'addition d'un traitement antibiotique de ceftiofur au traitement standard (modification environnementale, corticostéroïde et bronchodilatateur) n'a pas mené à une plus grande amélioration que le traitement standard seul (108). Un traitement de dix jours d'azithromycine

seul n'a montré aucun effet sur la neutrophilie pulmonaire de chevaux atteints d'asthme sévère, mais occasionne une diminution de l'expression génique d'interleukine-8, suggérant que l'effet immunomodulateur de cet antibiotique est insuffisant pour mener à une amélioration, du moins pas à si court terme (109). Une tendance à l'augmentation de la charge et de la diversité bactériennes en culture sur lavage trachéal est observée chez les chevaux ayant préalablement reçu un traitement antibiotique, effet à ne pas négliger lorsqu'un tel traitement est instauré (108). Pour le moment, les antibiotiques ne semblent pas bénéfiques chez les chevaux atteints d'asthme sans évidence de surinfection. Chez les humains toutefois, certaines études semblent appuyer leur utilisation chez les sujets atteints d'asthme sévère (voir [section 2.4.1](#)).

Chapitre 2 – Microbiote/microbiome

2.1 Notions générales sur le microbiote et le microbiome

Le microbiote consiste en l'ensemble des microorganismes (bactéries, virus, fongis, archées, etc.) formant une communauté en un lieu alors que le microbiome consiste en l'ensemble des gènes de cette communauté (110). Le terme « microbiote » devrait être employé lorsqu'il est question d'une étude taxonomique même si le séquençage est impliqué, alors que le terme « microbiome » devrait être réservé pour les études s'attardant au matériel génétique en entier, soit les méta-génomiques (111). L'étude du microbiote et du microbiome, tant dans l'homéostasie que dans la pathologie, a pris de l'importance au cours des dernières années avec le développement de techniques permettant la détection de faibles quantités de matériel génétique. La complexité et la variabilité entre les individus, et même au sein d'un même individu dans le temps, ne facilite pas sa caractérisation (112). La culture a longtemps été utilisée pour caractériser les microbiotes, autrefois nommés « flores bactériennes », toutefois cette technique présente plusieurs limites, notamment en favorisant la détection de bactéries qui croissent bien dans les milieux et conditions de culture standard et en étant très limitée pour les microorganismes autres que les bactéries (111). De nouvelles technologies offrant de meilleures sensibilité et spécificité remplacent la culture traditionnelle. Dans le présent chapitre, par défaut le terme « microbiote » fera référence au microbiote bactérien.

Le gène codant pour l'acide ribonucléique 16S (*ARNr 16S*) code pour la sous-unité 30S des ribosomes procaryotes bactériens et est ainsi retrouvé seulement chez ces microorganismes. Ce gène est hautement conservé entre les différentes espèces bactériennes. Une amplification PCR utilisant des amorces liant les régions hautement conservées de ce gène suivi du séquençage des régions hypervariables, technique appelée séquençage de nouvelle génération (*next-generation sequencing*, NGS) ou séquençage haut débit, est à la base des méthodes d'analyse qui ont révolutionné l'étude du microbiote. Contrairement au séquençage Sanger, le NGS permet de séquencer plusieurs brins en parallèle et permet donc un plus grand volume d'analyse (111). Il faut toutefois garder en tête que la détection PCR ne permet pas de différencier les microorganismes vivants des morts, et de leurs fragments d'ADN. Lorsqu'un microorganisme précis est recherché, l'utilisation de la PCR ou du qPCR s'avère la technique de choix. D'autres techniques permettant la caractérisation du microbiome, telles que les analyses méta-transcriptomiques ou méta-protéomiques, permettant la détection d'ARNm ou des protéines bactériennes respectivement, ne seront pas abordés dans le présent mémoire (111).

Le terme « unité taxonomique opérationnelle » (*operational taxonomic unit*, OTU), utilisé à quelques reprises dans ce mémoire, correspond à un regroupement de séquences spécifiques fortement similaires (habituellement au-dessus de 97% d'homologie), et lorsque ces séquences sont comparées aux gènes de référence, elles permettent généralement une identification de microorganismes au taxon espèce (111, 113). Des revues des termes permettant de décrire le microbiote d'un individu ou d'une région anatomique, décrits ici comme la communauté, sont disponibles pour ceux souhaitant approfondir ce sujet (110, 111, 113, 114).

2.2 Notions générales sur le microbiote respiratoire

L'étude du microbiote pulmonaire est compliquée par la faible biomasse présente dans cet organe. En effet, les poumons de sujets sains ont été considérés comme étant stériles jusqu'à récemment, et ont d'ailleurs été exclus de la première mouture du *Human Microbiome Project*, en 2008, visant la caractérisation du microbiote de 18 régions anatomiques du corps humain (115). Hilty *et al.*, en 2010, ont publié le premier article ayant recours au NGS afin de caractériser le microbiote pulmonaire chez des individus sains, atteints d'asthme ou atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) et ont démontré que les voies respiratoires inférieures ne sont pas stériles, même chez les sujets sains (13). La faible charge en microorganismes de cet organe et la surreprésentation de l'ADN de l'hôte par rapport à l'ADN bactérien expliquent cette découverte tardive. Depuis, plusieurs techniques ont été décrites, allant de la collecte des échantillons à l'analyse bio-informatique des données, afin d'optimiser la détection de matériel génique et d'assurer la fiabilité des résultats lorsqu'il est question d'échantillons à faible biomasse (116). Par exemple, chez les chevaux, une gaine protectrice peut être utilisée lors du prélèvement de lavages bronchoalvéolaires afin de réduire la contamination de l'échantillon par le microbiote des voies respiratoires supérieures (117).

La venue de méthodes indépendantes de la culture pour la caractérisation du microbiote pulmonaire a permis de revisiter les termes « agent pathogène respiratoire » et « infection » (118). En ce sens, plusieurs microorganismes isolés des voies respiratoires inférieures en culture étaient nécessairement considérés comme des agents pathogènes, alors que leur récente identification à l'aide d'une méthode indépendante de la culture permet parfois leur reconnaissance également chez des sujets sains. Ainsi, pour certains microorganismes, l'induction de pathologie va au-delà de la présence seule, et pourrait être dû entre autres à une variation dans la quantité absolue, à une variation dans leur abondance relative par rapport aux autres espèces, à la souche bactérienne et ses facteurs de virulence, ou aux conditions de l'environnement pulmonaire influençant l'homéostasie (118). L'interaction de l'hôte avec des

microorganismes commensaux est plus complexe et dynamique que celle avec des agents pathogènes primaires. Dans certain cas, le terme « amphibiont », décrivant une interaction parfois pathogénique, parfois symbiotique dépendamment des circonstances entre une bactérie et son hôte, s'applique mieux (112). Il est plus approprié de comparer les caractéristiques décrivant les communautés dans leur ensemble afin de déterminer une certaine causalité (112). Le terme « dysbiose » décrit un changement dans la structure du microbiote normal, souvent secondairement à des facteurs externes comme un traitement antibiotique ou même le statut de santé (112). Il peut toutefois exister plusieurs degrés de dysbiose séparant le poumon sain du poumon atteint d'une infection, et c'est dans ce spectre de dysbiose que pourrait se retrouver les maladies non infectieuses telles l'asthme et la fibrose kystique (118). Il existe plusieurs variations, mais, de manière générale, la littérature semble soutenir que la santé est associée à un microbiote diverse (119).

Le microbiote pulmonaire est dynamique et est influencé par l'apport en microorganismes en provenance de l'environnement et des voies respiratoires supérieures, leur élimination, leur croissance au niveau des poumons et les conditions locales comme la température, le pH, les nutriments, la tension en oxygène, etc. (120).

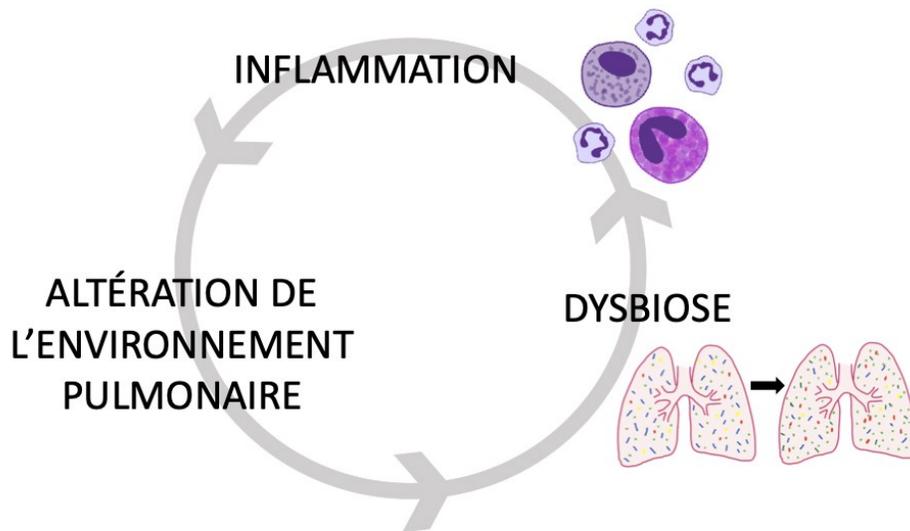


Figure 4. Cercle vicieux impliquant l'inflammation et la dysbiose des voies respiratoires inférieures.

L'exposition d'un sujet prédisposé à un déclencheur pourrait induire le développement d'inflammation locale ou d'une dysbiose et déclencher ce cercle vicieux. Ce cycle s'amplifiant lui-même justifie la proposition que les crises d'exacerbation d'asthme coïncident avec les épisodes de dysbiose pulmonaires (120). Adapté de Dickson et al., 2014.

2.3 Microbiote bactérien respiratoire et l'asthme équin

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) et le qPCR ont permis la caractérisation du microbiote respiratoire de chevaux et d'ânes sains (121, 122) et de chevaux atteints d'asthme léger à modéré (4, 33, 34) ou sévère (11). Les quatre phyla les plus abondants dans les voies respiratoires des équidés, indépendamment du statut de santé, sont les Protéobactéries, les Actinobactéries, les Firmicutes et les Bactéroidetes (4, 34, 122). Selon les études, les familles *Moraxellaceae* et *Bacillaceae* et les genres *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Sphingomonas* et *Pantoea* sont les plus abondants dans les voies respiratoires (4, 121, 122). Les voies respiratoires supérieures sont plus riches (la richesse correspond au nombre de taxa différents compris dans une communauté) que les voies respiratoires inférieures, et les communautés diffèrent entre ces deux régions anatomiques (4, 11, 121). Lorsque la culture (identification morphologique et biochimique) est employée pour analyser le microbiote des voies respiratoires supérieures (nez ou nasopharynx) de chevaux sains ou avec maladie respiratoire, les genres prédominants sont *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. et *Pantoea* spp. (123, 124). *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* est fréquemment isolé du nez et de la trachée dans les deux groupes, et *S. equi* subsp. *zooepidemicus* et *Nicoletella semolina* croissent plus fortement dans la trachée de chevaux avec atteinte respiratoire (124).

S. equi subsp. *zooepidemicus* (38) et *Pasteurella/Actinobacillus* spp. (5-8, 10, 33, 125) sont les bactéries les plus fréquemment associées avec de l'inflammation respiratoire, en culture pure ou mixte. Les *Pasteurellaceae*, dont *Pasteurella* spp. et *Actinobacillus* spp., seront détaillés dans la section [3.5.2 Les Pasteurellaceae et l'asthme équin](#). Lorsque la culture sur lavage trachéal révèle la présence de ces bactéries spécifiques, les jeunes chevaux sont deux fois plus à risque de présenter de l'inflammation trachéale (6, 8). Des associations positives entre la quantité de bactéries retrouvées en culture et le degré d'inflammation (6, 7, 38), la présence de toux (10) ou le risque qu'un diagnostic d'inflammation respiratoire soit posé (5, 8) sont observées. Une croissance plus importante sur lavage bronchoalvéolaire est également observée chez les chevaux présentant une forte intolérance à l'exercice (44). Étonnamment, la charge bactérienne retrouvée dans la trachée, lorsqu'évaluée par qPCR, est inférieure chez les chevaux atteints d'asthme modéré par rapport aux chevaux sains dans une étude (33). *S. pneumoniae* est aussi associé avec l'inflammation des voies respiratoires inférieures, mais majoritairement chez de jeunes chevaux (5-8). *Mycoplasma equirhinis* (8), *Mycoplasma felis*, un *Streptococcus* non hémolytique (5) et d'autres espèces du genre *Streptococcus* ainsi que *Bordetella bronchiseptica* (10) sont associés à la condition, mais de façon variable dans les différentes études. L'inhalation d'extraits de la bactérie *Micropolyspora faeni* (maintenant *Saccharopolyspora rectivirgula*)

induit une neutrophilie pulmonaire chez les chevaux atteints d'asthme sévère (31). Une certaine immunisation envers les bactéries reliées à la pathologie se développant avec l'âge est suspectée puisque les jeunes chevaux sont plus à risque de développer de l'inflammation des voies respiratoires inférieures (5-8, 38). Toutefois, sans tenir compte de l'âge, la plupart des chevaux étant atteints d'inflammation des voies respiratoires inférieures présentent une culture trachéale positive, suggérant une composante bactérienne commune (7). Ceci n'a toutefois pas été observé dans l'étude de Dauvillier *et al.* (32), et entre 4 et 58 % des lavages trachéaux de chevaux atteints d'inflammation des voies respiratoires inférieures montrent une croissance bactérienne limitée ou nulle (8, 10). Il faut toutefois garder en tête que dans la plupart des études basées sur de grandes cohortes, le diagnostic d'asthme est basé sur les signes cliniques, avec ou sans inflammation trachéale. Aussi, l'utilisation de la culture n'est pas la méthode la plus sensible ni spécifique pour la caractérisation du microbiote respiratoire, c'est donc pourquoi les études plus récentes se tournent vers des méthodes indépendantes de la culture. Par exemple, la PCR permet l'identification de bactéries dans un plus grand nombre d'échantillons respiratoires que la culture (15, 33, 126, 127).

Alors que le microbiote des voies respiratoires supérieures (nasopharynx/oral/nasal) des chevaux atteints d'asthme s'avère similaire à celui des chevaux sains, une dysbiose respiratoire inférieure est observée à l'aide du séquençage de nouvelle génération chez les chevaux atteints d'asthme (4, 11). En effet, dans les formes légères à modérées, la structure du microbiote des voies respiratoires inférieures (trachée dans cette étude) diffère selon le statut de santé des chevaux et est influencée par une variation dans l'abondance relative de six OTUs (4). Entre autres, l'abondance relative du genre *Streptococcus* spp. est plus élevée chez les chevaux atteints d'asthme. Toutefois, dans cette étude, les chevaux ont été qualifiés comme sains seulement sur la base d'une cytologie normale sur lavage bronchoalvéolaire, alors que tous avaient un historique de toux. La différence entre les communautés pulmonaires des chevaux sains et atteints d'asthme sévère est plus importante lorsque ces derniers présentent de l'inflammation pulmonaire et une obstruction respiratoire (11). Aucune OTU particulière n'est associée avec le statut de santé, mais une tendance à la surreprésentation de la famille *Pasteurellaceae* est observée chez les chevaux atteints d'asthme sévère. Les microbiotes oral, nasal et pulmonaire sont influencés par l'environnement dans lequel le cheval réside, et cette influence sur le microbiote pulmonaire est d'autant plus forte chez les chevaux sains, suggérant que le statut de santé a une influence plus importante que l'environnement (11).

L'administration parentérale de dexaméthasone altère le microbiote bactérien des voies respiratoires inférieures des chevaux, sains comme atteints d'asthme (4). En effet, ce traitement a mené à une modification de la structure des communautés en affectant l'abondance relative de 11 OTUs, dont une augmentation de *Streptococcus* spp. Ainsi, ce traitement pourrait favoriser la surcroissance de genres bactériens entretenant l'inflammation, menant à une persistance de la neutrophilie pulmonaire ou favorisant les rechutes suite à l'arrêt des traitements. Un traitement de dexaméthasone nébulisée, quant à lui, n'affecte pas le microbiote bactérien des voies respiratoires inférieures (34).

2.4 Microbiote bactérien respiratoire et l'asthme chez l'humain

Cette section n'est pas une revue complète de la littérature du microbiote respiratoire et de l'asthme chez les humains. Son but est de fournir une base permettant de faire des comparaisons avec l'espèce équine.

Le microbiote pulmonaire des individus sains est dominé par les phyla Bactéroidetes, Firmicutes et Protéobactérie, et par les genres *Prevotella*, *Veillonella*, *Streptococcus* et *Pseudomonas* (résumé par (118)). Chez les individus atteints d'asthme, une dysbiose est observée par rapport aux sujets sains et plusieurs études rapportent une augmentation de l'abondance relative du phylum des Protéobactéries, majoritairement résultant d'une augmentation relative des genres *Haemophilus*, *Moraxella* et *Neisseria* (13, 14, 128). Plusieurs familles appartenant à ce phylum ont d'ailleurs été associées à l'hyperréactivité bronchique chez des patients atteints d'asthme difficilement contrôlable (12), à une détérioration et une instabilité du score du *Asthma Control Questionnaire* (ACQ) (128, 129) et à l'expression de gènes associés à la voie des Th17 (128). *Haemophilus influenzae* est le microorganisme le plus fréquemment détecté, seul ou en combinaison, chez les patients en exacerbation aiguë d'asthme bronchique (15). Une fois l'exacerbation résolue, cette bactérie n'est plus retrouvée chez plusieurs patients, appuyant soit un rôle causal de la bactérie ou une surcroissance secondaire à l'environnement inflammatoire. L'observation d'une association entre l'identification d'*H. influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Moraxella catarrhalis* dans le nasopharynx de nouveau-nés et le développement d'asthme juvénile appuie aussi l'implication de la dysbiose dans l'induction de la maladie (130). Une étude n'a pas observé de microbiome altéré chez les sujets atteints d'asthme (131).

Tout comme chez les chevaux, il existe différents phénotypes inflammatoires d'asthme chez les humains, à savoir les phénotypes éosinophilique, non éosinophilique (neutrophilique, pauci-granulocytaire) et mixte. Les phénotypes non éosinophiliques sont associés à une moins bonne réponse aux traitements conventionnels (132). Le mécanisme immunitaire menant à l'asthme de phénotype éosinophilique implique la voie de signalisation T helper 2 (Th2) (résumé par (133)). Les cytokines interleukine 5 (IL-5) et

IL-13, associées à cette voie de signalisation, sont positivement corrélées à l'éosinophilie chez ces sujets (134). La plupart des études ne rapportent aucune dysbiose bactérienne spécifique ni association entre le microbiote et les marqueurs inflammatoires de la voie Th2 chez les patients atteints d'asthme éosinophilique, contrairement au phénotype neutrophilique (128, 135). Une étude a toutefois montré que l'éosinophilie sur sputum et les concentrations en IL-13 sont faiblement mais significativement corrélés aux charges en *Porphyromonas pasteri* et *Veillonella rogosae* (134). Certains genres bactériens, comme par exemple *Streptococcus* spp. et *Neisseria* spp., sont plus abondants chez les patients atteints d'asthme éosinophilique par rapport aux autres phénotypes inflammatoires, sans toutefois que l'éosinophilie sur sputum soit corrélée à la composition du microbiote (134, 135).

Le développement de la neutrophilie pulmonaire dans l'asthme pourrait être secondaire à l'activation des voies de signalisation Th1 ou Th17 plutôt que Th2 (128, 136). Le microbiote semble aussi associé à ce phénotype inflammatoire, d'ailleurs la proportion en neutrophiles dans le sputum représenterait le plus fort prédicteur de la composition du microbiote (135). Les individus atteints d'asthme neutrophilique présentent une communauté pulmonaire distincte, moins riche et moins diverse, des autres phénotypes inflammatoires (128, 135, 137, 138). Ce changement dans la diversité est probablement secondaire à une hausse de l'abondance relative du phylum des Protéobactéries, plus spécifiquement *Haemophilus* spp. et *Moraxella* spp. (135, 137, 138). Toutefois, en contrôlant pour la surreprésentation de ces genres, une dysbiose est tout de même identifiée dans le sputum de ces sujets (135). *Haemophilus* spp., *Streptococcus* spp. et surtout *M. catarrhalis* sont associés à la neutrophilie sur sputum, à la concentration en interleukine 8 et sont surreprésentés chez les sujets atteints d'asthme résistant aux traitements (136). Le système immunitaire inné pourrait aussi être impliqué dans le développement de l'asthme neutrophilique, en effet on retrouve chez ces individus une plus forte expression de certains récepteurs (TLR2, TLR4 et CD14) et cytokines (IL-8 et IL-1 β) associés à ce type de réponse immune (30). L'activation du système immunitaire inné pourrait faire suite à une activation par les LPS ou par une colonisation bactérienne chronique.

En résumé, la dysbiose pulmonaire observée chez les patients atteints d'asthme pourrait être secondaire au microenvironnement occasionné par l'inflammation et le remodelage tissulaire, mais elle pourrait peut-être aussi avoir un lien dans les crises d'exacerbation ou même dans le développement de certains types d'asthme. La causalité n'est pas simple à démontrer, mais les données semblent pointer de plus en plus vers une certaine implication du microbiote bactérien pulmonaire dans la pathogénie de l'asthme. Dickson *et al.* proposent d'ailleurs que les crises d'exacerbation correspondent à des épisodes de dysbiose pulmonaire perturbant l'équilibre précaire du poumon déjà altéré (120).

2.4.1 Les antibiotiques dans le traitement de l'asthme chez les humains

L'identification d'une dysbiose respiratoire chez les patients atteints d'asthme suggère qu'un traitement antibiotique pourrait s'avérer pertinent. Les antibiotiques de la classe des macrolides ont surtout été étudiés, entre autres pour leurs propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires en plus de celles antibactériennes.

L'utilisation d'antibiotiques faisant partie de la classe des macrolides, entre autres l'azithromycine et la clarithromycine, en supplément aux thérapies conventionnelles, est controversée. Suite à l'ajout d'un traitement d'azithromycine, une augmentation de la qualité de vie, une diminution de la fréquence des exacerbations, du nombre d'exacerbations sévères et des infections ont été observées chez les asthmatiques sévères non éosinophiliques après un traitement de 26 semaines (139) et chez tous les sous-types inflammatoires après 48 semaines (140). La clarithromycine montre aussi une amélioration de la qualité de vie et une diminution de certaines molécules inflammatoires, surtout pour les sous-types d'asthme non éosinophilique (141). Toutefois, peu d'effets positifs sont observés chez les patients atteints d'asthme léger à modéré, suggérant que certaines caractéristiques propres aux individus atteints d'asthme sévère soient visées par un traitement macrolide (142). Une revue systématique récente sur l'azithromycine n'a montré aucun effet positif global quant à son utilisation pour le traitement de l'asthme, toutefois sans tenir compte des différents phénotypes inflammatoires d'asthme (143). Un désavantage de cet ajout thérapeutique est l'induction de résistances bactériennes; en effet des patrons de résistance peuvent être identifiés suite à une administration prolongée de macrolides (139, 144, 145).

Il est à se demander si l'ajout d'un antibiotique dans le traitement de l'asthme sévère pourrait avoir un effet positif aussi en modulant le microbiote pulmonaire, et donc en réduisant une potentielle source additionnelle de stimulation chronique du système immunitaire. En effet, une diminution de la charge d'*Haemophilus influenzae* est notée suite à un traitement d'azithromycine (145). Cette bactérie est fréquemment retrouvée chez les patients en exacerbation aiguë d'asthme bronchique (15) et est aussi associée avec une aggravation du score au *Asthma Control Questionnaire* (128, 129). Il est probable que la diminution de la fréquence et de la sévérité des crises d'exacerbation mentionnée plus haut pourrait en partie être due à une diminution de la charge de *H. influenzae* dans les voies respiratoires suite au traitement antibiotique. La réponse inflammatoire démesurée observée chez les asthmatiques sévères pourrait découler d'une réponse normale du système immunitaire inné secondairement à une dysbiose pulmonaire.

Lorsque ces études sont considérées conjointement, il semble que l'utilisation d'un antibiotique seul est moins efficace que la combinaison de cet antibiotique avec une thérapie anti-inflammatoire. Il est possible de poser l'hypothèse que l'ajout d'un traitement antibiotique peut aider à rétablir un microbiote pulmonaire normal, et qu'un traitement anti-inflammatoire et bronchodilatateur est également nécessaire afin d'améliorer la clairance pulmonaire et ainsi permettre le maintien de ce microbiote normal. Une meilleure caractérisation de l'effet des macrolides dans le traitement de l'asthme sévère s'avère nécessaire avant de les considérer comme un additif thérapeutique bénéfique. Pour le moment, les dernières recommandations de l'*American Thoracic Society*, datant de 2014, déconseillent l'utilisation d'antibiotiques macrolides pour le traitement de l'asthme sévère, et ce à cause des preuves insuffisantes sur leur efficacité ainsi que le fort risque de résistance (146). Ces recommandations n'ont toutefois pas pris en compte la littérature plus récente sur le sujet, peut-être que la prochaine version conseillera cet antibiotique pour certains phénotypes inflammatoires d'asthme sévère. De plus amples études s'avèrent nécessaires chez les chevaux.

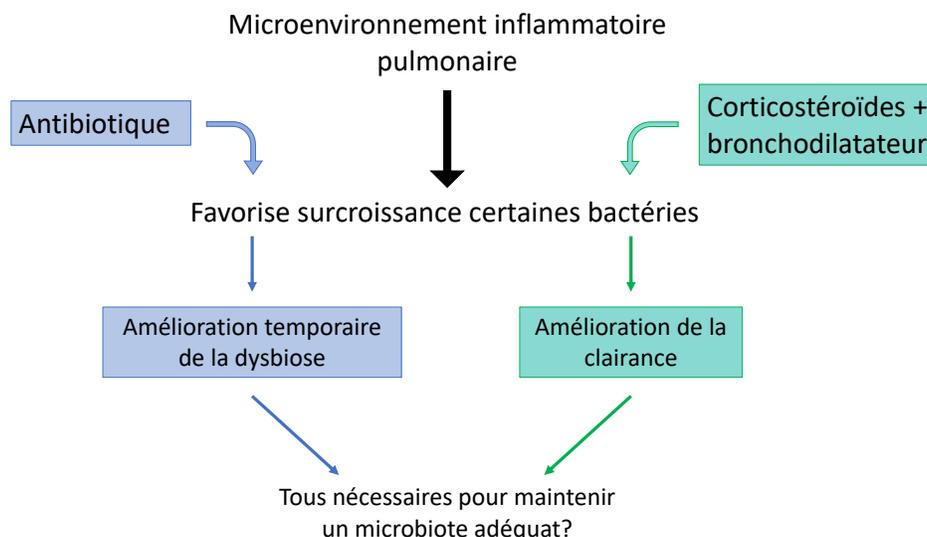


Figure 5. Intégration des différents traitements de l'asthme.

2.5 Dysbiose bactérienne dans l'asthme : résumé

À la lumière de la revue sur le microbiote bactérien dans l'asthme (sections 2.2 à 2.4), la modification du microbiote pulmonaire, autant chez les humains que chez les chevaux, pourrait être secondaire à la formation d'un microenvironnement occasionné par l'inflammation, la diminution de la clairance et le remodelage tissulaire. Par contre, cette dysbiose pourrait aussi avoir une part dans le développement, la progression et la perpétuation de la condition, par exemple en entretenant l'inflammation pulmonaire. Une clarification du rôle de ce microbiote dans l'asthme permettra une meilleure compréhension de la

pathogénie et mènera possiblement à de nouvelles avenues thérapeutiques visant un rétablissement du microbiome normal afin de limiter les manifestations de la condition. Le tableau suivant résume les faits appuyant l'implication des bactéries dans la pathogénie de l'asthme, et ceux ne l'appuyant pas, avec une emphase sur l'espèce équine.

Tableau 3. Pour et contre l'implication des bactéries dans l'asthme.

	Faits supportant l'implication des bactéries dans la pathogénie de l'asthme	Faits ne supportant pas l'implication des bactéries dans la pathogénie de l'asthme
Équin	<ul style="list-style-type: none"> • Certaines bactéries spécifiques sont associées à la pathologie (5-8, 10, 33, 38, 125) et il y a des associations positives entre leur quantité en culture et le degré d'inflammation (6, 7, 38), la présence de toux (10), ainsi que le risque qu'un diagnostic d'asthme soit posé (5, 8); • Les chevaux atteints d'asthme présentent une dysbiose respiratoire inférieure (4, 11); • L'incidence moins élevée de l'asthme léger à modéré chez les chevaux plus âgés peut découler du développement d'immunité (8, 38); • Les endotoxines (LPS) ont un effet synergique avec les autres composantes du foin dans l'induction de la condition (25, 26); • Les traitements médicaux conventionnels ne permettent généralement pas de corriger la neutrophilie pulmonaire, suggérant la persistance d'antigènes soit environnementaux ou locaux comme dans le microbiote (3, 93); • La toux est associée aux bactéries intracellulaires dans le lavage trachéal, et non aux bactéries extracellulaires (147); • Il y a plus de <i>neutrophil extracellular traps</i> (NETs), un mécanisme de phagocytose des neutrophiles (148), à la cytologie sur lavage bronchoalvéolaire de chevaux atteints d'asthme (53). 	<ul style="list-style-type: none"> • Absence d'association entre la condition et l'isolement de bactéries (32); • Certains chevaux atteints d'inflammation des voies respiratoires inférieures ne montrent aucune croissance bactérienne sur lavage trachéal, et certains chevaux sains montrent de la croissance sur lavage trachéal (5, 8, 10); • L'efficacité des corticostéroïdes comme traitement suggère que la condition est inflammatoire plutôt qu'infectieuse; • Il est possible que la présence de ces bactéries soit seulement secondaire à une clairance mucociliaire altérée et une accumulation de mucus, une colonisation transitoire ou même seulement une contamination (5, 56); • De manière générale, les neutrophiles visibles à la cytologie ne sont pas dégénérés (149); • La charge bactérienne sur lavage trachéal, évaluée par PCR, est inférieure chez les chevaux atteints d'asthme que les sains (33); • Un traitement antibiotique de courte durée ne mène pas à une diminution de l'inflammation pulmonaire (108, 109).

Humain	<ul style="list-style-type: none"> • Une dysbiose bactérienne des voies respiratoires inférieures est identifiée chez les sujets atteints d’asthme par rapport aux sujets sains (13, 14, 128, 150). • L’addition de macrolide diminue les crises d’exacerbation et augmente la qualité de vie chez les humains atteints d’asthme, surtout de phénotype neutrophilique (139-141); • Il y a une association entre l’identification de certaines bactéries spécifiques dans le nasopharynx de nouveau-nés et le développement d’asthme juvénile (130); • L’administration d’antibiotiques en jeune âge est un facteur de risque d’asthme juvénile (humain) (151, 152). 	<ul style="list-style-type: none"> • Absence de dysbiose chez les sujets atteints d’asthme (131).
---------------	---	--

Chapitre 3 – *Pasteurellaceae*

3.1 Caractéristiques générales

La famille *Pasteurellaceae*, seule famille formant l'ordre des *Pasteurellales*, appartient à la classe des Gammaprotéobactéries, du phylum des Protéobactéries. Cette famille est composée de bactéries à Gram négatif non motiles, anaérobies facultatives, pléomorphes et ne formant pas de spores. Leur croissance est idéale à une température de 37°C. En culture sur gélose, on observe de petites colonies grisâtres et luisantes qui sont parfois adhérentes au milieu de culture. Hors de leur hôte, les *Pasteurellaceae* ne survivent généralement que pour de courtes durées (153).

Les *Pasteurellaceae* sont en grande partie des agents opportunistes ou des bactéries commensales, et seulement environ 10% de la famille serait associé avec une pathologie (153). Cette famille bactérienne comprend toutefois plusieurs agents pathogènes majeurs considérés « primaires », dont *Actinobacillus pleuropneumoniae* chez les porcs, *Avibacterium paragallinarum* chez la volaille et *Pasteurella multocida* chez les bovins et la volaille. La plupart des taxa sont isolés des muqueuses de l'oropharynx et des voies respiratoires supérieures de plusieurs espèces, autant animales que chez les humains (154, 155). Seuls les genres d'importance en médecine équine, plus particulièrement ceux retrouvés dans les voies respiratoires, ainsi que *H. influenzae* (qui est associé aux exacerbations d'asthme chez les humains) seront abordés ici. Cette revue se concentrera plus sur un aspect clinique que moléculaire.

3.2 Taxonomie

La hiérarchie taxonomique des *Pasteurellaceae* est présentée dans la Figure 6. La famille *Pasteurellaceae* ne comprenait initialement que trois genres : *Pasteurella* spp., *Actinobacillus* spp. et *Haemophilus* spp. Ces genres demeurent les principaux membres de la famille *Pasteurellaceae*, mais plusieurs se sont ajoutés pour atteindre 12 genres en 2006, 18 en 2014 et 19 en 2020 (153, 156, 157). En 2014, date pour laquelle les dernières données de genres sont disponibles, la famille comprenait 73 espèces, dont 49 considérées comme adéquatement classifiées alors que l'identification reste spéculative pour 24 espèces. Ces dernières espèces sont identifiées par des crochets (ex : [*Actinobacillus*] *actinomycetemcomitans*, maintenant *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, bactérie associée avec des cas de parodontite chez les humains). 30 autres taxa demeurent non identifiés (153). Les genres *Basfia*, *Bibersteinia*, *Chelonobacter*, *Histophilus*, *Lonepinella*, *Nicoletella* et *Phocoenobacter* ne comprennent tous qu'une seule espèce à ce jour (158).

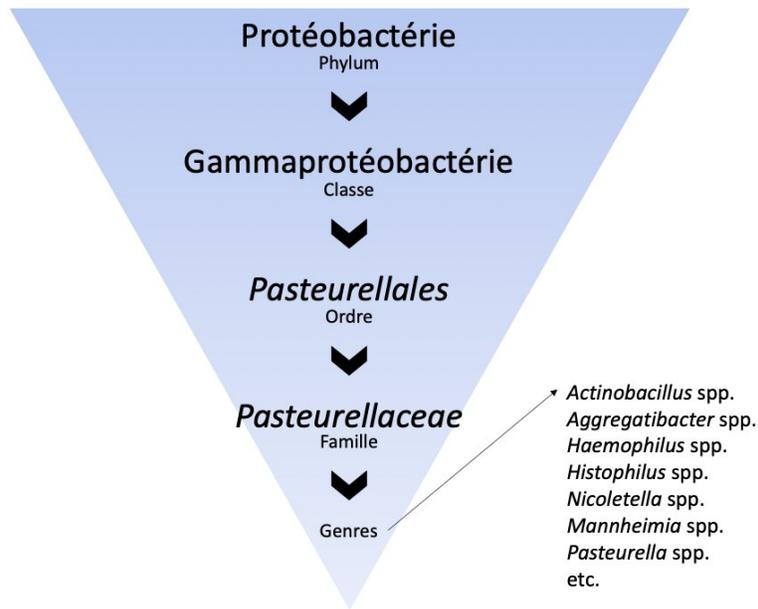


Figure 6. Hiérarchie taxonomique des Pasteurellaceae.

Taxa reliés à la famille des Pasteurellaceae. Quelques genres sont donnés à titre d'exemple, mais les genres compris dans la famille des Pasteurellaceae ne sont pas tous indiqués dans la figure.

Les différents genres de la famille sont déterminés par des caractéristiques biochimiques et phénotypiques différentes, justifiant l'usage d'analyses poussées afin de les distinguer (153). Par exemple, les espèces appartenant au genre *Actinobacillus* spp. dégradent l'urée, les *Pasteurella* spp. dégradent le tryptophane en indole, tout comme les *Haemophilus* spp. et *Lonepinella* spp. Les fortes similarités entre les différents membres augmentent d'autant plus la complexité de classification des espèces non classifiées ou incorrectement classifiées (156). De plus, la caractérisation génotypique des *Pasteurellaceae* s'avère différente de la caractérisation phénotypique. Les analyses phylogéniques suggèrent que le nombre de genres devrait être augmenté afin de mieux structurer la famille (159). L'analyse du gène ARNr 16S a été grandement utilisée à cet effet, toutefois cette méthode comprend certaines limitations et les classifications et reclassifications futures seront probablement plutôt basées sur l'analyse phylogénique de plusieurs gènes conservés (160). En résumé, la classification de la famille n'est pas simple et demeure sous constantes révisions.

3.3 Identification et différenciation des *Pasteurellaceae*

3.3.1 Culture et isolement des *Pasteurellaceae*

La plupart des *Pasteurellaceae* peuvent croître en 24 à 48 heures sur gélose sang dans un milieu aérobie ou idéalement microaérophilique, certains genres et espèces nécessitent des conditions particulières (153). Par exemple, les facteurs V, pour la demande en nicotinamide adénine dinucléotide (NAD), et X,

soit le facteur hémine qui reflète l'inhabilité de la bactérie à produire des porphyrines, sont nécessaires pour la croissance de certains *Haemophilus* spp. en culture. Le préfixe « para » de certaines espèces de *Haemophilus* spp. signifie que seulement un de ces deux facteurs est nécessaire pour la croissance. Certains *Actinobacillus* nécessitent le facteur V pour leur croissance. Le facteur V peut être fournis grâce à l'addition d'une strie de *Staphylococcus aureus* sur une gélose sang, ou en utilisant une gélose chocolat. La gélose chocolat est nommée ainsi seulement pour sa couleur chocolatée, mais est obtenue en créant la lyse thermique des érythrocytes contenus dans la gélose, permettant la libération des facteurs V et X contenus dans ces cellules. Malgré des conditions de culture adéquates, certains *Pasteurellaceae* comme *Nicoletella semolina* peuvent représenter un défi en culture (159). Au laboratoire de bactériologie du Complexe de diagnostic et d'épidémiosurveillance vétérinaires du Québec (CDEVQ) de l'Université de Montréal, les échantillons sont d'emblée ensemencés sur gélose Columbia avec 5 % de sang de mouton, et incubées à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ avec 5 % de CO_2 . Si un agent pathogène spécifique est soupçonné (anamnèse, mentionné dans la requête), l'échantillon sera également ensemencé sur les géloses appropriées. Par exemple, une gélose chocolat sera ensemencée si l'on soupçonne la présence d'un *Histophilus* dans un échantillon bovin. Pour les échantillons des voies respiratoires équine, il est rare que d'autres milieux que la Columbia avec sang de mouton soient utilisés. Un comptage bactérien à l'aide d'une anse calibrée ainsi qu'un frottis direct avec une coloration de Gram sont aussi effectués. Les identifications bactériennes sont faites à l'aide de la technologie *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS).

3.3.2 Difficultés d'identification des *Pasteurellaceae*

Les erreurs d'identification des *Pasteurellaceae* sont fréquentes lorsque seules des méthodes phénotypiques et biochimiques usuelles sont utilisées (156). En effet, les fréquents changements de classification ainsi que la difficulté de différencier les genres par leur morphologie et leurs caractéristiques biochimiques ne facilitent pas la tâche (153, 156, 161, 162), et d'ailleurs les publications rectifiant des identifications précédentes de divers *Pasteurellaceae* sont fréquentes (162-165). Lorsque la culture est utilisée, la détermination du genre bactérien est fréquemment le taxon le plus spécifique atteignable, mais encore, en médecine équine, il peut être difficile de différencier *Pasteurella* spp. et *Actinobacillus* spp. (5, 8). Il est recommandé d'utiliser des méthodes indépendantes de la culture, par exemple une ou plusieurs méthodes moléculaires, pour identifier les différents *Pasteurellaceae*. Le MALDI-TOF facilite l'identification et la différenciation de la plupart des *Pasteurellaceae*, toutefois la culture précède obligatoirement cette méthode.

3.3.3 Le *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*

Le *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS, ou MALDI-TOF) permet une identification rapide, spécifique et peu coûteuse de la plupart des bactéries. En bref, une colonie bactérienne pure est mélangée à une solution matrice et le mélange est déposé sur une plaque de métal qui sera par la suite bombardée par un laser. Le laser permet de vaporiser (désorption) les bactéries et d'ioniser leurs protéines. Pour les *Pasteurellaceae*, seul *Histophilus somni* nécessite d'être purifié par extraction pour obtenir un spectre protéique valable (158). Un champ électrique accélère ensuite les protéines et les sépare selon leur masse et leur charge (166). Le spectre de protéines de chaque colonie est comparé à une banque de données et permet ainsi l'identification de la colonie bactérienne initiale. La différenciation des bactéries est surtout basée sur la comparaison de leur spectre de protéines ribosomales (166). La banque de données disponible contient majoritairement des souches humaines, il est donc nécessaire d'utiliser une banque de données adaptée au diagnostic vétérinaire lorsqu'il s'agit d'isolats animaux. Kuhnert *et al.* en 2012 ont développé une banque de spectres protéiques de *Pasteurellaceae* d'intérêt vétérinaire complémentaire à la banque de données disponible, en y incluant entre autres la bactérie *N. semolina* (158). Il est possible d'ajouter de nouvelles souches à la banque de données en produisant leur spectre de référence, il ne suffit que de confirmer l'identification de la souche initiale en séquençant le gène ARNr 16S ou un autre gène de référence (166).

Suite à chaque analyse d'isolats, le MALDI-TOF donne un score de corrélation pour indiquer la fiabilité de l'identification de la colonie bactérienne au genre ou à l'espèce (158). Certaines espèces ou sous-espèces étroitement apparentées, par exemple *A. suis* et *A. equuli*, *A. pleuropneumoniae* et *A. lignieresii*, *A. equuli* subsp. *equuli* et *A. equuli* subsp. *haemolyticus* ou les sous-espèces de *P. multocida*, ne peuvent pas être différenciées au MALDI-TOF MS et nécessitent des tests supplémentaires (158, 166). Par exemple, parmi 27 isolats équins identifiés comme différentes espèces d'*Actinobacillus* à l'aide du MALDI-TOF, sept n'avaient pas été identifiés comme appartenant à la bonne espèce et trois étaient en fait du [*P.*] *caballi* (164). Toutefois, pour la plupart des membres de la famille *Pasteurellaceae*, le MALDI-TOF est spécifique pour leur identification et différenciation (158). Les désavantages du MALDI-TOF sont que la méthode doit être précédée de la culture afin d'obtenir des colonies pures et qu'une bactérie absente de la banque de données pourra être différenciée des autres, mais ne pourra pas être identifiée.

3.3.4 Réaction de polymérase en chaîne (PCR)

L'utilisation de la PCR permet une détection spécifique d'espèces bactériennes. Elle peut aussi être utilisée pour identifier des facteurs de virulence ou pour le sérotypage de souches (153). Des amorces PCR ont pu être optimisées pour certains *Pasteurellaceae* associés à des pathologies, par exemple *P. multocida*, *H.*

influenzae, [*Haemophilus*] *parasuis* (maintenant *Glaesserella parasuis*), *Mannheimia haemolytica*, etc. (153). Pour les *Pasteurellaceae* commensaux ou moins fréquents, peu d'études se sont attardées à la synthèse d'amorces PCR spécifiques. L'identification par PCR des *Pasteurellaceae* pour lesquels des amorces n'ont pas été optimisées devrait être basée au minimum sur le séquençage du gène *ARNr 16S*, et idéalement aussi des gènes de référence *rpoB* et *infB* (153). Pour les *Pasteurellaceae* retrouvés dans les voies respiratoires équinés, très peu d'amorces PCR sont disponibles. La [section 8.7](#) revient sur ce sujet.

3.4 Caractéristiques intéressantes

3.4.1 Spécificité d'espèce

Quelques *Pasteurellaceae* sont adaptés à leur hôte et n'ont été isolés que chez ce dernier; on dit de ces genres qu'ils sont spécifiques d'espèce. Par exemple, le *Pasteurellaceae* *Lonepinella koalarum* est retrouvé dans la cavité orale et les fèces de koalas, *Otariodibacter oris* dans la cavité orale de lions de mer, *Chelonobacter oris* dans les voies respiratoires d'une tortue malade et *Mesocricetibacter intestinalis* dans le système digestif de hamsters. Ces bactéries ont été isolées chez quelques individus (154). Les *Pasteurellaceae* associés aux chevaux sont [*Pasteurella*] *caballi*, *Actinobacillus equuli*, *Actinobacillus arthritidis* (167) et *Nicoletella semolina* (159). [*P.*] *caballi* a également été retrouvé dans les voies respiratoires de porcs (167).

3.4.2 Facteurs de virulence

3.4.2.1 Toxines RTX

Les toxines *Repeats in the structural Toxin* (RTX), nom basé sur la structure répétée de peptides riches en glycine, sont des exo-protéines de poids moléculaire se situant entre 100 et 300 kDA et pouvant être retrouvées chez certaines bactéries à Gram négatif, dont plusieurs *Pasteurellaceae* (résumé par (168, 169)). Les toxines RTX exercent leur activité toxique en formant des pores dans les parois cellulaires, causant de l'hémolyse ou de la nécrose. L'activité hémolytique, cytotoxique ou co-hémolytique (réaction basée sur le synergisme entre la formation de pores et la sphingomyélinase de *Staphylococcus aureus* β -hémolytique) dépend du type de toxine RTX. Les activités hémolytique ou co-hémolytique (CAMP) sont les phénotypes les plus faciles à observer *in vitro* (hémolyse visible sur gélose sang), mais cet effet est non spécifique. Les cibles principales des toxines RTX sont les sous-unité β (CD18) des intégrines $\beta 2$ des leucocytes (168), du moins en ce qui concerne *Mannheimia haemolytica*, *Aggregatibacter* et *Actinobacillus pleuropneumoniae* (153).

En ce qui concerne les *Pasteurellaceae*, les toxines RTX sont décrites chez les genres *Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Bibersteinia*, *Mannheimia*, *Pasteurella*, *Avibacterium* et *Gallibacterium*. Le Tableau 4

résume les toxines RTX connues pour ces différentes espèces bactériennes. La leucotoxine de *Mannheimia haemolytica* et les toxines Apx d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* sont les toxines de *Pasteurellaceae* d'espèces vétérinaires les mieux étudiées.

Tableau 4. Toxines RTX retrouvées chez différents *Pasteurellaceae*.

<i>Pasteurellaceae</i>	Toxine RTX retrouvée	Référence
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	ApxI, ApxII, ApxIII et ApxIV*	(169)
<i>Mannheimia haemolytica</i>	Leucotoxine Lkt	
<i>Actinobacillus equuli subsp. haemolyticus</i>	Aqx	
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Ltx	
[<i>Pasteurella</i>] <i>aerogenes</i>	Pax	
[<i>Pasteurella</i>] <i>mairi</i>		
<i>Mannheimia varigena</i>	Plkt	
<i>Actinobacillus suis</i>	ApxI, ApxII et ApxIII	(153)
<i>A. rossii</i>		
[<i>Pasteurella</i>] <i>pneumotropica</i>		
<i>Avibacterium paragallinarum</i>		
[<i>Pasteurella</i>] <i>multocida</i>		
<i>Gallibacterium anatis</i>		

RTX : Repeats in the structural Toxin. * Le gène *apxIV* d'*A. pleuropneumoniae* est seulement induit lors d'infection *in vivo*, et la toxine n'est pas retrouvée dans des conditions *in vitro* (168).

C'est la présence de la toxine Aqx, codée par le gène *aqx*, qui permet de différencier *Actinobacillus equuli subsp. haemolyticus* (hémolytique comme son nom l'indique) d'*A. equuli subsp. equuli* (aucune activité hémolytique). L'isolement d'*A. equuli subsp. equuli* dans des cas de septicémie néonatale à *A. equuli* suggère que d'autres facteurs de virulence sont impliqués dans la pathogénie (170). En effet, les larges embolies intravasculaires bactériens d'*A. equuli* retrouvés chez des poulains atteints de septicémie suggèrent que des facteurs d'adhésion à l'endothélium sont impliqués dans la pathogénie.

La leucotoxine Lkt de *M. haemolytica* est spécifique aux leucocytes de ruminants (bovin, caprin et ovin) (168), et les neutrophiles équins ne sont pas sensibles à cette toxine (171). La toxine Aqx est hautement toxique pour les leucocytes équins alors que les toxines ApxI et ApxII le sont pour les leucocytes porcins, et à moins grande échelle pour les leucocytes équins (168). Au contraire, les toxines ApxI et ApxII (surtout d'*A. pleuropneumoniae*) sont nécessaires dans la pathogénie chez les porcs, et les sérotypes comportant ces deux toxines sont les plus nocifs (169). Toutefois, ces toxines ne sont pas les seuls facteurs de virulence nécessaires puisqu'également retrouvées chez d'autres bactéries moins nocives comme *A. suis*, *Actinobacillus rossii* (169) et *Actinobacillus porcitonisillarum* (153). Les lipopolysaccharides (LPS) agissent potentiellement comme cofacteur.

Globalement, le rôle de certaines de ces toxines RTX dans la pathogénie, comme Aqx, demeure à élucider. Étant donné que plusieurs *Pasteurellaceae* exprimant ces toxines sont des agents commensaux, l'hypothèse posée par Christensen *et al.* est que ces toxines sont nécessaires pour le commensalisme de ces bactéries, et que la pathologie découle d'un déséquilibre dans l'action de ces toxines (153). *Nicoletella semolina* est non hémolytique et ne semble pas exprimer de toxines RTX.

3.4.2.2 Lipopolysaccharides (LPS) et lipooligosaccharides (LOS)

Comme mentionné précédemment, les lipopolysaccharides (LPS) sont formés d'un lipide A et d'un antigène O reliés par le corps oligosaccharide, et composent la paroi des bactéries à Gram négatif. L'antigène O est un polymère de sucre protégeant la bactérie du stress, des conditions externes comme des températures et pH inadéquats, et du système immunitaire de l'hôte (172). Certaines bactéries bien adaptées aux muqueuses ne nécessitent pas une telle protection et portent en leur surface des LPS de faible poids moléculaire, les lipooligosaccharides (LOS). Ces LOS sont en fait des LPS ne comprenant pas d'antigène O. Ce groupe inclut *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyi*, *Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae* (173). L'absence de l'antigène O ne rend cependant pas ces molécules plus simples. En fait, ces bactéries sont plutôt composées d'un corps oligosaccharide complexe étant capable de mimétisme moléculaire en organisant leurs sucres communs de manière similaire aux oligosaccharides sur les glycosphingolipides des cellules de l'hôte (172), en plus de maintenir l'activité endotoxique de la molécule par le lipide A. Cette adaptation permet à ces bactéries de diminuer leur reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte. Non seulement ces bactéries ont la capacité de se camoufler, mais aussi la sialylation (addition d'acide sialique aux oligosaccharides ou glycoprotéines) de la portion terminale du corps mène à une résistance accrue de la bactérie en diminuant sa phagocytose par les neutrophiles, en régulant à la baisse l'activation du complément et en diminuant l'induction de flambées oxydatives par les neutrophiles, du moins pour les bactéries du genre *Neisseria* spp. (173). Une pathogénèse similaire est suspectée pour *H. influenzae* (174).

Les *Pasteurellaceae* *Actinobacillus* spp., *Aggregatibacter* spp. et *Mannheimia* spp. contiennent des LPS, alors que la plupart des espèces des genres *Pasteurella* spp., *Haemophilus* spp. et *Histophilus* spp. contiennent des LOS (153). Il est possible de différencier les bactéries comportant des LPS de celles comportant des LOS par électrophorèse sur gel (154). En effet, les LPS apparaissent comme une échelle allongée de bandes représentant les unités de l'antigène O de différentes tailles moléculaires, alors que les LOS apparaissent comme plusieurs bandes de faible poids moléculaire.

3.4.2.3 Autres facteurs de virulence

Parmi les autres facteurs de virulence de certains *Pasteurellaceae*, on retrouve le captage de fer, nécessaire pour la croissance bactérienne, via la liaison à la transferrine. Une certaine spécificité d'espèce est aussi notée pour ce facteur, par exemple *A. pleuropneumoniae* lie la transferrine porcine, *P. multocida*, *M. haemolytica* et *Histophilus somni* lient la transferrine des ruminants et *H. influenzae* et *H. haemolyticus*, la transferrine humaine (154). La capsule peut représenter un facteur de virulence. Par exemple, *H. influenzae* a six sérotypes capsulaires, soit de A à F, dont le type B (Hib) est associé avec des infections invasives (153). Des pili ont été décrits chez certains *Pasteurellaceae*. On retrouve le pilus Flp (locus *Tad*) chez *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. multocida* et *A. pleuropneumoniae*, entre autres (153). Ce pilus est associé à l'adhérence et à la formation de biofilms. Le pilus de type IV (TFP), quant à lui, est associé à la mobilité, à la formation de biofilms et à l'invasion des voies respiratoires supérieures, et on le retrouve sur *H. influenzae*, *P. multocida* et *A. pleuropneumoniae* (153). *P. multocida* a aussi une toxine qui lui est propre : la toxine PMT, codée par le gène *toxA*. Elle est surtout exprimée chez les porcs dans les cas de rhinite atrophique (153).

3.5 Genres et espèces d'intérêt

La présente section décrit plus en détail les différents *Pasteurellaceae* retrouvés chez les chevaux et dans quelles situations ils sont isolés, avec une emphase sur les échantillons provenant des voies respiratoires.

3.5.1 Les *Pasteurellaceae* dans les pathologies respiratoires infectieuses équines

Actinobacillus spp. et *Pasteurella* spp. peuvent être identifiés chez des chevaux atteints de pneumonie ou de pleuropneumonie (175-178), d'asthme (voir la section suivante), mais aussi chez des chevaux sains. En culture, jusqu'à 8 % de chevaux sains ou atteints de maladie respiratoire étaient positifs pour *Actinobacillus* spp., *Nicoletella semolina* et *Pasteurella/Mannheimia* spp., avec une prédominance de *N. semolina* (124). Lorsqu'on s'attarde plutôt à l'abondance relative des *Pasteurellaceae* par rapport aux autres bactéries dans les échantillons, sur un total de 270 isolats obtenus par culture d'échantillons du nasopharynx de 104 chevaux sains ou atteints de maladie respiratoire en Éthiopie, 11,5 % de tous les isolats correspondent au genre *Pasteurella* spp., sans différence significative entre les groupes (123). *Actinobacillus* spp. a seulement été identifié dans le groupe des chevaux sains, à raison de 2,2 % des échantillons. *Actinobacillus* spp. et des *Pasteurellaceae* non identifiés ont également été retrouvés par séquençage dans la bouche de deux chevaux sains et représentent entre environ 4 et 13 % des séquences chacun (179).

Différentes conditions semblent occasionner une surcroissance de différents membres de cette famille. Par exemple, *Pasteurella/Actinobacillus* spp. sont identifiés par culture dans des lavages trachéaux de chevaux ayant la tête attachée en hauteur pour une période de 24 à 48 heures, et sont surtout retrouvés dans les échantillons avec une forte croissance bactérienne (180). Un transport prolongé (8h) occasionne également une hausse de la charge bactérienne, identifiée via culture et séquençage, dans les lavages trachéaux de chevaux et est accompagnée d'une diminution de la diversité associée à une surreprésentation de la famille des *Pasteurellaceae*, entre autres *Actinobacillus* spp. et *Aggregatibacter* spp., et ce, chez la majorité des chevaux (181). Cette dysbiose perdure moins de 24h. L'échantillonnage de l'air ambiant dans l'écurie et dans la remorque révèle la présence de bactéries différentes que celles contenues dans les lavages trachéaux, suggérant une origine locale ou des voies respiratoires supérieures plutôt qu'environnementale. Les auteurs de ces études suggèrent que l'augmentation des *Pasteurellaceae* pourrait être causée par des aspirations, un appareil mucociliaire altéré, ou à l'effet du stress sur le système immunitaire (180-182). Chez de jeunes ânes porteurs de *Streptococcus equi* subsp. *equi* suite à un épisode de gourme, les *Pasteurellaceae* et *Nicoletella* sont prédominants au niveau du nasopharynx et sont plus fréquents que chez des ânes sains du même âge. *N. semolina* représente en moyenne 38 % des séquences dans le groupe "post-gourme" (122). Ces études supportent le rôle opportuniste des *Pasteurellaceae* dans les voies respiratoires des équidés.

Chez 34 chevaux atteints de pneumonie ou de pleuropneumonie, la culture trachéale ou de l'effusion pleurale a permis l'identification de *Pasteurellaceae* (majoritairement [*P.*] *caballi*-like ou *A. suis*-like) dans 65 % (29/34) des cas (177). Les *Pasteurellaceae* n'ont dans aucun cas été isolés en culture pure, mais plutôt en culture mixte avec *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (n = 3) ou dans des cultures polymicrobiennes. Une autre étude a identifié du *Actinobacillus* spp. en culture dans environ le tiers des échantillons de lavages trachéaux de chevaux atteints de pleuropneumonie (178).

3.5.2 Les *Pasteurellaceae* et l'asthme équin

Comme discuté dans la section sur le microbiote des voies respiratoires équines, *Pasteurella/Actinobacillus* spp. sont fréquemment isolés par culture de lavages trachéaux de chevaux présentant de l'inflammation des voies respiratoires inférieures (5-8, 10, 33, 125). En effet, l'isolement de ces bactéries est associé à la présence d'inflammation trachéale (6-8), de mucus (8, 9), de toux (5, 10) ainsi que de jetage nasal (5) chez les chevaux de sport. Une récente étude a identifié par culture *Actinobacillus* spp. et des *Pasteurellaceae* dans la trachée de jusqu'à un tiers des chevaux atteints d'asthme modéré (33). Ayant recours au séquençage de nouvelle génération, la famille des

Pasteurellaceae tend à être surreprésentée dans les LBA d'une population de six chevaux atteints d'asthme sévère (11), et, dans une autre cohorte de 12 chevaux, les *Pasteurellaceae* sont plus fortement retrouvés dans les LBA lors de l'exacerbation par rapport à la rémission, et sont positivement corrélés à la neutrophilie pulmonaire (Dre E. Manguin, communication personnelle). Quelques études n'ont toutefois pas identifié de lien entre les *Pasteurellaceae* et l'asthme équin (4, 33, 38). La différenciation entre *Actinobacillus* spp. et *Pasteurella* spp. s'avère problématique dans les échantillons respiratoires et limite l'interprétation des résultats obtenus (5, 6, 8). Une seule étude s'est réellement attardée à leur différenciation chez des chevaux atteints d'inflammation des voies respiratoires inférieures, encore une fois en utilisant la culture en plus d'une batterie de tests morphologiques et biochimiques. Seuls *A. lignieresii* et un *A. suis*-like, et potentiellement *A. equuli*, se sont avérés significativement associés à l'inflammation des voies respiratoires inférieures (125). Les limites de cet article résident dans l'usage seul de tests morphologiques et biochimiques, sans confirmation à l'aide de méthodes moléculaires.

3.5.3 [*Pasteurella*] *caballi*

[*Pasteurella*] *caballi*, « *Pasteurella* du cheval », a été identifié pour la première fois en 1989 dans des échantillons cliniques de chevaux aux États-Unis (183, 184). Il s'agit d'un bâtonnet non motile anaérobie facultatif qui forme des colonies lisses et légèrement bombées de couleur grisâtre ou jaunâtre sur gélose sang (Figure 7B). La bactérie croît peu ou pas sur gélose MacConkey. Des 29 souches analysées, 15 ont été isolées des voies respiratoires supérieures (poches gutturales, trachée) et inférieures (poumons, effusion pleurale), en culture pure ou mixte (avec *Rhodococcus equi*, *A. equuli*, *Bordetella bronchiseptica*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus* et *Pseudomonas aeruginosa*). La bactérie a aussi été retrouvée au niveau du système reproducteur femelle, d'abcès externes ou d'autres sites. Étant donné que les autres espèces du genre *Pasteurella* spp. sont des opportunistes, les auteurs suggèrent que [*P.*] *caballi* ne fait pas exception à la règle, sans toutefois que la bactérie n'ait été identifiée chez des animaux sains dans ce premier rapport.

La bactérie a initialement été classifiée comme faisant partie du genre *Pasteurella* étant donné que ses caractéristiques morphologiques et biochimiques ne sont pas classiques des genres *Haemophilus* et *Actinobacillus* (183). Toutefois, certaines de ses caractéristiques biochimiques sont également atypiques pour le genre *Pasteurella*, par exemple le fait que la bactérie est catalase négative. D'ailleurs, il est peu fréquent d'isoler *Pasteurella* spp. de chevaux, ce qui est également le cas au laboratoire de bactériologie du Complexe de diagnostic et d'épidémiosurveillance vétérinaires du Québec (CDEVQ) de l'Université de Montréal (Dre J-H Fairbrother, communication personnelle). De plus récents rapports sur la

reclassification de la famille *Pasteurellaceae* suggèrent que [*P.*] *caballi* est probablement classifié dans le mauvais genre (153, 167), justifiant l'utilisation d'un nom entre crochets.

Depuis, la bactérie a été isolée chez des chevaux atteints de pneumonie ou de pleuropneumonie, habituellement en culture mixte (164, 177). Deux rapports de cas indiquent que la bactérie a été retrouvée avec *S. suis* et *S. equi* subsp. *zooepidemicus* chez un cheval de 2 ans atteint de pleuropneumonie sévère faisant suite à un transport (185), et avec un *Streptococcus* alpha-hémolytique dans le lavage trachéal d'un cheval adulte présentant de la toux, du jetage nasal ainsi que de l'intolérance à l'exercice (186). [*P.*] *caballi* semble également être présent dans la bouche de certains chevaux, étant donné son isolement dans des plaies de morsures (167, 187).

Dans ces études, la bactérie a majoritairement été identifiée par culture, et aussi par immunohistochimie sur un échantillon de poumon (185). [*P.*] *caballi* a été identifié par culture suivie par une caractérisation biochimique extensive dans 38 % de 65 lavages trachéobronchiques (procédures répétées sur 13 poulains) et 59 % de 17 échantillons de poumons (acquis en post-mortem) de 17 poulains dont le statut de santé était inconnu (188). Dans ce même article, les auteurs proposent une paire d'amorces sensible et apparemment spécifique pour la détection par PCR de [*P.*] *caballi*, menant à la détection de la bactérie dans 48 % des lavages trachéaux et 65 % des échantillons de poumon. La spécificité de cette amorce n'a cependant pas pu être confirmée par nos travaux (voir la [section 7.2](#)).

3.5.4 *Nicoletella semolina*

En 2004, *Nicoletella semolina*, un nouveau membre de la famille des *Pasteurellaceae*, a été identifié en Suisse et en Suède (159). Les isolats de cette bactérie sont distincts des autres genres de la même famille d'un point de vue phénotypique et phylogénique, mais l'hybridation ADN-ADN et le séquençage des gènes *ARNr 16S*, *rpoB* et *infB* confirme qu'ils appartiennent bien à la famille *Pasteurellaceae*. La souche type de *N. semolina* pour le gène *ARNr 16S* est le CCUG43639. Cette bactérie a été retrouvée dans des lavages trachéobronchiques de 19 chevaux présentant des signes d'atteinte respiratoire (toux, jetage nasal, pneumonie). La nouvelle identification de cet organisme pourrait suggérer que *N. semolina* est une espèce émergente, mais il se pourrait aussi que sa distinction des autres *Pasteurellaceae* n'ait pas été possible auparavant lorsque seule la culture était employée. Son identification chez des chevaux avec atteinte respiratoire peut suggérer un rôle comme agent pathogène primaire, mais un rôle d'agent pathogène opportuniste est aussi possible (159).

La culture de *N. semolina* est fastidieuse. L'utilisation de géloses sang dans un milieu aérobie avec 5 % de CO₂ est optimal. Les facteurs hémine (facteur X) et NAD (facteur V) ne sont pas nécessaires pour la

croissance et les colonies sont non hémolytiques. La morphologie des colonies de *N. semolina* n'est pas typique de tous les *Pasteurellaceae* : les colonies sont cireuses, grises, et peuvent être déplacées sur la gélose sans perdre leur forme (Figure 7A). D'ailleurs, le nom de l'espèce, « *semolina* », provient de sa ressemblance avec la semoule. Cette distinction macroscopique ne permet toutefois pas facilement de différencier la bactérie des autres genres et espèces de la famille *Pasteurellaceae*, car ce ne sont pas les seules colonies ayant cet aspect. Microscopiquement, *N. semolina* est un bacille pléomorphe non motile. L'analyse biochimique des colonies de *N. semolina* montre que cette bactérie est positive pour la réduction des nitrates en nitrite et pour les enzymes oxydase, catalase et uréase (159, 189). Autrement, *N. semolina* est inerte d'un point de vue biochimique. Kuhnert *et al.* suggèrent qu'une identification tout d'abord phénotypique suivie d'une confirmation moléculaire sont idéales pour l'identifier. La caractérisation à l'aide de la galerie *analytical profile index* (API) et des autres tests biochimiques est difficile et ne permet pas de distinguer *N. semolina* des autres *Pasteurellaceae* (159). Une annotation MALDI-TOF serait idéale pour une identification rapide, mais ne règle pas le problème de la croissance fastidieuse. Un test PCR serait donc des plus utiles mais n'a pas été développé jusqu'ici.

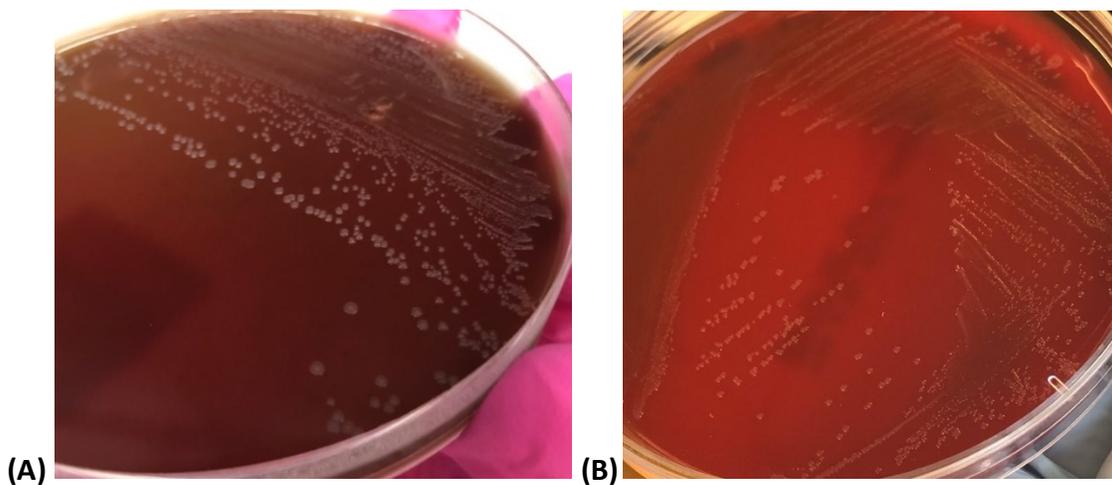


Figure 7. Aspect macroscopique de colonies de *N. semolina* en culture pure sur gélose sang.

Nicoletella semolina en culture pure sur gélose sang (A) en comparaison à [*Pasteurella*] *caballi* (B). Les colonies de *N. semolina* sont grisâtres et plus cireuses alors que celles de [*P.*] *caballi* sont plus blanchâtres à jaunâtres et sont luisantes. La couleur des deux géloses varie à cause de l'éclairage.

D'autres études basées sur la culture ont tenté d'élucider le rôle de *N. semolina* dans les voies respiratoires de chevaux. Maillard *et al.* ont obtenu une prévalence de 1,8% (19/1054) dans des lavages trachéaux équin soumis pour bactériologie (190). Dans cet échantillon, la neutrophilie sur lavage trachéal des chevaux *N. semolina*-positifs est significativement plus élevée que celle des chevaux *N. semolina*-négatifs. La plupart des chevaux positifs présentent de la toux et du jetage nasal. Hansson *et al.* ont obtenu

une prévalence entre 6 % et 3 % dans des écouvillons nasaux, et entre 3 % et 5 % dans des lavages trachéaux des chevaux sains et avec maladie respiratoire, respectivement (124). Aucune différence significative n'est observée quant à la prévalence entre les groupes au niveau de la trachée, par contre une croissance trachéale riche (3e quadrant/3) de *N. semolina* est plus fréquente dans le groupe avec maladie respiratoire. La prévalence de *N. semolina* dans les échantillons nasaux et trachéaux est supérieure à celle des autres *Pasteurellaceae* (*Pasteurella* spp., *Mannheimia* spp. ou *Actinobacillus* spp.; tous moins de 1 %). En se basant sur ces deux études, il s'avère pertinent d'inclure *N. semolina* dans le diagnostic différentiel d'un cheval présentant des signes d'atteinte respiratoire et de l'inflammation trachéale suppurative, mais la bactérie agit probablement comme un agent pathogène opportuniste qui peut aussi être retrouvé dans le microbiote normal des voies respiratoires. *N. semolina* est peut-être un organisme en émergence, mais il se peut plutôt que la bactérie n'ait pas été différenciée des autres *Pasteurellaceae* auparavant. Dans la plupart des cas, *N. semolina* est retrouvé en culture mixte, le plus souvent avec *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. *N. semolina* a également été isolé de manière prédominante chez quatre chevaux atteints de bronchopneumonie (191, 192). Chez trois de ces derniers cas, un asthme concomitant était suspecté (sans confirmation diagnostique) (191).

Récemment, le séquençage de nouvelle génération a mis en évidence une prédominance de *N. semolina* dans le nasopharynx d'ânes porteurs de *Streptococcus equi* subsp. *equi* suite à un épisode de gourme. Alors que les ânes sains présentent une faible abondance relative de *Nicoletella*, les ânes porteurs de *S. equi* ont une abondance relative moyenne de *Nicoletella* de 38 %. Les auteurs proposent que la dysbiose associée à la gourme aurait pu mener à cette surcroissance de *N. semolina*, et que ce microorganisme inhibe probablement la croissance d'autres bactéries habituellement retrouvées chez les individus sains (122). L'ADN de *N. semolina* a aussi été détecté par séquençage de nouvelle génération dans des biopsies conjonctivales de chevaux sains (125).

En résumé, *N. semolina* a été identifié dans le nez, le nasopharynx, les conjonctives, la trachée ainsi que les poches gutturales d'équidés sains ou avec atteinte respiratoire. L'utilisation de la culture comme première ligne de différenciation et d'identification est une limite commune à la majorité de ces études sur *N. semolina*. Considérant la croissance fastidieuse de cette bactérie malgré des conditions de culture adéquates, une sous-estimation de la prévalence réelle est probable et a mené à l'élaboration d'une des phases expérimentales de ce mémoire.

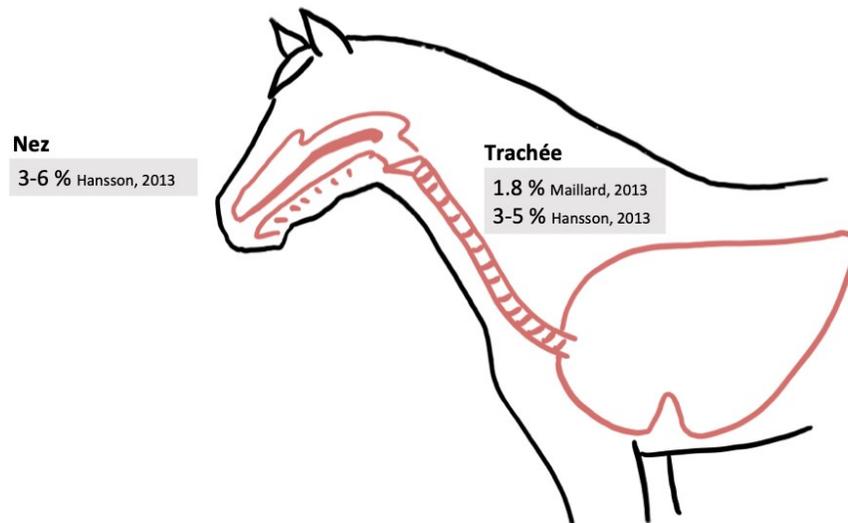


Figure 8. Prévalence de *N. semolina* dans le nez et la trachée de chevaux.

Prévalences nasale et trachéale de *N. semolina* en culture. Données tirées de Hansson et al., 2013 et Maillard et al., 2013 (124, 190).

3.5.5 *Actinobacillus* spp.

Les bactéries appartenant au genre *Actinobacillus* sont des bacilles pléomorphes non motiles formant des colonies grisâtre cireuses sur gélose (193). Elles peuvent croître sur gélose MacConkey. *Actinobacillus* spp. est fréquemment isolé de cultures mixtes dans le cas d'infections respiratoires, et un facteur prédisposant est souvent identifié, suggérant une infection secondaire des voies respiratoires par ces *Pasteurellaceae* dans la majeure partie des cas (170).

Les souches hémolytiques et non hémolytiques d'*Actinobacillus equuli* font partie du microbiote normal de la cavité orale (194) et des voies respiratoires supérieures de chevaux, en plus de pouvoir agir comme agent opportuniste causant des affections multiples (infections respiratoires, septicémie, métrite, péritonite, mammite, arthrite septique, endocardite, méningite, avortement, etc.) (170, 195, 196). Des souches non hémolytiques d'*A. equuli* sont isolées par culture de la cavité orale de 12 à 88 % des chevaux de différentes écuries (194). Un échantillonnage sérié réalisé chez quelques-uns de ces chevaux suggère un dynamisme du statut de porteur d'*A. equuli* dans le temps, et, lorsqu'on s'attarde au génotype via l'identification de patrons via électrophorèse (*pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE), il semble y avoir plus d'une souche retrouvée par troupeau et sur un même cheval. Quelques cas de morsures par un cheval ont mené à l'isolement d'*A. equuli* subsp. *haemolyticus*, d'*A. lignieresii*, d'*A. equuli*-like, d'*A. suis* et d'*Actinobacillus* spp. des plaies (197-199).

Initialement, il a été noté que certaines souches de *A. equuli* étaient hémolytiques. En 2002, Christensen *et al.* ont proposé de séparer l'espèce *A. equuli* en deux sous-espèces, soit *A. equuli* subsp. *equuli*, sous-espèce non hémolytique et CAMP négatif, et *A. equuli* subsp. *haemolyticus* (précédemment identifié comme Bisgaard 11), sous-espèce hémolytique et CAMP positive (163). C'est la présence de la toxine Aqx, une toxine *Repeats in the structural Toxin* (RTX), codée par le gène *aqx*, qui confère à *A. equuli* subsp. *haemolyticus* ses capacités hémolytiques (168). *Actinobacillus equuli* subsp. *equuli* est un agent important de septicémie néonatale souvent fatale, favorisée par un défaut de transfert d'immunité passive (résumé par (193)). La sous-espèce *haemolyticus* peut aussi être impliquée. Cette septicémie cause une vasculite suppurative et des emboles bactériens dont la lésion la plus fréquemment observée est une néphrite purulente, mais peut affecter d'autres organes également (pneumonie, nécrose lymphoïde, hépatite suppurative, adénite, sérosite, endocardite valvulaire, omphalite) (170). Étant retrouvé dans le microbiote oral et respiratoire supérieur de chevaux adultes sains (170, 195, 197), un passage de la jument au poulain à la naissance est suspecté. Rarement, *A. equuli* subsp. *equuli* et *haemolyticus* peuvent aussi causer des septicémies chez le cheval adulte (170). *A. equuli* non hémolytique est également impliqué dans des péritonites (200, 201). Il faut interpréter avec précaution les résultats d'isolement d'*Actinobacillus suis* équins identifiés avant 2002, soit avant la description d'une souche hémolytique d'*A. equuli* (*A. equuli* subsp. *haemolyticus*) (163, 170).

Un cas atypique de bronchopneumonie fatale à *A. equuli* subsp. *haemolyticus* associée à des hémorragies pulmonaires multifocales a été rapporté chez une jument Paint de six ans (196). Les hémorragies semblent avoir été causée par un dommage endothélial secondaire à la toxine hémolysine RTX de *A. equuli* subsp. *haemolyticus*. La présence du gène codant cette toxine ainsi que la transcription de ce dernier ont été confirmés par qPCR (amorces visant le gène *aqx*, sur ADN et sur ADNc pour vérifier l'activité transcriptionnelle) sur liquide trachéal et sur le parenchyme pulmonaire. La présentation clinique ainsi que les lésions observées ressemblent à celle observées suite à une infection à *Actinobacillus pleuropneumoniae* chez les porcs, et les lésions causées par cette bactérie chez cette dernière espèce sont attribuées aux toxines RTX. De manière similaire, des bactéries *A. suis*-like ont été isolées de lavages trachéaux ou d'effusion pleurale de chevaux avec infarctus hémorragiques pulmonaires aigus et pneumonie nécrosante, le plus souvent suivant un exercice intense (résumé de conférence (202)). D'autres bactéries *A. suis*-like sont associées à des cas de pneumonies ou pleuropneumonies (177).

Dans une étude sur 99 chevaux, la plupart des isolats d'*Actinobacillus* en culture proviennent des systèmes respiratoire, reproducteur ou de septicémies (170). *A. equuli* subsp. *equuli* est le plus fréquemment isolé

des échantillons respiratoires, suivi d'*A. equuli* subsp. *haemolyticus* et *A. lignieresii*. L'infection mixte est fréquente (autre *Actinobacillus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Clostridium* spp., herpèsvirus équin type I (EHV1), ou virus Influenza A). Les *Actinobacillus* isolés des voies respiratoires sont probablement des agents pathogènes secondaires, des agents pathogènes « faibles » nécessitant une condition préexistante afin de proliférer, ou des contaminants provenant des voies respiratoires supérieures lors des prélèvements (170). Une autre étude basée sur le MALDI-TOF MS suivi de la PCR pour toxines RTX et le séquençage de l'ARNr 16S a plutôt montré qu'*Actinobacillus equuli* subsp. *haemolyticus* est la bactérie la plus isolée dans les cas de pneumonie, de pneumonie post-transport ou d'infection des voies respiratoires supérieures (164). *A. equuli* subsp. *equuli* n'a quant à lui pas été retrouvé dans les échantillons des voies respiratoires. Les autres isolats de chevaux avec pneumonie correspondent à du *A. pleuropneumoniae* ou du [*Pasteurella*] *caballi*. Les résultats de cette étude, avec une identification initiale erronée (basée uniquement sur le MALDI-TOF) pour dix de 27 échantillons, suggèrent que le MALDI-TOF peut s'avérer sous-optimal pour une identification précise des espèces d'*Actinobacillus* (164).

3.5.6 *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae est le *Pasteurellaceae* le plus important en ce qui concerne les maladies chez les humains (153). Cet agent pathogène opportuniste propre aux humains est retrouvé dans le microbiote normal des voies respiratoires supérieures et possède différents mécanismes d'attachement à la muqueuse et d'évasion du système immunitaire (203). *H. influenzae* est la bactérie la plus isolée chez les individus en exacerbation aiguë d'asthme bronchique et d'asthme sévère (15, 204), est associé avec un score détérioré au *Asthma Control Questionnaire* (128) et avec la durée de la condition (136, 204). Chez les patients atteints d'asthme difficilement contrôlable, une charge (qPCR ou culture) plus élevée en *H. influenzae* dans le sputum est associée à une fréquence plus importante de crises d'exacerbation (204, 205). *Haemophilus* spp. (ou *H. influenzae* quand le qPCR est utilisé) est surreprésenté chez les patients atteints d'asthme de phénotype neutrophilique (30, 135-138). L'implication de cette bactérie dans l'asthme chez les humains, du moins chez les patients atteints du phénotype neutrophilique ou d'asthme difficilement contrôlable, est d'autant plus supportée par l'efficacité de l'ajout d'un antibiotique macrolide (azithromycine) aux traitements conventionnels : ce traitement diminue la charge de *H. influenzae* (145), et ces patients présentent moins de crises d'exacerbation que ceux ne recevant pas ce traitement antibiotique (205). *H. influenzae* est aussi retrouvé chez les patients atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) (13, 203, 206-208), plus particulièrement ceux en exacerbation

(207). Même si jamais isolé chez des équidés, il s'avère pertinent de rechercher cette bactérie chez des chevaux atteints d'asthme étant donné son association avec l'asthme chez les humains.

3.5.7 Autres *Pasteurellaceae* isolés chez les chevaux

Certains *Pasteurellaceae* ont été identifiés occasionnellement en ayant recours à une caractérisation biochimique complète. *Pasteurella pneumotropica*, [*P.*] *haemolytica* (maintenant *Mannheimia haemolytica*) et *P. mairii* ont été isolés de lavages trachéaux de chevaux sains et présentant de l'inflammation des voies respiratoires inférieures (125). L'isolement de *M. haemolytica* et de *Pasteurella multocida* est possible mais rare chez les chevaux (Dre J-H Fairbrother, communication personnelle).

3.5.8 Résumé : *Pasteurellaceae* dans les voies respiratoires d'équidés

Le tableau présenté ci-dessous résume les différents *Pasteurellaceae* isolés de la cavité orale ou des voies respiratoires d'équidés en plus du statut de santé de ces derniers (sain ou malade, le cas échéant quelle pathologie lorsque décrite).

Tableau 5. Résumé de la littérature sur les *Pasteurellaceae* dans la cavité orale et les voies respiratoires.

<i>Pasteurellaceae</i>	Site d'isolement	Méthode d'identification	Références
<i>A. equuli</i> subsp. <i>haemolyticus</i>	Cavité orale cheval sain	Culture + analyse biochimique + MALDI-TOF + séquençage ARNr 16S	(199)
	Pneumonie, pneumonie post-transport, infection VRS	Culture + analyse biochimique	(164)
	Bronchopneumonie et pneumonie hémorragique	Culture + PCR toxine RTX	(196)
	Infection voies respiratoires	Culture + analyse biochimique	(170)
<i>A. equuli</i> subsp. <i>equuli</i>	Infection voies respiratoires	Culture + analyse biochimique	(170)
<i>A. equuli</i>	Cavité orale et VRS de chevaux sains	Culture + analyse biochimique	(194, 195, 197)
	Lavages trachéaux chevaux sains et atteints d'asthme léger à modéré		(125)
<i>A. lignieresii</i>	Cavité orale cheval sain	Culture + analyse biochimique	(197)
	Lavages trachéaux chevaux sains et atteints d'asthme léger à modéré		(125)
<i>A. pleuropneumoniae</i>	Pneumonie	Culture + analyse biochimique + MALDI-TOF + séquençage ARNr 16S	(164)
<i>A. suis</i>	Cavité orale cheval sain	Culture + analyse biochimique	(197)
<i>A. suis</i> -like	Pneumonie ou bronchopneumonie	Culture + analyse biochimique	(177, 202)

	Lavages trachéaux chevaux sains et atteints d'asthme léger à modéré		(125)
<i>Actinobacillus</i> spp.	Cavité orale/gencive chevaux sains (et atteints d'asthme sévère (11))	NGS (11, 179)	(11, 179, 198)
	Lavages trachéaux chevaux sains et atteints d'asthme modéré	Culture	(33)
<i>N. semolina</i>	Lavages trachéaux ou nez/poches gutturales/nasopharyngien de chevaux ou ânes avec maladie respiratoire	Culture + analyse biochimique + séquençage ARNr 16S	(122, 124, 159, 190, 191)
	Bronchopneumonie		(191, 192)
	Lavages trachéaux et échantillon nasal de chevaux sains		(124)
<i>[P.] caballii</i>	Infection voies respiratoires	Culture + analyse biochimique (et immunohistochimie (185), MALDI-TOF + séquençage ARNr 16S (164))	(183, 186)
	Pneumonie et pleuropneumonie		(164, 177, 185)
	Cavité orale chevaux sains		(167, 187)
<i>P. multocida</i>	Cavités orale et nasale et LBA chevaux sains et atteints d'asthme sévère	NGS	(11)
<i>P. pneumotropica</i> , <i>P. mairii</i> et <i>[P.] haemolytica</i> (maintenant <i>M. haemolytica</i>)	Lavages trachéaux chevaux sains et atteints d'asthme	Culture + analyse biochimique	(125)
<i>Pasteurella</i> spp. et/ou <i>Actinobacillus</i> spp.	Inflammation des voies respiratoire inférieures	Culture + analyse biochimique	(5-8, 10, 125)
	Pneumonie ou pleuropneumonie		(175, 176, 178)
	Nasopharynx chevaux sains ou atteints de maladie respiratoire		(123)
	Lavages trachéaux chevaux gardés avec la tête élevée		(180)
<i>Pasteurellaceae</i>	Cavités orale et nasale et LBA chevaux sains et atteints d'asthme sévère	NGS	(11)
	Gencive chevaux sains		(179)
	Lavages trachéaux chevaux, surtout post-transport	Culture + analyse biochimique et NGS	(181)

	Lavages trachéaux chevaux sains et atteints d'asthme modéré	Culture et qPCR	(33)
--	---	-----------------	------

A. : Actinobacillus, ARNr 16S : gène codant l'acide ribonucléique ribosomique 16S, LBA : lavage bronchoalvéolaire, M. Mannheimia, MALDI-TOF : Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight, N. : Nicoletella, NGS : séquençage de nouvelle génération, P. : Pasteurella, qPCR : réaction de polymérase en chaîne quantitative, RTX : toxines Repeats in the structural Toxin, VRS : voies respiratoires supérieures.

Chapitre 4 – Objectifs et hypothèses

4.1 Objectifs

À la lumière de cette revue de la littérature sur les *Pasteurellaceae*, de la croissance fastidieuse de certains membres de cette famille à la contribution potentielle des bactéries à l'inflammation dans l'asthme équin, l'objectif de ce mémoire est de quantifier et d'évaluer la prévalence de *Pasteurellaceae* spécifiques dans la bouche et les voies respiratoires de chevaux sains et atteints d'asthme sévère gardés dans différents environnements. Le but est d'évaluer si certains genres ou certaines espèces de cette famille bactérienne sont plus fréquents ou plus abondants chez les chevaux atteints d'asthme sévère. Le choix des *Pasteurellaceae* pour lesquels des amorces ont été synthétisées est basé sur les bactéries ayant été identifiées dans les voies respiratoires équines et sur les *Pasteurellaceae* associés à l'asthme chez les humains.

Suite aux résultats initiaux encourageants obtenus pour *Nicoletella semolina*, de plus amples recherches ont été poursuivies, incluant deux phases supplémentaires et une compilation de cas cliniques. L'objectif pour *N. semolina* est également de quantifier la bactérie dans la bouche et les voies respiratoires de chevaux sains et atteints d'asthme dans différents environnements. Pour les cas cliniques, les objectifs sont 1) d'évaluer la présentation clinique de chevaux positifs à la bactérie (identification confirmée au MALDI-TOF ou au qPCR) et 2) de comparer ces résultats avec des chevaux négatifs présentés pour les mêmes raisons de consultation.

4.2 Hypothèses

Nos hypothèses sont 1) que les bactéries [*Pasteurella*] *caballi*, *Pasteurella multocida*, *Nicoletella semolina* et *Actinobacillus equuli* sont présentes chez plusieurs chevaux atteints d'asthme sévère (forte prévalence) et en plus grande quantité chez ceux-ci par rapport aux chevaux sains, surtout lors d'exacerbation, et 2) que les bactéries *Haemophilus influenzae*, *Actinobacillus suis*, *Actinobacillus lignieresii* et *Actinobacillus pleuropneumoniae* sont rares ou absentes chez les chevaux sains et les chevaux atteints d'asthme.

Chapitre 5 – Article

Présentation sous forme d'article.

L'article a été soumis au *Journal of Veterinary Internal Medicine* en septembre 2020, a été accepté en avril 2021, et a été publié en mai 2021.

Contribution prépondérante de l'étudiante (Flavie Payette) dans l'organisation du projet, l'acquisition, l'analyse et l'interprétation des données ainsi que dans l'écriture du manuscrit. Audrey Charlebois a participé à l'acquisition et l'analyse des données ainsi qu'à la révision du manuscrit. Dre Julie-Hélène Fairbrother a aidé à l'acquisition des données et la révision du manuscrit. Guy Beauchamp a réalisé les analyses statistiques et a révisé la section associée dans le manuscrit. Dre Mathilde Leclère a grandement participé à l'élaboration des hypothèses, du design expérimental, l'analyse et l'interprétation des données ainsi qu'à l'écriture du manuscrit.

Les références sont indiquées en exposant dans le manuscrit (sections 5.1 à 5.7) pour faciliter leur distinction avec le reste du mémoire. Elles font référence à la [section 5.7](#).

***Nicoletella semolina* in the airways of healthy horses and horses with severe asthma**

Flavie Payette¹, Audrey Charlebois^{1*}, Julie-Hélène Fairbrother², Guy Beauchamp³, Mathilde Leclere¹

¹ Clinical Sciences Department and ³ Veterinary Biomedicine Department, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal.

² Bacteriology diagnostic laboratory, Complexe de Diagnostic et d'Épidémiologie Vétérinaires du Québec, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec and Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal.

* Audrey Charlebois's current affiliation is National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada.

Corresponding author: Mathilde Leclere. 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada, J2S 2M2. mathilde.leclere@umontreal.ca.

Keywords: Equine, Heaves, Microbiota, *Pasteurellaceae*, Recurrent Airway Obstruction

List of abbreviations: BALF: bronchoalveolar lavage fluid, CFU: colony-forming units, DNA: deoxyribonucleic acid, MALDI-TOF MS: matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, PMN: polymorphonuclear, qPCR: quantitative polymerase chain reaction, rRNA: ribosomal ribonucleic acid, R5: lung resistance measured at 5 Hz, R10: lung resistance measured at 10 Hz, Δ PL: transpulmonary pressure.

Acknowledgments: Funding was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (06090). The funding source did not have any involvement in the study design, data analysis and interpretation, or writing and publication of the manuscript. The authors acknowledge Marie-Lou Gauthier and Valérie Dubuc their contribution, as well as Ms Dominique Michel for giving us access to her horses.

Conflict of Interest Declaration: Authors declare no conflict of interest.

Off-label Antimicrobial Declaration: Authors declare no off-label use of antimicrobials.

Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) or Other Approval Declaration: All animal manipulations were performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council for Animal Care, and the protocol was approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Montreal (15Rech1760, 19Rech1995 and 20Rech2082).

Human Ethics Approval Declaration: Not needed for this study.

5.1 Abstract

Background – *Nicoletella semolina* was identified in the airways of horses and its low prevalence could be due to its difficult differentiation from other *Pasteurellaceae*.

Objectives – To develop a molecular method for the identification of *N. semolina* and to evaluate its prevalence in the mouth and the airways of healthy and severe asthmatic horses.

Animals – 6 healthy and 6 severely asthmatic horses in phase I, 10 severely asthmatic horses in phase II, 10 healthy horses in phase III.

Methods – Cohort (phases I and II) and cross-sectional (phase III) studies. qPCR primers targeting the *sodA* gene were optimized. *N. semolina* was quantified in oral and nasal washes and in BALF (phase I, sampled twice), in nasal washes and BALF (phase II, sampled twice), and in nasal washes (phase III).

Results – *N. semolina* was found in the nose of 5, 10 and 9 horses in phases I, II and III, respectively (first sampling for phases I and II). Six BALF from 5 different horses were positive for *N. semolina* in phase II. In phase I, there was no significant difference in the nasal loads of healthy horses (median (range): 2.04×10^4 copies/mL (0 - 2.44×10^5)) and asthmatic horses in exacerbation (3.75×10^2 (0 - 4.84×10^6)) (Wilcoxon's rank sum test, $p=0.57$).

Conclusions and clinical importance – *N. semolina* is commonly found in the airways of horses. The potential pathogenicity of *N. semolina* remains to be elucidated but the molecular technique we developed will facilitate future studies.

5.2 Introduction

Asthma is a common disease affecting approximately 15 % of horses in its severe form¹, while milder forms of the disease are likely more prevalent²⁻⁴. Although asthma is primarily considered a non-infectious disease, bacteria could act as contributing factors by inducing an inappropriate innate response, resulting in excessive inflammation of the airways⁵. Lower airway dysbiosis in horses with severe and moderate asthma suggests that bacteria are related to inflammation^{6,7}. However, whether dysbiosis perpetuates pulmonary inflammation or occurs secondarily to chronic allergic inflammation is unknown⁸. There is a correlation between bacteria isolated from the trachea of horses and airway inflammation^{9,10} or the risk of respiratory disease¹¹. It remains uncertain if non-specific bacterial molecular patterns, such as lipopolysaccharides¹², or specific virulence factors of pathogenic or opportunistic bacteria are a cause, but the presence of certain bacteria in the lower airways has been associated with asthma in horses. These bacteria include *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*^{6,9,10,13,14}, *S. pneumoniae*^{9,10,14} and bacteria from the *Pasteurellaceae* family, including *Pasteurella* spp. and *Actinobacillus* spp.^{9,10,14,15}.

Recently, a new *Pasteurellaceae*, *Nicoletella semolina*, was isolated from horses with and without respiratory diseases^{16,17}. It is associated with tracheal inflammation¹⁸, and is found in larger amount in horses with respiratory diseases¹⁷. This suggests that *N. semolina* could be, as are other *Pasteurellaceae*, an opportunistic pathogen¹⁹, and could occasionally act as a contributing factor to exacerbations of asthma in horses. Elucidating *N. semolina*'s role using standard culture is complicated by its fastidious growth and difficult differentiation from other *Pasteurellaceae*¹⁶. The development of a molecular method will improve our ability to detect its presence and will help determine its role in the airways of horses. The objectives of the study were I) to develop a molecular method for the identification of *N. semolina*, and II) to evaluate its prevalence in the mouth and the airways of healthy and severe asthmatic

horses kept in different environments. The hypothesis was that *N. semolina* is more commonly detected in horses with asthma, especially during exacerbation.

5.3 Methods

5.3.1 Study design

The study was conducted in three phases, the first two with research horses and the third one in a private barn. Samples from the Equine Respiratory Tissue Biobank (http://www.ertb.ca/media/html/en_biobank.html) were used in phase I. Briefly, oral and nasal washes and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from six controls and six severe asthmatic horses, stored at -80°C from a previous project, were analyzed ⁷. Samples had been collected when horses were on grass pasture (low antigen exposure), and after being housed indoors and fed poor quality hay (high antigen exposure) for three weeks. In phase II, BALF and nasal washes were collected from ten severe asthmatic horses (different from phase I) when experiencing exacerbation upon being fed poor quality hay (high antigen exposure), and after 6 weeks of being fed either hay soaked for 45 minutes ($n = 5$) or alfalfa pellets ($n = 5$) in order to achieve clinical remission (low antigen exposure). Other than having only asthma-affected horses, phase II differs from phase I by having horses in remission kept indoors, instead of on pasture. In phase III, nasal washes were collected from ten client-owned, clinically healthy horses living in the barn of the initial case from which *N. semolina* was isolated (unrelated to the research facility). All experimental procedures were performed in accordance with the Canadian Council for Animal Care guidelines and were approved by the animal care committee of the Université de Montréal (15Rech1760, 19Rech1995 and 20Rech2082).

5.3.2 Sample collection and DNA extraction

In phase I, oral, nasal and BALF samples were obtained as previously described ⁷. Briefly, oral and nasal cavities were rinsed using 50 mL of sterile 0.9% saline collected by gravity in a sterile tube, and BALF was collected by passing a 2.5 m videoendoscope through a protective sheath, and by instilling and aspirating two 250 mL boluses of sterile 0.9% saline. In phase II, BALF samples and nasal washes were collected as in phase I, with the exception that a 1.6 m videoendoscope without a protective sheath was used for BALF collection (Olympus, GIF-H180, Olympus Canada Inc., Richmond Hill, ON, Canada). In phase III, nasal washes were collected without sedation, using a plastic bag around the nose to avoid spills. All samples were kept on ice until freezing at -80°C within three hours of collection.

In phase I, 2 to 5 mL (based on availability) of oral and nasal washes and of BALF samples were used for DNA extraction. Oral washes were filtered (sterile 4-ply gauze) to eliminate large feed particles. In phase

II, 5 mL of nasal wash and 20 mL of BALF were used, to increase chances of detection in BALF. In phase III, 5 mL of nasal wash were used for extraction. DNA was initially pelleted by centrifuging samples at 18 400 x g over 30 minutes, at 4 °C. DNA extraction was performed using DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada) following the manufacturer's protocol, with minor modifications to optimize extraction of low biomass samples.

5.3.3 Initial *N. semolina* strain

The initial *N. semolina* strain was obtained from a 2-month-old Standardbred colt presented to the Equine Hospital of the Université de Montréal with pneumonia. Culture of the tracheal aspirate and tentative matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) identification of the bacteria present showed a few colonies of *Rhodococcus equi* and heavy growth (> 10 000 CFU/mL) of an unidentified *Pasteurellaceae*. DNA was extracted as described above. Complete 16S ribosomal RNA gene (V1-V9, 1 465 base pairs) was sequenced by Génome Québec (Génome Québec Inc., Montreal, QC, Canada). Primers 27F: 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and 1492R: 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3' were used for amplification and sequencing. Sequencing results were run in Nucleotide BLAST (standard databases) and confirmed the identification of the unknown *Pasteurellaceae* strain as *N. semolina*, with 99.85 % homology with the 16S ribosomal RNA type strain (CCUG43639¹⁶), with a two-base-pair difference.

N. semolina-confirmed strain's spectra was added to the MALDI-TOF database of the bacteriology diagnostic laboratory of the Complexe de diagnostic et d'épidémiologie vétérinaires du Québec (CDEVQ) of the Université de Montréal. Briefly, MALDI-TOF technology was used on a Microflex LT/SH mass spectrometer (Bruker Daltonics, Milton, ON, Canada). Generated spectra were compared with spectra from the RUO Biotyper database (Bruker Daltonics, Milton, ON, Canada) and with a homemade database from the bacteriology diagnostic laboratory, then including the *N. semolina* spectra of the initially sequenced strain.

5.3.4 Quantitative PCR

Primers were designed using Geneious Prime software v.2019.2.1 (Biomatters Ltd., San Diego, CA, United States), based on available NCBI Nucleotide sequences. The primer set amplifies *N. semolina*, targeting a 130 base-pair amplicon in the *sodA* gene (based on DSM16380). Forward primer sodAF 5'-CAGCGATTGGTCGATTTGGCTCT-3' and reverse primer sodAR 5'-GGATAACCAGACACCTGCAA-3' were further optimized. PCR product was sequenced to confirm gene identification. Primers were tested with eight other bacteria from the *Pasteurellaceae* family, three other Gram-negative bacteria, and one Gram-

positive bacteria often found in equine airways (*S. equi* subsp. *zooepidemicus*). There was no DNA amplification, confirming the high specificity of these primers for *N. semolina*. Five other isolates of *N. semolina* identified in the following months using the annotated MALDI-TOF were tested with the primers and led to DNA amplification in all cases, confirming that our primers could detect more than one isolate of *N. semolina*. A standard curve was made using serial dilutions. Efficiency of 89.63 % and R² of 0.99 or more were considered adequate ²⁰.

Quantitative PCR (qPCR) was carried out using Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, Australia) with QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada), following the manufacturer's recommendations. Briefly, 2.0 µL of extracted DNA, 0.5 µM of forward and reverse primers (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, IL, United States), 10 µL of QuantiTect SYBR Green and 4 µL of sterile molecular grade water (Wisent, Saint-Bruno, QC, Canada) were used, for a total of 20 µL per reaction. Every run had an initial hold period of 15 minutes at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 94 °C, 30 s at 59 °C and 30 s at 72 °C, ending with a melt from 72 °C to 95 °C. In each qPCR run, all samples were run in duplicates, with inclusion of a water mock and three samples of known concentration from the standard curve. When only one duplicate was positive, it was run again, and a sample was considered positive if at least two runs were positive, and mean value was used for analysis. The standard curve was imported within each run and quantification was reported in gene copies per mL of sample. Melt curves were analyzed to remove non-specific amplifications.

5.3.5 Statistical analysis

Statistical analysis and figures were carried out using SAS v9.4 (Cary, N.C., United States) and GraphPad Prism software v8.3.0 (San Diego, CA, United States). *N. semolina* loads among horses were not normally distributed. In phase I and BALF samples of phase II, Wilcoxon's signed-rank tests were used to compare loads as a function of antigen exposure in each group, and Wilcoxon's rank sum tests were used to compare loads as a function of groups for each antigen exposure. When groups did not differ statistically, horses were pooled and a Wilcoxon's signed-rank test was used to compare loads between environments (phase I) or between asthma status (phase II, lung only). For nasal samples of phase II and BALF recovery volumes, a linear mixed model on log-transformed data was used, with horse identification as the random factor and group and diet as fixed factors. The number of positive horses between level of antigen exposure (pasture and hay in phase I, hay and pellets/soaked hay in phase II) was compared with McNemar's test. Spearman's correlations were used to test the association between BALF neutrophils percentages, lung resistance at 5 Hz over resistance at 10 Hz (R5 to R10 ratio) and *N. semolina* loads in

phase I, between loads and BALF recovery volume and lung function (resistance, elastance and transpulmonary pressure (Δ PL)) in phase II, and between nasal loads and age for all three phases. For the correlations with age, only loads of horses housed indoors and eating hay were used for phases I and II. P values of less than .05 were considered statistically significant.

5.4 Results

5.4.1 Horses, lung function and BALF cytology

Lung functions and bronchoalveolar lavage cytology from phase I were previously reported⁷. Horses with asthma developed airway obstruction and severe bronchoalveolar lavage neutrophilia with hay feeding and indoor environment, while controls did not. In phase II, horses were all in exacerbation at base line, and were in remission or close to remission after 6 weeks of low-antigen exposure (Westerfeld et al., in writing). Horses from phase III were deemed healthy based on physical examination and history.

5.4.2 Phase I: Control and asthmatic horses

PCR quantification revealed the presence of *N. semolina* in 10 oral and 13 nasal samples from eight different horses (Figure 9A and B). All BALF samples were negative for *N. semolina* (Figure 9C). Oral and nasal loads were not significantly different between control and asthmatic horses in either environment (oral: $p \geq .46$; nasal: $p \geq .57$), or between environments in either group (oral: $p \geq .25$; nasal: $p = .13$). Pooling horses from the two groups, there was significantly more *N. semolina* in the nose of horses kept indoors on hay rather than on pasture ($p = .008$), but not in their mouth ($p = .30$). When horses were on pasture, 3 oral and 5 nasal washes were positive for *N. semolina*, while 7 oral and 8 nasal washes were positive when horses were indoors (25 to 66 % positive samples overall), with no significant difference between environments in either group ($p \geq .13$). All horses positive in the mouth were also positive in the nose and all but one horse had higher loads (per mL recovered) in their nose than in their mouth. There was no significant correlation between BALF neutrophils percentage or lung function (R5 to R10 ratio) and *N. semolina* load in the mouth ($p \geq .26$) nor in the nose ($p \geq .16$), on pasture and with hay exposure. There was no correlation between age and nasal loads of horses on hay ($p = .51$).

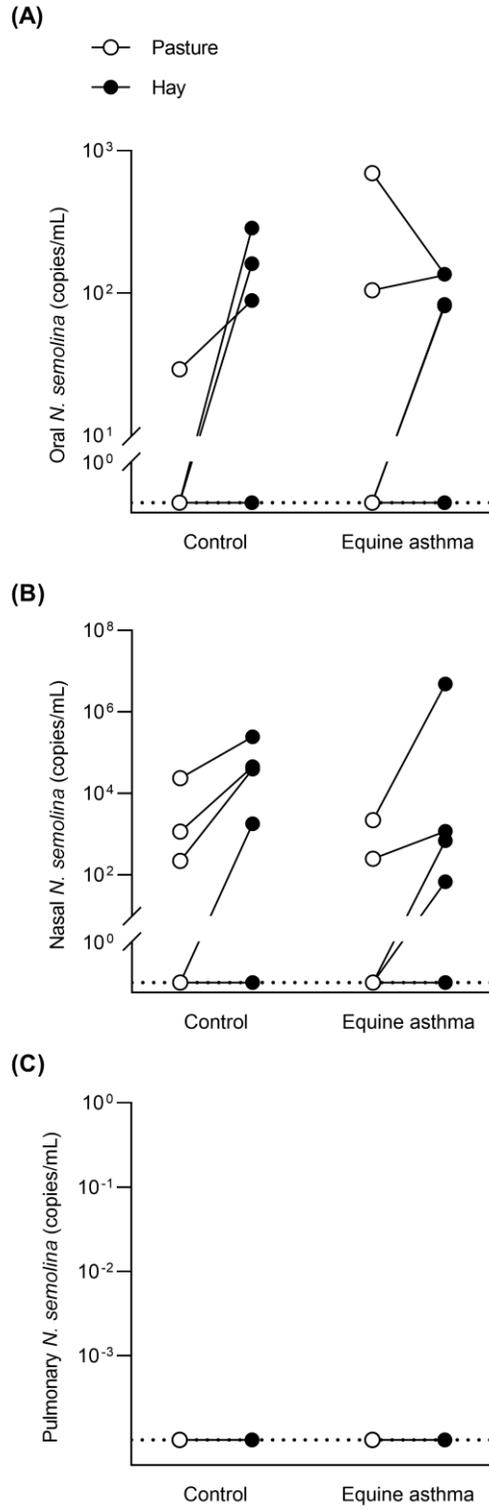


Figure 9. *Nicoletella semolina* loads in phase I.

N. semolina oral (A), nasal (B) and pulmonary (C) loads in gene copies per mL extracted from healthy ($n = 6$) and asthmatic horses ($n = 6$) housed on pasture (open circles) and indoors and fed hay (solid circles). There was significantly more *N. semolina* in the nose of horses on hay (Wilcoxon's signed-rank test on pooled data; $p = .008$). No significant difference between groups or environments in the mouth and lungs ($p \geq .25$).

5.4.3 Phase II: Asthmatic horses

Nicoletella semolina was detected in all but one nasal samples from phase II (9/10 in remission and 10/10 in exacerbation, 95 to 100% positive samples), and in six BALF samples (5/10 in remission and 1/10 in exacerbation) (Figure 10). The linear mixed model showed no significant effect of asthma status (remission/exacerbation) ($p = .42$), type of diet ($p = .33$), or interaction between these factors ($p = .92$) on nasal loads. Pulmonary loads were not different between antigen exposures in either diet group ($p \geq .42$), or between diets in either antigen exposure ($p \geq .25$). When horses from both diet groups were pooled, pulmonary loads were not significantly higher in horses in remission ($p = .06$). Similarly, the percentage of *N. semolina* positive horses in the lungs was not significantly different between remission (5/10, 50 %) and exacerbation (1/10, 10%) ($p = .13$). There was no significant correlation between nasal and pulmonary loads ($p \geq .21$), and between pulmonary loads and lung function when horses were in exacerbation ($p = .86$) and in remission ($p \geq .31$). In addition, BALF recovery volume did not correlate with lung function ($p > .06$) and was not different between diet groups or antigen exposure ($p \geq .90$). There was no correlation between age and nasal loads of horses in exacerbation ($p = .47$).

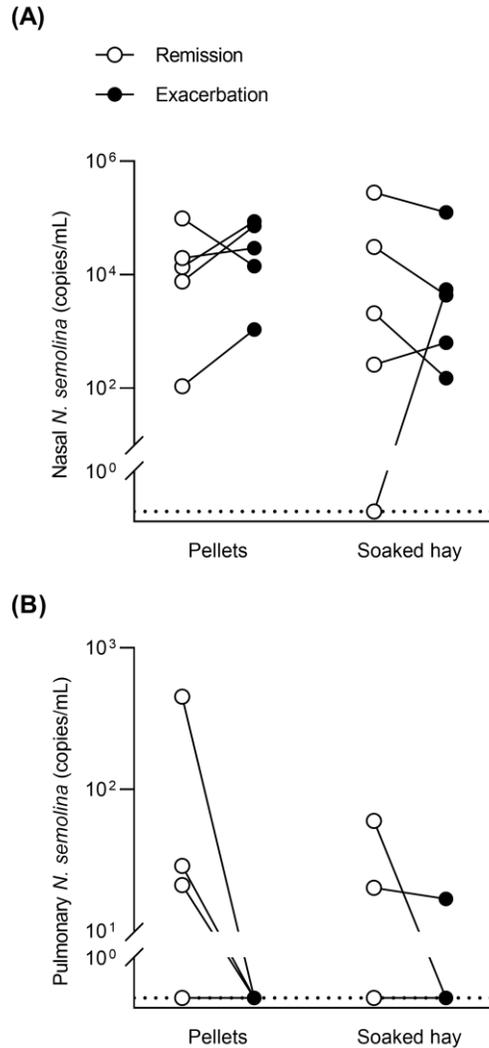


Figure 10. *Nicoletella semolina* loads in phase II.

N. semolina nasal (A) and pulmonary (B) loads in gene copies per mL extracted from asthmatic horses fed either pellets ($n=5$) or soaked hay ($n=5$) during remission (open circles) and exacerbation of asthma (solid circles). No significant effect of feed or asthma status on log-transformed nasal loads (linear mixed model; $p \geq .33$) and no significant difference between diet or asthma status in the lungs (Wilcoxon's signed-rank tests; $p > .06$).

5.4.4 Phase III: Healthy horses from a different barn

Ten horses, ranging from 6 months to 12 years of age, were sampled in the Fall of 2020, one year after the foal with pneumonia had returned home. A total of approximately 20 horses and foals lived on the facility. Not all horses had direct contact with one another, but they shared paddocks, the arena and the wash stall. *N. semolina* was identified in the nose of all but one horse (9/10 horses). The four yearlings who had lived in the same paddock for many months showed the highest loads of *N. semolina* in their

nasal cavities, along with a 6-month-old foal. A significant negative correlation was observed between nasal loads and age ($r = -.68$, $p = .04$) (Figure 11). The foal with pneumonia, who had also been tested at 4 months of age and was now a healthy yearling, remained positive. Its dam, who had also been positive previously, was the only horse in which the bacteria was not detected.

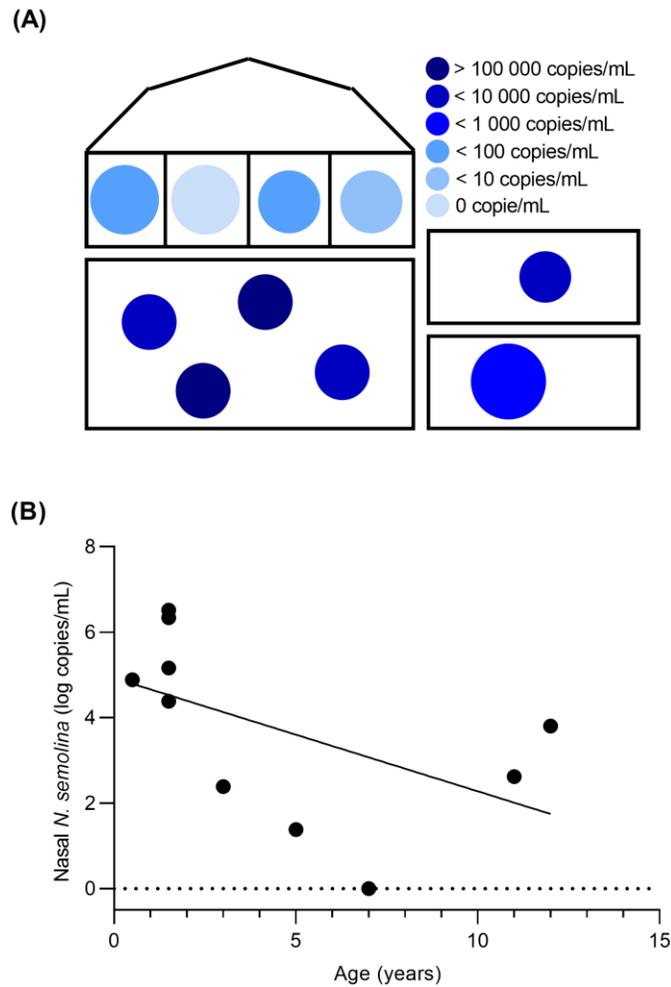


Figure 11. *Nicoletella semolina* in phase III.

Layout showing the horses in the private barn where 10 healthy horses were sampled in the nose (A). Each circle represents a horse; younger horses are represented by smaller circles and darker shades represent horses with higher loads of *N. semolina*. There is a significant negative correlation between nasal loads and age (Spearman's correlation; $r = -.68$, $p = .04$) (B).

5.5 Discussion

This report describes a culture-independent method for the detection of *N. semolina* in the airways of horses. There are few reports of cases in North America²¹ and a 2012 study included two strains

originating from Canada²². *N. semolina* could be an emerging bacterium, but further research would be needed to support this and for now, we hypothesize that *N. semolina*'s fastidious growth and identification prevented accurate identification in the past. Overall, in our study sample of horses in close contact with one another, *N. semolina* was found in 25 to 58 % of oral samples, 41 to 100 % of nasal samples and in up to 30 % of BALF samples. *N. semolina* was also added to the MALDI-TOF database of the Complexe de diagnostic et d'épidémiologie vétérinaires du Québec (CDEVQ) of the Université de Montréal.

5.5.1 Higher prevalence than previously reported

Using culture, *N. semolina* is found in the nose of up to 6% (12/207) of healthy horses¹⁷, and in the trachea of between 1.8% (19/1054) and 5% (49/921) of horses with respiratory diseases^{17,18}. For comparison, 41% (5/12) and 100% (10/10) of the 22 different horses sampled in phase I and II, respectively, were positive for *N. semolina* in their nose on their first sampling, with 18 horses having at least one positive sample (mouth, nose or lungs) on at least one occasion. *N. semolina* was also identified in 9 of the 10 horses sampled at an unrelated barn. The use of a molecular method increases the chances of detecting the presence of bacteria compared to culture²³ and could explain, in part, the high prevalence obtained in these three samples of horses. Approximately 68% of tracheal aspirates of horses yield growth in standard aerobic culture, whereas all samples are positive for 16S rRNA gene quantification²⁴. Similar results are obtained when analyzing nasopharyngeal and sputum samples from humans with bronchial asthma²⁵ or with pneumonia²⁶. The increased sensitivity of molecular methods compared to culture is further enhanced by the fact that *Pasteurellaceae* show limited survival outside their hosts²⁷. In addition to its fastidious growth¹⁶, *N. semolina* identification using traditional phenotypical and biochemical characterization is not always possible given the close similarities between *Pasteurellaceae*^{16,27,28}. It is therefore possible that studies relying on culture for the detection of *N. semolina* underestimate its prevalence in horses. However, in the current study, samples were not analyzed using standard bacterial culture for a direct comparison between techniques and the high prevalence could be at least in part the result of sampling horses living in the same environment rather than sampling a large number of unrelated horses from different barns, as in previous studies^{17,18}. In Phase III, horses also shared the same environment and all but one harbored the bacteria in their nose. In humans, the skin, and to a lesser extent, the oral and gut, microbiota is more similar in individuals living within the same household than between households²⁹. This remains true for the skin of genetically unrelated roommates³⁰ and the fecal microbiota of spouses³¹ and of monozygotic twins³². It is therefore possible that horses housed together harbor a similar microbiota. The apparent higher prevalence in phase II, where almost all horses harbored

N. semolina in their nose, could result from decreased ventilation in the barn as the experiment was carried out during wintertime, which could increase concentration of airborne particles³³⁻³⁵. Thus, our results raise the possibility that cohabitation plays a role in *N. semolina*'s carrier status.

5.5.2 Effect of housing

In phase I, there were significantly more *N. semolina* in the nose of horses housed inside and in phase II, when all horses had been indoors for more than a month, 19 out of 20 nasal samples were positive. We hypothesized that indoors housing could induce mucosal inflammation which could favor the growth of *N. semolina*. Whether nasal mucosa inflammation is present in horses housed indoors remains speculative, but horses with and without asthma develop airway inflammation when housed indoors, at least transiently^{12, 36-38}. Alternatively, hay or pellets could act as a source of bacteria and create a microenvironment inside the barn increasing exposition to airborne particles. If that was the case, we could have seen higher loads in asthmatic horses fed soaked hay, as overall bacterial content tends to increase with soaking³⁹⁻⁴¹, but levels were similar whether horses were fed dry hay, soaked hay or pellets. This points back towards an effect of being housed indoors *per se*, where horses are more exposed to suspended aerosols and particles, including bacteria that tend to remain suspended in the air for long periods of time^{39,42}.

5.5.3 *Nicoletella semolina* in bronchoalveolar lavage fluid

Initial conclusion from phase I was that there was no *N. semolina* in the horses' lungs. DNA extraction from a larger BALF volume (20 mL compared to 5 mL) in phase II resulted in the detection of *N. semolina* in six BAL from five different horses. Because we did not use a protective sheath in phase II, it is however difficult to determine if *N. semolina* is a true inhabitant of the lungs or if it was carried over from the upper airways. Lower airway sampling can bring contamination from the upper airways^{43,44} and a protective sheath can be used to minimize such contamination⁴³. However, there was no correlation between nasal and BALF loads and studies in humans show that carry over from the upper airways with unprotected bronchoscopes plays a minimal role in the communities observed in BALF samples^{8,45,46}.

Five out of 10 horses in remission in phase II were positive for *N. semolina* in their lungs as opposed to only one when in exacerbation (not statistically significant). Higher BALF recovery volume from decreased fluid trapping with reduced airway obstruction^{47,48} was explored as a potential explanation but BALF recovery volume was not different between remission and exacerbation and it was not correlated to lung function. It would have been interesting to quantify *N. semolina* pulmonary loads in the healthy horses from phase III using the 20 mL volume from phase II and the protective sheath from phase I in order to

help understand its significance when detected in horses' lungs. Unfortunately, horses from phase III were client-owned horses and only minimally invasive procedures could be performed.

5.5.4 Potential role of *N. semolina* in the airways

Whether *Nicoletella semolina* is an emerging pathogen, an opportunistic organism or simply is part of the normal microbiota of horses remains unclear, but it does not seem to act as a primary pathogen. It is suggested that infection by *N. semolina* should be considered when in presence of respiratory signs¹⁶ or tracheal inflammation¹⁸. However, its isolation alongside *S. equi* subsp. *zooepidemicus* and other bacteria^{17,18} suggests it might not have been the only driver of inflammation in those cases. Results from phases I and III, as well as a previous report¹⁷, show that *N. semolina* can be found in the nose and the mouth of healthy horses and support the hypothesis that this bacteria is a normal inhabitant of respiratory mucosal surfaces of horses, with the capacity of overgrowing when conditions are propitious^{17,21}. Nevertheless, the negative correlation between nasal loads and age in phase III raises the question whether the development of immunity with age contributes to lower loads as horses get older, as observed with other opportunistic bacteria^{10,11}. This finding is further supported by the fact that clinical disease in *N. semolina*-positive horses is mainly reported in younger horses^{18,21}. Correlation with age was not observed in phases I and II, where only mature horses were sampled.

The contribution of bacteria in the development and perpetuation of inflammation in asthma is currently unknown^{4,8}. Albeit no clear diagnosis was established in most cases, horses positive for *N. semolina* by culture mainly present with cough and nasal discharge^{16,18}. *Pasteurellaceae* are associated with airway inflammation^{9,10,14,15} and it is possible that some of these *Pasteurella/Actinobacillus*-identified bacteria are in fact *N. semolina*. Here, we were unable to show an association between *N. semolina* and severe asthma in horses, but we developed a tool to look at a possible association with mild to moderate asthma on a larger scale.

5.5.5 Limitations

The main limitation resides in the small number of convenience samples used for both initial phases of the project. This, along with the absence of preliminary data on the detection of *N. semolina* by qPCR, limited the use of sample size calculation. A larger number of horses would probably have been necessary to detect differences in the percentage of *N. semolina*-positive horses between environments or asthma status, should such differences exist. Sampling of feed, pasture, water buckets, ambient air inside the barn and around a horse's breathing zone could have brought more information on the presence of *N. semolina*

in the environment, even if expected to be minimal ²⁷. Finally, direct comparison between culture and qPCR on the same samples would have helped comparing our results with previous literature.

5.6 Conclusion

In conclusion, *N. semolina* is highly prevalent in our colony of research horses with and without asthma, and in an unrelated study sample of healthy horses living in a different barn. In both cases however, high prevalence could be due in part to the proximity of these horses living together. We could not show an association between *N. semolina* and severe asthma, but it is found in higher loads in the nose of horses kept indoors. The potential pathogenicity of *N. semolina* remains to be elucidated but the molecular techniques we developed (qPCR and in-house MALDI-TOF database annotation) will greatly facilitate future studies in a randomly selected sample of horses.

5.7 References

1. Hotchkiss JW, Reid SW, Christley RM. A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: Risk factors for recurrent airway obstruction. *Equine Vet J* 2007;39:301-308.
2. Ivester KM, Couetil LL, Moore GE. An observational study of environmental exposures, airway cytology, and performance in racing thoroughbreds. *J Vet Intern Med* 2018;32:1754-1762.
3. Allen KJ, Tremaine WH, Franklin SH. Prevalence of inflammatory airway disease in national hunt horses referred for investigation of poor athletic performance. *Equine Vet J Suppl* 2006:529-534.
4. Couetil LL, Cardwell JM, Gerber V, et al. Inflammatory Airway Disease of Horses--Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med* 2016;30:503-515.
5. Bullone M, Lavoie JP. Asthma "of horses and men"--how can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences? *Mol Immunol* 2015;66:97-105.
6. Bond SL, Timsit E, Workentine M, et al. Upper and lower respiratory tract microbiota in horses: bacterial communities associated with health and mild asthma (inflammatory airway disease) and effects of dexamethasone. *BMC Microbiol* 2017;17:184-195.
7. Fillion-Bertrand G, Dickson RP, Boivin R, et al. Lung Microbiome Is Influenced by the Environment and Asthmatic Status in an Equine Model of Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2019;60:189-197.
8. Dickson RP, Erb-Downward JR, Martinez FJ, et al. The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annu Rev Physiol* 2016;78:481-504.
9. Wood JL, Burrell MH, Roberts CA, et al. Streptococci and Pasteurella spp. associated with disease of the equine lower respiratory tract. *Equine Vet J* 1993;25:314-318.
10. Chapman PS, Green C, Main JP, et al. Retrospective study of the relationships between age, inflammation and the isolation of bacteria from the lower respiratory tract of thoroughbred horses. *Vet Rec* 2000;146:91-95.

11. Newton JR, Wood JL, Chanter N. A case control study of factors and infections associated with clinically apparent respiratory disease in UK Thoroughbred racehorses. *Prev Vet Med* 2003;60:107-132.
12. Pirie RS, Collie DD, Dixon PM, et al. Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma). *Clin Exp Allergy* 2003;33:676-683.
13. Burrell MH, Wood JL, Whitwell KE, et al. Respiratory disease in thoroughbred horses in training: the relationships between disease and viruses, bacteria and environment. *Vet Rec* 1996;139:308-313.
14. Wood JL, Newton JR, Chanter N, et al. Association between respiratory disease and bacterial and viral infections in British racehorses. *J Clin Microbiol* 2005;43:120-126.
15. Ward CL, Wood JL, Houghton SB, et al. *Actinobacillus* and *Pasteurella* species isolated from horses with lower airway disease. *Vet Rec* 1998;143:277-279.
16. Kuhnert P, Korczak B, Falsen E, et al. *Nicoletella semolina* gen. nov., sp. nov., a new member of Pasteurellaceae isolated from horses with airway disease. *J Clin Microbiol* 2004;42:5542-5548.
17. Hansson I, Johansson KE, Persson M, et al. The clinical significance of *Nicoletella semolina* in horses with respiratory disorders and a screening of the bacterial flora in the airways of horses. *Vet Microbiol* 2013;162:695-699.
18. Maillard K, Richard EA, Kuhnert P, et al. Isolation of *Nicoletella semolina* from Equine Tracheal Washes. *J Equine Vet Sci* 2013;561-564.
19. Bisgaard M. Ecology and significance of Pasteurellaceae in animals. *Zentralbl Bakteriologie* 1993;279:7-26.
20. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, et al. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 2010;50:S1-5.
21. McConachie EL, Hart KA, Whelchel DD, et al. Pulmonary disease potentially associated with *Nicoletella semolina* in 3 young horses. *J Vet Intern Med* 2014;28:939-943.
22. Kuhnert P, Bisgaard M, Korczak BM, et al. Identification of animal Pasteurellaceae by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Microbiol Methods* 2012;89:1-7.
23. Boyle AG, Timoney JF, Newton JR, et al. *Streptococcus equi* Infections in Horses: Guidelines for Treatment, Control, and Prevention of Strangles-Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med* 2018;32:633-647.
24. Manguin E, Pépin E, Boivin R, et al. Tracheal microbial populations in horses with moderate asthma. *J Vet Intern Med* 2020;34:986-995.
25. Yoshii Y, Shimizu K, Morozumi M, et al. Detection of pathogens by real-time PCR in adult patients with acute exacerbation of bronchial asthma. *BMC Pulm Med* 2017;17:150-157.
26. Yoshii Y, Shimizu K, Morozumi M, et al. Identification of pathogens by comprehensive real-time PCR versus conventional methods in community-acquired pneumonia in Japanese adults. *Infect Dis (Lond)* 2016;48:782-788.

27. Christensen H, Kuhnert P, Nørskov-Lauritsen N, et al. The Family Pasteurellaceae. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F: *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014:535-564.
28. Christensen H, Kuhnert P, Busse HJ, et al. Proposed minimal standards for the description of genera, species and subspecies of the Pasteurellaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57:166-178.
29. Song SJ, Lauber C, Costello EK, et al. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *Elife* 2013;2:e00458.
30. Sharma A, Richardson M, Cralle L, et al. Longitudinal homogenization of the microbiome between both occupants and the built environment in a cohort of United States Air Force Cadets. *Microbiome* 2019;7:70-87.
31. Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012;486:222-227.
32. Finnicum CT, Beck JJ, Dolan CV, et al. Cohabitation is associated with a greater resemblance in gut microbiota which can impact cardiometabolic and inflammatory risk. *BMC Microbiol* 2019;19:230-239.
33. Rosenthal FS, Gruntman A, Couetil LL. A comparison of total, respirable, and real-time airborne particulate sampling in horse barns. *J Occup Environ Hyg* 2006;3:599-605.
34. Ivester KM, Smith K, Moore GE, et al. Variability in particulate concentrations in a horse training barn over time. *Equine Vet J Suppl* 2012;43:51-56.
35. Webster AJ, Clarke AF, Madelin TM, et al. Air hygiene in stables. 1: Effects of stable design, ventilation and management on the concentration of respirable dust. *Equine Vet J* 1987;19:448-453.
36. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Gelinias-Lymburner E, et al. Effect of antigenic exposure on airway smooth muscle remodeling in an equine model of chronic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;45:181-187.
37. Pirie RS, Dixon PM, Collie DD, et al. Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses. *Equine Vet J* 2001;33:311-318.
38. Holcombe SJ, Jackson C, Gerber V, et al. Stabling is associated with airway inflammation in young Arabian horses. *Equine Vet J* 2001;33:244-249.
39. Blackman M, Moore-Colyer MJS. Hay for horses: the effects of three different wetting treatments on dust and nutrient content. *Animal Science* 1998;66:745-750.
40. Moore-Colyer MJS, Fillery BG. The effect of three different treatments on the respirable particle content, total viable count and mould concentrations in hay for horses. In: Saastamoinen M, Fradinho MJ, Santos AS, Miraglia N: *Forages and grazing in horse nutrition*. Wageningen: Wageningen Academic Publishers; 2012:101-106.
41. Moore-Colyer MJS, Taylor JLE, James R. The Effect of Steaming and Soaking on the Respirable Particle, Bacteria, Mould, and Nutrient Content in Hay for Horses. *J Equine Vet Sci* 2016;39:62-68.

42. Clarke AF. A review of environmental and host factors in relation to equine respiratory disease. *Equine Vet J* 1987;19:435-441.
43. Hoffman AM, Viel L, Muckle CA, et al. Evaluation of a guarded bronchoscopic method for microbial sampling of the lower airways in foals. *Can J Vet Res* 1991;55:325-331.
44. Bartlett JG, Alexander J, Mayhew J, et al. Should fiberoptic bronchoscopy aspirates be cultured? *Am Rev Respir Dis* 1976;114:73-78.
45. Hilty M, Burke C, Pedro H, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One* 2010;5:e8578.
46. Dickson RP, Martinez FJ, Huffnagle GB. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *Lancet* 2014;384:691-702.
47. Jean D, Vrins A, Beauchamp G, et al. Evaluation of variations in bronchoalveolar lavage fluid in horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res* 2011;72:838-842.
48. Derksen FJ, Scott JS, Miller DC, et al. Bronchoalveolar lavage in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *Am Rev Respir Dis* 1985;132:1066-1070.

Chapitre 6 – Méthodologie supplémentaire (non décrite dans l'article)

Cette section décrit la méthodologie qui n'a pas abordée dans l'article sur *N. semolina*, et inclut donc la recherche sur les amorces pour les différents *Pasteurellaceae*.

6.1 Lavages oraux, nasaux, trachéaux et bronchoalvéolaires

Les échantillons utilisés afin d'évaluer la présence de différents *Pasteurellaceae* dans les voies respiratoires de chevaux sains et atteints d'asthme sévère provenaient de la bio-banque de tissus respiratoires équins (*Equine Respiratory Tissue Biobank*; http://www.ertb.ca/media/html/en_biobank.html). Ces échantillons ont été récoltés lors d'une étude précédente (Fillion-Bertrand, 2019; (11)) et correspondent aux mêmes échantillons que ceux analysés dans le cadre de la phase I décrite dans l'article sur *N. semolina* ([Chapitre 5](#)). Ce projet sera nommé « Asthme équin vs Chevaux sains » pour faciliter la compréhension. Au cours de ce projet, 6 chevaux sains et 6 chevaux atteints d'asthme sévère étaient initialement gardés au pâturage sur herbe (faible exposition antigénique) pour une période d'au moins trois semaines, puis à l'intérieur en étant nourri du foin de pauvre qualité (haute exposition antigénique) pour trois semaines supplémentaires. Suite à chaque exposition environnementale, des lavages nasaux, oraux et bronchoalvéolaires ont été prélevés et les fonctions respiratoires ont été mesurées via oscillométrie. Les chevaux atteints d'asthme sévère ont développé de l'exacerbation lorsque gardés à l'intérieur avec du foin de bonne ou de pauvre qualité. Les résultats de fonctions pulmonaires, de cytologie sur LBA et de séquençage de nouvelle génération sont publiés (11). L'utilisation de ces échantillons pour le présent projet permettait à la fois de comparer des chevaux sains à des chevaux atteints d'asthme, de comparer la rémission à l'exacerbation d'asthme et d'évaluer l'effet de l'environnement. Ce projet de recherche avait préalablement été accepté par le Comité d'éthique de l'utilisation des animaux (CÉUA) de l'Université de Montréal (15Rech1760) et était en accord avec le Conseil canadien de protection des animaux (CCPA).

6.1.1 Résumé des procédures

Les procédures d'échantillonnage pour les lavages nasaux, oraux et bronchoalvéolaires sont décrites dans l'article initial (11) et dans l'article sur *N. semolina* (voir [Chapitre 5](#)).

6.1.2 Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée sur des échantillons provenant de chevaux (lavages oraux, nasaux, trachéaux ou bronchoalvéolaires) ou de bactéries en culture pure pour l'optimisation des amorces. Pour les échantillons équins, la procédure d'extraction résumée est présentée dans l'article (11) et le protocole d'extraction complet est présenté en [Annexe A](#). Pour certains échantillons de la bio-banque de tissus

respiratoires équins et pour certains lavages trachéaux de chevaux présentés au CHUV pour consultations respiratoires, parfois moins de 5 mL (quantité idéale afin d'uniformiser les extractions) étaient disponibles pour extraction. Le cas échéant, la quantité maximale de matériel disponible était extraite. Toutes les quantifications au qPCR sont rapportées en copies par millilitre extrait (copies/mL), corrigeant ainsi pour la quantité initiale de matériel disponible.

Le protocole en [Annexe B](#) résume les étapes d'extraction d'ADN de bactéries à Gram négatif en culture pure, ADN utilisé ensuite afin de tester la spécificité des amorces. Les bactéries sur géloses étaient fournies par le CDEVQ. Les bactéries extraites sont énumérées dans le Tableau 8 et correspondaient à des *Pasteurellaceae*, d'autres bactéries à Gram négatif et une bactérie à Gram positif fréquemment retrouvée dans des échantillons respiratoires de chevaux (extraite préalablement avec un protocole légèrement différent).

Tableau 6. Bactéries utilisées pour vérifier la spécificité des amorces.

Type de bactérie	Genre et espèce
Pasteurellaceae	<i>Actinobacillus equuli</i>
	<i>Actinobacillus lignieresii</i>
	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
	<i>Actinobacillus suis</i>
	<i>Haemophilus influenzae</i>
	<i>Mannheimia haemolytica</i>
	<i>Nicoletella semolina</i>
	[<i>Pasteurella</i>] <i>caballi</i>
	<i>Pasteurella multocida</i>
Autres Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Prevotella bivia</i>
Gram positif	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>

6.2 Supplément sur *N. semolina*

En ce qui concerne *N. semolina*, en plus des trois phases incluses dans l'article « *Nicoletella semolina in the airways of healthy horses and horses with severe asthma* » inclus dans ce mémoire (voir [Chapitre 5](#)), des lavages trachéaux provenant de cas cliniques ont été analysés afin d'évaluer la présence de la bactérie. Ils ont été analysés plus tardivement et n'ont pas été inclus dans l'article. Ces chevaux étaient présentés pour consultation respiratoire (raisons de présentation : toux chronique, intolérance à l'exercice, etc.) au Centre hospitalier universitaire vétérinaire (CHUV) équin de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal entre 2019 et 2020. Suite à l'addition de *Nicoletella semolina* dans la banque de

données du MALDI-TOF MS du laboratoire de bactériologie du Complexe de diagnostic et d'épidémiosurveillance vétérinaires du Québec (CDEVQ) grâce à nos travaux, le nombre de cas identifiés a fortement augmenté et les dossiers des chevaux positifs à la culture et identifiés au MALDI-TOF entre 2019 et 2021 ont également été analysés. Les échantillons positifs provenaient de lavages trachéaux ou de poches gutturales.

6.3 Amorces qPCR *Pasteurellaceae* synthétisées et testées

Les *Pasteurellaceae* *H. influenzae*, *P. multocida*, [*P.*] *caballi*, *N. semolina*, *A. suis*, *A. equuli*, *A. lignieresii* et *A. pleuropneumoniae* ont été choisis étant donné leur association avec le microbiote (normal ou pathologique) oral ou respiratoire des chevaux ou des animaux de la ferme, ou avec l'asthme chez les humains dans le cas de *H. influenzae*. Des amorces visant la détection de ces microorganismes ont donc été recherchées dans la littérature ou synthétisées et testées. Les étapes de la synthèse d'amorces sont présentées dans l'[Annexe C](#). Compte tenu de la forte similarité génique entre *A. suis* et *A. equuli* et entre *A. lignieresii* et *A. pleuropneumoniae* pour les gènes disponibles dans la banque de données NCBI Nucleotide (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), les amorces visaient la détection des deux bactéries en combinaison, ou de *Actinobacillus* spp. Quelques paires d'amorces générales pouvant détecter tous les *Pasteurellaceae* ont aussi été créées. Une fois les amorces sélectionnées, elles étaient synthétisées (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, IL, United States) et testées *in vitro*.

6.4 Réaction de polymérase en chaîne quantitative (qPCR)

L'appareil Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, Australia) avec la technologie SYBR Green (QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada)) ont été employés. Chaque réaction PCR comprenait 10 µL de SYBR Green, 0,5 µM d'amorces sens (F) et anti-sens (R), 2 µL d'ADN et de l'eau de grade moléculaire pour un total de 20 µL par échantillon. La dénaturation initiale avait lieu sur une période de 15 minutes à 95 °C. Par la suite s'enchaînait de 35 à 40 cycles répétant les trois étapes clés du PCR : la dénaturation (15 secondes à 94 °C), l'hybridation (30 secondes à une température variant selon l'amorce) et l'élongation (30 secondes à 72 °C), le tout se terminant par une courbe de dénaturation thermique (*melting curve*) passant de 72 °C à 95 °C pour estimer la longueur et donc indirectement la spécificité des fragments amplifiés. Pour toutes les amorces testées, ces conditions qPCR demeuraient les mêmes; seule la température pour l'étape d'hybridation dépendait de la paire d'amorces. Plus cette température est élevée, plus la spécificité augmente. Par contre, il a fallu viser des températures adaptées aux amorces, c'est donc pourquoi plusieurs températures différentes étaient testées.

6.4 Analyses statistiques non détaillées dans l'article

Les analyses statistiques étaient réalisées avec les logiciels statistiques SAS v9.4 (Cary, N.C., États-Unis) et GraphPad Prism v8.3.0 (San Diego, CA, États-Unis). La distribution des données a été évaluée avec les tests Shapiro-Wilk et Kolmogorov Smirnov ou par l'évaluation visuelle du diagramme quantile-quantile sur les résidus. Les valeurs de p inférieures à ,05 étaient considérées comme statistiquement significatives.

6.4.1 Bactéries pour lesquelles des amorces ont été optimisées

Les analyses statistiques réalisées pour le projet *N. semolina* sont présentées dans l'article ([Chapitre 5](#)).

Étant donné l'absence de données normalement distribuées, des tests non paramétriques ont été choisis afin d'évaluer les effets du statut de santé et de l'environnement sur les charges bactériennes. Un Wilcoxon matched-pairs signed rank test était réalisé pour comparer les deux environnements (pâturage et foin) pour chaque groupe, et un test de Mann-Whitney (équivalent au Wilcoxon rank sum test fait pour *N. semolina*) était réalisé pour comparer les deux groupes (contrôles et asthmatiques) dans chaque environnement. Lorsqu'aucune différence n'était obtenue entre les groupes, ces derniers étaient regroupés et un Wilcoxon matched-pairs signed rank test était répété.

Les corrélations entre les charges bactériennes des différentes régions anatomiques et la neutrophilie pulmonaire au lavage bronchoalvéolaire (en pourcentage) et la résistance pulmonaire (R5/R10) étaient évaluées à l'aide d'une corrélation non paramétrique de Spearman.

6.4.2 Lavages trachéaux de cas cliniques

Des statistiques descriptives ont été choisies pour résumer les données cliniques et les résultats de procédures des chevaux positifs à *N. semolina* (identification par séquençage, MALDI-TOF ou qPCR). Afin de comparer les chevaux *N. semolina*-positifs aux chevaux *N. semolina*-négatifs dans leur lavage trachéal (identification par qPCR), des tests exacts de Fisher ont été réalisés pour les données suivantes : toux, jetage nasal, intolérance à l'exercice, sécrétions trachéales, inflammation trachéale suppurative et diagnostic d'asthme.

Chapitre 7 – Résultats supplémentaires (non décrits dans l'article)

Les résultats présentés dans ce chapitre sont à part de ceux présentés dans l'article sur *N. semolina* ([Chapitre 5](#)). Il sera question des amorces créées et optimisées ainsi que leurs résultats, et quelques résultats complémentaires pour *N. semolina* seront également présentés.

7.1 Amorces qPCR

Des amorces fonctionnelles ainsi qu'une courbe standard ont été obtenues pour les *Pasteurellaceae* *H. influenzae*, *N. semolina*, [*P.*] *caballi* et *P. multocida*. La figure ci-dessous montre l'évolution des différentes amorces synthétisées au cours de ce projet.

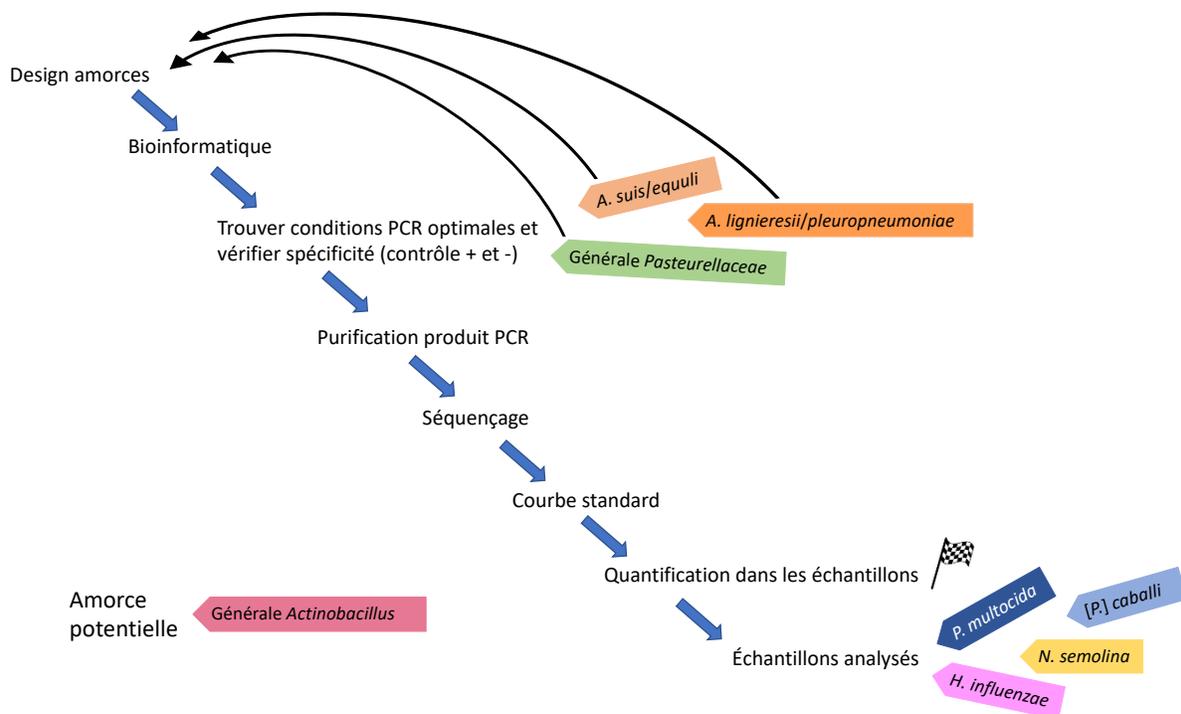


Figure 12. Évolution des amorces synthétisée pour le projet actuel.

PCR : Réaction de polymérase en chaîne.

Au final, seules quatre paires d'amorces sur les huit bactéries, combinaisons de bactéries ou familles ciblées ont pu être utilisées pour la quantification sur des échantillons, soit des amorces pour la détection de *H. influenzae*, *N. semolina*, [*P.*] *caballi* et *P. multocida*. Les résultats sont décrits dans l'article joint à ce mémoire pour *N. semolina* ([Chapitre 5](#)) et dans les sections suivantes pour les autres bactéries.

Les autres amorces ont montré peu de succès, le plus souvent dû à une spécificité trop faible, et ont donc été mises de côté. Ainsi, il n'a pas été possible de synthétiser des amorces suffisamment spécifiques

pour la détection d'*Actinobacillus suis*, d'*A. equuli*, d'*A. lignieresii* et d'*A. pleuropneumoniae*, individuellement ou en combinaisons double ou multiple (amorce générale *Actinobacillus*). Toutefois, la paire d'amorces *Actinobacillus* générale pourrait permettre de déterminer si un échantillon comprend ou non des *Actinobacillus*, au mieux menant à une quantification semi-quantitative, mais il serait difficile d'arriver à une quantification précise à cause des différentes espèces du genre. Une amorce générale *Pasteurellaceae* a été synthétisée, mais n'a pas non plus pu être optimisée dû à une spécificité trop faible (détectait d'autres bactéries à Gram négatif). Le tableau 10 résume les tentatives de création d'amorces spécifiques.

Tableau 7. Amorces Pasteurellaceae synthétisées et testées.

Nom de l'amorce	Gène visé	Séquences amorces sens et anti-sens	Température d'hybridation*	Taille de l'amplicon	Commentaire	Référence
<i>A. lignieresii/pleuropneumoniae</i>	ARNr 16S	F 5' GGTAACGGGAAGGGAGCTT 3'	57 °C	157 pb	Peu spécifique, détecte <i>A. equuli</i>	Geneious v.2019.2.1
		R 5' CCCGAAAGTCCCACCTT 3'				
<i>A. suis/equuli</i>	<i>dsbE</i>	F 5' GCGCTGTTTGGTTATCGCCG 3'	53 °C	112 pb	Peu spécifique	Geneious v.2019.2.1
		R 5' CGTAAGAAACGCAACTAAAGC 3'				
<i>A. suis/equuli 2</i>	<i>infB</i>	F 5' GTTCGTACCTGTATCAGCGAA 3'	53 °C	137 pb	Peu spécifique, détecte <i>A. pleuropneumoniae</i>	Geneious v.2019.2.1
		R 5' CAAGATAAGATTCGATTACGACA 3'				
Générale <i>Actinobacillus</i>	<i>infB</i>	F 5' TTGCGGTAAACAAAATTGATAAACC 3'	53 °C	139 pb	Peu spécifique au-dessus de 28 cycles**, pourrait servir pour détection sans quantification	Geneious v.2019.2.1
		R 5' ATACCTAAACCTTTTTTCGCTGA 3'				
<i>H. influenzae</i>	<i>siaT</i>	F 5' AATGCGTGATGCTGGTTATGAC 3'	55 °C	138 pb	Amorces spécifiques, courbe standard disponible	(209)
		R 5' AAGAGTTTTGCGATAGATTCATTGG 3'				
<i>N. semolina 1</i>	<i>infB</i>	F 5' GTGCCAGTCTCAGCTAAAC 3'	52 °C	104 pb	Peu spécifique au-dessus de 30 cycles	Geneious v.2019.2.1
		R 5' GCCATACCTTGCTTAACGG 3'				
<i>N. semolina 2</i>	<i>sodA</i>	F 5' CAGCGATTGGTCGATTTGGCTCT 3'	59 °C	130 pb	Amorces spécifiques, courbe standard disponible	Geneious v.2019.2.1
		R 5' GGATAACCAGACACACCTGCAA 3'				
[<i>P.</i>] <i>caballi</i> Primer set-2	ARNr 16S	F 5' ACGGGTGAGTAATGCTTGGG 3'	56 °C	178 pb	Analyse NCBI Primer BLAST non spécifique	(188)
		R 5' GAGATCGTCGGCTTGGTAGG 3'				
[<i>P.</i>] <i>caballi 1</i>	ARNr 16S	F 5' GGTGGTGAGGAAGGTGGTTGTT 3'	57 °C	157 pb	Amplification trop tardive, spécificité non évaluée	Geneious v.2019.2.1
		R 5' CTTAATCAACCGCCTGCGTGCC 3'				
[<i>P.</i>] <i>caballi 2</i>	<i>rpoB</i>	F 5' CGAACTTAGATGAAAATTACG 3'	51 °C	84 pb	Amorces spécifiques, courbe standard disponible	Geneious v.2019.2.1
		R 5' CAGGACGATATAAACACGAC 3'				
<i>P. multocida</i>	<i>KMT1</i>	F 5' GGGCTTGTCGGTAGTCTTT 3'	53 °C	148 pb	Peu spécifique et amplification tardive	(210)
		R 5' CGGCAAATAACAATAAGCTGAGTA 3'				

<i>P. multocida</i> 2	<i>infB</i>	F 5' CCATTGAGGCGATCCAACAT 3'	57 °C	111 pb	Amorces spécifiques, courbe standard disponible	Geneious v.2019.2.1
		R 5' GTAACAATTCGGTCTCAACACGCT 3'				
Générale <i>Pasteurellaceae</i> 1	ARNr 16S	F 5' GCAGCCCCTTGGGAATGTAC 3'	58 °C	154 pb	Peu spécifique au-dessus de 25 cycles	Geneious v.2019.2.1
		R 5' CCAGGCGGTTCGATTTATCACG 3'				
Générale <i>Pasteurellaceae</i> 2	ARNr 16S	F 5' GTACTTTAGGGAGGGGTAGAAT 3'	55 °C	106 pb	Peu spécifique au-dessus de 28 cycles	Geneious v.2019.2.1
		R 5' CATGAGCGTCAGTACATTCCCAA 3'				
Générale <i>Pasteurellaceae</i> 3	ARNr 16S	R 5' CGGGTTGTAAGTTCTTTCGGT 3'	57 °C	157 pb	Peu spécifique au-dessus de 25 cycles	Geneious v.2019.2.1
		R 5' GCCCTTACGCCCAGTTATTC 3'				

ARNr 16S : gène codant l'acide ribonucléique ribosomique 16S, *dsbE* : gène codant pour la protéine d'échange thiol:disulfide, *infB* : gène codant pour le facteur d'initiation de la transcription IF2, *KMT1* : gène impliqué dans la capsule de *P. multocida*, *pb* : paires de bases, *rpoB* : gène codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase, *siaT* : gène codant pour l'enzyme siatyltransferase, *sodA* : gène codant pour la superoxide dismutase. * La température d'hybridation affichée correspond à la dernière tentative essayée (si la paire d'amorces a été rejetée), ou à la température optimisée (si la paire répondait à tous les critères). ** Les cycles obtenus dépendent de la quantité initiale de matériel génétique utilisée, et l'identification des cycles ici sert plutôt à donner un ordre de grandeur à la spécificité et à comparer les différentes amorces entre elles.

7.2 [*Pasteurella*] *caballi*

Un article datant de 2016 propose deux paires d'amorces pour la détection de [*P.*] *caballi*, visant le gène ARNr 16S, dans des échantillons respiratoires de chevaux (188). Les auteurs ont testé les amorces avec sept autres bactéries (contrôles négatifs) dont deux *Pasteurellaceae*, et une des deux paires d'amorces semblait spécifique. Étant donné la forte spécificité nécessaire pour ce projet, les séquences de cette paire d'amorces spécifique ont tout de même été évaluées dans NCBI Primer BLAST afin de vérifier leur spécificité théorique avant de tester les amorces *in vitro*. Nos résultats d'analyse BLAST montraient que ces amorces ne détectaient pas seulement [*P.*] *caballi* (peu spécifiques) et ont donc été mises de côté. Les auteurs de l'article ont été contactés sans succès. Des amorces ont été synthétisées à l'aide du logiciel Geneious Prime et la deuxième paire ([*P.*] *caballi* 2) a été optimisée et une courbe standard a été faite afin de quantifier [*P.*] *caballi* dans les échantillons du projet Asthme équin vs Chevaux sains.

L'amplification qPCR des échantillons a révélé la présence de [*P.*] *caballi* uniquement dans la cavité orale des chevaux sains et atteints d'asthme sévère, la bactérie étant absente dans la cavité nasale et les poumons (Figure 13). Des 12 chevaux échantillonnés, 11 étaient positifs pour [*P.*] *caballi* à au moins un des deux échantillonnages, avec un total de 83% de chevaux positifs indépendamment du statut de santé dans chaque environnement. Les analyses statistiques ne montraient aucune différence significative entre les chevaux sains et les asthmatiques pour chaque environnement (pâturage $p = ,17$, foin $p = ,07$), et entre le pâturage et le foin pour chacun des deux groupes (contrôles $p = ,06$, asthmatiques $p = ,56$). Puisqu'il n'y avait aucune différence entre les groupes, les chevaux ont été regroupés, toujours n'obtenant aucune différence significative dans la charge orale entre le pâturage et le foin ($p = ,21$). Il n'y avait pas de corrélation entre la charge orale de [*P.*] *caballi* et le pourcentage de neutrophiles au LBA et la fonction pulmonaire (ratio R5/R10), et ce, sur pâturage et sur foin ($p \geq ,18$).

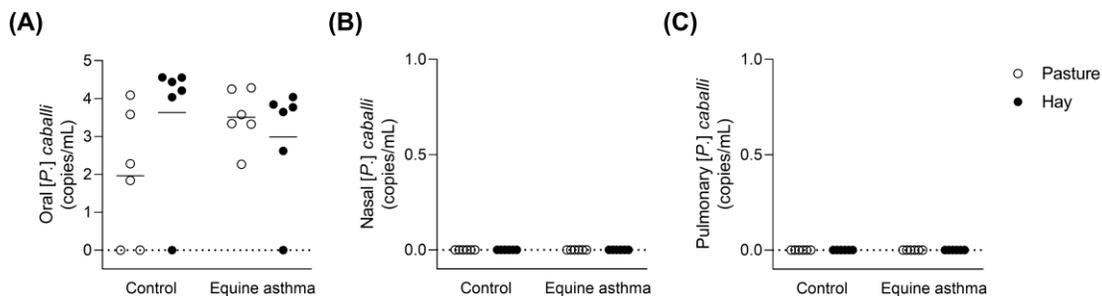


Figure 13. [*Pasteurella*] *caballi* dans les voies respiratoires de chevaux.

Charges orales (A), nasales (B) et pulmonaires (C) de [*P.*] *caballi* en copies par mL extrait de chevaux sains ($n = 6$) et atteints d'asthme sévère ($n = 6$) gardés au pâturage (cercles ouverts) et à l'intérieur

en étant nourri du foin de pauvre qualité (cercles fermés). Il n'y a aucune différence significative entre les groupes (Mann-Whitney; $p \geq ,07$) ni entre les environnements (Wilcoxon's matched-pairs signed rank test; $p \geq ,06$). La barre représente la moyenne.

7.3 *Pasteurella multocida*

La quantification par qPCR de *P. multocida* dans les échantillons oraux, nasaux et pulmonaires de chevaux a révélé une charge nulle (Figure 14). Puisque ces résultats étaient inattendus (voir [section 8.3](#)), la capacité des amorces à détecter plusieurs souches de la même bactérie visée a été testée en les utilisant avec quatre autres souches de *P. multocida* (porcin, canin, bovin et lapin). Les amorces ont permis l'amplification de toutes les souches.

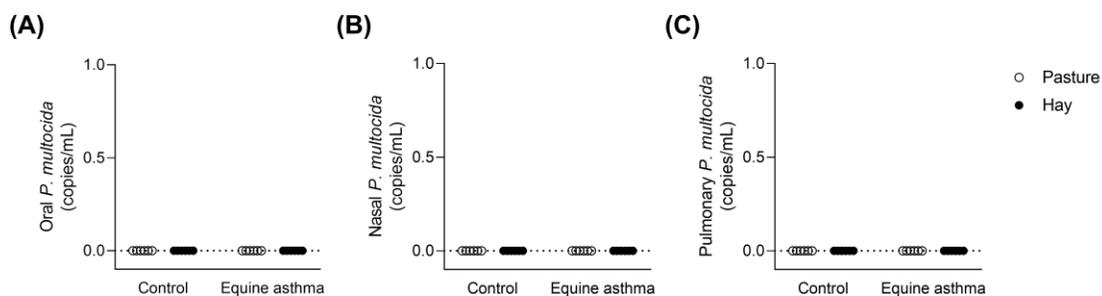


Figure 14. *Pasteurella multocida* dans les voies respiratoires de chevaux.

Charges orales (A), nasales (B) et pulmonaires (C) de *P. multocida* en copies par mL extrait de chevaux sains ($n = 6$) et atteints d'asthme sévère ($n = 6$) gardés au pâturage (cercles ouverts) et à l'intérieur en étant nourri du foin de pauvre qualité (cercles fermés).

7.4 *Haemophilus influenzae*

Comme attendu, la quantification par qPCR de *H. influenzae* dans les échantillons oraux, nasaux et pulmonaires de chevaux a montré que cette bactérie est absente dans les voies respiratoires des chevaux du projet Asthme équin vs Chevaux sains (charge nulle) (Figure 15).

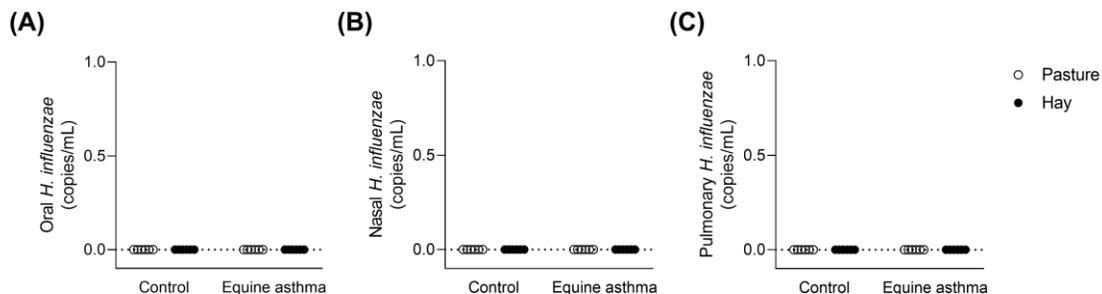


Figure 15. *Haemophilus influenzae* dans les voies respiratoires de chevaux.

Charges orales (A), nasales (B) et pulmonaires (C) de *H. influenzae* en copies par mL extrait de chevaux sains (n = 6) et atteints d'asthme sévère (n = 6) gardés au pâturage (cercles ouverts) et à l'intérieur en étant nourri du foin de pauvre qualité (cercles fermés).

7.5 *Nicoletella semolina*

Des amorces ont pu être synthétisées et optimisées. Les résultats de quantification de *Nicoletella semolina* dans les voies respiratoires supérieures et inférieures de chevaux sains ou atteints d'asthme sévère sont présentés dans l'article joint à ce mémoire (voir [Chapitre 5](#)). Quelques informations supplémentaires à cet article sont fournies dans les sections ci-dessous.

7.5.1 *N. semolina* identifié par culture et MALDI-TOF

La première souche bactérienne confirmée comme correspondant à du *N. semolina* au Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire de l'Université de Montréal (CHUV) a initialement été identifiée comme étant un *Pasteurellaceae*. Le séquençage de l'ARNr 16s entier de l'ADN extrait de la culture pure de cette bactérie a montré au-dessus de 99 % d'homologie avec la souche type de *N. semolina* (voir [Chapitre 5](#)). Les autres souches de *N. semolina* ont ensuite été identifiées par culture suivie du MALDI-TOF, une fois la banque de données annotée. La Figure 16 montre un exemple de résultat de bactériologie d'un cheval positif à *N. semolina*. La banque de données du CDEVQ a été consultée et, au total, dix chevaux se sont avérés positifs pour *N. semolina* par culture entre juin 2019 et avril 2021. La bactérie a été identifiée dans neuf lavages trachéaux et deux lavages de poches gutturales, un cheval étant positif dans ces deux régions anatomiques. Les résultats reliés à l'identification de la bactérie et le diagnostic des chevaux est présenté dans la présente section. De plus amples renseignements sont fournis dans l'[Annexe D](#).

Les résultats de culture ont montré que *N. semolina* a crû en culture mixte dans 91 % des cas (10/11 échantillons). Dans six de ces cas, *N. semolina* a crû en plus forte quantité que les autres bactéries, et dans les quatre autres, il était présent en quantité similaire aux autres bactéries. Les autres bactéries comprenaient *Rhodococcus equi*, *Actinobacillus* spp., *Actinobacillus equuli*, *Actinobacillus rossii*, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Streptococcus* alpha-hémolytique, *Klebsiella pneumoniae* et d'autres bactéries du microbiote normal. Le seul échantillon à partir duquel *N. semolina* a crû en culture pure provient d'un lavage de poche gutturale. Lorsqu'un antibiogramme a pu être réalisé, *N. semolina* était sensible à tous les antibiotiques testés (amikacine, ampicilline, ceftiofur, chloramphénicol, enrofloxacin, érythromycine, gentamicine, pénicilline, rifampin, tétracycline et triméthoprime/sulfa).

Des six chevaux sur lesquels un lavage bronchoalvéolaire a été réalisé, cinq avaient une inflammation compatible avec de l'asthme et deux présentaient également des évidences d'hémorragies pulmonaires

antérieures (hémorragies pulmonaires induites à l'exercice; EIPH). Le Tableau 11 montre les diagnostics provisoires ou définitifs des dix chevaux positifs à *N. semolina* à la culture.



SERVICE DE DIAGNOSTIC
Faculté de médecine vétérinaire

TRIAL REPORT

Faculté de médecine vétérinaire
Université de Montréal
3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe (Québec) J2S 2M2
Téléphone : (450) 778-8151
Télécopieur : (450) 778-8107

<p>Account : CHUV Hopital 3200 Sicotte St-Hyacinthe Québec</p> <p>Requester: [REDACTED] 3200 RUE SICOTTESaint-Hyacinthe Quebec, Canada, J2S2M2 Tel:450-773-8521,Fax:</p> <p>Copies to [REDACTED]</p>	<p>Animal: [REDACTED] Case # [REDACTED]</p> <p>[REDACTED] EQUIN QUARTER HORSE</p> <p>Reference #: [REDACTED] VETVIEW #: [REDACTED]</p> <p>Owner : [REDACTED]</p>
---	---

Clinical information

Source Lavage trachéal
Site Inconnu :
Requested Analysis AntibioGramme
 Bactériologie de routine

Direct Exam **GRAM** ++ Bâtonnets Gram négatif

Identification

<u>Bactériologie de routine</u>		
Streptococcus equi ssp. zooepidemicus - (Group C)	500 Colonies par mL	(1)
Streptococcus alpha-hémolytique	500 Colonies par mL	(2)
Nicoletella semolina	7 200 Colonies par mL	(3)

Figure 16. Exemple de résultat de culture pour un cheval positif à *N. semolina* au MALDI-TOF.

L'identification des bactéries a été faite par culture suivi du MALDI-TOF. À noter qu'ici la plus forte croissance de *N. semolina* et la visualisation de bactéries à Gram négatif au frottis suggère que *N. semolina* est prédominant chez ce cheval à ce stade de la maladie.

7.5.2 *N. semolina* chez des chevaux présentés pour consultation respiratoire

En parallèle des cas soumis au CDEVQ, notre laboratoire a récolté 16 lavages trachéaux obtenus au cours de consultations respiratoires au CHUV entre octobre 2019 et décembre 2020 afin de rechercher *N. semolina* par qPCR. Tous ces lavages trachéaux avaient aussi été soumis pour culture au CDEVQ. Les raisons de présentations incluaient les problèmes suivants : toux, jetage nasal et intolérance à l'exercice, et le diagnostic clinique final était le plus souvent l'asthme équin (dix cas) ou une autre affection respiratoire (cinq cas). *N. semolina* a été identifié dans cinq de ces 16 lavages trachéaux, soit 2,5 fois plus souvent que par culture sur ces mêmes échantillons. La section présente se concentrera, dans un premier

temps, sur l'analyse des cinq chevaux positifs à *N. semolina* au qPCR et, dans un deuxième temps, sur la comparaison des chevaux *N. semolina*-positifs et *N. semolina*-négatifs. De plus amples renseignements sont fournis dans l'[Annexe D](#).

Pour les deux cas positifs en culture et par qPCR, un cas était fortement positif pour *N. semolina* en culture (> 10 000 colonies/ml) et par qPCR (environ 700 000 copies/ml) (cheval 9) et l'autre cas était faiblement positif en culture (après centrifugation seulement) et au qPCR (260 copies/ml) (cheval 10). Pour les trois échantillons seulement positifs au qPCR, d'autres bactéries étaient présentes en forte quantité (> 10 000 colonies/ml) en culture ou aucune bactérie n'avait pu être identifiée dû à une croissance polybactérienne dans l'échantillon.

Lorsqu'on compare la présentation clinique ou les trouvaillles d'examen spécifique respiratoire des chevaux *N. semolina*-positifs via qPCR (n=5) aux chevaux *N. semolina*-négatifs (n=11), aucune différence significative n'était obtenue en ce qui concerne la toux, le jetage nasal, l'intolérance à l'exercice, la présence de sécrétions trachéales, d'inflammation suppurative trachéale et un diagnostic d'asthme (Fisher's exact test; $p \geq ,28$). Ainsi, on peut en déduire que la présentation clinique ne permet pas de prédire la présence de *N. semolina* chez un cheval présenté pour consultation respiratoire. Les analyses se voient limitées par l'absence de contrôles sains.

Tableau 8. Chevaux positifs à *N. semolina* au CHUV (identification par culture et MALDI-TOF ou séquençage ou PCR quantitatif).

Cheval	Âge (ans)	Échantillon	Identification MALDI-TOF	Croissance	Croissance concomitante	Résultats qPCR (copies/mL)	Diagnostic(s)
1	0,1	LT	Oui	Importante	Faible	NE	Pneumonie à <i>N. semolina</i> et <i>R. equi</i> (cas index au CHUV, identification confirmée par séquençage)
2	4,0	LT	Oui	Modérée	Faible	NE	Asthme mastocytaire et EIPH
3	1,5	LT et PG	Oui	Faible à modérée	Faible à modérée	NE	Infection voies respiratoires supérieures
4	0,5	PG	Oui	Faible	Aucune	NE	Foyer inflammatoire respiratoire
5	4,0	LT	Oui	Faible à modérée	Faible à modérée	NE	Asthme mastocytaire, hémiplegie laryngée gauche et EIPH
6	2,0	LT	Oui	Modérée à importante	Faible à modérée	NE	Pneumonie, processus inflammatoire respiratoire mixte (suspicion bactérien et parasitaire)
7	0,7	LT	Oui	Importante	Faible	NE	Pneumonie à <i>N. semolina</i>
8	17	LT	Oui	Faible	Faible à modérée	NE	Asthme sévère
9	1,5	LT	Oui	Importante	Importante	$6,94 \times 10^5$	Asthme neutrophilique modéré et suspicion infection voies respiratoires supérieures
10	6,0	LT	Oui	Faible	Faible	$2,60 \times 10^2$	Asthme neutrophilique modéré
11	10	LT	Non	Aucune	Importante	$8,82 \times 10^3$	EIPH, DDIVP, collapse pharyngé, surcroissance bactérienne pulmonaire, hypomotilité œsophagienne
12	1,5	LT	Non	Aucune	Importante	$9,86 \times 10^6$	Folliculite pharyngée sévère et bronchite (post-virale ou asthme)
13	13,5	LT	Non	Aucune	Importante	$2,84 \times 10^3$	Surcroissance bactérienne trachéale

Âge, type d'échantillon, résultats de culture, quantification PCR et diagnostics des 13 chevaux positifs à *N. semolina* (identification par culture et MALDI-TOF ou séquençage et/ou qPCR) entre juin 2019 et avril 2021. CHUV : Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire de l'Université de Montréal, DDIVP : déplacement dorsal intermittent du voile du palais, EIPH : hémorragies pulmonaires induites à l'exercice (exercise-induced pulmonary hemorrhage), LT : lavage trachéal, MALDI-TOF : Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight, NE : non évalué, PG : poches gutturales, qPCR : Réaction de polymérase en chaîne quantitative.

7.5.3 Suppléments pour l'article sur *N. semolina*

7.5.3.1 Comparaison des charges orales et nasales entre le pâturage et l'écurie sur foin (phase I)

La Figure 17 illustre la différence des charges nasales ou orales de *N. semolina* chez les chevaux étant gardés au pâturage (faible exposition antigénique) ou à l'intérieur en mangeant du foin de pauvre qualité (haute exposition antigénique). Puisqu'aucune différence n'était notée entre les chevaux sains et les chevaux atteints d'asthme sévère, ils ont été jumelés. Les chevaux présentaient une plus forte charge nasale de *N. semolina* à l'intérieur avec du foin par rapport au pâturage ($p = ,008$).

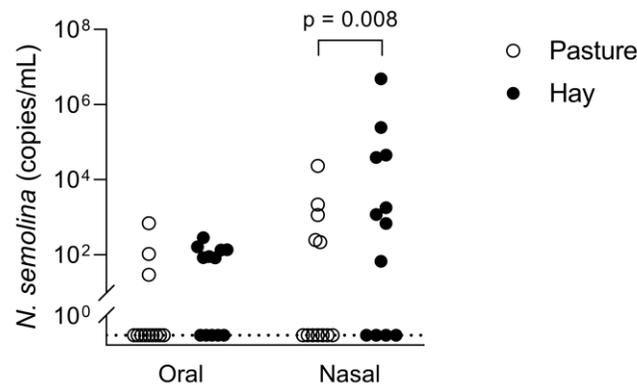


Figure 17. Comparaison entre la charge de *N. semolina* au pâturage et dans l'écurie sur foin dans le nez et dans la bouche.

Charges orales et nasales de *N. semolina* en copies par mL extrait de chevaux sains ou atteints d'asthme sévère ($n = 12$) gardés au pâturage (cercles ouverts) et à l'intérieur en étant nourri du foin de pauvre qualité (cercles fermés). Il y a significativement plus de *N. semolina* dans le nez de chevaux gardés sur foin par rapport au pâturage (Wilcoxon's matched-pairs signed rank test; $p = ,008$).

7.5.3.2 Évaluation du statut de porteur de *N. semolina* dans le temps (phase III)

Le cas index de *N. semolina* du CHUV a été échantillonné à trois reprises : la première fois lorsqu'atteint de pneumonie à un mois et demi d'âge (lavage trachéal), la deuxième fois trois mois plus tard lors d'un suivi (lavage nasal) et la troisième fois un an plus tard dans le cadre de la phase III du projet (lavage nasal). Le cheval est demeuré positif lors des trois prélèvements. La mère du poulain a également été échantillonnée (lavages nasaux) lors du deuxième et troisième prélèvement du cas index, et elle s'est avérée positive seulement lors de son premier échantillonnage. Au deuxième prélèvement, le poulain présentait une plus grande charge nasale que la jument. La Figure 18 illustre le statut de porteur du cas index et de la jument lors des prélèvements.

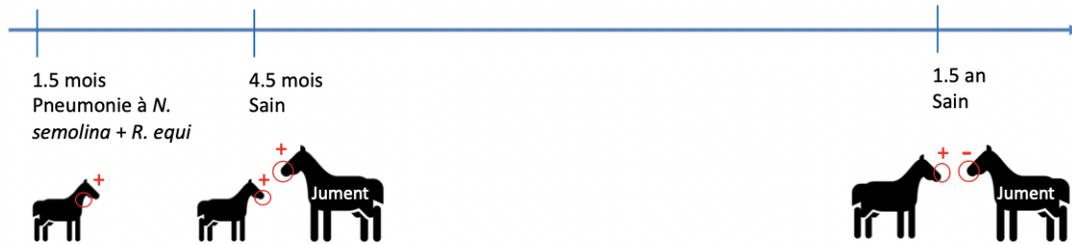


Figure 18. Évaluation binaire du statut de porteur lors de deux à trois prélèvements à plus d'un an d'intervalle du cas index de *N. semolina* et de la mère du cheval.

La région anatomique encerclée illustre le lieu de prélèvement (lavage trachéal ou nasal) et le symbole + ou – représente le statut de porteur du cheval. L'âge indiqué est celui du cas index au moment des prélèvements.

Tous les chevaux échantillonnés dans le cadre de la phase III (n = 10) étaient jugés comme sains basé sur l'anamnèse et un examen physique sommaire. Un cheval avait un historique d'hémorragie pulmonaire induite à l'exercice, un autre, de jetage nasal dans les mois précédents et un dernier, d'une plaie superficielle au niveau du jarret. Les résultats sont présentés dans l'article.

Chapitre 8 – Discussion

Malgré plusieurs écueils dans le développement des amorces pour les *Pasteurellaceae* d'intérêt dans l'asthme équin, il a été possible de développer des qPCR fonctionnels pour [*P.*] *caballi*, *P. multocida* et *N. semolina*, et de reproduire, à partir d'amorces publiées, un qPCR pour *H. influenzae*. L'impossibilité de développer des amorces spécifiques pour les différents *Actinobacillus* et le temps passé à synthétiser et optimiser les nombreuses amorces potentielles ont limité au final les analyses qui auraient pu être faites sur de plus grands échantillons de chevaux.

N. semolina a été identifié dans 0 à 66 % des échantillons oraux, nasaux et pulmonaires, dépendamment de l'environnement, et était retrouvé en plus forte quantité dans le nez de chevaux gardés à l'intérieur et nourris avec du foin par rapport au pâturage. Le statut de santé n'influait pas la charge de la bactérie. Dans les phases II et III, *N. semolina* a été identifié dans 90 à 100 % des échantillons nasaux. Cette dernière bactérie a aussi été identifiée dans six lavages bronchoalvéolaires de cinq chevaux différents dans la phase II, surtout lors de la rémission d'asthme. [*P.*] *caballi* a été identifié dans la cavité orale de 83 % des chevaux, indépendamment du statut de santé et de l'environnement. [*P.*] *caballi* n'a pas été identifié dans la cavité nasale ni dans les poumons. *P. multocida* et *H. influenzae* n'ont pas été détectés.

Aucun *Pasteurellaceae* spécifique ici testé ne s'est avéré être associé à l'asthme équin dans notre petit échantillon de chevaux sains et atteints d'asthme sévère. Il n'est toutefois pas possible de se positionner quant au rôle de tous les *Pasteurellaceae* réunis puisqu'une amorce générale pour tous les *Pasteurellaceae* n'a pas pu être synthétisée. De plus amples informations sur la bactérie *N. semolina* nouvellement décrite ont cependant été obtenues et montrent une bactérie probablement plus fréquente qu'initialement décrite.

8.1 Abondance relative des *Pasteurellaceae* et taxa liés

L'obtention de résultats de PCR discordants des résultats de séquençage de haut débit (*next generation sequencing*) publiés par Fillion *et al.* (11) sur les mêmes échantillons nous a mené à analyser de nouveau, en rétrospective, les données d'abondances relatives pour les taxa associés à la famille *Pasteurellaceae*, en incluant aussi une troisième exposition environnementale intermédiaire aux deux autres mentionnées plus haut ([section 6.1](#)). Les trois phases correspondaient au pâturage sur herbe (faible exposition antigénique), à l'écurie avec foin de qualité (moyenne exposition antigénique) et à l'écurie avec foin de pauvre qualité (haute exposition antigénique). Cette troisième exposition environnementale n'était pas incluse dans la portion de quantification par PCR du projet pour une question de temps, de logistique et

de budget. Dans l'étude de Fillion *et al.*, le séquençage de la région V4 de l'ARN ribosomal 16S de ces échantillons avait permis l'obtention de valeurs d'abondance relative du microbiote bactérien dans trois régions anatomiques (nez, bouche, poumons). Les analyses additionnelles faites dans le cadre de ce mémoire étaient concentrées sur le phylum des Protéobactéries, la classe des Gammaprotéobactéries ainsi que la famille *Pasteurellaceae*. L'ordre des *Pasteurellales*, comprenant seulement la famille *Pasteurellaceae*, n'a pas été inclus dans les analyses.

Les analyses complètes des abondances relatives des trois taxa dans les trois régions anatomiques sont présentées dans l'[Annexe E](#). Le tableau ci-dessous résume les différences significatives obtenues et sera utile pour la compréhension des prochaines sections. L'abondance relative des *Pasteurellaceae* était seulement influencée par l'environnement au niveau de la cavité nasale.

Tableau 9. Résumé des différences significatives concernant les abondances relatives des *Pasteurellaceae*.

	Région anatomique		
	Nez	Bouche	Poumons
OTU prédominante	OTU0001 (<i>P. multocida</i> *)	OTU0002 (<i>Actinobacillus</i> spp.)	Aucune
Abondance relative des Protéobactéries	-	Pâturage > Beau foin Pâturage > Mauvais foin	-
Abondance relative des Gammaprotéobactéries	-	Pâturage > Mauvais foin	-
Abondance relative des <i>Pasteurellaceae</i>	Mauvais foin > Pâturage	-	-

Résumé des données d'abondances relatives significativement différentes ($p < ,05$) entre les trois environnements et OTU prédominante dans le nez, la bouche et les poumons. Les chevaux sains ($n = 6$) et atteints d'asthme sévère ($n = 6$) sont regroupés pour les analyses (aucune différence significative entre les groupes). L'identification entre parenthèses des OTUs correspond aux résultats d'analyses BLAST des séquences. OTU = operational taxonomic unit, Pâturage : faible niveau d'exposition antigénique, Beau foin : écurie avec foin de qualité (niveau intermédiaire d'exposition antigénique), Mauvais foin : écurie avec foin de pauvre qualité (haute exposition antigénique), - : aucune différence significative. * : L'OTU0001 pourrait en fait correspondre à plusieurs *Pasteurellaceae*, voir sections [8.3](#) et [8.5](#).

8.2 [*Pasteurella*] *caballi*

[*P.*] *caballi* a uniquement été retrouvé dans la cavité orale, et ce, chez la majorité des chevaux échantillonnés. Ces résultats sont en accord avec la description d'infections de plaies de morsure par des chevaux apparemment sains avec du [*P.*] *caballi* (167, 187). [*P.*] *caballi* est majoritairement retrouvé par culture dans les voies respiratoires supérieures et inférieures de chevaux atteints de maladie respiratoire (164, 177, 183, 185, 186). Toutefois, dans notre petit échantillon de 12 chevaux sains et atteints d'asthme sévère, la bactérie n'est pas retrouvée dans les cavités nasales ni les poumons. Les auteurs du premier

article décrivant la bactérie ont posé l'hypothèse que celle-ci fait partie du microbiote des voies respiratoires des chevaux comme la plupart des *Pasteurellaceae*, sans toutefois en démontrer la présence chez les chevaux sains (183). Il est ainsi difficile de se positionner quant au rôle de [*P.*] *caballi* dans les voies respiratoires étant donné que peu d'études ont évalué sa présence chez des chevaux sains, mais le présent travail suggère que la bactérie fait partie du microbiote buccal normal. On peut se questionner à savoir si certains facteurs prédisposant, par exemple un récent transport ou une altération de l'appareil muco-ciliaire, pourraient favoriser une aspiration des [*P.*] *caballi* présents normalement dans la cavité orale et pourrait expliquer pourquoi on retrouve la bactérie plus fréquemment dans les voies respiratoires de chevaux malades.

Tout comme pour les autres *Pasteurellaceae* pour lesquels des amorces ont pu être synthétisées, les amorces optimisées pour la détection de [*P.*] *caballi* vont faciliter son identification et sa différenciation des autres *Pasteurellaceae* dans des études futures. Il serait intéressant d'évaluer sa présence dans des lavages trachéaux de chevaux sains et dans les poumons en utilisant un plus grand volume de lavage bronchoalvéolaire comme dans la deuxième phase du projet sur *N. semolina* (projet Exacerbation vs Rémission).

8.3 *Pasteurella multocida*

Les résultats de qPCR pour *Pasteurella multocida* étaient inattendus. En effet, la charge de *P. multocida* évaluée par qPCR était nulle pour tous les chevaux, et ce, dans chaque région anatomique, alors que les résultats de *Next Generation Sequencing* (ARNr 16S, région V4) sur ces mêmes échantillons, présenté dans le tableau 9 et la Figure 24 en [Annexe E](#) suggèrent que *P. multocida* est l'*operational taxonomic unit* (OTU) la plus abondante (identifiée OTU0001), surtout au niveau nasal, représentant en moyenne environ 40% des séquences (11). L'OTU0001 était aussi retrouvée au niveau oral et pulmonaire.

La capacité des amorces à détecter différentes souches de *P. multocida* a initialement été mise en doute. Les amorces ont donc été testées avec quatre souches de *P. multocida* d'espèces différentes (porcin, canin, bovin et lapin), qui ont toutes été détectées au qPCR avec ces amorces. Aucun *P. multocida* isolé d'un échantillon équin n'a pu être testé étant donné la rareté de l'isolement de cette espèce bactérienne chez les chevaux au CDEVQ (Dre J-H Fairbrother, communication personnelle). Ceci a donc soulevé des questions sur l'identification d'ARNr 16S de *P. multocida* par Fillion *et al.* (11). La séquence d'ARNr 16S ayant été initialement utilisée afin d'identifier l'OTU0001 dans la banque de données de Nucleotide BLAST (NCBI) a été remise à nouveau dans la banque de données (en date de l'automne 2019). Les résultats de BLAST ont montré un haut pourcentage d'homologie (> 97 %), suggérant une identification juste de au

niveau de l'espèce (113), pour *P. multocida*, mais aussi pour d'autres *Pasteurellaceae* dont *N. semolina*. Ceci pourrait être dû au fait que la région V4 du gène ARNr 16S ne permet pas une différenciation assez spécifique pour certains *Pasteurellaceae*. Il est aussi probable que la banque de donnée disponible lors de l'analyse initiale de la séquence de l'OTU0001 était moins complète que celle disponible lors de la seconde analyse en 2019. Il demeure que la majorité des séquences avec plus de 97 % d'homologie correspondaient à *P. multocida*, fort probablement à cause de la fréquence d'isolement et d'analyse plus élevée de cette bactérie en comparaison aux autres *Pasteurellaceae*. Ainsi, il est possible que l'OTU0001 corresponde entre autres à *P. multocida*, mais puisque les résultats de qPCR montrent une charge nulle de cette bactérie chez tous les chevaux, l'OTU0001 semble en fait représenter un ou plusieurs autres *Pasteurellaceae*. Il est également possible que les amorces qPCR n'étaient pas suffisamment sensibles pour détecter *P. multocida* dans nos échantillons. Toutefois, avec des abondances relatives si hautes, atteignant une abondance relative moyenne d'environ 40 ± 3 % dans la cavité nasale (Figure 24, (11)), il serait surprenant que la charge bactérienne contenue dans les échantillons soit trop faible pour être détectée par les amorces. Il faudrait toutefois tester la sensibilité des amorces sur des dilutions sériées d'un échantillon contenant une quantité connue de la bactérie avant de confirmer ou infirmer cette hypothèse.

En résumé, nos résultats de qPCR suggèrent que *P. multocida* ne fait pas partie du microbiote respiratoire de chevaux sains ou atteints d'asthme sévère.

8.4 *Nicoletella semolina*

Des amorces ont pu être synthétisées et optimisées, permettant l'identification de *N. semolina* par qPCR pour la première fois, à notre connaissance, et permettant également de faciliter sa détection.

8.4.1 *N. semolina* identifié par culture et MALDI-TOF dans des lavages trachéaux et de poches gutturales

Suite à nos résultats initiaux, l'ajout de *N. semolina* dans la banque de données MALDI-TOF du CDEVQ a permis d'identifier la bactérie dans des échantillons cliniques. À ce jour, la bactérie n'a été identifiée que chez des chevaux, plus spécifiquement dans les voies respiratoires (lavages trachéaux et de poches gutturales). Ceci va permettre de mieux comprendre l'implication de *N. semolina* dans les infections dans le futur mais le faible nombre de cas positifs, lorsque comparé à la prévalence estimée avec le qPCR (voir sections [7.5.1](#), [7.5.2](#) et [8.4.2](#)), pourrait venir du fait que la culture demeure une étape nécessaire à l'identification au MALDI-TOF. La croissance de la bactérie étant reconnue comme fastidieuse (159), il est possible que la combinaison culture et MALDI-TOF ne permette de détecter *N. semolina* que quand il est

présent en quantité similaire ou supérieure aux autres bactéries dans un échantillon. On ne peut pas non plus exclure la possibilité que la présence de la bactérie soit hautement variable d'une écurie à l'autre, et que la prévalence réelle de la bactérie dans une population de chevaux non reliés soit en fait plus faible que celle observée dans les trois phases de l'article (voir [Chapitre 5](#)).

N. semolina a été isolé d'échantillons cliniques, souvent en culture mixte, de chevaux atteints d'asthme (n = 5) ou présentant une infection des voies respiratoires supérieures ou inférieures (pneumonie) (n = 5). Il est difficile de déterminer l'implication de *N. semolina* dans ces pathologies, à savoir s'il est l'agent primaire causal ou s'il a crû secondairement, toutefois dans six cas d'infection mixte sur dix, la bactérie a crû en quantité plus importante que les autres bactéries. D'ailleurs, chez deux chevaux, une pneumonie primaire à *N. semolina* est suspectée (croissance de *N. semolina* fortement supérieure aux autres bactéries), incluant le cas index. À la lumière de ces constatations, il est justifié d'ajouter l'infection à *N. semolina* dans le diagnostic différentiel d'infections respiratoires inférieures et supérieures chez les chevaux, et sa potentielle association avec l'asthme équin léger à modéré demeure à élucider.

La plupart des chevaux positifs à *N. semolina* en culture étaient de jeune âge : neuf avaient six ans ou moins, et le cheval restant était atteint d'asthme sévère et était âgé de 17 ans. Ces résultats sont en accordance avec la littérature sur *N. semolina* et les résultats de la phase III du projet (voir [Chapitre 5](#)). En effet, la majorité des chevaux positifs sont aussi âgés de moins de 5 ans (190, 191), mais pas exclusivement (192). L'asthme sévère se manifeste plus souvent chez les chevaux de plus de sept ans, et d'ailleurs aucune association entre la charge de la bactérie et l'âge des chevaux atteints d'asthme sévère n'a été observée dans les phases I et II du projet (voir [Chapitre 5](#)) (3).

Lorsqu'un antibiogramme a pu être réalisé, la bactérie était sensible à tous les antibiotiques testés, ce qui est positif pour les chevaux nécessitant un tel traitement (seulement un cheval avait reçu un traitement antibiotique avant le prélèvement). Considérant que la bactérie fait partie du microbiote respiratoire normal des voies respiratoires des chevaux (voir [Chapitre 5](#)), un traitement antibiotique n'est pas recommandé chez tous les chevaux s'avérant positifs à la bactérie. Un tel traitement pourrait en fait contribuer à une dysbiose diminuant la charge de cette bactérie. L'instauration d'un traitement antimicrobien devrait être basé sur la présentation clinique du cheval et les trouvailles de l'examen physique et des examens complémentaires.

8.4.2 *N. semolina* dans des lavages trachéaux de chevaux présentés pour consultation respiratoire

N. semolina a été identifié par qPCR dans la trachée de 5 chevaux sur 16 présentés pour consultation respiratoire au CHUV, représentant une prévalence d'environ 31 %. En comparaison avec la littérature, entre 1,8 et 5 % de chevaux sains ou avec atteinte respiratoire sont positifs dans la même région anatomique lorsque la culture est utilisée (124, 190). Une limite commune aux trois phases de l'article et pouvant expliquer les hautes prévalences observées (jusqu'à 100 % de positifs) est que les chevaux échantillonnés partageaient le même environnement (voir [section 5.5.5](#)). Toutefois, les chevaux échantillonnés lors des consultations respiratoires au CHUV étaient quant à eux non reliés et la prévalence obtenue était tout de même plus élevée qu'avec la culture. Cela, combiné au fait que le qPCR était positif dans trois échantillons qui étaient négatifs à la culture, suggère que le qPCR est probablement plus sensible que la culture pour la détection de *N. semolina* dans des échantillons. La prévalence dans la trachée de chevaux présentés pour consultation respiratoire tend à être inférieure à celle obtenue par qPCR dans le nez, mais semble similaire à la prévalence orale. La présence de la bactérie dans la trachée pourrait potentiellement être secondaire à une contamination en provenance des voies respiratoires supérieures ou de la cavité orale.

Lorsqu'un échantillon était positif à la culture et au qPCR, la quantification était proportionnelle entre les deux techniques (observation basée sur deux échantillons seulement). Dans les trois autres échantillons seulement positifs au qPCR, d'autres bactéries ont crû en grande quantité en culture, ce qui laisse croire que la croissance de *N. semolina* a été inhibée par les autres bactéries dans ces échantillons.

En comparant les raisons de présentation, les trouvailles de l'examen clinique et résultats d'examens complémentaires (endoscopie, cytologie sur lavages trachéal et bronchoalvéolaire) entre les chevaux *N. semolina*-positifs et négatifs, il n'y a aucun signe clinique ou trouvaille d'examen, mis à part la culture ou la PCR, qui permet de prédire ou d'augmenter notre index de suspicion qu'un cheval est positif à la bactérie. Il est toutefois difficile de pousser les analyses en absence de contrôles sains. L'identification de *Nicoletella semolina*, par culture ou par qPCR, dans la trachée de chevaux présentant différentes affections respiratoires pourrait être relié à son rôle comme opportuniste.

8.4.3 Suppléments pour l'article sur *N. semolina*

8.4.3.1 Plus grande charge nasale chez les chevaux dans un environnement hautement antigénique

Cette section complète la [section 5.5.2](#) de l'article sur *N. semolina* et revient plus en détail sur nos hypothèses initiales pouvant expliquer la plus haute charge nasale de *N. semolina* chez les chevaux gardés à l'intérieur tout en mangeant du foin.

Les hypothèses sont basées sur le fait que *N. semolina* fait partie du microbiote normal des voies respiratoires supérieures des chevaux. La haute exposition antigénique occasionnée par la combinaison de l'environnement intérieur et de l'exposition à du foin de pauvre qualité induit une inflammation des voies respiratoires inférieures chez les chevaux atteints d'asthme et aussi chez les chevaux sains mais de manière temporaire et moins importante (29, 70, 77). Cette inflammation pourrait favoriser la surcroissance de *N. semolina* dans le nez. Cela implique toutefois que l'inflammation des voies respiratoires inférieures affecte également la muqueuse nasale, par extension des muqueuses, et demeure spéculatif. De manière similaire, l'inflammation nasale pourrait aussi causer une dysbiose favorisant secondairement la croissance de *N. semolina*, par exemple en favorisant la croissance de microorganismes lui étant symbiotiques ou en diminuant la charge d'inhibiteurs. Dans le présent projet, toutefois, aucune corrélation n'était observée entre le degré d'inflammation pulmonaire et la charge nasale de *N. semolina* dans cet environnement, ni avec la fonction respiratoire. De plus, les chevaux sains et atteints d'asthme sévère présentaient des charges nasales similaires alors que l'inflammation pulmonaire était significativement plus élevée chez les chevaux atteints d'asthme, et aurait pu suggérer également une inflammation nasale plus importante (11).

Étant donné l'absence de différence entre les deux groupes de chevaux, la précédente hypothèse semble moins probable. L'environnement intérieur pourrait par contre être en cause. En effet, une moins bonne ventilation est atteinte dans l'écurie par rapport au pâturage (72, 76), formant un microenvironnement dans lequel les chevaux sont plus exposés à leurs aérosols expirés et pouvant ainsi favoriser une réimplantation de la bactérie dans les cavités nasales des chevaux. De manière alternative, le foin sec pourrait contenir plus de *N. semolina* que l'herbe au pâturage. Toutefois, le procédé de trempage du foin, comme mis en place pour la phase II du projet (projet évaluant l'effet du foin trempé dans l'asthme équin sévère) n'a pas occasionné une hausse de *N. semolina* dans les voies respiratoires des chevaux exposés à ce foin alors qu'un trempage, pour une durée aussi courte que 10 minutes, tend à augmenter la quantité de bactéries retrouvées dans le foin (86, 89). La charge orale de *N. semolina* est demeurée stable dans les deux environnements dans la phase I, mais n'a pas été évaluée dans la phase II. La quantification de *N. semolina* dans le foin ainsi que dans les cavités nasales et orales de chevaux gardés à l'intérieur mais nourris du foin de bonne qualité se serait avérée pertinente. L'hypothèse la plus probable expliquant la hausse de *N. semolina* dans le nez de chevaux gardés à l'intérieur est la création de ce microenvironnement. Cela est d'autant plus appuyé par le fait que l'abondance relative nasale de la famille des *Pasteurellaceae* est significativement plus grande dans l'environnement hautement antigénique par rapport au pâturage (voir le tableau 9 et la Figure 24 en [Annexe E](#)). Cette hausse est

probablement réelle puisque la charge bactérienne (qPCR du gène ARNr 16S sur les même échantillons) n'est pas différente entre ces deux environnements (11). La Figure 19 résume ces hypothèses.

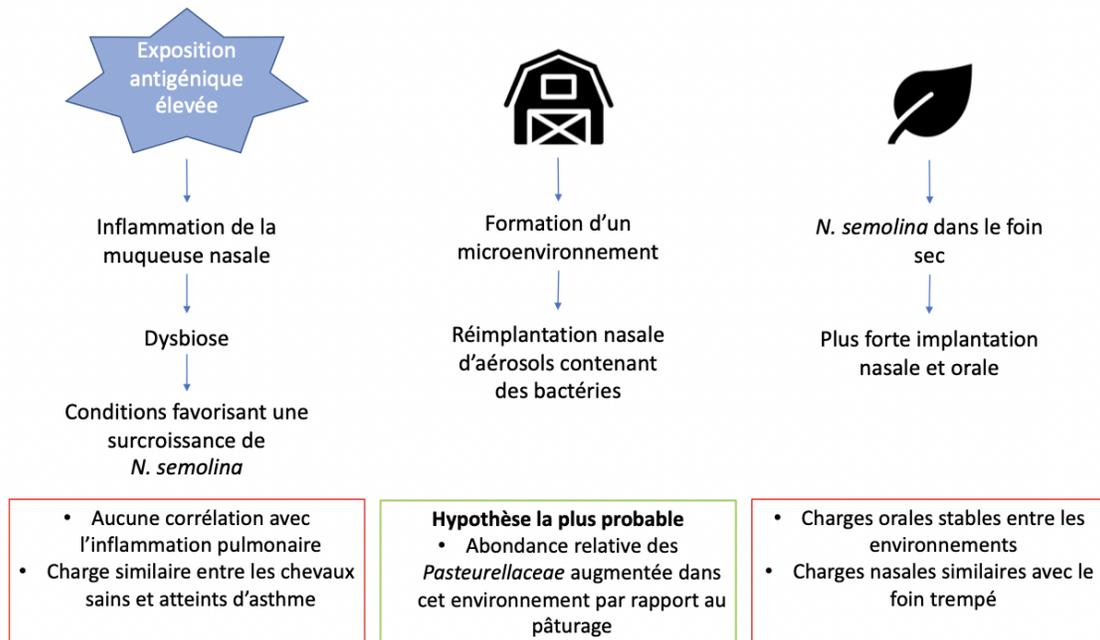


Figure 19. Hypothèses expliquant la plus haute charge nasale de *N. semolina* dans un environnement hautement antigénique.

Trois hypothèses expliquant la plus forte charge nasale de *N. semolina* chez les chevaux gardés à l'intérieur et nourris du foin de pauvre qualité (exposition antigénique élevée) dans le cadre de la phase I du projet sur *N. semolina* (projet Asthme équin vs Chevaux sains), et intégration avec les résultats de la phase II (projet Exacerbation vs Rémission). Les encadrés rouges énoncent les raisons pour lesquelles ces hypothèses sont moins probables.

Un environnement intérieur favorisant une plus grande charge nasale de *Pasteurellaceae* dont *N. semolina* ne justifie toutefois pas pourquoi l'abondance relative nasale en *Pasteurellaceae* n'est pas supérieure chez les chevaux gardés à l'intérieur mais nourris du foin de qualité par rapport à ceux gardés au pâturage (voir le tableau 9 et la Figure 24 en [Annexe E](#)). Cela pourrait être dû au fait que le foin de bonne qualité dégage en théorie moins de poussière que celui de pauvre qualité, considérant que le foin est la source principale de poussière dans une écurie (82-84). Toutefois, les *Pasteurellaceae* n'apparaissent pas prédominants dans le foin et, d'ailleurs, ils n'étaient pas plus abondants dans la cavité orale des chevaux dans cet environnement (90). Dans la cavité orale, l'environnement n'influence pas l'abondance relative des *Pasteurellaceae*, mais a un impact sur l'abondance relative des Protéobactéries et Gammaprotéobactéries (voir le tableau 9 et la Figure 25 en [Annexe E](#)).

8.4.3.2 Commentaires sur la qualité de l'échantillonnage nasal pour la phase III

Contrairement aux deux premières phases du projet, les lavages nasaux pour la phase III n'ont pas été réalisés sur des chevaux sédatisés. Le système de collection de la saline a été adapté afin d'éviter de devoir sédaté des chevaux d'une écurie privée (saline récoltée dans un sac de plastique plutôt que directement dans un tube) (Figure 20), mais il est difficile de savoir si la qualité de l'échantillonnage était équivalente entre les chevaux et avec les autres phases du projet. Il était plus difficile d'injecter la saline dans le nez des chevaux non sédatisés.



Figure 20. Prélèvement des lavages nasaux – différences entre les phases.

*Prélèvement d'un lavage nasal sur un cheval sédaté dans le cadre de la phase II (A) et sur un cheval non sédaté dans le cadre de la phase III (B). Chez les chevaux sédatisés, le port de tête bas permet de récupérer la saline directement dans un tube. Chez les chevaux non sédatisés, la saline est récupérée dans un sac de plastique et est ensuite transvidée dans un tube. À noter que dans la photo de droite (B) l'opérateur porte un masque et des lunettes pour se protéger de la COVID-19 et non de *N. semolina*.*

Afin de comparer la qualité de l'échantillonnage entre ces deux techniques, un gène de référence (*housekeeping gene*) aurait pu être utilisé. Le gène glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase équin (eGAPDH) a été utilisé par Pusterla *et al.* afin de comparer deux techniques d'échantillonnage des voies respiratoires supérieures pour obtenir une quantification absolue d'Herpès virus équin de type 1 (EHV-1) par rapport au gène de référence, qui lui provient des cellules épithéliales (211). Il faut toutefois garder en tête que les bactéries recherchées dans le cadre de ce projet ne sont pas directement reliées aux cellules épithéliales comme les virus respiratoires et ainsi une exfoliation aussi importante n'est pas

nécessairement attendue d'un lavage nasal. L'utilisation de ce gène de référence aurait par contre permis de comparer les deux techniques de lavages nasaux entre elles. Le Tableau 12 compare les moyennes et intervalles des charges nasales de *N. semolina* obtenues entre les trois phases du projet. Aucune analyse statistique n'a été réalisée étant donné les conditions différentes entre les phases, mais les moyennes et intervalles obtenus sont subjectivement similaires. Aussi, lors de l'échantillonnage, un cheval a été échantillonné à deux reprises puisque le premier prélèvement a été jugé comme inadéquat (seringue moins bien insérée dans le nez), mais ses résultats de qPCR pour la quantification de *N. semolina* ont révélé une charge similaire entre les deux prélèvements, suggérant que cette technique demeure valable pour des prélèvements nasaux de ce type.

Tableau 10. Comparaison des charges nasales de *N. semolina* entre les trois phases du projet.

	Copies de <i>N. semolina</i> nasal/mL extrait	
	Moyenne	Intervalle
Phase I	$2,17 \times 10^5$	0 – $4,84 \times 10^6$
Phase II	$3,95 \times 10^4$	0 – $2,79 \times 10^5$
Phase III	$5,72 \times 10^5$	0 – $3,28 \times 10^6$

Quantification PCR de *N. semolina* comme rapportée dans le chapitre 5. Les moyennes et intervalles pour les phases I et II sont présentés pour tous chevaux confondus (statut de santé et environnements pour la phase I, alimentation pour la phase II), et tous ont été échantillonnés à deux reprises dans différentes conditions.

8.4.3.3 Dynamisme du statut de porteur de *N. semolina* dans le temps (phase III)

Des 10 chevaux échantillonnés, neuf se sont avérés porteurs de *N. semolina* dans leurs cavités nasales. Seule la mère du cas index, qui était positive dans le nez en 2019, s'est avérée négative en 2020 (Figure 18). Cela suggère un potentiel dynamisme du statut de porteur de la bactérie. Un dynamisme similaire a été rapporté pour *Actinobacillus equuli* (non hémolytique) dans la cavité orale de chevaux, sans que les chevaux soient nécessairement porteurs de la même souche dans le temps (194). De manière intéressante, l'étude du génotype des *A. equuli* isolés en culture a montré que les chevaux d'une même écurie ne présentent pas nécessairement les mêmes souches de la bactérie entre eux, et donc que nous ne sommes pas en présence d'une infection de troupeau. La différence dans le temps observée pour *N. semolina* pourrait aussi venir d'une diminution de la charge de *N. semolina* avec l'âge, comme une corrélation inverse entre l'âge et la charge nasale de *N. semolina* a été observée dans cette phase. Il aurait été intéressant d'évaluer le génotype des souches de *N. semolina* intra- et inter-chevaux pour les trois phases du projet.

8.4.4 Résumé du pourcentage de chevaux positifs pour *N. semolina*

La comparaison entre les prévalences de *N. semolina* obtenues au qPCR et celles rapportées dans la littérature avec la culture a déjà été abordée dans les sections 5.5.1 et 8.4.2. Ces pourcentages sont résumés dans la figure ci-dessous. Les phases I, II et III correspondent aux résultats obtenus dans le Chapitre 5, et le CHUV correspond au pourcentage de chevaux positifs par qPCR sur lavage trachéal (voir section 7.5.2).

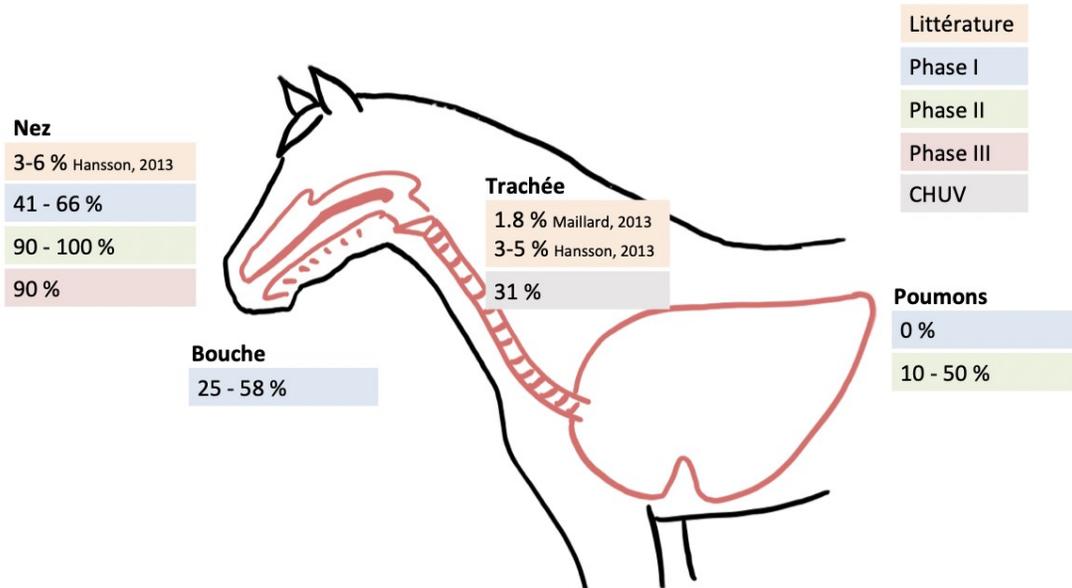


Figure 21. Pourcentage de chevaux positifs à *N. semolina* dans les trois phases du projet et au CHUV, et comparaison avec la littérature.

Illustration du pourcentage de chevaux positifs dans le nez, la bouche, la trachée et les poumons. Les pourcentages ont été obtenus par qPCR dans le cadre des trois phases du projet sur *N. semolina* (phase I : projet Asthme équin vs Chevaux sains, $n = 12$ chevaux; phase II : projet Exacerbation vs Rémission, $n = 10$ chevaux; phase III : projet Chevaux sains dans une écurie privée non reliée aux établissements de recherche, $n = 10$ chevaux) et par qPCR dans le cadre de consultations respiratoires au CHUV ($n = 16$ chevaux avec atteinte respiratoire), et sont comparés avec la littérature basée sur la culture. Les prévalences nasales et trachéales retrouvées de la littérature sont basées sur la culture et sont tirées de Hansson et al., 2013 et Maillard et al., 2013 (124, 190). Aucun effet groupe n'a été observé pour les phases I et II (sain vs asthme pour la phase I, pellets de luzerne vs foin trempé pour la phase II), les chevaux ont donc été regroupés.

8.5 Intégration des données qPCR de *P. multocida*, *N. semolina* et [*P.*] *caballi* avec les données d'abondances relatives des *Pasteurellaceae*

8.5.1 Retour sur les OTUs prédominantes dans les voies respiratoires

Les OTUs OTU0002 et OTU0001 identifiées dans le projet de Fillion et al. sont les plus abondantes dans les cavités orale et nasale, respectivement, lorsque comparées à toutes les OTUs identifiées dans les

échantillons (11). En effet, l'OTU0001, initialement identifiée comme correspondant à *Pasteurella multocida*, ressortait comme l'OTU la plus enrichie (composante principale) du microbiote nasal en représentant 40 ± 3 % des séquences et *Actinobacillus* spp. (OTU0002), la composante principale du microbiote oral en représentant 23 ± 11 % des séquences (tableau 9, (11)). La grande majorité des chevaux échantillonnés présentaient un ou plusieurs membres de la famille des *Pasteurellaceae* au niveau nasal, et tous en présentaient au niveau oral. En comparant ces résultats avec la littérature équine utilisant le séquençage de nouvelle génération pour caractériser le microbiote respiratoire des chevaux, il est fréquent que les *Pasteurellaceae* soient retrouvés dans ces régions anatomiques. *Actinobacillus* spp. et des *Pasteurellaceae* non classifiés représentent 9 % et 10 %, respectivement, des séquences obtenues dans la sous-gencive de chevaux sains (179). *Nicoletella semolina* représente en moyenne 37,7 % des séquences obtenues au niveau du nasopharynx de jeunes ânes avec un historique de gourme (122). Dans les voies respiratoires de chevaux sains, l'abondance relative de la famille des *Pasteurellaceae* n'apparaît toutefois pas comme prédominante dans un échantillon de huit chevaux sains dans une autre étude (121).

Bien que l'OTU0001 ait initialement été identifiée comme correspondant à du *P. multocida*, nos résultats qPCR ne supportent pas cette identification. L'analyse BLAST identifie plusieurs *Pasteurellaceae* différents, tous partageant > 97 % d'homologie avec la séquence identifiée : *P. multocida*, *P. canis*, *P. dagmatis*, *Pasteurella* spp., *Actinobacillus capsulatum*, *N. semolina*, *Haemophilus* spp., *Mannheimia* spp., *Necropsobacter* spp., *Aggregatibacter* spp., *Bibersteinia* sp., et même *Neisseria* spp. (pas un *Pasteurellaceae*). En comparant les OTUs et les résultats de qPCR obtenus chez chaque cheval ([Chapitre 5](#) et [Annexe E](#)), tous les chevaux positifs à *N. semolina* dans la phase I présentaient aussi l'OTU0001, mais les chevaux présentant l'OTU0001 n'étaient pas tous positifs à *N. semolina* au qPCR. Cela suggère que l'OTU0001 recoupe probablement *N. semolina* et d'autres *Pasteurellaceae* que nous n'avons pas pu identifier par qPCR au cours de ce projet.

L'analyse BLAST de l'OTU0001 n'a pas identifié [*Pasteurella*] *caballi* comme ayant au-dessus de 97 % d'homologie avec la séquence, et les chevaux positifs à [*P.*] *caballi* ne présentaient pas tous l'OTU0001. [*P.*] *caballi* s'est avéré abondant dans la cavité orale des chevaux, tout comme l'OTU0002, qui correspond à un/des *Actinobacillus* spp. Tous les chevaux positifs à [*P.*] *caballi* dans leur cavité orale présentaient l'OTU0002, mais les chevaux présentant l'OTU0002 n'étaient pas tous positifs à [*P.*] *caballi*. Comme mentionné précédemment, [*P.*] *caballi* n'est probablement pas correctement classifié (153, 167) et il se peut que la région V4 de son gène ARNr 16S soit plus près de celle des *Actinobacillus* spp. que des

Pasteurella spp. L'analyse BLAST de l'OTU0002 devrait par contre être faite avant de conclure qu'une portion de l'OTU0002 correspond à [*P.*] *caballi*.

Globalement, le séquençage de la région V4 par *Next Generation Sequencing* ne semble pas suffisamment spécifique pour distinguer les *Pasteurellaceae* au-delà du taxon famille. L'utilisation du qPCR demeure plus intéressante quand une identification spécifique est souhaitée. Les banques de données disponibles pour l'analyse de la région V4 du microbiote semblent toutefois devenir plus spécifiques, permettant dans certains cas d'identifier des genres et espèces spécifiques dans de plus récents rapports sur les équidés (122, 179).

8.5.2 Lien entre les voies respiratoires supérieures et la cavité orale et les voies respiratoires inférieures en ce qui concerne les *Pasteurellaceae*

L'analyse des OTUs *Pasteurellaceae* retrouvées entre les différentes régions anatomiques suggère que le microbiote pulmonaire relatif aux *Pasteurellaceae* ressemble plus au microbiote oral qu'au microbiote nasal en termes de richesse pour cette famille bactérienne (voir l'[Annexe E](#)). Le microbiote des voies respiratoires inférieures pourrait suivre le « modèle neutre », une théorie qui explique que le microbiote des voies respiratoires inférieures est une dilution de celui des voies respiratoires supérieures, ou pourrait être soumis à différentes pressions de sélections qui changeraient sa composition (118). Toutefois, la communauté pulmonaire est considérée comme distincte, mais non indépendante, de celle retrouvée en amont (118). Chez les humains sains, le microbiote pulmonaire est toutefois étroitement lié au microbiote retrouvé au niveau de la cavité orale et de l'oropharynx, probablement influencé par les micro-aspirations (13, 212, 213). Ces aspirations sont normales et, habituellement, l'appareil mucociliaire et le système immunitaire empêchent le développement de pneumonie (214, 215). Une clairance mucociliaire et un patron respiratoire altérés chez les sujets atteints d'asthme pourrait expliquer une partie de la dysbiose pulmonaire observée. Chez les chevaux par contre, puisque l'anatomie des voies respiratoires supérieures est différente de celle des humains et que les chevaux respirent obligatoirement par le nez, l'hypothèse des micro-aspirations demeure à être démontrée (11). Certaines OTUs retrouvées dans les cavités orales et nasales ou le nasopharynx sont par contre retrouvées dans la trachée distale ou les poumons, suggérant une certaine dépendance, du moins par continuité des membranes, entre les voies respiratoires supérieures et inférieures chez cette espèce (4, 11). Le microbiote des voies respiratoires inférieures chez les chevaux semble prendre origine des voies respiratoires supérieures plutôt que de l'environnement (181). Bien que la richesse soit similaire entre la cavité nasale et les poumons, aucune corrélation n'a été observée entre les abondances relatives des *Pasteurellaceae* de deux régions ([Annexe E](#)). La corrélation observée pour ces données entre le nez et les poumons dans l'environnement hautement antigénique est

probablement le fruit du hasard puisque les OTUs retrouvées dans ces deux régions correspondaient à peine.

8.6 Les *Pasteurellaceae* dans l'asthme équin

Le présent projet n'a pas permis de détecter une association entre les *Pasteurellaceae* étudiés (*Nicoletella semolina*, [*Pasteurella*] *caballi*, *Pasteurella multocida* et *H. influenzae*) et l'asthme équin sévère. Cela pourrait être dû :

- À une réelle absence d'association;
- Au fait que d'autres *Pasteurellaceae* que ceux recherchés sont associés à la condition;
- Au fait que plusieurs *Pasteurellaceae* sont impliqués, mais pas seulement un genre ou une espèce spécifiques;
- À une puissance de détection trop faible, à cause d'une trop petite population étudiée.

Avoir été en mesure de créer des amorces pour la détection d'un ou de plusieurs *Actinobacillus* aurait peut-être mené à différents résultats, dont l'identification d'une association. En effet, en utilisant la culture suivie d'une identification morphologique et biochimique complète, *A. lignieresii* et un *A. suis*-like, et potentiellement *A. equuli*, étaient associés à l'inflammation des voies respiratoires inférieures chez es chevaux dans une étude (125). L'utilisation de sondes TaqMan ou la synthèse d'amorces visant des gènes spécifiques aux *Actinobacillus* seraient à explorer.

Les résultats de la phase I du projet sur *N. semolina* supportent le rôle opportuniste des *Pasteurellaceae*. En effet, chez les équidés, une infection des voies respiratoires par un ou plusieurs *Pasteurellaceae* est souvent précédée d'un facteur prédisposant (170), par exemple un transport récent (164, 180, 181, 185), un épisode de gourme (infection à *S. equi* subsp. *equi*) (122) ou, pour *N. semolina*, un changement environnemental vers une régie plus haute en poussière (voir [Chapitre 5](#)). Aussi, les *Pasteurellaceae* sont souvent isolés d'échantillons respiratoires en culture mixte, ne suggérant pas un rôle primaire dans la pathologie (124, 164, 170, 177, 185, 186, 190, 191). L'isolement en culture de *Pasteurellaceae* dans la trachée de chevaux avec de l'inflammation trachéale ou présentant des signes cliniques compatibles avec l'asthme équin (5-8, 10, 33, 125), et l'identification de *Pasteurellaceae* dans des lavages bronchoalvéolaires de chevaux atteints d'asthme sévère, surtout lors de l'exacerbation, en ayant recours à une méthode indépendante de la culture (NGS) ((11), Dre E. Manguin, communication personnelle), supportent aussi ce rôle d'agent opportuniste de cette famille bactérienne. En évaluant le rôle habituel des *Pasteurellaceae*, leur surreprésentation dans les voies respiratoires de chevaux atteints d'asthme

pourrait être secondaire à la condition (inflammation, affection de l'appareil mucociliaire, bronchoconstriction, etc.) plutôt que d'agir comme un facteur favorisant la condition. Il demeure que la causalité n'a toujours pas été démontrée et de plus amples recherches seraient nécessaires pour confirmer ceci, par exemple en suivant une cohorte de chevaux dans le temps et en évaluant si les chevaux positifs ont de plus fortes chances de devenir asthmatiques, ou en induisant l'infection de manière expérimentale.

Un traitement antibiotique est fréquemment instauré en première ligne chez les chevaux présentant des signes d'affection respiratoire inférieure, sans qu'une culture ne soit réalisée. Cette pratique est déconseillée, et d'ailleurs l'identification d'une petite quantité de *Pasteurellaceae*, entre autres *N. semolina*, chez un cheval atteint d'asthme sans évidence de surinfection respiratoire secondaire (fièvre, foyer inflammatoire, abattement) ne justifie pas l'instauration d'un traitement antibiotique. Les résultats du présent projet soulignent d'autant plus l'importance du changement environnemental dans le traitement de l'asthme équin pour diminuer les charges bactériennes, les LPS et LOS, ainsi que l'exposition aux poussières concentrées dans un environnement intérieur et avec du foin.

Précédemment, l'analyse des échantillons du projet Asthme équin vs Chevaux sains à l'aide du séquençage de nouvelle génération a permis d'identifier une surreprésentation de la famille des *Pasteurellaceae* dans les poumons des chevaux atteints d'asthme par rapport aux sains (11). Des quatre paires d'amorces optimisées, aucune n'a permis l'identification de bactéries dans les lavages bronchoalvéolaires des chevaux du même projet. Les échantillons avaient été conservés à -80°C pour une durée d'environ quatre ans avant que les extractions d'ADN ne soient répétées. Les *Pasteurellaceae* se conservent difficilement (153), alors il pourrait y avoir eu dégradation avec le temps s'ils étaient initialement présents en faible quantité. *N. semolina* n'a pas été détecté dans les lavages bronchoalvéolaires dans la phase I du projet, mais en faisant l'extraction d'une plus grande quantité de matériel initial dans la phase II (20 mL vs 5 mL dans la phase I), et en utilisant des échantillons récents, la bactérie a été identifiée dans six lavages bronchoalvéolaires sur 20 (voir [Chapitre 5](#)).

8.7 Les défis des *Pasteurellaceae* pour la synthèse d'amorces qPCR

Il est possible de trouver, dans la littérature, des séquences d'amorces qPCR déjà optimisées pour certains *Pasteurellaceae* communs, tels *Haemophilus influenzae* (209) et *Pasteurella multocida* (210). La spécificité de ces amorces a cependant dû être vérifiée étant donné la précision nécessaire pour le projet actuel. Pour plusieurs autres *Pasteurellaceae*, il y a toutefois très peu d'amorces décrites dans la littérature, et celles décrites n'ont pas nécessairement été optimisées et validées. Au cours du présent projet, nous

avons rencontré quelques problèmes avec la spécificité de certaines amorces qPCR rapportées dans la littérature (188, 210).

La synthèse d'amorces sensibles et spécifiques pour le qPCR pour la détection d'espèces bactériennes faisant partie de la famille *Pasteurellaceae* a été difficile. Pour débiter, les banques de données géniques se faisaient rares pour les espèces moins fréquentes ou nouvellement identifiées, faisant en sorte que seulement quelques gènes étaient disponibles pour toutes les bactéries. Ces gènes étaient par exemple *ARNr 16S*, *rpoB*, *infB* et *sodA*, gènes codant respectivement pour l'acide ribonucléique ribosomique 16S, la sous-unité β de l'ARN polymérase, le facteur d'initiation de la transcription IF2 et la superoxyde dismutase. Ainsi, un total d'environ 2 000 à 3 000 paires de bases étaient disponibles pour être analysées dans l'espoir d'y retrouver des séquences propices à l'élaboration d'amorces idéales (détaillé plus bas). De plus, puisqu'appartenant à la même famille, il y avait plusieurs similarités dans les séquences de ces gènes. Un logiciel d'alignement génique, ici Geneious Prime v.2019.2.1 (Biomatters Ltd., San Diego, CA, United States), était utilisé pour faciliter cette étape autrement fastidieuse, et la Figure 22 en est un exemple.

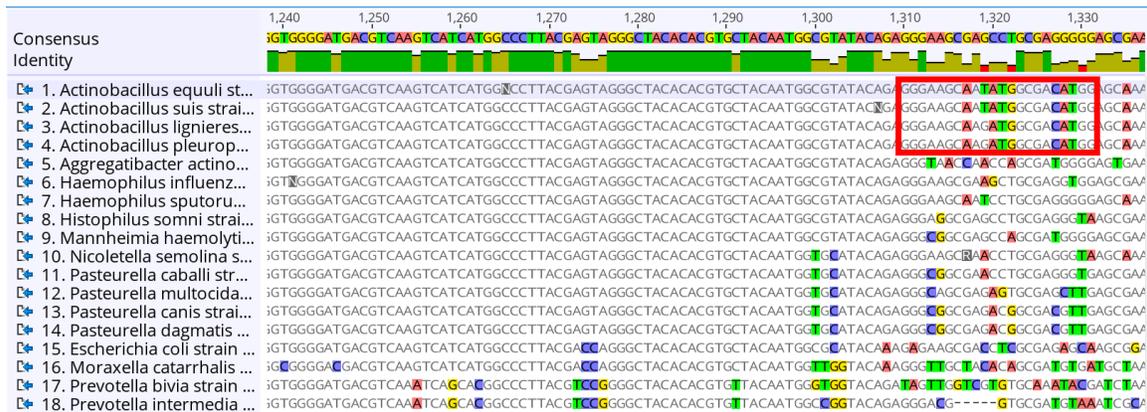


Figure 22. Exemple d'alignement du gène ARNr 16S dans le logiciel Geneious Prime.

Exemple d'alignement du gène ARNr 16S de différents *Pasteurellaceae* et d'autres bactéries à Gram négatif à l'aide du logiciel Geneious Prime. Les paires de base qui sont différentes de la majorité des autres paires de base de l'alignement sont surlignées. Si nous voulions par exemple faire une amorce commune aux *Actinobacillus*, la région de droite sur l'alignement, encadrée en rouge, serait intéressante étant donné la similarité entre les différents *Actinobacillus* et la différence avec les autres bactéries de l'alignement. ARNr 16S : gène codant pour l'acide ribonucléique ribosomique 16S, Paires de bases C : cytosine, G : guanine, A : adénine, T : thymine.

8.8 Avenues futures

Ci-dessous sont présentées quelques avenues de recherche intéressantes pour continuer ce projet :

- Continuer l'optimisation d'amorces pour d'autres *Pasteurellaceae*, dont le genre *Actinobacillus* spp. et les espèces *Pasteurella pneumotropica*, *P. mairii* (basé sur (125)). La recherche de toxines Aqx pour *A. equuli* subsp. *haemolyticus* serait une piste à explorer. L'utilisation de sondes TaqMan pour le qPCR permettrait d'augmenter la spécificité des paires d'amorces;
- Déterminer si *Nicoletella semolina* porte des lipopolysaccharides (LPS) ou des lipooligosaccharides (LOS) en sa surface, ce qui aiderait à clarifier son rôle comme commensal ou plutôt comme opportuniste;
- Évaluer la présence de [*P.*] *caballi* et *P. multocida* dans des lavages trachéaux et chez des chevaux atteints d'asthme léger à modéré;
- Évaluer la prévalence de *N. semolina* dans une plus grande population de chevaux n'habitant pas dans le même environnement, et chez des chevaux atteints d'asthme léger à modéré.

Conclusion

Des amorces qPCR spécifiques pour la détection de trois espèces de *Pasteurellaceae* – *Nicoletella semolina*, [*Pasteurella*] *caballi* et *Pasteurella multocida* – ont été synthétisées et optimisées, et un qPCR pour la détection de *H. influenzae* a été reproduit à partir de la littérature. La présence et la charge de ces bactéries ont été évaluées dans la bouche et les voies respiratoires de chevaux et ne se sont pas avérées associées à l'asthme équin sévère. *N. semolina* et les *Pasteurellaceae* (dans l'analyse répétée des résultats de Fillion *et al.*, 2019) sont par contre associés au foin et à un environnement peu ventilé. En résumé, les résultats du présent projet n'ont pas permis d'identifier une association entre l'asthme équin sévère et quelques *Pasteurellaceae* spécifiques. Étendre l'étude à une plus grande population de chevaux, en incluant des chevaux atteints d'asthme léger à modéré, et rechercher d'autres *Pasteurellaceae* serait pertinent avant de conclure qu'il n'y a aucune association entre cette famille bactérienne et l'asthme équin. Les amorces qPCR développées pour la recherche de *Pasteurellaceae* spécifiques, entre autres pour *N. semolina* pour lequel les amorces sont déjà publiées, seront utiles pour de futurs projets.

Références bibliographiques

1. Hotchkiss JW, Reid SW, Christley RM. A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: Risk factors for recurrent airway obstruction. *Equine Vet J*. 2007;39(4):301-8.
2. Allen KJ, Tremaine WH, Franklin SH. Prevalence of inflammatory airway disease in national hunt horses referred for investigation of poor athletic performance. *Equine Vet J Suppl*. 2006(36):529-34.
3. Couetil LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Leguillette R, Richard EA. Inflammatory Airway Disease of Horses--Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med*. 2016;30(2):503-15.
4. Bond SL, Timsit E, Workentine M, Alexander T, Leguillette R. Upper and lower respiratory tract microbiota in horses: bacterial communities associated with health and mild asthma (inflammatory airway disease) and effects of dexamethasone. *BMC Microbiol*. 2017;17(1):184-95.
5. Newton JR, Wood JL, Chanter N. A case control study of factors and infections associated with clinically apparent respiratory disease in UK Thoroughbred racehorses. *Prev Vet Med*. 2003;60(1):107-32.
6. Wood JL, Burrell MH, Roberts CA, Chanter N, Shaw Y. Streptococci and Pasteurella spp. associated with disease of the equine lower respiratory tract. *Equine Vet J*. 1993;25(4):314-8.
7. Chapman PS, Green C, Main JP, Taylor PM, Cunningham FM, Cook AJ, et al. Retrospective study of the relationships between age, inflammation and the isolation of bacteria from the lower respiratory tract of thoroughbred horses. *Vet Rec*. 2000;146(4):91-5.
8. Wood JL, Newton JR, Chanter N, Mumford JA. Association between respiratory disease and bacterial and viral infections in British racehorses. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1):120-6.
9. Cardwell JM, Smith KC, Wood JL, Newton JR. Infectious risk factors and clinical indicators for tracheal mucus in British National Hunt racehorses. *Equine Vet J*. 2014;46(2):150-5.
10. Christley RM, Hodgson DR, Rose RJ, Wood JL, Reids SW, Whitear KG, et al. A case-control study of respiratory disease in Thoroughbred racehorses in Sydney, Australia. *Equine Vet J*. 2001;33(3):256-64.
11. Fillion-Bertrand G, Dickson RP, Boivin R, Lavoie JP, Huffnagle GB, Leclere M. Lung Microbiome Is Influenced by the Environment and Asthmatic Status in an Equine Model of Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2019;60(2):189-97.
12. Huang YJ, Nelson CE, Brodie EL, Desantis TZ, Baek MS, Liu J, et al. Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(2):372-81.e1-3.
13. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One*. 2010;5(1):e8578.
14. Marri PR, Stern DA, Wright AL, Billheimer D, Martinez FD. Asthma-associated differences in microbial composition of induced sputum. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(2):346-52.e1-3.
15. Yoshii Y, Shimizu K, Morozumi M, Chiba N, Ubukata K, Uruga H, et al. Detection of pathogens by real-time PCR in adult patients with acute exacerbation of bronchial asthma. *BMC Pulm Med*. 2017;17(1):150-7.
16. Pirie RS. Recurrent airway obstruction: a review. *Equine Vet J*. 2014;46(3):276-88.
17. Ivester KM, Couetil LL, Moore GE. An observational study of environmental exposures, airway cytology, and performance in racing thoroughbreds. *J Vet Intern Med*. 2018;32(5):1754-62.
18. Wasko AJ, Barkema HW, Nicol J, Fernandez N, Logie N, Léguillette R. Evaluation of a risk-screening questionnaire to detect equine lung inflammation: results of a large field study. *Equine Vet J*. 2011;43(2):145-52.
19. Ivester KM, Couetil LL, Moore GE, Zimmerman NJ, Raskin RE. Environmental exposures and airway inflammation in young thoroughbred horses. *J Vet Intern Med*. 2014;28(3):918-24.
20. Marti E, Gerber H, Essich G, Oulehla J, Lazary S. The genetic basis of equine allergic diseases. 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. *Equine Vet J*. 1991;23(6):457-60.

21. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology*. 2011;16(7):1027-46.
22. Gerber V, Tessier C, Marti E. Genetics of upper and lower airway diseases in the horse. *Equine Vet J*. 2015;47(4):390-7.
23. Pirie RS, Collie DD, Dixon PM, McGorum BC. Evaluation of nebulised hay dust suspensions (HDS) for the diagnosis and investigation of heaves. 2: Effects of inhaled HDS on control and heaves horses. *Equine Vet J*. 2002;34(4):337-42.
24. Pirie RS, McLachlan G, McGorum BC. Evaluation of nebulised hay dust suspensions (HDS) for the diagnosis and investigation of heaves. 1: Preparation and composition of HDS. *Equine Vet J*. 2002;34(4):332-6.
25. Pirie RS, Dixon PM, McGorum BC. Evaluation of nebulised hay dust suspensions (HDS) for the diagnosis and investigation of heaves. 3: Effect of fractionation of HDS. *Equine Vet J*. 2002;34(4):343-7.
26. Pirie RS, Collie DD, Dixon PM, McGorum BC. Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma). *Clin Exp Allergy*. 2003;33(5):676-83.
27. Cardwell JM, Wood JL, Smith KC, Newton JR. Descriptive results from a longitudinal study of airway inflammation in British National Hunt racehorses. *Equine Vet J*. 2011;43(6):750-5.
28. Bullone M, Lavoie, J. P. Recurrent Airway Obstruction and Summer Pasture-Associated Obstructive Pulmonary Disease. In: Julia B, Felipe, M., editor. *Equine clinical immunology*. 1st ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc.; 2016. p. 127-44.
29. Pirie RS, Dixon PM, Collie DD, McGorum BC. Pulmonary and systemic effects of inhaled endotoxin in control and heaves horses. *Equine Vet J*. 2001;33(3):311-8.
30. Simpson JL, Grissell TV, Douwes J, Scott RJ, Boyle MJ, Gibson PG. Innate immune activation in neutrophilic asthma and bronchiectasis. *Thorax*. 2007;62(3):211-8.
31. McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE. Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens. *Equine Vet J*. 1993;25(4):261-7.
32. Dauvillier J, Ter Woort F, van Erck-Westergren E. Fungi in respiratory samples of horses with inflammatory airway disease. *J Vet Intern Med*. 2019;33(2):968-75.
33. Manguin E, Pepin E, Boivin R, Leclere M. Tracheal microbial populations in horses with moderate asthma. *J Vet Intern Med*. 2020.
34. Bond SL, Workentine M, Hundt J, Gilkerson JR, Leguillette R. Effects of nebulized dexamethasone on the respiratory microbiota and mycobiota and relative equine herpesvirus-1, 2, 4, 5 in an equine model of asthma. *J Vet Intern Med*. 2019.
35. Couetil L, Ivester K, Barnum S, Pusterla N. Equine respiratory viruses, airway inflammation and performance in thoroughbred racehorses. *Vet Microbiol*. 2021;257:109070.
36. Back H, Ullman K, Treiberg Berndtsson L, Riihimäki M, Penell J, Ståhl K, et al. Viral load of equine herpesviruses 2 and 5 in nasal swabs of actively racing Standardbred trotters: Temporal relationship of shedding to clinical findings and poor performance. *Vet Microbiol*. 2015;179(3-4):142-8.
37. Back H, Penell J, Pringle J, Isaksson M, Ronéus N, Treiberg Berndtsson L, et al. A longitudinal study of poor performance and subclinical respiratory viral activity in Standardbred trotters. *Vet Rec Open*. 2015;2(1):e000107.
38. Burrell MH, Wood JL, Whitwell KE, Chanter N, Mackintosh ME, Mumford JA. Respiratory disease in thoroughbred horses in training: the relationships between disease and viruses, bacteria and environment. *Vet Rec*. 1996;139(13):308-13.
39. Houtsma A, Bedenice D, Pusterla N, Pugliese B, Mapes S, Hoffman AM, et al. Association between inflammatory airway disease of horses and exposure to respiratory viruses: a case control study. *Multidiscip Respir Med*. 2015;10:33.

40. Fortier G, van Erck E, Fortier C, Richard E, Pottier D, Pronost S, et al. Herpesviruses in respiratory liquids of horses: putative implication in airway inflammation and association with cytological features. *Vet Microbiol.* 2009;139(1-2):34-41.
41. Castillo JR, Peters SP, Busse WW. Asthma Exacerbations: Pathogenesis, Prevention, and Treatment. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017;5(4):918-27.
42. Ferro F FF, Salimei E, Antonin M, Codazza D, Caniatti M. Relationship between the conditions of lower airways in healthy horses, environmental factors and air quality in stables. *Pferdeheilkunde.* 2000;16:579–86.
43. Leclere M, Lavoie J. P. Inflammatory Airway Disease. In: Julia B, Felipe, M., editor. *Equine clinical immunology.* 1st ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc.; 2016. p. 145-52.
44. Fogarty U, Buckley T. Bronchoalveolar lavage findings in horses with exercise intolerance. *Equine Vet J.* 1991;23(6):434-7.
45. Holcombe SJ, Robinson NE, Derksen FJ, Bertold B, Genovese R, Miller R, et al. Effect of tracheal mucus and tracheal cytology on racing performance in Thoroughbred racehorses. *Equine Vet J.* 2006;38(4):300-4.
46. Hoffman AM. Bronchoalveolar lavage: sampling technique and guidelines for cytologic preparation and interpretation. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2008;24(2):423-35, vii-viii.
47. Bullone M, Lavoie JP. Asthma "of horses and men" --how can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences? *Mol Immunol.* 2015;66(1):97-105.
48. de Lagarde M, Rodrigues N, Chevigny M, Beauchamp G, Albrecht B, Lavoie JP. N-butylscopolammonium bromide causes fewer side effects than atropine when assessing bronchoconstriction reversibility in horses with heaves. *Equine Vet J.* 2014;46(4):474-8.
49. Hoffman AM, Mazan MR, Ellenberg S. Association between bronchoalveolar lavage cytologic features and airway reactivity in horses with a history of exercise intolerance. *Am J Vet Res.* 1998;59(2):176-81.
50. Hare JE, Viel L. Pulmonary eosinophilia associated with increased airway responsiveness in young racing horses. *J Vet Intern Med.* 1998;12(3):163-70.
51. Bedenice D, Mazan MR, Hoffman AM. Association between cough and cytology of bronchoalveolar lavage fluid and pulmonary function in horses diagnosed with inflammatory airway disease. *J Vet Intern Med.* 2008;22(4):1022-8.
52. Lavoie JP, Maghni K, Desnoyers M, Taha R, Martin JG, Hamid QA. Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(8 Pt 1):1410-3.
53. Vargas A, Boivin R, Cano P, Murcia Y, Bazin I, Lavoie JP. Neutrophil extracellular traps are downregulated by glucocorticosteroids in lungs in an equine model of asthma. *Respir Res.* 2017;18(1):207.
54. Beekman L, Tohver T, Leguillette R. Comparison of cytokine mRNA expression in the bronchoalveolar lavage fluid of horses with inflammatory airway disease and bronchoalveolar lavage mastocytosis or neutrophilia using REST software analysis. *J Vet Intern Med.* 2012;26(1):153-61.
55. Riihimaki M, Lilliehook I, Raine A, Berg M, Pringle J. Clinical alterations and mRNA levels of IL-4 and IL-5 in bronchoalveolar cells of horses with transient pulmonary eosinophilia. *Res Vet Sci.* 2008;85(1):52-5.
56. Richard EA, Fortier GD, Lekeux PM, Van Erck E. Laboratory findings in respiratory fluids of the poorly-performing horse. *Vet J.* 2010;185(2):115-22.
57. Cardwell JM, Christley RM, Gerber V, Malikides N, Wood JL, Newton JR, et al. What's in a name? Inflammatory airway disease in racehorses in training. *Equine Vet J.* 2011;43(6):756-8.

58. Malikides N, Hughes KJ, Hodgson DR, Hodgson JL. Comparison of tracheal aspirates and bronchoalveolar lavage in racehorses. 2. Evaluation of the diagnostic significance of neutrophil percentage. *Aust Vet J.* 2003;81(11):685-7.
59. Jean D, Vrins A, Lavoie JP. Monthly, daily, and circadian variations of measurements of pulmonary mechanics in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res.* 1999;60(11):1341-6.
60. van Erck E, Votion D, Art T, Lekeux P. Measurement of respiratory function by impulse oscillometry in horses. *Equine Vet J.* 2004;36(1):21-8.
61. Bullone M, Chevigny M, Allano M, Martin JG, Lavoie JP. Technical and physiological determinants of airway smooth muscle mass in endobronchial biopsies of asthmatic horses. *J Appl Physiol* (1985). 2014;117(7):806-15.
62. Jackson CA, Berney C, Jefcoat AM, Robinson NE. Environment and prednisone interactions in the treatment of recurrent airway obstruction (heaves). *Equine Vet J.* 2000;32(5):432-8.
63. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Joubert P, Relave F, Setlakwe EL, Beauchamp G, et al. Corticosteroids and antigen avoidance decrease airway smooth muscle mass in an equine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;47(5):589-96.
64. Clarke AF. Stable environment in relation to the control of respiratory diseases. In: Hickman J, editor. *Horse management.* 2nd ed. London: Academic Press; 1987. p. 125-74.
65. Blackman M, Moore-Colyer MJS. Hay for horses: the effects of three different wetting treatments on dust and nutrient content. *Animal Science.* 1998;66(3):745-50.
66. Vandenput S, Duvivier DH, Votion D, Art T, Lekeux P. Environmental control to maintain stabled COPD horses in clinical remission: effects on pulmonary function. *Equine Vet J.* 1998;30(2):93-6.
67. Vandenput S, Votion D, Duvivier DH, Van Erck E, Anciaux N, Art T, et al. Effect of a set stabled environmental control on pulmonary function and airway reactivity of COPD affected horses. *Vet J.* 1998;155(2):189-95.
68. Miskovic M, Couëtill LL, Thompson CA. Lung function and airway cytologic profiles in horses with recurrent airway obstruction maintained in low-dust environments. *J Vet Intern Med.* 2007;21(5):1060-6.
69. Kirschvink N, Di Silvestro F, Sbaï I, Vandenput S, Art T, Roberts C, et al. The use of cardboard bedding material as part of an environmental control regime for heaves-affected horses: in vitro assessment of airborne dust and aeroallergen concentration and in vivo effects on lung function. *Vet J.* 2002;163(3):319-25.
70. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Gelinas-Lymburner E, David F, Martin JG, Lavoie JP. Effect of antigenic exposure on airway smooth muscle remodeling in an equine model of chronic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45(1):181-7.
71. Woods PS, Robinson NE, Swanson MC, Reed CE, Broadstone RV, Derksen FJ. Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different management systems. *Equine Vet J.* 1993;25(3):208-13.
72. Webster AJ, Clarke AF, Madelin TM, Wathes CM. Air hygiene in stables. 1: Effects of stable design, ventilation and management on the concentration of respirable dust. *Equine Vet J.* 1987;19(5):448-53.
73. Clements JM, Pirie RS. Respirable dust concentrations in equine stables. Part 2: the benefits of soaking hay and optimising the environment in a neighbouring stable. *Res Vet Sci.* 2007;83(2):263-8.
74. Clarke AF. A review of environmental and host factors in relation to equine respiratory disease. *Equine Vet J.* 1987;19(5):435-41.
75. Szabo E. Experimentelle Untersuchungen luftgetragener Partikel und Schimmelpilze in Pferdeställen : Experimental analysis of airborne dust and moulds in horse barns. In: Prof. Dr. Wolfgang M, editor.: Berlin: Freie Universität Berlin Universitätsbibliothek; 2010.
76. Ivester KM, Smith K, Moore GE, Zimmerman NJ, Couëtill LL. Variability in particulate concentrations in a horse training barn over time. *Equine Vet J Suppl.* 2012;43(43):51-6.

77. Holcombe SJ, Jackson C, Gerber V, Jefcoat A, Berney C, Eberhardt S, et al. Stabling is associated with airway inflammation in young Arabian horses. *Equine Vet J.* 2001;33(3):244-9.
78. McGorum BC, Ellison J, Cullen RT. Total and respirable airborne dust endotoxin concentrations in three equine management systems. *Equine Vet J.* 1998;30(5):430-4.
79. Berndt A, Derksen FJ, Edward Robinson N. Endotoxin concentrations within the breathing zone of horses are higher in stables than on pasture. *Vet J.* 2010;183(1):54-7.
80. Bullone M, Vargas A, Elce Y, Martin JG, Lavoie JP. Fluticasone/salmeterol reduces remodelling and neutrophilic inflammation in severe equine asthma. *Sci Rep.* 2017;7(1):8843.
81. Orard M, Hue E, Couroucé A, Bizon-Mercier C, Toquet MP, Moore-Colyer M, et al. The influence of hay steaming on clinical signs and airway immune response in severe asthmatic horses. *BMC Vet Res.* 2018;14(1):345.
82. Clements JM, Pirie RS. Respirable dust concentrations in equine stables. Part 1: validation of equipment and effect of various management systems. *Res Vet Sci.* 2007;83(2):256-62.
83. Vandeput S, Istasse L, Nicks B, Lekeux P. Airborne dust and aeroallergen concentrations in different sources of feed and bedding for horses. *Vet Q.* 1997;19(4):154-8.
84. Whittaker AG, Hughes KJ, Parkin TD, Love S. Concentrations of dust and endotoxin in equine stabling. *Vet Rec.* 2009;165(10):293-5.
85. Moore-Colyer MJ, Lumbis K, Longland A, Harris P. The effect of five different wetting treatments on the nutrient content and microbial concentration in hay for horses. *PLoS One.* 2014;9(11):e114079.
86. Moore-Colyer MJS, Taylor JLE, James R. The Effect of Steaming and Soaking on the Respirable Particle, Bacteria, Mould, and Nutrient Content in Hay for Horses. *J Equine Vet Sci.* 2016;39(C):62-8.
87. Jochmans-Lemoine A, Picotte K, Beauchamp G, Vargas A, Lavoie JP. Effects of a propriety oiled mixed hay feeding system on lung function, neutrophilic airway inflammation and oxidative stress in severe asthmatic horses. *Equine Vet J.* 2020;52(4):564-71.
88. Thomson JR, McPherson EA. Effects of environmental control on pulmonary function of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease. *Equine Vet J.* 1984;16(1):35-8.
89. Moore-Colyer MJS, Fillery BG. The effect of three different treatments on the respirable particle content, total viable count and mould concentrations in hay for horses. In: Saastamoinen M, Fradinho MJ, Santos AS, Miraglia N, editors. *Forages and grazing in horse nutrition.* Wageningen: Wageningen Academic Publishers; 2012. p. 101-6.
90. Daniels S, Hepworth J, Moore-Colyer M. The haybiome: Characterising the viable bacterial community profile of four different hays for horses following different pre-feeding regimens. *PLoS One.* 2020;15(11):e0242373.
91. Rosenthal FS, Gruntman A, Couetil LL. A comparison of total, respirable, and real-time airborne particulate sampling in horse barns. *J Occup Environ Hyg.* 2006;3(11):599-605.
92. Leclere M. Corticosteroids and Immune Suppressive Therapies in Horses. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2017;33(1):17-27.
93. Mainguy-Seers S, Lavoie JP. Glucocorticoid treatment in horses with asthma: A narrative review. *J Vet Intern Med.* 2021.
94. Lavoie JP, Bullone M, Rodrigues N, Germim P, Albrecht B, von Salis-Soglio M. Effect of different doses of inhaled ciclesonide on lung function, clinical signs related to airflow limitation and serum cortisol levels in horses with experimentally induced mild to severe airway obstruction. *Equine Vet J.* 2019;51(6):779-86.
95. Pirie RS, Mueller HW, Engel O, Albrecht B, von Salis-Soglio M. Inhaled ciclesonide is efficacious and well tolerated in the treatment of severe equine asthma in a large prospective European clinical trial. *Equine Vet J.* 2021.

96. Dauvillier J, Felipe MJ, Lunn DP, Lavoie-Lamoureux A, Leclère M, Beauchamp G, et al. Effect of long-term fluticasone treatment on immune function in horses with heaves. *J Vet Intern Med.* 2011;25(3):549-57.
97. Munoz T, Leclere M, Jean D, Lavoie JP. Serum cortisol concentration in horses with heaves treated with fluticasone propionate over a 1 year period. *Res Vet Sci.* 2015;98:112-4.
98. Lavoie JP, Leclere M, Rodrigues N, Lemos KR, Bourzac C, Lefebvre-Lavoie J, et al. Efficacy of inhaled budesonide for the treatment of severe equine asthma. *Equine Vet J.* 2019;51(3):401-7.
99. Couëtill LL, Art T, de Moffarts B, Becker M, Mélotte D, Jaspard F, et al. Effect of beclomethasone dipropionate and dexamethasone isonicotinate on lung function, bronchoalveolar lavage fluid cytology, and transcription factor expression in airways of horses with recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med.* 2006;20(2):399-406.
100. Rush BR, Raub ES, Rhoads WS, Flaminio MJ, Matson CJ, Hakala JE, et al. Pulmonary function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *Am J Vet Res.* 1998;59(8):1039-43.
101. de Wasseige S, Picotte K, Lavoie JP. Nebulized dexamethasone sodium phosphate in the treatment of horses with severe asthma. *J Vet Intern Med.* 2021.
102. Mainguy-Seers S, Bessonnat A, Picotte K, Lavoie JP. Nebulisation of dexamethasone sodium phosphate for the treatment of severe asthmatic horses. *Equine Vet J.* 2019;51(5):641-5.
103. Leclere M, Lefebvre-Lavoie J, Beauchamp G, Lavoie JP. Efficacy of oral prednisolone and dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction in the presence of continuous antigen exposure. *Equine Vet J.* 2010;42(4):316-21.
104. Hirsch G, Lavoie-Lamoureux A, Beauchamp G, Lavoie JP. Neutrophils are not less sensitive than other blood leukocytes to the genomic effects of glucocorticoids. *PLoS One.* 2012;7(9):e44606.
105. Bertin FR, Ivester KM, Couëtill LL. Comparative efficacy of inhaled albuterol between two hand-held delivery devices in horses with recurrent airway obstruction. *Equine Vet J.* 2011;43(4):393-8.
106. Pearson EG, Riebold TW. Comparison of bronchodilators in alleviating clinical signs in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *J Am Vet Med Assoc.* 1989;194(9):1287-91.
107. Couetil L, Hammer J, Miskovic Feutz M, Nogradi N, Perez-Moreno C, Ivester K. Effects of N-butylscopolammonium bromide on lung function in horses with recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med.* 2012;26(6):1433-8.
108. Husulak ML, Manning ST, Meachem MD, Burgess HJ, Epp TY, Montgomery JB. Does antimicrobial therapy improve outcomes in horses with severe equine asthma and a positive tracheal wash bacterial culture? *Can J Vet Res.* 2018;82(3):184-91.
109. Mainguy-Seers S, Vargas A, Labrecque O, Bedard C, Helie P, Lavoie JP. Randomised study of the immunomodulatory effects of azithromycin in severe asthmatic horses. *Vet Rec.* 2019;185(5):143.
110. Costa MC, Weese JS. Understanding the Intestinal Microbiome in Health and Disease. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2018;34(1):1-12.
111. Costa M, Weese JS. Methods and basic concepts for microbiota assessment. *Vet J.* 2019;249:10-5.
112. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet.* 2012;13(4):260-70.
113. Segal LN, Rom WN, Weiden MD. Lung microbiome for clinicians. New discoveries about bugs in healthy and diseased lungs. *Ann Am Thorac Soc.* 2014;11(1):108-16.
114. Kim BR, Shin J, Guevarra R, Lee JH, Kim DW, Seol KH, et al. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *J Microbiol Biotechnol.* 2017;27(12):2089-93.
115. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature.* 2007;449(7164):804-10.

116. Marsh RL, Nelson MT, Pope CE, Leach AJ, Hoffman LR, Chang AB, et al. How low can we go? The implications of low bacterial load in respiratory microbiota studies. *Pneumonia (Nathan)*. 2018;10:7.
117. Hoffman AM, Viel L, Muckle CA, Tesarowski DB. Evaluation of a guarded bronchoscopic method for microbial sampling of the lower airways in foals. *Can J Vet Res*. 1991;55(4):325-31.
118. Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. The role of the bacterial microbiome in lung disease. *Expert Rev Respir Med*. 2013;7(3):245-57.
119. Welp AL, Bomberger JM. Bacterial Community Interactions During Chronic Respiratory Disease. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:213.
120. Dickson RP, Martinez FJ, Huffnagle GB. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *Lancet*. 2014;384(9944):691-702.
121. Hirsch G SH, Costa MC, Arroyo LG, Weese JS. . Characterization of the respiratory tract microbiota of healthy horses. (Abstract). In: University of Guelph, Guelph, ON, Canada, Universidade Estadual de Londrina, PR, Brazil. 2015.
122. Zhu Y, Chen S, Yi Z, Holyoak R, Wang T, Ding Z, et al. Nasopharyngeal Microbiomes in Donkeys Shedding *Streptococcus equi* Subspecies *equi* in Comparison to Healthy Donkeys. *Front Vet Sci*. 2021;8:645627.
123. Debelu TA, N.; Sisay, T.; Desissa, F. Isolation and identification of aerobic bacterial species from upper respiratory tract of cart horses in Central Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*. 2014;6(9):239-44.
124. Hansson I, Johansson KE, Persson M, Riihimaki M. The clinical significance of *Nicoletella semolina* in horses with respiratory disorders and a screening of the bacterial flora in the airways of horses. *Vet Microbiol*. 2013;162(2-4):695-9.
125. Ward CL, Wood JL, Houghton SB, Mumford JA, Chanter N. *Actinobacillus* and *Pasteurella* species isolated from horses with lower airway disease. *Vet Rec*. 1998;143(10):277-9.
126. Yoshii Y, Shimizu K, Morozumi M, Chiba N, Ubukata K, Uruga H, et al. Identification of pathogens by comprehensive real-time PCR versus conventional methods in community-acquired pneumonia in Japanese adults. *Infect Dis (Lond)*. 2016;48(11-12):782-8.
127. Boyle AG, Timoney JF, Newton JR, Hines MT, Waller AS, Buchanan BR. *Streptococcus equi* Infections in Horses: Guidelines for Treatment, Control, and Prevention of Strangles-Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med*. 2018;32(2):633-47.
128. Huang YJ, Nariya S, Harris JM, Lynch SV, Choy DF, Arron JR, et al. The airway microbiome in patients with severe asthma: Associations with disease features and severity. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(4):874-84.
129. Jacquet-Guibon S, Dupays AG, Coudry V, Crevier-Denoix N, Leroy S, Sineriz F, et al. Randomized controlled trial demonstrates the benefit of RGTA(R) based matrix therapy to treat tendinopathies in racing horses. *PLoS One*. 2018;13(3):e0191796.
130. Bisgaard H, Hermansen MN, Buchvald F, Loland L, Halkjaer LB, Bonnelykke K, et al. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. *N Engl J Med*. 2007;357(15):1487-95.
131. Yayan J. No direct association between asthma and the microbiome based on currently available techniques. *Medicine (Baltimore)*. 2014;93(27):e199.
132. Pavord ID, Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. *Lancet*. 1999;353(9171):2213-4.
133. Kozik AJ, Huang YJ. The microbiome in asthma: Role in pathogenesis, phenotype, and response to treatment. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2019;122(3):270-5.
134. Son JH, Kim JH, Chang HS, Park JS, Park CS. Relationship of Microbial Profile With Airway Immune Response in Eosinophilic or Neutrophilic Inflammation of Asthmatics. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2020;12(3):412-29.

135. Taylor SL, Leong LEX, Choo JM, Wesselingh S, Yang IA, Upham JW, et al. Inflammatory phenotypes in patients with severe asthma are associated with distinct airway microbiology. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(1):94-103 e15.
136. Green BJ, Wiriyaichaiporn S, Grainge C, Rogers GB, Kehagia V, Lau L, et al. Potentially pathogenic airway bacteria and neutrophilic inflammation in treatment resistant severe asthma. *PLoS One.* 2014;9(6):e100645.
137. Simpson JL, Daly J, Baines KJ, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, et al. Airway dysbiosis: *Haemophilus influenzae* and *Tropheryma* in poorly controlled asthma. *Eur Respir J.* 2016;47(3):792-800.
138. Yang X, Li H, Ma Q, Zhang Q, Wang C. Neutrophilic Asthma Is Associated with Increased Airway Bacterial Burden and Disordered Community Composition. *Biomed Res Int.* 2018;2018:9230234.
139. Brusselle GG, Vanderstichele C, Jordens P, Deman R, Slabbynck H, Ringoet V, et al. Azithromycin for prevention of exacerbations in severe asthma (AZISAST): a multicentre randomised double-blind placebo-controlled trial. *Thorax.* 2013;68(4):322-9.
140. Gibson PG, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, Hodge S, James AL, et al. Effect of azithromycin on asthma exacerbations and quality of life in adults with persistent uncontrolled asthma (AMAZES): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2017;390(10095):659-68.
141. Simpson JL, Powell H, Boyle MJ, Scott RJ, Gibson PG. Clarithromycin targets neutrophilic airway inflammation in refractory asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(2):148-55.
142. Sutherland ER, King TS, Icitovic N, Ameredes BT, Bleecker E, Boushey HA, et al. A trial of clarithromycin for the treatment of suboptimally controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(4):747-53.
143. Tian BP, Xuan N, Wang Y, Zhang G, Cui W. The efficacy and safety of azithromycin in asthma: A systematic review. *J Cell Mol Med.* 2019;23(3):1638-46.
144. Malhotra-Kumar S, Lammens C, Coenen S, Van Herck K, Goossens H. Effect of azithromycin and clarithromycin therapy on pharyngeal carriage of macrolide-resistant streptococci in healthy volunteers: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet.* 2007;369(9560):482-90.
145. Taylor SL, Leong LEX, Mobegi FM, Choo JM, Wesselingh S, Yang IA, et al. Long-Term Azithromycin Reduces *Haemophilus influenzae* and Increases Antibiotic Resistance in Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019.
146. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro M, Sterk PJ, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J.* 2014;43(2):343-73.
147. Christley RM, Hodgson DR, Rose RJ, Hodgson JL, Wood JL, Reid SW. Coughing in thoroughbred racehorses: risk factors and tracheal endoscopic and cytological findings. *Vet Rec.* 2001;148(4):99-104.
148. Liu FC, Chuang YH, Tsai YF, Yu HP. Role of neutrophil extracellular traps following injury. *Shock.* 2014;41(6):491-8.
149. Jocelyn NA, Wylie CE, Lean M, Barrelet A, Foote AK. Association of neutrophil morphology with bacterial isolates in equine tracheal wash samples. *Equine Vet J.* 2018;50(6):752-8.
150. Lu J, Xiong L, Zhang X, Liu Z, Wang S, Zhang C, et al. The Role of Lower Airway Dysbiosis in Asthma: Dysbiosis and Asthma. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:3890601.
151. Yamamoto-Hanada K, Yang L, Narita M, Saito H, Ohya Y. Influence of antibiotic use in early childhood on asthma and allergic diseases at age 5. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2017;119(1):54-8.
152. Ahmadizar F, Vijverberg SJH, Arets HGM, de Boer A, Turner S, Devereux G, et al. Early life antibiotic use and the risk of asthma and asthma exacerbations in children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2017;28(5):430-7.
153. Christensen H, Kuhnert P, Nørskov-Lauritsen N, Planet PJ, Bisgaard M. The Family Pasteurellaceae. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, editors. *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 535-64.

154. Kuhnert P, Christensen H. *Pasteurellaceae : biology, genomics, and molecular aspects*. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2008. viii, 267, 4 p. de pl. p.
155. Bisgaard M. Ecology and significance of *Pasteurellaceae* in animals. *Zentralbl Bakteriol*. 1993;279(1):7-26.
156. Christensen H, Kuhnert P, Busse HJ, Frederiksen WC, Bisgaard M. Proposed minimal standards for the description of genera, species and subspecies of the *Pasteurellaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2007;57(Pt 1):166-78.
157. Dickerman A, Bandara AB, Inzana TJ. Phylogenomic analysis of *Haemophilus parasuis* and proposed reclassification to *Glaesserella parasuis*, gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020;70(1):180-6.
158. Kuhnert P, Bisgaard M, Korczak BM, Schwendener S, Christensen H, Frey J. Identification of animal *Pasteurellaceae* by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Microbiol Methods*. 2012;89(1):1-7.
159. Kuhnert P, Korczak B, Falsen E, Straub R, Hoops A, Boerlin P, et al. *Nicoletella semolina* gen. nov., sp. nov., a new member of *Pasteurellaceae* isolated from horses with airway disease. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5542-8.
160. Christensen H, Bisgaard M. Classification of genera of *Pasteurellaceae* using conserved predicted protein sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018;68(8):2692-6.
161. Brenner DJ, Staley JT, SpringerLink. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2 / The proteobacteria / Part B, The gammaproteobacteria. 2nd ed.. ed. New York: New York : Springer; 2005.
162. Blackall PJ, Bisgaard M, McKenzie RA. Characterisation of Australian isolates of *Actinobacillus capsulatus*, *Actinobacillus equuli*, *Pasteurella caballi* and Bisgaard Taxa 9 and 11. *Aust Vet J*. 1997;75(1):52-5.
163. Christensen H, Bisgaard M, Olsen JE. Reclassification of equine isolates previously reported as *Actinobacillus equuli*, variants of *A. equuli*, *Actinobacillus suis* or Bisgaard taxon 11 and proposal of *A. equuli* subsp. *equuli* subsp. nov. and *A. equuli* subsp. *haemolyticus* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002;52(Pt 5):1569-76.
164. Uchida-Fujii E, Niwa H, Kinoshita Y, Nukada T. *Actinobacillus* species isolated from Japanese Thoroughbred racehorses in the last two decades. *J Vet Med Sci*. 2019;81(9):1234-7.
165. Dafni H, Greenfeld L, Oren R, Harmelin A. The Likelihood of Misidentifying Rodent *Pasteurellaceae* by Using Results from a Single PCR Assay. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2019;58(2):201-7.
166. Frey J, Kuhnert P. Identification of animal *Pasteurellaceae* by MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol Biol*. 2015;1247:235-43.
167. Christensen H, Hommez J, Olsen JE, Bisgaard M. [*Pasteurella*] *caballi* infection not limited to horses - a closer look at taxon 42 of Bisgaard. *Lett Appl Microbiol*. 2006;43(4):424-9.
168. Frey J. The role of RTX toxins in host specificity of animal pathogenic *Pasteurellaceae*. *Vet Microbiol*. 2011;153(1-2):51-8.
169. Frey J, Kuhnert P. RTX toxins in *Pasteurellaceae*. *Int J Med Microbiol*. 2002;292(3-4):149-58.
170. Layman QD, Rezabek GB, Ramachandran A, Love BC, Confer AW. A retrospective study of equine actinobacillosis cases: 1999-2011. *J Vet Diagn Invest*. 2014;26(3):365-75.
171. Foreyt WJ, Lagerquist JE. Experimental contact of bighorn sheep (*Ovis canadensis*) with horses and cattle, and comparison of neutrophil sensitivity to *Pasteurella haemolytica* cytotoxins. *J Wildl Dis*. 1996;32(4):594-602.
172. Inzana TJ. The Many Facets of Lipooligosaccharide as a Virulence Factor for *Histophilus somni*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2016;396:131-48.
173. Moran AP, Prendergast MM, Appelmek BJ. Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1996;16(2):105-15.
174. Mandrell RE, Apicella MA. Lipo-oligosaccharides (LOS) of mucosal pathogens: molecular mimicry and host-modification of LOS. *Immunobiology*. 1993;187(3-5):382-402.

175. Sweeney CR, Holcombe SJ, Barningham SC, Beech J. Aerobic and anaerobic bacterial isolates from horses with pneumonia or pleuropneumonia and antimicrobial susceptibility patterns of the aerobes. *J Am Vet Med Assoc.* 1991;198(5):839-42.
176. Reuss SM, Giguere S. Update on bacterial pneumonia and pleuropneumonia in the adult horse. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2015;31(1):105-20.
177. Racklyeft DJ, Love DN. Bacterial infection of the lower respiratory tract in 34 horses. *Aust Vet J.* 2000;78(8):549-59.
178. Arroyo MG, Slovis NM, Moore GE, Taylor SD. Factors Associated with Survival in 97 Horses with Septic Pleuropneumonia. *J Vet Intern Med.* 2017;31(3):894-900.
179. Gao W, Chan Y, You M, Lacap-Bugler DC, Leung WK, Watt RM. In-depth snapshot of the equine subgingival microbiome. *Microb Pathog.* 2016;94:76-89.
180. Racklyeft DJ, Love DN. Influence of head posture on the respiratory tract of healthy horses. *Aust Vet J.* 1990;67(11):402-5.
181. Padalino B, Raidal SL, Knight P, Celi P, Jeffcott L, Muscatello G. Behaviour during transportation predicts stress response and lower airway contamination in horses. *PLoS One.* 2018;13(3):e0194272.
182. Raidal SL, Bailey GD, Love DN. Effect of transportation on lower respiratory tract contamination and peripheral blood neutrophil function. *Aust Vet J.* 1997;75(6):433-8.
183. Schlater LK, Brenner DJ, Steigerwalt AG, Moss CW, Lambert MA, Packer RA. *Pasteurella caballi*, a new species from equine clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1989;27(10):2169-74.
184. Schlater LR. An aerogenic *Pasteurella*-like organism isolated from horses. *J Vet Diagn Invest.* 1989;1(1):3-5.
185. Hayakawa Y, Komae H, Ide H, Nakagawa H, Yoshida Y, Kamada M, et al. An occurrence of equine transport pneumonia caused by mixed infection with *Pasteurella caballi*, *Streptococcus suis* and *Streptococcus zooepidemicus*. *J Vet Med Sci.* 1993;55(3):455-6.
186. Bada R, Higgins R, Jean D. Quebec. Isolation of *Pasteurella caballi* in a horse. *Can Vet J.* 1993;34(9):571.
187. Escande F, Vallee E, Aubart F. *Pasteurella caballi* infection following a horse bite. *Zentralbl Bakteriol.* 1997;285(3):440-4.
188. Sayin Z, Erganis O, Sakmanoglu A, Hadimli H. Comparison of two different primer sets for detection of *Pasteurella caballi* in bronchoalveolar lavage fluids samples from thoroughbred Arabian foals, using PCR. *Veterinarski Arhiv.* 2016.
189. Dousse F, Thomann A, Brodard I, Korczak BM, Schlatter Y, Kuhnert P, et al. Routine phenotypic identification of bacterial species of the family Pasteurellaceae isolated from animals. *J Vet Diagn Invest.* 2008;20(6):716-24.
190. Maillard K, Richard EA, Kuhnert P, Fortier G, Léon A, Pitel P-H. Isolation of *Nicoletella semolina* from Equine Tracheal Washes. *J Equine Vet Sci.* 2013(33):561-4.
191. McConachie EL, Hart KA, Whelchel DD, Schroeder EL, Schott HC, 2nd, Sanchez S. Pulmonary disease potentially associated with *Nicoletella semolina* in 3 young horses. *J Vet Intern Med.* 2014;28(3):939-43.
192. Riley CB, Aldrich ED, Pemberton SL, Mirza AA. First report of pulmonary disease associated with *Nicoletella semolina* in a horse in New Zealand. *N Z Vet J.* 2021;69(1):65-9.
193. Rycroft AN, Garside LH. *Actinobacillus* species and their role in animal disease. *Vet J.* 2000;159(1):18-36.
194. Sternberg S. Isolation of *Actinobacillus equuli* from the oral cavity of healthy horses and comparison of isolates by restriction enzyme digestion and pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol.* 1998;59(2-3):147-56.
195. Kuhnert P, Berthoud H, Christensen H, Bisgaard M, Frey J. Phylogenetic relationship of equine *Actinobacillus* species and distribution of RTX toxin genes among clusters. *Vet Res.* 2003;34(3):353-9.

196. Pusterla N, Jones ME, Mohr FC, Higgins JK, Mapes S, Jang SS, et al. Fatal pulmonary hemorrhage associated with RTX toxin producing *Actinobacillus equuli* subspecies *haemolyticus* infection in an adult horse. *J Vet Diagn Invest.* 2008;20(1):118-21.
197. Peel MM, Hornidge KA, Luppino M, Stacpoole AM, Weaver RE. *Actinobacillus* spp. and related bacteria in infected wounds of humans bitten by horses and sheep. *J Clin Microbiol.* 1991;29(11):2535-8.
198. Brook I. Management of human and animal bite wound infection: an overview. *Curr Infect Dis Rep.* 2009;11(5):389-95.
199. Schrottner P, Schultz J, Rudolph W, Gunzer F, Thurmer A, Fitze G, et al. *Actinobacillus equuli* ssp. *haemolyticus* in a semi-occlusively treated horse bite wound in a 2-year-old girl. *Ger Med Sci.* 2013;11:Doc14.
200. Gay CC, Lording PM. Peritonitis in horses associated with *Actinobacillus equuli*. *Aust Vet J.* 1980;56(6):296-300.
201. Matthews S, Dart AJ, Dowling BA, Hodgson JL, Hodgson DR. Peritonitis associated with *Actinobacillus equuli* in horses: 51 cases. *Aust Vet J.* 2001;79(8):536-9.
202. Carr EA, Carlson GP, Wilson WD, Read DH. Acute hemorrhagic pulmonary infarction and necrotizing pneumonia in horses: 21 cases (1967-1993). *J Am Vet Med Assoc.* 1997;210(12):1774-8.
203. King P. *Haemophilus influenzae* and the lung (*Haemophilus* and the lung). *Clin Transl Med.* 2012;1(1):10.
204. Zhang Q, Illing R, Hui CK, Downey K, Carr D, Stearn M, et al. Bacteria in sputum of stable severe asthma and increased airway wall thickness. *Respir Res.* 2012;13:35.
205. Taylor SL, Ivey KL, Gibson PG, Simpson JL, Rogers GB. Airway abundance of *Haemophilus influenzae* predicts response to azithromycin in adults with persistent uncontrolled asthma. *Eur Respir J.* 2020;56(4).
206. Singh R, Mackay AJ, Patel AR, Garcha DS, Kowlessar BS, Brill SE, et al. Inflammatory thresholds and the species-specific effects of colonising bacteria in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res.* 2014;15(1):114.
207. Garcha DS, Thurston SJ, Patel AR, Mackay AJ, Goldring JJ, Donaldson GC, et al. Changes in prevalence and load of airway bacteria using quantitative PCR in stable and exacerbated COPD. *Thorax.* 2012;67(12):1075-80.
208. Diver S, Richardson M, Haldar K, Ghebre MA, Ramsheh MY, Bafadhel M, et al. Sputum microbiomic clustering in asthma and chronic obstructive pulmonary disease reveals a *Haemophilus*-predominant subgroup. *Allergy.* 2020;75(4):808-17.
209. Price EP, Harris TM, Spargo J, Nosworthy E, Beissbarth J, Chang AB, et al. Simultaneous identification of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* using real-time PCR. *Future Microbiol.* 2017;12:585-93.
210. Kishimoto M, Tsuchiaka S, Rahpaya SS, Hasebe A, Otsu K, Sugimura S, et al. Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with bovine respiratory disease complex. *J Vet Med Sci.* 2017;79(3):517-23.
211. Pusterla N, Mapes S, Wilson WD. Diagnostic sensitivity of nasopharyngeal and nasal swabs for the molecular detection of EHV-1. *Vet Rec.* 2008;162(16):520-1.
212. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(8):957-63.
213. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, et al. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *mBio.* 2015;6(2):e00037.
214. Gleeson K, Egli DF, Maxwell SL. Quantitative aspiration during sleep in normal subjects. *Chest.* 1997;111(5):1266-72.

215. Huxley EJ, Viroslav J, Gray WR, Pierce AK. Pharyngeal aspiration in normal adults and patients with depressed consciousness. *Am J Med.* 1978;64(4):564-8.
216. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods.* 2010;50(4):S1-5.
217. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611-22.

Annexe A

Protocole d'extraction d'ADN d'échantillons

Ce protocole décrit comment extraire l'ADN de plusieurs types d'échantillons. Il s'agit de la procédure *Purification of Total DNA from Animal Tissues* du kit QIAGEN DNeasy® Blood & Tissue Kit, avec quelques modifications. Deux étapes importantes peuvent influencer la quantité et la qualité de l'ADN qui sera extrait : 1) la quantité de matériel de départ et 2) le volume de tampon AE utilisé pour l'élution finale.

Pour la phase II du projet *N. semolina*, 20,0 mL de lavage bronchoalvéolaire a été extrait afin d'augmenter les chances de détection de la bactérie, suite aux résultats de la phase I (voir [Chapitre 5](#)). Pour ce faire, les étapes 2 à 12, inclusivement, du protocole d'extraction ci-dessous ont été adaptées. Tout d'abord, l'échantillon de 20,0 mL était divisé dans 12 eppendorfs de 2,0 mL. Ensuite, les quantités de tous les réactifs jusqu'au transfert sur colonne DNeasy (étape 13) étaient doublées pour compenser pour la plus grande quantité de matériel initial (Buffer ATL, Protéinase K, Buffer AL, éthanol 100 %). Les étapes subséquentes demeuraient les mêmes.

Matériel nécessaire

- QIAGEN DNeasy® Blood & Tissue Kit (cat # 69504/69506)
- Tubes de billes garnet 0,7 mm (OMNI international cat # 19-624)
- Tubes stériles 1,5 ou 2,0 mL (eppendorf)

Ce protocole est à réaliser sous la hotte biologique.

1. Régler un bain chauffant à 55 °C et un deuxième à 70 °C.
2. Prendre un aliquot de 5,0 mL de l'échantillon à extraire (LBA, lavage oral, lavage nasal, lavage trachéal) et le diviser entre 4 tubes de 1,5 mL (ou 3 tubes de 2,0 mL).
 - a. Les lavages oraux doivent être grossièrement filtrés à l'aide d'une gaze stérile (4 plis d'épaisseur) afin de retirer les plus grosses particules alimentaires qui gênent l'extraction autrement.
3. Centrifuger les tubes à 18 400 x g pour 30 minutes, à 4 °C.
4. Retirer le surnageant et re-suspendre le culot dans 90 µL de Buffer ATL (ou 120 µL si 3 tubes de 2,0 mL). Garder les tubes sur glaces jusqu'au transfert dans les tubes de billes.
5. Recombiner les 4 tubes dans 1 tube de billes.

6. Homogénéiser l'échantillon dans le Mini-Beadbeater pour 1 minute à vitesse maximale. Il est possible qu'il y ait légère décoloration des billes.
7. Centrifuger les tubes à vitesse maximale pour 1 minute à température pièce pour concentrer la mousse.
8. Ajouter 40 μ L de protéinase K et vortexer.
9. Incuber à 55 °C pour 1 h.
10. Retirer le liquide du tube (ne pas prendre des billes) et le transférer dans un nouveau tube 1,5 mL.
11. Ajouter 200 μ L de Buffer AL et vortexer immédiatement. Incuber à 70 °C pour 30 minutes (après l'incubation, il y a fréquemment des débris au fond du tube, ne pas les mélanger)
12. Ajouter 200 μ L d'éthanol 100 % et mélanger par inversion les tubes doucement (1 à 2 fois).
13. Transférer le mélange (sans prendre les débris) sur une colonne DNeasy placée sur un tube collecteur 2,0 mL.
14. Centrifuger à 6000 x *g* pour 1 minute à température pièce. Jeter le liquide du tube collecteur et le replacer sous la colonne.
15. Ajouter 500 μ L Buffer AW1 et centrifuger à 6000 x *g* pour 1 minute à température pièce. Jeter le liquide du tube collecteur et le replacer sous la colonne.
16. Ajouter 500 μ L de Buffer AW2 et centrifuger à 18 400 x *g* (vitesse maximale) pour 3 minutes à température pièce afin de sécher la membrane de la colonne.
17. Jeter le liquide du tube collecteur et le replacer sous la colonne. Centrifuger à 18 400 x *g* (vitesse maximale) pour 1 minute à température pièce.
18. Placer la colonne dans un nouveau tube 1,5 mL et ajouter 100 μ L de Buffer AE au centre de la membrane. Incuber à température pièce pour 1 minute et centrifuger 1 minute à 6000 x *g* pour éluer l'ADN.
19. Placer l'ADN à -20 °C jusqu'à analyse ou à -80 °C pour conservation à long terme.

Annexe B

Protocole d'extraction d'ADN de bactéries à Gram négatif

Ce protocole est adapté de celui de l'annexe A et de la procédure *Purification of Total DNA from Animal Tissues* du kit QIAGEN DNeasy® Blood & Tissue Kit et permet d'isoler de l'ADN bactérien d'une culture pure.

Matériel nécessaire

- QIAGEN DNeasy® Blood & Tissue Kit (cat # 69504/69506)
- Tubes de billes garnet 0,7 mm (OMNI international cat # 19-624)
- Tubes stériles 1,5 mL (eppendorf)

Ce protocole est à réaliser sous la hotte biologique. Veillez à ce que les bactéries extraites respectent le niveau de confinement du laboratoire.

1. Régler un bain chauffant à 55 °C et un deuxième à 70 °C.
2. Ajouter 360 µL de Buffer ATL dans un tube de billes.
3. À partir d'une culture pure sur gélose, prendre quelques colonies isolées à l'aide d'une anse de Koch stérile et les suspendre dans le tube de billes.
4. Homogénéiser l'échantillon dans le Mini-Beadbeater pour 1 minute à vitesse maximale. Il est possible qu'il y ait légère décoloration des billes.
5. Centrifuger les tubes à vitesse maximale pour 1 minute à température pièce pour concentrer la mousse.
6. Ajouter 40 µL de protéinase K et vortexer.
7. Incuber à 55 °C pour 1 h.
8. Retirer le liquide du tube (ne pas prendre des billes) et le transférer dans un nouveau tube 1,5 mL.
9. Ajouter 200 µL de Buffer AL et vortexer immédiatement. Incuber à 70 °C pour 30 minutes (après l'incubation, il y a fréquemment des débris au fond du tube, ne pas les mélanger)
10. Ajouter 200 µL d'éthanol 100 % et mélanger par inversion les tubes doucement (1 à 2 fois).
11. Transférer le mélange (sans prendre les débris) sur une colonne DNeasy placée sur un tube collecteur 2,0 mL.
12. Centrifuger à 6000 x *g* pour 1 minute à température pièce. Jeter le liquide du tube collecteur et le replacer sous la colonne.

13. Ajouter 500 μ l Buffer AW1 et centrifuger à 6000 x *g* pour 1 minute à température pièce. Jeter le liquide du tube collecteur et le replacer sous la colonne.
14. Ajouter 500 μ L de Buffer AW2 et centrifuger à 18 400 x *g* (vitesse maximale) pour 3 minutes à température pièce afin de sécher la membrane de la colonne.
15. Jeter le liquide du tube collecteur et le replacer sous la colonne. Centrifuger à 18 400 x *g* (vitesse maximale) pour 1 minute à température pièce.
16. Placer la colonne dans un nouveau tube 1,5 mL et ajouter 100 μ L de Buffer AE au centre de la membrane. Incuber à température pièce pour 1 minute et centrifuger 1 minute à 6000 x *g* pour éluer l'ADN.
17. Placer l'ADN à -20 °C jusqu'à analyse ou à -80 °C pour conservation à long terme.

Annexe C

Principes généraux de la synthèse d'amorces qPCR

Ces étapes sont souvent non-nécessaires car plusieurs séquences d'amorces sont disponibles dans la littérature et il suffit de confirmer leur spécificité et d'optimiser les conditions qPCR pour les échantillons à l'étude. Les amorces viennent en paire, une amorce sens (ou *forward*) et une amorce anti-sens (ou *reverse*), et encadrent une section d'ADN de longueur variable pour permettre l'amplification de ce segment. Le qPCR permet de suivre en temps réel cette amplification.

Dans les cas où des amorces spécifiques ne sont pas disponibles, il est possible de synthétiser des amorces. La première étape de la synthèse est la bio-informatique, qui consiste en l'alignement de séquences géniques à l'aide d'un logiciel tel que Geneious Prime (Biomatters Ltd., San Diego, CA, United States), suivi de la vérification de la spécificité théorique et des autres critères propres aux amorces (affinité *self* et *self* 3') à l'aide du site NCBI Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Ensuite, il faut vérifier la spécificité des amorces dans de « vraies » conditions *in vitro* en les utilisant avec la bactérie d'intérêt, d'autres espèces bactériennes phylogéniquement près de la bactérie visée et avec des espèces qui seront probablement retrouvées dans les échantillons d'intérêt. Une paire d'amorces peut sembler parfaite en théorie, mais ne pas être aussi spécifique que souhaité lorsqu'utilisée avec d'autres bactéries similaires. Les conditions PCR peuvent être optimisées afin de favoriser la spécificité des amorces. Le séquençage permet par la suite de confirmer que le produit PCR amplifié correspond bien à la bactérie et son segment génique visés. Une fois toutes ces étapes complétées, une courbe standard peut être faite à partir de dilutions sériées et les amorces peuvent être utilisées pour quantifier la bactérie spécifique dans des échantillons. La figure ci-dessous résume les étapes de synthèse.

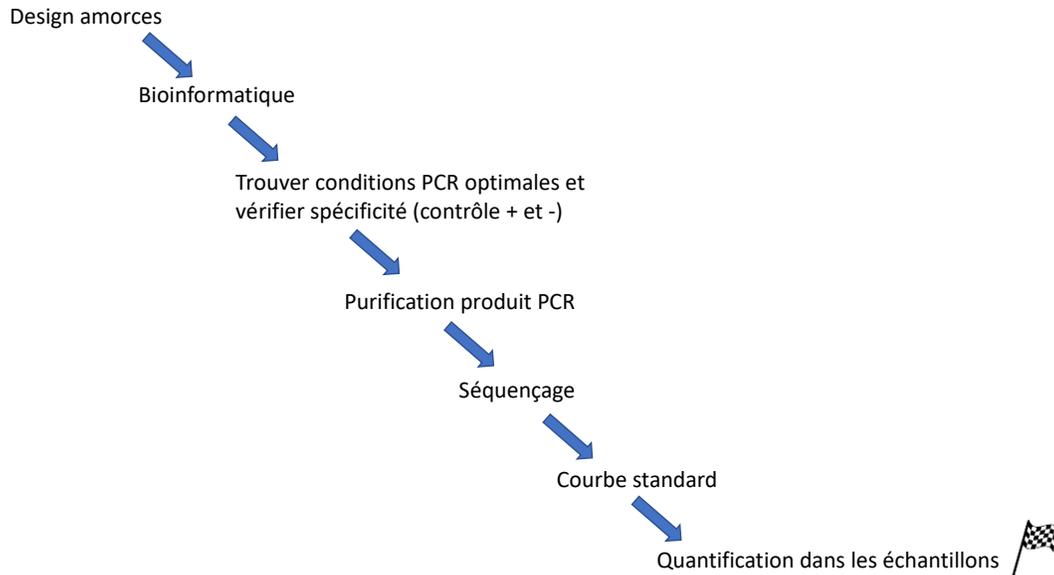


Figure 23. Résumé des étapes de la synthèse jusqu'à l'utilisation d'amorces PCR.

PCR : Réaction de polymérase en chaîne.

Il est conseillé de suivre certaines conditions afin de synthétiser des amorces efficaces. Le site de Thermo Fisher Scientific fournit de plus amples renseignements à ce sujet en plus de servir de bonne référence pour la PCR et le qPCR (<https://www.thermofisher.com/ca/en/home/life-science/oligonucleotides-primers-probes-genes/custom-dna-oligos/oligo-technical-resources.html> et <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/pcr-primer-design-tips/>). Avant de commencer un projet ayant recours au PCR ou au qPCR, il est conseillé de se référer aux *MIQE Guidelines* (216, 217). Le tableau suivant résume les conditions à remplir afin de synthétiser des amorces qPCR.

Tableau 11. Conditions à respecter pour la synthèse d'amorces qPCR.

Condition à respecter	Explication
Viser une longueur de 18 à 24 nucléotides par amorce.	Plus longue est une amorce, plus sa spécificité envers le fragment d'intérêt augmente. Toutefois, une amorce plus courte se lie plus rapidement et efficacement. On peut modifier la longueur des amorces afin que la paire d'amorces ait une température d'hybridation (T_m) similaire.
Viser une longueur de 80 à 150 paires de base pour le produit qPCR.	Un fragment de plus grande taille devra être amplifié par PCR et le suivi de son amplification en temps réel sera impossible, le qPCR permettant la détection de petits fragments d'ADN seulement. La dénaturation et l'élongation sont plus longs pour les grands fragments.
Favoriser C et G en 5' et en partie centrale, éviter en 3'.	Les paires de bases C et G demandent une plus haute température pour être séparées étant donné leur liaison par

	trois ponts hydrogène plutôt que deux pour la liaison A-T, et sont donc plus stables. On favorise ainsi une stabilité de l'amorce à son extrémité 5'.
Viser un contenu en paires de bases C et G de 40 à 60 %.	Voir l'explication précédente. Le contenu en paire de bases de l'amorce permet de déterminer sa température d'hybridation.
Éviter des séquences complémentaires dans une même amorce et entre les deux amorces sens et anti-sens (à évaluer également à l'aide de NCBI Primer BLAST).	Pour éviter les <i>self-dimers</i> et les <i>primer-dimers</i> (amorces qui se lient à elles-mêmes ou entre elles plutôt qu'au fragment d'intérêt). Dans NCBI Primer BLAST, on vise des caractères <i>Self</i> et <i>Self 3' ≤ 4</i> pour les deux amorces. Il s'agit d'une condition fréquemment problématique.
Veiller à ce que les deux amorces fonctionnent à des températures d'hybridation similaires ($\Delta < 5^\circ\text{C}$).	Cela permet de régler la réaction à une température d'hybridation favorable pour les deux amorces. Cette température devrait être quelques degrés (environ 4 à 8°C) plus bas que la température déterminée par les amorces (basé sur leur taille et leur composition). Il s'agit d'une condition fréquemment problématique.
Éviter les répétitions consécutives triples d'une même paire de base (ex. ATTTT) et les di-nucléotides qui se répètent (ex. CTCTCT).	Peut faire « glisser » la Taq polymérase et augmente le risque d'erreurs dans la transcription.

qPCR: Réaction de polymérase en chaîne quantitative, paires de bases C : cytosine, G : guanine, A : adénine, T : thymine, NCBI : National Center for Biotechnology Information, NCBI Primer BLAST : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, Δ : variation.

Il est également possible de synthétiser des amorces détectant plus d'une espèce, un genre ou une famille bactérienne, en visant des sections communes à plusieurs espèces. Le principe demeure le même; il suffit d'utiliser l'alignement génique afin de trouver deux sections communes (une pour chaque amorce) aux bactéries d'intérêt et dissimilaire des autres bactéries.

Annexe D

Informations supplémentaires sur la section 7.5.1 « *N. semolina* identifié par culture et MALDI-TOF »

En moyenne, les chevaux *N. semolina*-positifs étaient âgés de 3,7 ans, le plus jeune étant un poulain de 1,5 mois (cas index) et le plus vieux étant âgé de 17 ans. Deux chevaux étaient de race Standardbred, cinq Quarter Horse, un Paint, un Lusitanien et un Hanovrien. Un cheval avait reçu un traitement antibiotique et quatre, des corticostéroïdes avant les prélèvements.

Concernant la présentation clinique des chevaux, sept sur dix présentaient de la toux, sept, du jetage nasal, deux, de la fièvre, quatre avaient un foyer inflammatoire, et quatre des cinq chevaux à l'exercice étaient présentés pour intolérance à l'effort.

Lors de l'examen spécifique du système respiratoire, sept chevaux sur neuf avaient une auscultation thoracique anormale, neuf présentaient des sécrétions trachéales et huit avaient aussi une pharyngite plus ou moins sévère. Les radiographies thoraciques étaient anormales (lésions variables) chez sept chevaux sur dix. À la cytologie du lavage trachéal, six chevaux sur sept ont montré une inflammation suppurative. À la coloration Gram, des bactéries à Gram négatif ont été visualisées dans quatre des dix des échantillons. Les diagnostics provisoires ou définitifs des sont présentés dans le Tableau 11.

Informations supplémentaires sur la section 7.5.2 « *N. semolina* chez des chevaux présentés pour consultation respiratoire »

En moyenne, les chevaux *N. semolina*-positifs au qPCR étaient âgés de 6,5 ans (1,5 à 13,5 ans). Trois étaient de race Paint et deux de race Quarter Horse. Un cheval avait reçu des antibiotiques et deux, des corticostéroïdes précédant le prélèvement. Concernant les raisons de présentations, tous présentaient de la toux et de l'intolérance à l'exercice, et aucun ne faisait de la fièvre. Seulement un cheval présentait également du jetage nasal. À l'auscultation respiratoire, deux des cinq chevaux présentaient des anomalies (toux ou crépitements). À l'endoscopie des voies respiratoires, une folliculite pharyngée a été notée chez trois chevaux, un déplacement dorsal intermittent du voile du palais (DDIVP) chez deux chevaux et des sécrétions trachéales chez tous les chevaux. Des anomalies aux radiographies thoraciques ont été observées dans tous les cas (lésions variables).

À la cytologie du lavage trachéal, quatre chevaux sur cinq présentaient une inflammation suppurative avec des neutrophiles dégénérés. Deux des cinq cytologies du lavage bronchoalvéolaire étaient compatibles

avec un asthme léger à modéré et un cheval, différent de ceux atteints d'asthme, avait des évidences d'EIPH. Les diagnostics provisoires ou définitifs des cinq chevaux positifs au qPCR sont présentés dans le Tableau 11.

Annexe E

Abondances relatives des *Pasteurellaceae* et taxa reliés dans le projet Asthme équin vs Chevaux sains

La présente section recoupe les analyses d'abondances relatives spécifiques aux *Pasteurellaceae* et taxa reliés du projet Asthme équin vs Chevaux sains. Les données de séquençage de nouvelle génération (*next generation sequencing*) proviennent d'une étude antérieure (11). Une phase environnementale supplémentaire aux deux analysées par PCR était incluse. Les trois phases correspondaient donc au pâturage sur herbe (faible exposition antigénique), à l'écurie avec foin de qualité (moyenne exposition antigénique) et à l'écurie avec foin de pauvre qualité (haute exposition antigénique). Cette troisième exposition environnementale n'était pas incluse dans la portion quantification PCR du projet pour une question de temps, de logistique et de budget. Le séquençage de la région V4 de l'ARN ribosomal 16S de ces échantillons avait permis l'obtention de valeurs d'abondance relative du microbiome bactérien dans trois régions anatomiques (nez, bouche, poumons). Les analyses additionnelles faites dans le cadre de ce mémoire étaient concentrées sur le phylum des Protéobactéries, la classe des Gammaprotéobactéries ainsi que la famille *Pasteurellaceae*. L'ordre des *Pasteurellales*, comprenant seulement la famille *Pasteurellaceae*, n'a pas été inclus dans les analyses.

Analyses statistiques

Pour les données d'abondance relative des *Pasteurellaceae* et taxa reliés avec valeurs résiduelles normales, un modèle linéaire mixte permettait de vérifier les effets de l'environnement (pâturage, beau foin, mauvais foin) et du statut de santé (contrôles vs asthmatiques) sur les abondances relatives. Dans ce modèle, l'individu imbriqué dans le statut de santé correspondait à l'effet aléatoire et le statut de santé, l'environnement et l'interaction entre ces deux derniers facteurs correspondaient aux effets fixes. Les contrastes étaient évalués pour les effets fixes montrant une différence significative dans le modèle linéaire mixte. Puisqu'aucun effet du statut de santé n'était noté, les contrastes ont été réalisés sur tous les chevaux indépendamment de leur statut de santé.

Pour les données qui n'étaient pas normalement distribuées (abondances relatives pulmonaires au taxon famille), un modèle de régression logistique mixte était réalisé. Un premier modèle de régression logistique mixte classait les valeurs de manière dichotomique, soit une RA nulle ($= 0\%$) ou une RA non nulle ($> 0\%$). Un deuxième modèle de régression logistique multinomial mixte classait les valeurs de RA selon trois niveaux, soit nulles ($RA = 0\%$), intermédiaires ($0\% < RA \leq 10\%$) ou élevées ($RA > 10\%$). L'effet aléatoire correspondait à l'individu imbriqué dans le statut de santé et les effets fixes étaient le statut de

santé et l'environnement, l'interaction n'ayant pas été évaluée étant donné le grand nombre de valeurs nulles.

Les relations (corrélations) entre les abondances relatives orales/nasales et pulmonaires pour les taxa phylum et classe étaient évaluées dans chaque environnement à l'aide d'un modèle de covariance. Les valeurs orales ou nasales étaient placées comme cofacteur et le statut de santé, comme effet fixe. Pour le taxon famille, une corrélation non paramétrique de Spearman entre les RA orales/nasales et pulmonaires a été réalisée pour chaque environnement étant donné le grand nombre de valeurs de RA nulles. Les chevaux ont été regroupés puisqu'aucun effet du statut de santé n'a été noté aux taxa précédents.

Deux échantillons de LBA de chevaux sains dans l'environnement beau foin ainsi que deux échantillons de LBA de chevaux atteints d'asthme dans l'environnement mauvais foin ont été retirés des analyses étant donné leur faible nombre de séquences. Ces données étaient considérées comme manquantes et non comme nulles.

Résultats – Abondances relatives nasales

Comme représenté dans le graphique d'abondance relative (RA) des *Pasteurellaceae* au niveau de la cavité nasale ci-dessous (Figure 24A), la majorité des chevaux présentaient une forte abondance relative de cette famille, représentée par une seule *operational taxonomic unit* (OTU), l'OTU0001, autant chez les chevaux sains que chez ceux atteints d'asthme. L'analyse BLAST de l'OTU0001 avait initialement montré que cette OTU correspondait à *Pasteurella multocida* (11), mais une analyse plus récente, combinée aux résultats de qPCR pour *P. multocida*, suggère qu'il pourrait en fait s'agir de plusieurs *Pasteurellaceae* différents (voir sections [8.3](#) et [8.5](#)). Un seul cheval appartenant au groupe sain (identifié 4_NW_Healthy) avait une abondance relative nulle dans les trois environnements, alors que dans le groupe asthme, tous les chevaux étaient positifs à au moins deux temps. Seule une autre OTU (OTU0002), correspondant à *Actinobacillus* spp., a été exprimée chez un cheval atteint d'asthme dans l'environnement beau foin.

Aucun effet du statut de santé ni de l'environnement n'a été noté pour les abondances relatives des taxa phylum (Protéobactéries) et classe (Gammaprotéobactéries) au niveau nasal ($p \geq ,12$) (Figure 24 B et C). Toutefois, un effet de l'environnement significatif ($p = ,028$) était observé pour le taxon famille, toujours sans effet du statut de santé ($p = ,31$). L'analyse des contrastes montrait une abondance relative de *Pasteurellaceae* sur foin de pauvre qualité (exposition antigénique élevée, HDST dans le graphique) significativement plus élevée qu'au pâturage (exposition antigénique faible, PAST) ($p = ,009$) (Figure 24D).

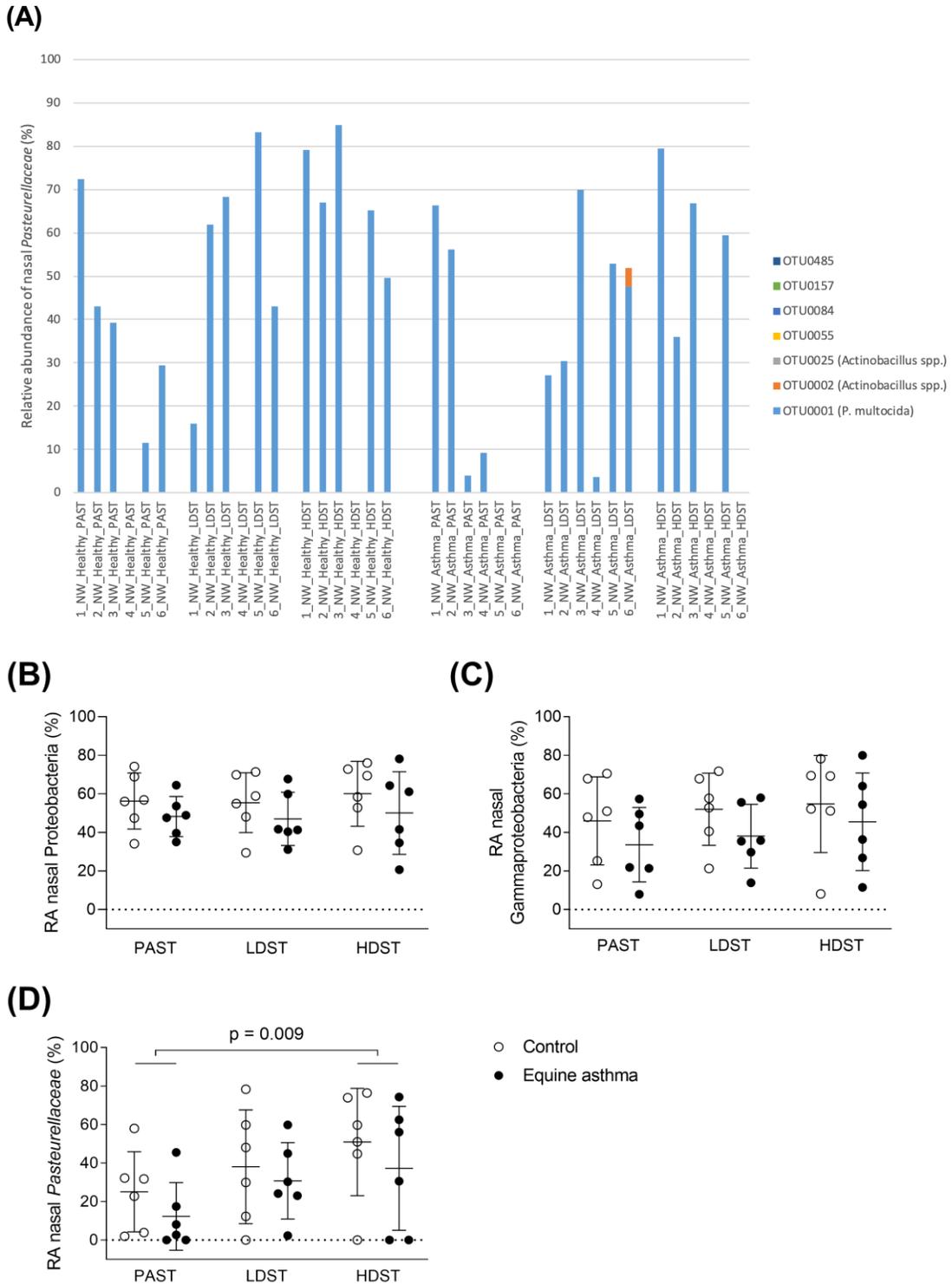


Figure 24. Abondance relative des *Pasteurellaceae* et taxa reliés au niveau nasal.

Abondance relative en pourcentage des différents *Pasteurellaceae* (A) et des taxa Protéobactéries (B), Gammaprotéobactéries (C) et *Pasteurellaceae* (D) au niveau nasal chez des chevaux sains

(Healthy ou Control, points ouverts, $n = 6$) et atteints d'asthme sévère (Equine asthma, points fermés, $n = 6$) gardés au pâturage (PAST, faible niveau d'exposition antigénique), à l'écurie avec du foin de qualité (LDST, niveau intermédiaire d'exposition antigénique) et à l'écurie avec du foin de pauvre qualité (HDST, haute exposition antigénique). Il y a significativement plus de *Pasteurellaceae* dans le nez de chevaux à l'intérieur avec foin de pauvre qualité par rapport au pâturage, indépendamment du statut de santé (modèle linéaire mixte, $p = ,009$) (D). NW = lavage nasal, OTU = operational taxonomic unit, RA = abondance relative. Chaque OTU représente une espèce différente de *Pasteurellaceae*. Les barres représentent la moyenne \pm l'écart type. Les données d'abondances relatives de Fillion et al. (11) ont été ré-analysées pour ce projet.

Résultats – Abondances relatives orales

Comme représenté dans le graphique d'abondance relative des *Pasteurellaceae* dans la cavité orale, tous les chevaux présentaient différentes bactéries de cette famille en quantité modérée à importante, et ce, dans les différents environnements (Figure 25A). L'OTU principalement représentée correspondait à un *Actinobacillus* spp. (OTU0002). L'OTU0001 était aussi retrouvée chez la majorité des chevaux. Les OTU0025 (*Actinobacillus* spp.) et OTU0084 étaient présentes chez quelques chevaux alors que les OTU0055 et OTU0157 n'ont été retrouvées qu'une seule fois chacune. La majorité des chevaux présentaient entre deux et quatre OTUs différentes, faisant de la cavité orale la région la plus riche et diverse en *Pasteurellaceae* en comparaison aux deux autres régions anatomiques à l'étude.

Un important effet environnemental a été observé pour les abondances relatives des taxa phylum et classe dans la cavité orale ($p = ,0002$ et $p = ,013$, respectivement). L'analyse des contrastes montrait une plus forte abondance relative de Protéobactéries (phylum) chez les chevaux au pâturage (PAST) que chez les chevaux sur foin, peu importe la qualité du foin (LDST et HDST, $p \leq ,0005$) (Figure 25B). Cet effet perdurait en partie au taxon classe, où les Gammaprotéobactéries montraient une abondance relative plus élevée au pâturage en comparaison au mauvais foin (HDST, $p = ,004$) (Figure 25C). Aucun effet du statut de santé n'était noté ($p \geq ,46$). Pour les *Pasteurellaceae*, aucun effet du statut de santé ni de l'environnement n'était observé ($p \geq ,21$) (Figure 25D). On peut donc en tirer que les différences significatives observées dans les abondances relatives affectant les taxa précédant le taxon famille ne sont pas influencées par un changement dans l'abondance relative des *Pasteurellaceae*.

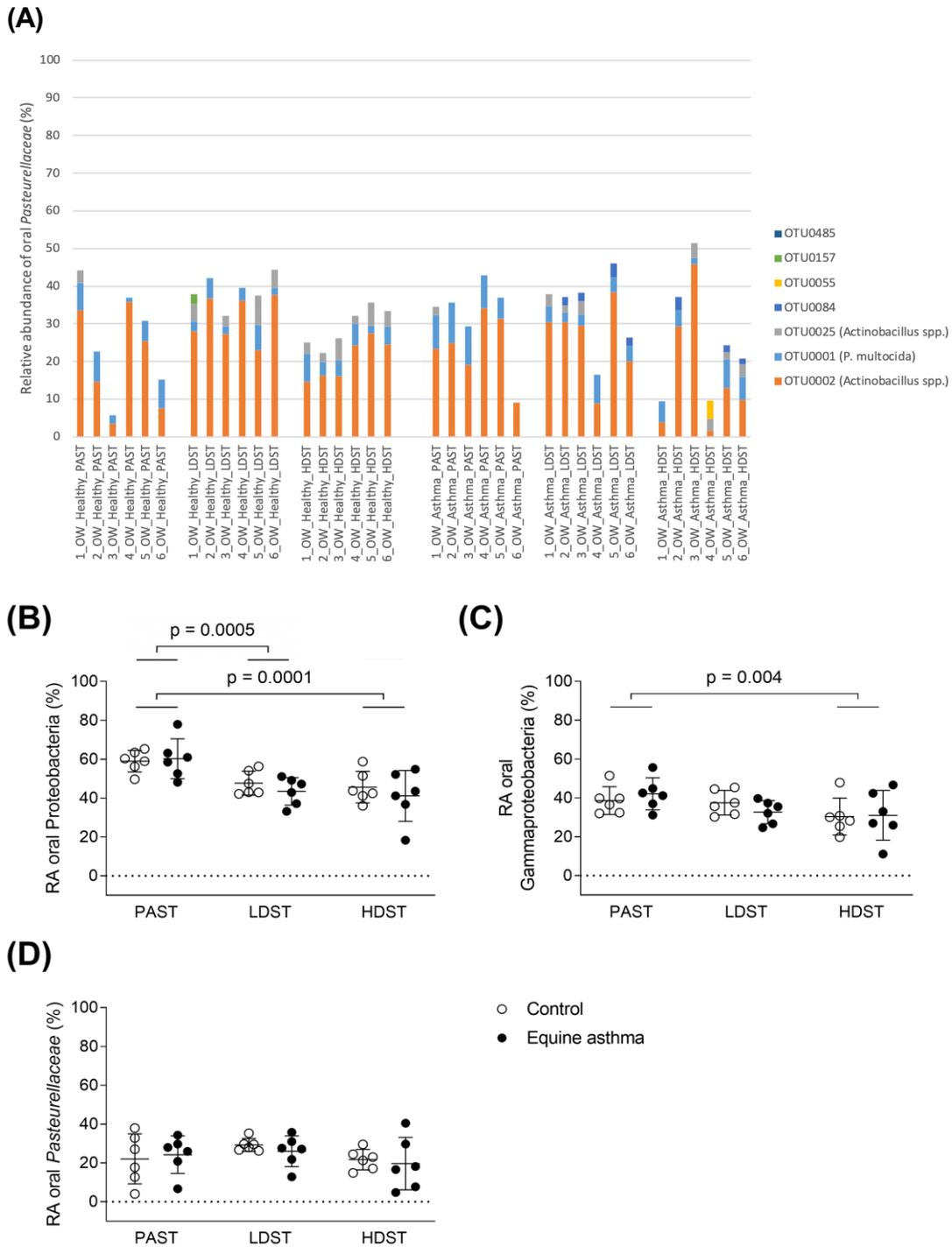


Figure 25. Abondance relative des *Pasteurellaceae* et taxa reliés au niveau oral.

Abondance relative en pourcentage des différents *Pasteurellaceae* (A) et des taxa Protéobactéries (B), Gammaprotéobactéries (C) et *Pasteurellaceae* (D) au niveau oral chez des chevaux sains

(Healthy ou Control, points ouverts, $n = 6$) et atteints d'asthme sévère (Equine asthma, points fermés, $n = 6$) gardés au pâturage (PAST, faible niveau d'exposition antigénique), à l'écurie avec du foin de qualité (LDST, niveau intermédiaire d'exposition antigénique) et à l'écurie avec du foin de pauvre qualité (HDST, haute exposition antigénique). Il y a significativement plus de Protéobactéries dans la cavité orale de chevaux au pâturage par rapport aux environnements intérieurs (B), et significativement plus de Gammaprotéobactéries au pâturage par rapport à l'écurie avec du foin de mauvaise qualité (C), indépendamment du statut de santé des chevaux (modèle linéaire mixte, $p \leq ,004$). OTU = operational taxonomic unit, OW = lavage oral, RA = abondance relative. Chaque OTU représente une espèce différente de Pasteurellaceae. Les barres représentent la moyenne \pm l'écart type. Les données d'abondances relatives de Fillion et al. (11) ont été ré-analysées pour ce projet.

Résultats – Abondances relatives pulmonaires

Un nombre similaire de chevaux entre les groupes contrôle et asthme présentaient des *Pasteurellaceae* (Figure 26A), mais les chevaux positifs dans le groupe asthme avaient une abondance relative entre 14 et 74 % environ, et les chevaux sains, entre 2 et 9%. Un seul cheval était positif dans les trois environnements (identifié 1_BAL_Asthma), mais ne présentait pas les mêmes OTUs à tous les temps. Aucune OTU des *Pasteurellaceae* n'apparaissait prédominante dans les poumons.

Aucun effet du statut de santé ni de l'environnement n'a été noté pour les abondances relatives des taxa Protéobactérie et Gammaprotéobactérie au niveau pulmonaire ($p \geq ,084$) (Figure 26 B et C). Pour le taxon des *Pasteurellaceae*, la dichotomisation des valeurs ($RA = 0 \%$ ou $RA > 0 \%$) et leur classement dans trois groupes ($RA = 0 \%$, $0 \% < RA < 10 \%$ et $RA \geq 10 \%$) montraient que le risque d'avoir des valeurs supérieures à zéro ne variait pas selon le statut de santé ($p \geq ,38$) ni selon l'environnement ($p \geq ,46$) (Figure 26D). Il n'y avait pas de grande différence entre les approches avec 2 ou 3 classes de valeurs pour les abondances relatives pulmonaires.

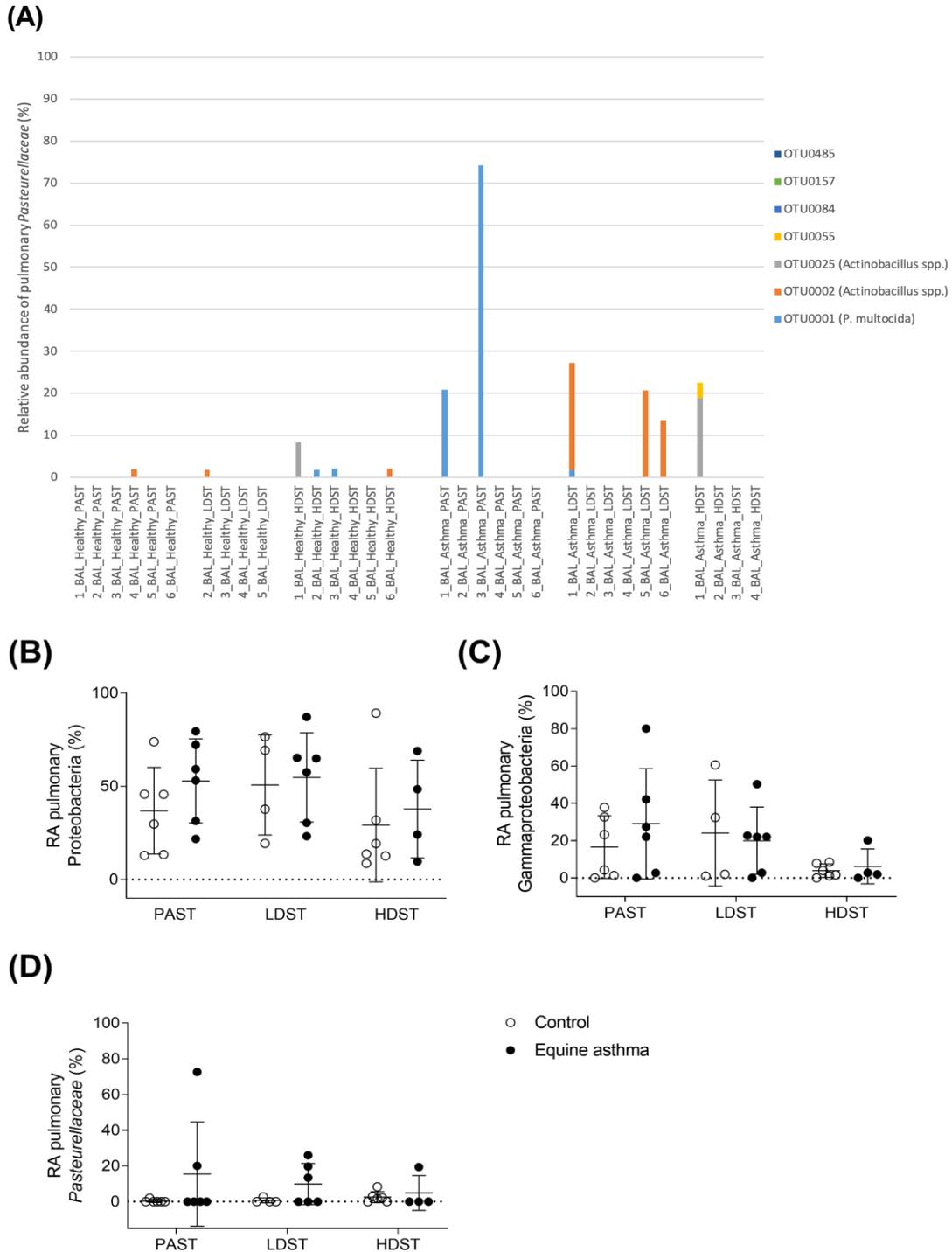


Figure 26. Abondance relative des *Pasteurellaceae* et taxa reliés au niveau pulmonaire.

Abondance relative en pourcentage des différents *Pasteurellaceae* (A) et des taxa Protéobactéries (B), Gammaprotéobactéries (C) et *Pasteurellaceae* (D) au niveau pulmonaire chez des chevaux sains (Healthy ou Control, points ouverts, $n = 6$) et atteints d'asthme sévère (Equine asthma, points

fermés, n = 6) gardés au pâturage (PAST, faible niveau d'exposition antigénique), à l'écurie avec du foin de qualité (LDST, niveau intermédiaire d'exposition antigénique) et à l'écurie avec du foin de pauvre qualité (HDST, haute exposition antigénique. Aucune différence significative. BAL = lavage bronchoalvéolaire, OTU = operational taxonomic unit, RA = abondance relative. Chaque OTU représente une espèce différente de Pasteurellaceae. Les barres représentent la moyenne \pm l'écart type. Les données d'abondances relatives de Fillion et al. (11) ont été ré-analysées pour ce projet.

Résultats - Corrélations

L'analyse de la relation entre les abondances relatives nasales et pulmonaires des *Pasteurellaceae* de chevaux gardés à l'intérieur et exposés au mauvais foin (environnement fortement antigénique) montrait une corrélation significative (corrélation de Spearman; $r = ,75$, $p < ,02$) (Figure 27A). Ceci suggère que l'augmentation de l'abondance relative en *Pasteurellaceae* au niveau nasal occasionne aussi une augmentation de l'abondance relative des *Pasteurellaceae* dans les voies respiratoires inférieures, ou *vice versa*. La relation était toutefois fortement influencée par une valeur d'abondance relative élevée dans les poumons (environ 20 %). Aussi, les OTUs exprimées au niveau pulmonaire (OUT0001, OTU0002, OTU0025, OTU0055) étaient plus diverses que celles retrouvées au niveau nasal (OTU0001 majoritairement), suggérant que cette corrélation pourrait plutôt être accidentelle. Le graphique illustrant la corrélation entre les abondances relatives de *Pasteurellaceae* orales et pulmonaires pour ce même environnement est fourni pour comparaison (Figure 27B), mais la corrélation observée n'était pas significative ($r = - ,58$, $,05 < p < ,1$). Aucune corrélation significative n'était notée entre les abondances relatives des *Pasteurellaceae* orales/nasales et pulmonaires pour le pâturage et le beau foin (environnements faiblement et modérément antigéniques, respectivement, $p > ,5$). Pour les taxa Protéobactérie et Gammaprotéobactérie, aucune relation linéaire entre les abondances relatives orales/nasales et pulmonaires n'était observée, et ce, dans les trois environnements (modèle de covariance; $p \geq ,10$). Il n'y avait aucune interaction entre les valeurs orales/nasales et pulmonaires ($p \geq ,12$).

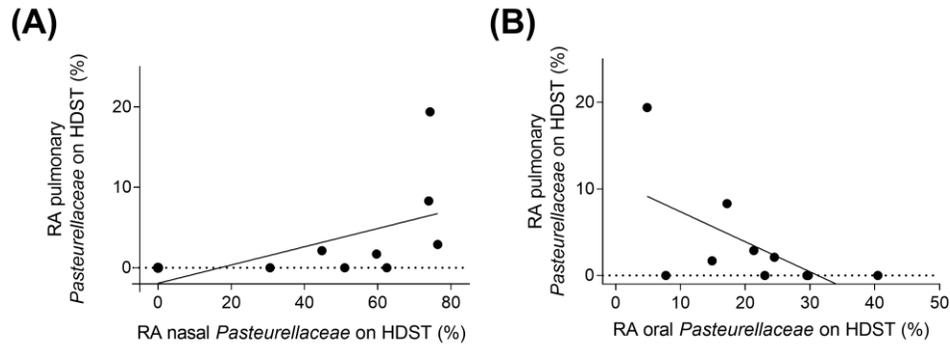


Figure 27. Corrélations entre les abondances relatives nasales/orales et pulmonaires des *Pasteurellaceae* dans l'environnement mauvais foin.

Corrélation entre les abondances relatives nasales et pulmonaires (A), et orales et pulmonaires (B) de chevaux ($n = 10$, indépendamment du statut de santé) gardés à l'écurie avec du foin de pauvre qualité (HDST, haute exposition antigénique). Corrélation significative avec les abondances relatives nasales (corrélation Spearman, $r = ,75$; $p < ,02$). Aucune corrélation avec les abondances relatives orales ($r = -,58$; $,1 > p > ,05$). RA = abondance relative.