

Université de Montréal

Effets des corticostéroïdes et des bronchodilatateurs sur le microbiome, la
fonction et l'inflammation pulmonaires dans l'asthme équin

Par

Estelle Manguin

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

Avril 2022

© Estelle Manguin, 2022

Université de Montréal
Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

Effets des corticostéroïdes et des bronchodilatateurs sur le microbiome, la fonction et l'inflammation pulmonaires dans l'asthme équin

Présenté par

Estelle Manguin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Marcio Costa

Président-rapporteur

Mathilde Leclère

Directrice de recherche

Jean-Pierre Lavoie

Codirecteur de recherche

Marie-Lou Gauthier

Membre du jury

Résumé

Les corticostéroïdes inhalés (ICs) utilisés dans le traitement de l'asthme ont un effet sur le microbiome pulmonaire. Il est toutefois difficile de séparer leurs effets sur les communautés bactériennes via leur rôle immunomodulateur, de leurs effets indirects via l'amélioration de la ventilation. Notre objectif est de déterminer si les ICs altèrent le microbiote pulmonaire indépendamment de leurs effets sur la fonction pulmonaire.

Douze chevaux atteints d'asthme en exacerbation ont reçu des bronchodilatateurs à longue durée d'action (LABA, salmétérol) ou une combinaison ICs/LABA (fluticasone/salmétérol) pendant deux semaines. Des tests de fonction pulmonaire et des lavages broncho-alvéolaires (LBA) ont été effectués avant et après traitement. La quantification par PCR et le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S via une plateforme MiSeq-Illumina ont été réalisés sur les LBA. Les données ont été analysées avec mothur.

La fonction pulmonaire s'est améliorée dans les deux groupes. Les abondances relatives de familles et genres appartenant au phylum Bacteroidetes ont augmenté suite au traitement ICs/LABA, tandis que les phyla Verrucomicrobia et Actinobacteria se sont appauvris avec les LABA. Une modification de la β -diversité et une diminution de la charge bactérienne ont été observées seulement après le traitement LABA. L' α -diversité n'a en revanche pas varié dans les deux groupes.

Les différences observées entre les groupes ICs/LABA et LABA suggèrent que les changements au sein des communautés bactériennes ne sont pas seulement dus à l'amélioration de la ventilation. Il reste toutefois difficile de trancher quant à un effet positif ou bien néfaste des ICs sur le microbiote pulmonaire.

Mots-clés : asthme équin, bactéries, bronchodilatateurs, corticostéroïdes, microbiote pulmonaire, séquençage de nouvelle génération

Abstract

Inhaled corticosteroids (ICs) affect the respiratory microbiome in asthma. It remains difficult to separate the immunomodulatory effects of ICs on bacterial communities from their indirect effects via improvement of ventilation. Our objective was to determine if ICs alter the lung microbiota independently from their effects on lung function.

Twelve horses with equine asthma in exacerbation were assigned to receive a long-acting bronchodilator (LABA, salmeterol) or the combination ICs/LABA (fluticasone/salmeterol) for 2 weeks. Lung function and bronchoalveolar lavages (BAL) were performed before and after treatment. 16S rRNA gene quantification and sequencing were performed on BAL fluid, using PCR and the Illumina MiSeq platform. Data were processed using the software package mothur.

Lung function improved with both treatments. The relative abundances of families and genera belonging to the Bacteroidetes phylum increased with ICs/LABA, while the Verrucomicrobia and the Actinobacteria phyla decreased with LABA. Furthermore, β -diversity differed from baseline and the bacterial load decreased after LABA only. On the contrary, α -diversity indices did not vary in both groups.

The differences observed between the ICs/LABA and LABA groups suggest that the changes in bacterial communities are not only due to improved ventilation. However, it remains difficult to clarify if the effects of ICs are positive or detrimental to the lung environment.

Key words: bacteria, bronchodilators, corticosteroids, equine asthma, pulmonary microbiota, new-generation sequencing

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract	4
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures.....	9
Liste des sigles et abréviations.....	11
Remerciements	12
INTRODUCTION	13
1ERE PARTIE : REVUE DE LITTERATURE.....	14
I. ASTHME EQUIN	14
1. Définition	14
2. Étiologie et pathophysiologie	14
a. Réaction exagérée du système immunitaire	15
b. Rôle des bactéries dans l'asthme	15
c. Rôle des virus dans l'asthme	16
3. Diagnostic	16
a. Examen physique	16
b. Fonction pulmonaire	18
i. Tests de fonction pulmonaire : mécanique pulmonaire standard	18
ii. Gaz sanguins artériels	19
c. Inflammation pulmonaire	20
i. Cytologie du lavage broncho-alvéolaire	20
ii. Score de mucus trachéal	23
iii. Cytologie et bactériologie du lavage trachéal	24
4. Traitements standards	24
a. Mesures environnementales	25
b. Médication	26
II. MICROBIOTE BACTERIEN PULMONAIRE	29
2. Notions générales sur le microbiome	29
a. Terminologie et concepts de base	29
b. Interrelations hôte-microorganisme	33
c. Notions générales sur le microbiote bactérien respiratoire	35

3.	Méthodes d'analyse du microbiome bactérien	37
a.	Différentes techniques d'analyse du microbiome bactérien	37
b.	Séquençage de nouvelle génération avec la technique Illumina	41
c.	Analyses bio-informatiques des données de séquençage du gène de l'ARNr 16S	44
d.	Biais de techniques et d'analyses	45
4.	Microbiote bactérien pulmonaire dans l'asthme	46
a.	Effets de la maladie sur le microbiote pulmonaire	46
b.	Effets des traitements antibiotiques sur la maladie et le microbiote pulmonaire	49
c.	Effets du microbiote sur la réponse aux traitements	51
III.	EFFETS DES CORTICOSTEROÏDES DANS LE TRAITEMENT DE L'ASTHME	51
1.	Effets des corticostéroïdes sur le microbiote pulmonaire	52
2.	Effets des corticostéroïdes sur la fonction pulmonaire chez le cheval	55
3.	Effets des corticostéroïdes sur l'inflammation pulmonaire chez le cheval	56
4.	Effets secondaires des corticostéroïdes chez le cheval	57
IV.	EFFETS DES BRONCHODILATEURS DANS LE TRAITEMENT DE L'ASTHME	59
1.	Effets des bronchodilatateurs sur le microbiote pulmonaire	59
2.	Effets des bronchodilatateurs sur la fonction pulmonaire chez le cheval	60
3.	Effets des bronchodilatateurs sur l'inflammation pulmonaire chez le cheval	60
4.	Effets secondaires des bronchodilatateurs chez le cheval	61
	2EME PARTIE : ARTICLE	62
I.	ABSTRACT	64
II.	INTRODUCTION	65
III.	METHODS	66
1.	Horses	66
2.	Experimental design	66
3.	Clinical score, tracheal score, and lung function	67
4.	Sample collection	67
5.	Sample processing	67
6.	Data analysis	67
IV.	RESULTS	68
1.	Horses	68
2.	Lung function	68
3.	Lung inflammation	68

4. Bacterial DNA load	68
5. Sequencing results	69
V. DISCUSSION.....	71
VI. CONCLUSION.....	74
VII. FIGURES	74
VIII. ONLINE DATA SUPPLEMENT	80
IX. REFERENCES.....	87
3EME PARTIE : DISCUSSION GENERALE	90
I. SYNTHÈSE DES RESULTATS	90
1. Effets des corticostéroïdes et des bronchodilatateurs sur le microbiote pulmonaire	91
2. Effets de la combinaison fluticasone/salmétérol sur la fonction et l'inflammation pulmonaires	93
3. Effet du statut de la maladie sur le microbiote pulmonaire	93
II. LIMITES DE L'ÉTUDE	95
1. Possibles biais du modèle expérimental	95
2. Possibles biais de méthodologie	96
3. Problématique des contaminants	97
III. PERSPECTIVES	100
1. Persistence des effets des corticostéroïdes sur le microbiote pulmonaire	100
2. Effets des corticostéroïdes sur le mycobiotte et les interrelations bactéries-fungi	101
3. Effets des corticostéroïdes sur l'axe intestins-poumons	102
CONCLUSION	104
Références bibliographiques	105

Liste des tableaux

Tableau 1 - Score de mucus trachéal chez le cheval ⁴⁸	23
Tableau 2 - Principaux corticostéroïdes utilisés dans le traitement de l'asthme équin	27
Tableau 3 - Principaux bronchodilatateurs utilisés dans le traitement de l'asthme équin	28
Tableau 4 - (Supp Table E1) : Age (years), sex, breed, and weight (kg) of horses including in the study ...	85
Tableau 5 - Synthèse des résultats de l'étude.....	91

Liste des figures

Figure 1 - Tirage nasal (à gauche) et contraction abdominale (à droite) lors d'efforts respiratoires	17
Figure 2 - Cathéter à ballonnet (à gauche) et masque facial connecté à un pneumotachographe (à droite) lors de mécaniques pulmonaires standards.....	18
Figure 3 - Prise de sang artériel à l'artère faciale droite	20
Figure 4 - LBA effectué par endoscopie (à gauche) et gaine protectrice utilisée pour l'étude (à droite)...	21
Figure 5 - Cytologie de LBA contenant de nombreux neutrophiles (flèches noires)	22
Figure 6 - Score de mucus trachéal de grade 4/5.....	23
Figure 7 - Haygain® (à gauche) et Nutrifoin® (à droite)	25
Figure 8 - Exemple de système de délivrance d'inhalation chez le cheval (masque Top Spacer®)	26
Figure 9 - Classification taxonomique	29
Figure 10 - Concepts de base de l' α -et β -diversité (AMOVA : analysis of molecular variance ; PCoA : principal coordinate analysis).....	30
Figure 11 - Exemple de diagramme en bâton d'abondances relatives des phyla majoritaires au sein de deux groupes (groupe rémission : n = 12 ; groupe exacerbation : n = 12)	31
Figure 12 - Exemple de PCoA de la structure représentant deux groupes	33
Figure 13 - Exemple de diagramme provenant de l'analyse LEfSe au niveau du genre entre deux groupes (rémission/exacerbation)	33
Figure 14 - Gène de l'ARNr 16S (d'après : https://doi.org/10.7888/juoeh.38.223)	39
Figure 15 - Principales étapes du séquençage bactérien	40
Figure 16 - Figure 16 : Principe de la technologie Illumina (d'après : https://planet-vie.ens.fr). A : Étapes de l'amplification avec la technique Illumina ; B : Multiples amplifications en parallèle sur la cellule de flux ; C : Formation du brin complémentaire par incorporation de nucléotides fluorescents.	43
Figure 17 - Dysbiose dans l'asthme équin	47
Figure 18 - Potentiels mécanismes d'action des corticostéroïdes sur le microbiote pulmonaire	53
Figure 19 - (figure 1 article) : Asthma score (A) and standard lung mechanics (DeltaPL: difference in pleural pressure, RL: lung resistance, EL: lung elastance) (B) in horses with severe asthma before and after treatments. Open circles: horses treated with LABA. Solid circles: horses treated with ICs/LABA. Black lines represent the mean and SD. Grey area represents normal values in healthy horses.	74
Figure 20 - (figure 2 article) : Arterial blood gas analyzes (PaO ₂ : arterial partial pressure of oxygen, PaCO ₂ : arterial partial pressure of carbon dioxide) in horses with severe asthma before and after treatments. Open circles: horses treated with LABA. Solid circles: horses treated with ICs/LABA. Black lines represent the mean and SD. Grey area represents normal values in healthy horses.	75

Figure 21 - (figure 3 article) : Relative abundance of predominant bacteria at the phylum (A), family (B), and genus (C) levels. Only the 10 most common phyla, the 19 most common families, and the 21 most common genera are represented 76

Figure 22 - (figure 4 article) : Relative abundance of predominant bacteria at the phylum (A), family (B), and genus (C) levels. Open circles: horses treated with LABA. Solid circles: horses treated with ICs/LABA. Black lines represent the mean and SD. *: significant difference within group..... 77

Figure 23 - (figure 5 article) : Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis showing genera that were significantly differentially abundant before (in red) and after (in green) treatments..... 77

Figure 24 - (figure 6 article) : Indices of alpha diversity at the genus level of taxonomy. Open circles: horses treated with LABA. Solid circles: horses treated with ICs/LABA. Black lines represent the mean and SD 78

Figure 25 - (figure 7 article) : Principal coordinate analysis (PCoA) of bacterial communities at the genus level by horses. Bidimensional representation of the principal coordinate analysis of bacterial communities' membership using the Classic Jaccard index (A) and structure using the Yue and Clayton index (B). 79

Figure 26 - (Supp Figure E1 article) : Bronchoalveolar lavage cells (A) and mucus score (B) in horses with severe asthma before and after treatments. Black lines represent the mean and SD. Grey area represents normal values in healthy horses 86

Figure 27 - (Supp Figure E2 article) : Bacterial 16S rRNA gene quantification by digital droplet PCR in horses with severe asthma before and after treatments. Open circles: horses treated with LABA. Solid circles: horses treated with ICs/LABA. Black lines represent the mean and SD..... 87

Figure 28 - Design expérimental complet 90

Figure 29 - Abondance relative de genres appartenant à la famille Pasteurellaceae entre les phases de rémission et d'exacerbation (n = 12)..... 94

Figure 30 - Distribution des OTUs majoritaires au sein des contrôles 99

Figure 31 - Distribution des OTUs majoritaires au sein des LBA 99

Figure 32 - Evolution de DeltaPL sur toute la période l'étude entre les groupes ICs/LABA et LABA 100

Liste des sigles et abréviations

ACVIM : American College of Veterinary Internal Medicine

ADN : acide désoxyribonucléique

AMOVA : analysis of molecular variance

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNr : acide ribonucléique ribosomal

Axe HPA : axe hypothalamo-pituitaire-adrénalien

ddPCR : digital droplet polymerase chain reaction

DeltaP_L : variation de la pression transpulmonaire

IAD : inflammatory airway disease

ICs : inhaled corticosteroids

LABA : long-acting β 2-agonist

LBA : lavage broncho-alvéolaire

LDA : linear discriminant analysis

LEfSe : linear discriminant analysis effective size

LT : lavage tracheal

MPOC : maladie pulmonaire obstructive chronique

NGS : next-generation sequencing

OUT : operational taxonomic units

P_aO₂ : arterial partial pressure of oxygen

P_aCO₂ : arterial partial pressure of carbon dioxide

PCoA : principal coordinate analysis

RAO : recurrent airway obstruction

RDP : Ribosomal Database Project

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier chaleureusement ma directrice de recherche, Dre Mathilde Leclère, pour l'excellence de son enseignement, ses précieux conseils et son soutien sans faille (même lors de mes soumissions à la dernière minute...). Mentor depuis l'internat, j'espère que tu le resteras longtemps !

Merci à Dr Jean-Pierre Lavoie, mon co-directeur, pour sa gentillesse, sa bienveillance et ses remarques toujours pertinentes ! J'ai beaucoup appris à vos côtés, toujours avec la bonne humeur et le sourire.

Merci à Dr Robert Dickson, notre collaborateur, d'avoir permis que ce beau projet porte ses fruits et pour m'avoir initiée au labmeeting de médecine humaine.

Merci à mes amies et collègues de laboratoire, Roxane Westerfeld et Flavie Payette pour leur formidable soutien et joie de vivre. Un grand merci également à mes amis chers du Québec, Séléna, Gwladys, Marine, Eloi, Yves, Laure, Morgane (et beaucoup d'autres). Que dire ... vous me manquez tout simplement.

Merci à Valérie Dubuc, Khristine Picotte et Juliette Jamon pour leur aide inestimable dans ce projet !! Merci aussi à toutes les nombreuses personnes qui ont contribué au projet, de proche comme de loin.

Merci à Guy Beauchamp, Tristan Juette et Dr Marcio Costa pour leur précieuse aide dans la réalisation des analyses statistiques.

A ma famille et Ludovic, mes soutiens infailibles. Merci pour votre patience quand je rabâche souvent que je ne serai jamais dans les temps. A Toty et Moodi, mes amours à poils longs.

Merci à Christine Blondin pour son support et sa disponibilité à répondre à toutes mes questions.

Finalement, merci au jury d'évaluation, Dr Marcio Costa et Dre Marie-Lou Gauthier, d'avoir pris le temps d'évaluer ce travail.

INTRODUCTION

L'asthme équin est une condition fréquente partageant plusieurs similitudes avec l'asthme humain¹. Cette affection se caractérise entre autres par une inflammation pulmonaire ainsi qu'une bronchoconstriction, adressées médicalement par l'emploi de corticostéroïdes et de bronchodilatateurs et par la mise en œuvre de mesures environnementales visant à limiter l'exposition aux allergènes².

D'après les études du microbiote respiratoire menées ces dernières années chez l'humain et chez le cheval, une dysbiose pulmonaire est recensée chez les patients atteints d'asthme en comparaison d'individus sains³⁻⁵. Le rôle dans l'asthme de cette perte d'équilibre entre les communautés bactériennes pulmonaires demeure encore incertain et il s'avère difficile de contrôler strictement l'environnement et la médication reçue dans les études en médecine humaine. L'effet des traitements, plus particulièrement des corticostéroïdes⁴⁻⁹, sur le microbiote pulmonaire reste aussi encore peu documenté et le mécanisme par lequel ils agissent mal élucidé. En améliorant la fonction pulmonaire et la ventilation des individus malades, les corticostéroïdes pourraient modifier les conditions locales et donc entraîner secondairement une modulation des populations bactériennes. Il n'est toutefois pas exclu que leurs propriétés anti-inflammatoires pourraient aussi influencer le microbiote respiratoire de façon plus directe.

Au travers d'une revue de littérature introduisant d'abord les caractéristiques de l'asthme équin et de sa prise en charge, le microbiote pulmonaire et le lien avec l'asthme seront développés en second temps. L'objectif principal de ce mémoire, visant à rapporter les effets des corticostéroïdes et des bronchodilatateurs sur le microbiote, la fonction et l'inflammation pulmonaires dans l'asthme équin, sera détaillé dans les deux dernières portions de la revue de littérature.

Notre projet de recherche, orienté sur l'analyse du microbiote respiratoire chez le cheval, a pour but d'identifier si les corticostéroïdes inhalés influent sur le microbiote pulmonaire de chevaux atteints d'asthme sévère. L'étude vise ainsi à comparer le microbiote pulmonaire de chevaux atteints d'asthme sévère traités avec un bronchodilatateur seulement ou bien combiné avec un corticostéroïde, de manière à mieux isoler les potentiels effets immunomodulateurs des corticostéroïdes. Ces résultats sont présentés dans l'article joint à ce mémoire.

Finalement, une discussion reprenant les principaux résultats et limites de l'étude et ouvrant sur de potentielles perspectives clôt ce manuscrit.

1ERE PARTIE : REVUE DE LITTERATURE

I. ASTHME EQUIN

1. Définition

L'asthme équin est une maladie inflammatoire pulmonaire chronique affectant les chevaux adultes. Cette condition est caractérisée par des signes cliniques respiratoires (toux, excès de mucus, intolérance), de l'inflammation pulmonaire et de l'obstruction des voies respiratoires lors d'exposition à des allergènes environnementaux. Chez le cheval, ce syndrome regroupe trois principaux phénotypes se distinguant cliniquement : l'asthme léger, modéré et sévère^{1,2}. L'asthme léger et modéré était englobé sous le terme Inflammatory Airway Disease (IAD), l'asthme sévère répondait aux noms de souffle (heaves), Recurrent Airway Obstruction (RAO), Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), ou plus anciennement encore à l'emphysème pulmonaire. Une forme plus rare d'asthme sévère au pâturage est aussi recensée (Summer Pasture Recurrent Airway Obstruction). Bien qu'employant désormais la même appellation, l'étiologie et la pathophysiologie de l'asthme équin se distinguent en partie de celles de l'asthme humain.

L'asthme sévère est présent chez environ 15 % des chevaux adultes (souvent plus de 7 ans) dans les régions tempérées¹⁰. La prévalence de l'asthme léger à modéré est moins bien connue, mais près de 70 % des chevaux de loisir auraient de l'inflammation trachéale¹¹. A l'origine de contre-performance, cette maladie devient, en plus du contexte médical, un enjeu économique dans la filière équine sportive, renforçant ainsi le besoin de mieux élucider la pathophysiologie sous-jacente, d'avoir recours à des outils diagnostiques sensibles et de mettre en œuvre des thérapies efficaces avec peu d'effets secondaires.

2. Étiologie et pathophysiologie

L'étiologie de l'asthme équin est multifactorielle et comprend des composantes environnementales et génétiques². La poussière inorganique et organique inhalée (riche en fungi, acariens, et actinomycètes notamment) initie et exacerbe les signes cliniques chez les animaux prédisposés. De nombreuses endotoxines bactériennes sont également retrouvées dans l'habitat du cheval et ont la capacité de potentialiser l'inflammation pulmonaire induite par les moisissures¹². Les conditions d'habitat (intérieur/extérieur, type et qualité de l'alimentation et de la litière, qualité de la ventilation, fréquence de nettoyage) sont ainsi susceptibles de déclencher ou d'entretenir une inflammation respiratoire. Les

chevaux vivant principalement en écurie et recevant une alimentation à base de foin, deux conditions réputées plus poussiéreuses que le pâturage, sont en effet plus à risque de développer des symptômes liés à l'asthme équin¹³. Une forme plus rare d'asthme se développant au pâturage lors d'exposition aux pollens en saison estivale est également rapportée¹⁴. Une prédisposition génétique a aussi été démontrée dans certaines familles de chevaux, comme chez des Warmbloods¹⁵.

a. Réaction exagérée du système immunitaire

L'inflammation pulmonaire (neutrophilique lors d'asthme sévère ; neutrophilique, mastocytaire et/ou éosinophilique lors d'asthme léger à modéré) survient suite à une réaction non adaptée du système immunitaire inné et acquis^{1,16}. L'obstruction des voies respiratoires inférieures est reliée au bronchospasme, à l'inflammation et à l'accumulation de mucus, ainsi qu'au remodelage des voies respiratoires¹⁷, via notamment une augmentation de la masse du muscle lisse péribronchique^{18,19}. L'augmentation de la résistance des voies aériennes au passage de l'air entraîne une inadéquation du rapport ventilation/perfusion à l'origine d'hypoxémie. De l'hyperréactivité bronchique, surtout objectivée chez les animaux en phase d'exacerbation de la maladie, est également rapportée lors d'exposition aux antigènes environnementaux ou à des agents irritants non-spécifiques (histamine, endotoxine).

En plus de ces facteurs bien établis (prédisposition génétique associée à des allergènes ou antigènes inhalés, réaction immunitaire exagérée à des antigènes presque ubiquitaires), d'autres favorisant le développement ou les exacerbations d'asthme sont investigués, notamment le microbiote bactérien ou viral.

b. Rôle des bactéries dans l'asthme

Le rôle bactéries (infections ou colonisations) dans le déclenchement de l'asthme reste controversé, mais pourrait constituer un facteur favorisant et perpétuant l'exacerbation des signes cliniques. Des bactéries ont en effet été isolées au niveau trachéal chez de nombreux chevaux de course atteints d'asthme léger à modéré²⁰. Dans une autre étude, une culture trachéale positive est recensée chez la plupart des chevaux atteints d'inflammation des voies respiratoires inférieures²¹. La composante bactérienne n'est toutefois pas toujours retrouvée, puisque plusieurs études ne montrent qu'une croissance bactérienne limitée ou nulle chez des chevaux atteints d'inflammation des voies respiratoires inférieures^{13,22}.

D'autres études chez des jeunes chevaux de course ont rapporté une association entre la charge bactérienne au niveau de la trachée et la présence de toux²² ou d'inflammation des voies

respiratoires^{20,21,23-25}. Une croissance bactérienne plus importante sur lavage broncho-alvéolaire est également observée chez les chevaux présentant une forte intolérance à l'exercice²⁶. En revanche, la charge bactérienne dans la trachée, évaluée par PCR (polymerase chain reaction) quantitative, s'avère inférieure chez des chevaux atteints d'asthme modéré par rapport à des chevaux sains dans une étude²⁷.

Streptococcus equi subsp *zooepidemicus*, les *Pasteurellacea* et *Actinobacillus* sont les bactéries les plus fréquemment isolées en culture lors d'inflammation respiratoire chez le cheval^{21,23,25,28,29}. D'autres bactéries ont également été isolées de façon variable dans différentes études chez des chevaux présentant de l'inflammation des voies respiratoires inférieures, telles que *Streptococcus pneumoniae*, des *Mycoplasma*, d'autres *Streptococcus* ainsi que *Bordetella bronchiseptica*^{22,25,29}. Bien qu'étant corrélée à une inflammation du tractus respiratoire, ces croissances bactériennes peuvent aussi correspondre à une contamination du prélèvement par les voies respiratoires supérieures ou à une colonisation trachéale transitoire.

Certaines de ces études posent toutefois un diagnostic d'asthme à partir de critères partiels, en ne tenant compte que des signes cliniques ou en se basant sur l'inflammation du lavage trachéal, alors que le diagnostic final repose a minima sur la clinique et l'inflammation pulmonaire recensée au lavage broncho-alvéolaire (LBA). De plus, la culture bactérienne n'est pas la méthode la plus sensible ni spécifique pour la caractérisation du microbiote respiratoire, d'où le recours de plus en plus fréquent à des méthodes indépendantes de la culture, telles que la PCR et le séquençage bactérien.

c. Rôle des virus dans l'asthme

Un lien de causalité clair entre l'asthme équin et plusieurs virus, comprenant les herpesvirus équins, le virus de l'influenza, les adénovirus et les rhinovirus, n'a pas été démontré^{25,30,31}. Une étude a toutefois révélé une association entre un diagnostic d'asthme léger à modéré et le portage nasal d'herpesvirus équins de type 2 détecté par PCR³².

3. Diagnostic

a. Examen physique

Les signes cliniques varient selon la sévérité de la maladie et permettent de distinguer les trois phénotypes d'asthme : léger, modéré et sévère.²

Les chevaux atteints d'asthme léger ne montrent que peu voire pas de signes cliniques, à l'exception d'une intolérance à l'exercice. L'impact sur les performances sportives dépend du niveau d'exercice et de la

sévérité de l'affection. Durant un effort intense, les échanges respiratoires représentent le facteur limitant puisque même des chevaux sains développent une hypoxémie et une hypercapnie artérielles. Un asthme, même léger, peut ainsi significativement perturber les échanges gazeux et provoquer une diminution des performances et une récupération prolongée.

L'asthme modéré se caractérise par l'émergence de signes respiratoires, tels que de la toux et du jetage nasal résultant d'une augmentation de mucus trachéal, associés ou non à de l'intolérance à l'exercice. Ces signes respiratoires peuvent survenir au repos ou durant l'exercice. Les chevaux atteints d'asthme léger à modéré ne présentent toutefois pas de détresse respiratoire au repos.

A l'opposé, l'asthme sévère se caractérise par une augmentation marquée de l'effort respiratoire se traduisant par une ouverture large des naseaux, une extension de la tête et de l'encolure, une contraction abdominale prononcée lors de l'expiration ainsi que par une phase inspiratoire profonde à l'origine d'un soulèvement important de la cage respiratoire (figure 1). Il en résulte souvent de la léthargie, une perte d'appétit et un amaigrissement. Au fil du temps, les muscles obliques externes de l'abdomen tendent à s'hypertrophier, dessinant alors une ligne de soulèvement de la cage thoracique caractéristique appelée « ligne de pousse ». Ces chevaux manifestent également le plus souvent de la toux et du jetage nasal.



Figure 1 - Tirage nasal (à gauche) et contraction abdominale (à droite) lors d'efforts respiratoires

La fréquence respiratoire est le plus souvent augmentée. L'auscultation thoracique peut révéler des bruits respiratoires augmentés ou sourds et la présence de bruits adventices (sifflements à l'inspiration, crépitements à l'expiration) sur une aire pulmonaire étendue. Toutefois, du fait de son épaisse paroi thoracique, l'auscultation pulmonaire chez le cheval reste un examen peu sensible.

b. Fonction pulmonaire

i. Tests de fonction pulmonaire : mécanique pulmonaire standard

En raison de l'obstruction des voies respiratoires inférieures, les chevaux atteints d'asthme voient leur fonction pulmonaire et leur ventilation diminuer. Les tests de mécanique pulmonaire dynamique ont l'avantage d'aider au diagnostic en reflétant le degré d'obstruction bronchique, de suivre l'évolution de la maladie et d'évaluer la réponse au traitement³³. Bien que très répandus et utilisés en médecine humaine, leur usage chez les chevaux reste le plus souvent réservé à certains centres de cas référés et aux laboratoires de recherche.

La mécanique pulmonaire standard repose sur l'emploi d'un cathéter à ballonnet positionné dans la portion thoracique de l'œsophage, caudalement au cœur afin d'estimer la pression pleurale, ainsi que sur la mise en place d'un masque facial connecté à un pneumotachographe pour évaluer le débit d'air au niveau des naseaux (figure 2)³⁴. L'œsophage, passant dans le médiastin, est en effet soumis aux mêmes changements de pression que l'espace pleural, hormis lors du passage de bolus alimentaire.

La différence de pression entre celle à la sortie des naseaux et celle au niveau de l'œsophage (DeltaP), le volume (V) et le débit d'air (Q) sont ainsi répertoriés afin d'en déduire la résistance (R) et l'élastance (E) pulmonaires selon l'équation suivante : $\Delta P = (E \times V) + (R \times Q)$.



Figure 2 - Cathéter à ballonnet (à gauche) et masque facial connecté à un pneumotachographe (à droite) lors de mécaniques pulmonaires standards

Une augmentation de la résistance pulmonaire réfère à une obstruction principalement située au niveau des voies respiratoires inférieures centrales, tandis qu'une augmentation de l'élastance pulmonaire reflète davantage d'une obstruction des petites voies périphériques. L'évaluation de la mécanique pulmonaire s'avère être plus sensible à détecter l'obstruction respiratoire chez des animaux en phase d'exacerbation de la maladie présentant des signes cliniques évidents³⁵.

Puisque le placement du cathéter œsophagien se réalise généralement à l'aveugle, et pourrait se retrouver de façon transitoire dans la trachée proximale par erreur, le risque de contamination de la trachée par les bactéries retrouvées dans les voies respiratoires supérieures est augmenté et est à considérer lors d'étude sur le microbiome pulmonaire.

D'autres tests de fonction pulmonaire dynamique sont également décrits chez le cheval, comme la pléthysmographie³⁶, les tests d'expiration forcée³⁴ ou encore l'oscillométrie³⁷. Ces tests ne seront pas détaillés dans le présent mémoire.

ii. Gaz sanguins artériels

L'analyse des gaz sanguins artériels complète l'évaluation de la fonction pulmonaire en apportant des informations quant à l'efficacité des échanges gazeux pulmonaires. Cette technique a l'avantage d'être rapide, simple et peu onéreuse. En revanche, elle ne permet pas de statuer sur la localisation exacte du trouble respiratoire et l'absence d'anomalie des gaz sanguins ne signifie pas nécessairement l'absence d'affection respiratoire. En effet, les affections subcliniques s'accompagnent rarement d'hypoxémie ou d'hypercapnie au repos. A l'effort, une hypoxémie plus importante peut toutefois être mise en évidence chez les chevaux atteints d'asthme léger à modéré, par rapport à des animaux sains³⁸.

Chez des chevaux adultes en position debout, l'artère faciale transverse constitue un site de prélèvement privilégié (figure 3). La procédure doit être réalisée le plus possible au calme étant donné que le stress et l'agitation provoquent une hyperventilation, et sans sédation, afin d'éviter une réduction de la ventilation³⁹. Le sang artériel doit être collecté de manière anaérobique, dans des seringues dédiées, contenant de l'héparine lyophilisée.



Figure 3 - Prise de sang artériel à l'artère faciale droite

Chez les chevaux atteints d'asthme sévère en phase d'exacerbation, l'obstruction des voies respiratoires et le déséquilibre ventilation/perfusion peuvent être à l'origine d'hypoxémie ($P_aO_2 < 80$ mmHg) et d'hypercapnie ($P_aCO_2 > 45$ mmHg)^{40,41}. Ces anomalies ne sont toutefois pas spécifiques à l'asthme et peuvent être retrouvées lors de nombreuses affections (respiratoires, cardiaques ou métaboliques notamment) ou conditions physiologiques particulières, comme à l'exercice.

c. Inflammation pulmonaire

i. Cytologie du lavage broncho-alvéolaire

La cytologie du LBA permet de rendre compte de la sévérité et du type d'inflammation pulmonaire. Il s'agit d'une méthode facilement réalisable et répétable, utile pour le diagnostic et le suivi des chevaux asthmatiques².

La procédure est faite sur cheval debout, le plus souvent tranquilisé, et peut être effectuée à l'aveugle via une sonde à ballonnet spécifique (tube Binova) ou bien à l'aide d'un endoscope flexible (figure 4). Cette seconde méthode a l'avantage de limiter les risques de passage accidentel dans l'œsophage proximal et

est donc à privilégier dans le cadre d'étude sur le microbiome pulmonaire. De manière à limiter au maximum les contaminations par les voies respiratoires supérieures, il est possible d'avoir recours à une gaine protectrice stérile (figure 4) couvrant l'endoscope, lui aussi stérilisé entre chaque utilisation, lors du passage des voies respiratoires supérieures.



Figure 4 - LBA effectué par endoscopie (à gauche) et gaine protectrice utilisée pour l'étude (à droite)

L'endoscope couvert de sa gaine est d'abord passé au travers des cavités nasales, du pharynx, du larynx et de la portion proximale de la trachée. L'utilisation de cette gaine protectrice, technique développée par notre laboratoire³, permet de limiter les contaminations du LBA par les voies respiratoires supérieures. Lors de l'étude de systèmes de faible biomasse, tels que les poumons, il s'avère en effet essentiel de limiter au maximum les contaminants, pouvant sans quoi biaiser considérablement les analyses. L'endoscope seul est ensuite glissé jusqu'aux bronches plus périphériques, de 13 à 16 mm de diamètres (selon la taille de l'endoscope) et de la saline 0.9 % stérile est instillée par le canal de l'endoscope puis récupérée à l'aide d'une pression négative autour de 20 mmH₂O. Le liquide récupéré contient des cellules provenant de l'espace bronchique et alvéolaire et inclut principalement des cellules du système immunitaire, quelques cellules structurales ainsi que des bactéries, végétaux ou fungi⁴². Une préparation sur lame après centrifugation et coloration (Wright-Giemsa modifiée le plus souvent) est ensuite réalisée afin de

permettre une lecture et un comptage différentiel des cellules nucléées, en excluant les cellules épithéliales.

Lors d'asthme sévère, la cytologie du LBA révèle le plus souvent une importante neutrophilie (> 25 %) et une quantité de mucus augmentée pouvant contenir, lors de cas chronique, des moules de mucus épaissi communément appelés spirales de Curschmann. L'asthme léger à modéré peut quant à lui se manifester par différents profils inflammatoires : une neutrophilie (figure 5), une augmentation du pourcentage de mastocytes et/ou d'éosinophiles.

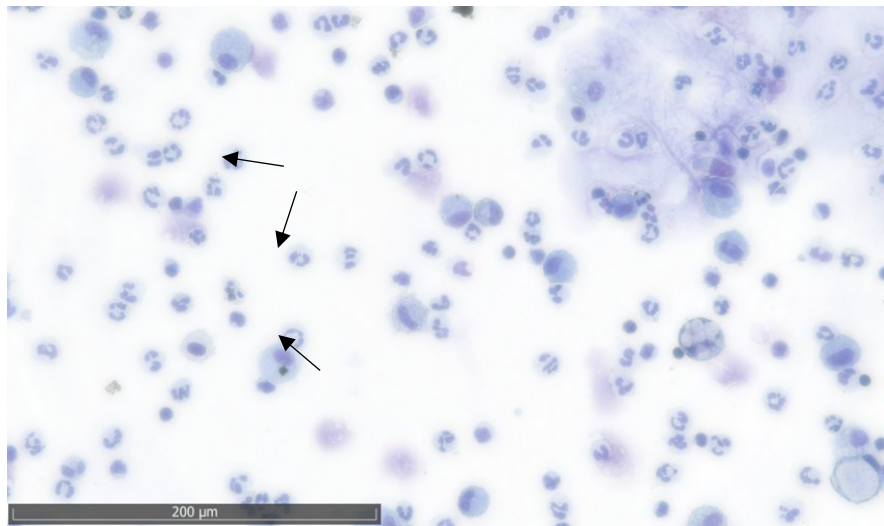


Figure 5 - Cytologie de LBA contenant de nombreux neutrophiles (flèches noires)

Le consensus de l'ACVIM rapporte différentes valeurs seuils pour l'interprétation de la cytologie du LBA². Le différentiel des cellules inflammatoires est considéré normal lorsqu'on observe : < 5 % neutrophiles, < 2 % mastocytes, < 1 % éosinophiles. A l'inverse, un diagnostic d'inflammation pulmonaire est posé face à : > 10 % neutrophiles, > 5 % mastocytes, > 5 % éosinophiles. Les valeurs intermédiaires doivent être interprétées dans le contexte clinique.

Chez les chevaux diagnostiqués avec un asthme léger ou modéré, le degré de neutrophilie et de mastocytes au LBA est associé à une diminution des performances en course^{26,43-46}. Une étude a également montré que l'inflammation neutrophilique pourrait être reliée à des épisodes de toux plus marqués⁴⁷. Dans l'asthme équin sévère, la neutrophilie du LBA est associée à la sévérité des lésions pulmonaires lors des phases d'exacerbations⁴⁸.

ii. Score de mucus trachéal

Dans une moindre mesure, le score de mucus trachéal peut également s'avérer utile pour rendre compte d'une inflammation pulmonaire. L'endoscopie des voies respiratoires supérieures permet ainsi d'objectiver la quantité de mucus dans la trachée et d'établir un score⁴⁹, détaillé dans le tableau 1 et illustré dans la figure 6. De l'asthme peut être suspecté chez les chevaux atteignant un score supérieur à 2, sans toutefois pouvoir différencier cette affection d'une infection pulmonaire. Chez les chevaux de course, un score supérieur à 1 est considéré anormal². Des études ont montré une association entre l'augmentation de mucus trachéal et la présence de toux ou de contre-performances^{22,50,51}.

Un érythème des voies aériennes supérieures ainsi qu'un œdème bronchial associé à un aplatissement de la carène sont également souvent visibles à l'endoscopie lors d'asthme.

Tableau 1 - Score de mucus trachéal chez le cheval⁴⁸

SCORE	DESCRIPTION
0	Absence de mucus
1	Une ou plusieurs petites gouttes de mucus
2	Plusieurs gouttes de mucus plus grandes mais non confluentes
3	Mucus confluent en région ventrale de la trachée
4	Large accumulation de mucus en région ventrale de la trachée
5	Quantité abondante de mucus occupant plus de 25 % de la trachée



Figure 6 - Score de mucus trachéal de grade 4/5

iii. Cytologie et bactériologie du lavage trachéal

Lors d'asthme, la cytologie du lavage trachéal (LT) peut révéler une augmentation des neutrophiles, sans être un indicateur sensible ou spécifique de la maladie. La cytologie et la bactériologie du LT constituent en revanche des examens diagnostiques de choix lors de suspicion de pneumonie infectieuse.

Avant que l'analyse du LBA s'impose comme gold standard de marqueur d'inflammation pulmonaire dans l'asthme équin, plusieurs études chez des jeunes chevaux de course ont eu recours à la cytologie du liquide de LT. Certaines de ces études ont révélé une association entre le taux de neutrophiles au LT et la toux⁵², tandis qu'un lien avec les mauvaises performances n'a pas été clairement démontré⁵¹. De plus, la faible corrélation entre la cytologie du LT et celle du LBA renforce le fait que la cytologie du LT n'est pas considérée comme une alternative appropriée pour confirmer un asthme⁵³.

Bien que la culture bactériologique ne soit pas une méthode sensible pour l'étude du microbiome pulmonaire et que le rôle des bactéries dans la pathophysiologie de l'asthme ne soit pas encore bien défini, il n'est pas rare d'obtenir des croissances bactériennes en culture standard chez les chevaux atteints d'asthme. Le lien entre l'asthme et le microbiome bactérien pulmonaire sera plus amplement développé dans la suite du manuscrit.

Il a aussi été montré que seulement environ 30 % des bactéries sont révélées en culture aérobie conventionnelle⁵⁴, à l'opposé de la quantification par PCR du gène codant pour l'ARNr 16S (quantification ciblée des bactéries) ou du séquençage massif qui s'avèrent être des techniques beaucoup plus sensibles.

D'autres examens complémentaires peuvent également être mis en œuvre, tels que l'histologie de biopsies endobronchiques afin d'objectiver le remodelage des voies respiratoires inférieures ou l'analyse de biomarqueurs. Ces tests ne seront pas développés dans le présent mémoire.

4. Traitements standards

Les buts du traitement de l'asthme sont de réduire l'inflammation et de lever l'obstruction des voies respiratoires. L'accent doit être principalement mis sur la réduction de l'exposition aux allergènes en misant sur des mesures environnementales. Une médication peut aussi être mise en place, notamment pour contrôler ou accélérer l'amélioration de la clinique des animaux très atteints, si les changements environnementaux s'avèrent insuffisants ou s'ils ne peuvent pas être facilement instaurés. Dans ce cadre, les corticostéroïdes sont principalement employés pour adresser l'inflammation pulmonaire tandis que les bronchodilatateurs visent à lever l'obstruction des voies aériennes².

a. Mesures environnementales

Les mesures environnementales passent par deux approches : le recours à une alimentation et à une litière générant peu de poussières, ainsi que l'amélioration de la ventilation et du renouvellement de l'air. La mise au pâturage herbagé s'avère ainsi la meilleure des solutions en cas d'asthme classique. Après la mise en vigueur des mesures hygiéniques, les signes cliniques tendent alors à régresser en une à deux semaines mais peuvent prendre jusqu'à 4 à 6 semaines^{55,56}. Il faut toutefois garder en mémoire que, même maintenus dans un environnement pauvre en poussières, certains chevaux présentant un remodelage des voies aériennes conservent une portion d'obstruction aérienne centrale et périphérique.

Les alternatives alimentaires, pour un cheval sans accès à l'herbe, sont : foin mouillé (autour de 45 min), foin traité à la vapeur à l'aide d'un appareil de type Haygain® (figure 7), foin traité à l'huile végétale à l'aide du Nutrifoin® (figure 7), ensilage, fibres en cubes ou pellets. Les foins mouillés, traités à la vapeur ou à l'huile végétale visent à éliminer ou capter les particules inhalables afin d'en réduire leur teneur dans le foin. Seuls le foin mouillé (étude en cours de publication dans notre laboratoire) et le système Nutrifoin® ont montré une amélioration de la fonction et de l'inflammation pulmonaires⁵⁶, à l'image des autres substituts de foin (ensilage, pellets ou cubes)^{18,57}. Bien que très répandu, aucune étude n'a à ce jour démontré une amélioration significative de la fonction pulmonaire avec le système Haygain®⁵⁸.



Figure 7 - Haygain® (à gauche) et Nutrifoin® (à droite)

Il est aussi à noter que les pellets peuvent se révéler moins appétents et parfois mener au développement d'ulcères gastriques et de tics liés à l'ennui chez le cheval compte tenu de leur rapidité d'ingestion⁵⁹. Dans

le cas de l'ensilage, une alimentation bien conservée et une vaccination contre le botulisme sont primordiales. Notons enfin qu'un foin trempé pendant plusieurs heures entraîne une réduction de sa valeur nutritive et peut générer une augmentation de la charge bactérienne⁶⁰.

Une autre mesure environnementale essentielle consiste à avoir recours à une litière pauvre en poussières, comme les copeaux de bois, la tourbe ou des litières synthétiques⁶¹. La paille, même de bonne qualité, reste une source d'allergènes, notamment lorsqu'elle est utilisée comme litière accumulée ou dans des écuries chaudes, humides et peu ventilées. Enfin, il est également conseillé de ventiler au maximum l'habitat du cheval, de stocker toutes les sources de particules respirables loin des boxes, de sortir l'animal atteint lors du nettoyage de son box et de limiter le travail sur un terrain trop poussiéreux.

b. Médication

Deux principaux types de traitements peuvent être employés dans la prise en charge de l'asthme équin : les corticostéroïdes et les bronchodilatateurs². Ces traitements sont administrés par voie systémique ou localement par inhalation. Des nébuliseurs et des inhalateurs pressurisés à valve doseuse peuvent être utilisés chez le cheval, plusieurs types de dispositifs (masques, adaptateurs naseaux) ayant été développés spécifiquement pour améliorer la délivrance de l'aérosol dans le poumon du cheval (figure 8).



Figure 8 - Exemple de système de délivrance d'inhalation chez le cheval (masque Top Spacer®)

Le procédé d'aérosolthérapie permet de délivrer une concentration élevée de substance active directement aux poumons, en minimisant la dose totale et l'absorption systémique. Les risques d'effets indésirables ainsi que l'accumulation de résidus sont ainsi réduits. Ce procédé reste néanmoins assez

coûteux et il existe un risque de mauvaise administration et de sous-dosage avec des opérateurs peu avertis ou des chevaux peu coopératifs. A contrario, la voie systémique, orale ou parentérale, reste moins onéreuse que les traitements inhalatoires mais comportent plus d'effets secondaires. En cas de détresse respiratoire grave, la voie systémique est néanmoins privilégiée en première intention, l'inhalation prenant ensuite le relais.

Les corticostéroïdes constituent de puissants agents anti-inflammatoires. Le tableau 2 reprend les principaux corticostéroïdes employés en pratique équine, par voie systémique ou par inhalation⁶².

Tableau 2 - Principaux corticostéroïdes utilisés dans le traitement de l'asthme équin

MOLECULES	DOSES ET VOIES D'ADMINISTRATION
	Voie systémique
DEXAMETHASONE	0,04-0,1 mg/kg une fois par jour, voies orale/IM/IV
PREDNISOLONE	1-2 mg/kg une fois par jour, voie orale
TRIAMCINOLONE	0,04-0,9 mg/kg minimum 3 mois entre doses, voie IM
	Voie inhalatoire
BECLOMETHASONE	1-7,5 µg/kg deux fois par jour
BUDESONIDE	1-4 µg/kg deux fois par jour
CICLESONIDE	2 744 µg deux fois par jour 5 jours puis 4 116 µg une fois par jour 5 jours
FLUTICASONE	4-6 µg/kg une à deux fois par jour

Les effets indésirables associés à la prise de corticostéroïdes dépendent de la puissance de la molécule utilisée, des doses administrées et de la durée du traitement. De cette manière, les molécules à action moyenne ou longue et puissantes (triamcinolone et dexaméthasone par exemple) causent davantage d'effets secondaires, comme une diminution de l'immunité, une suppression de l'axe hypothalamo-pituitaire-adrénalien ou, plus rarement, le déclenchement de fourbure. Ces complications seront étayées dans la portion consacrée aux corticostéroïdes.

Les bronchodilatateurs sont administrés afin de permettre une relaxation des muscles lisses respiratoires et donc de faciliter la levée de l'obstruction des voies aériennes. Il est possible d'avoir recours en premier

lieu à des bronchodilatateurs, avant l'usage des corticostéroïdes inhalés, de manière à favoriser le dépôt d'aérosol dans les voies périphériques de chevaux souffrant de bronchoconstriction marquée.

Plusieurs classes de molécules peuvent être employées : les β 2-agonistes, les anticholinergiques et les méthylxanthines. Le tableau 3 reprend les bronchodilatateurs le plus couramment utilisés en pratique équine, par voie systémique ou par inhalation.

Tableau 3 - Principaux bronchodilatateurs utilisés dans le traitement de l'asthme équin

MOLECULES	DOSES ET VOIES D'ADMINISTRATION
	Voie systémique
AMINOPHYLLINE	5-13 mg/kg deux fois par jour, voies orale/IV
CLENBUTEROL	0,8-3,2 μ g/kg deux fois par jour, voie orale
PENTOXIFYLLINE	35 mg/kg deux fois par jour, voie orale
THEOPHYLLINE	5-10 mg/kg deux fois par jour, voie orale
	Voie inhalatoire
ALBUTEROL	1-2 μ g/kg toutes les 1-3 h
BROMURE D'IPATROPIUM	0,2-0,4 μ g/kg deux à trois fois par jour
SALBUTAMOL	1-2 μ g/kg deux à trois fois par jour
SALMETEROL	0,5 μ g/kg deux fois par jour

Les effets des corticostéroïdes et des bronchodilatateurs sur le microbiote, la fonction et l'inflammation pulmonaires, ainsi que leurs effets secondaires, seront davantage étayés dans les chapitres III et IV de cette première partie.

D'autres traitements peuvent être institués, de manière moins conventionnelle, tels que des mucolytiques ou du cromoglycate de sodium pour limiter la dégranulation des mastocytes. Ces traitements ne seront pas développés dans le présent mémoire.

II. MICROBIOTE BACTERIEN PULMONAIRE

2. Notions générales sur le microbiome

a. Terminologie et concepts de base

Ces dernières années, l'intérêt pour l'étude des populations microbiennes n'a cessé de grandir. L'emploi d'une terminologie adéquate s'avère essentiel pour une bonne compréhension^{63,64}.

Il faut d'abord différencier les termes « microbiome » et « microbiote ». Le microbiote consiste en l'ensemble des microorganismes (bactéries, virus, fungi, archées, protozoaires) retrouvés dans un même milieu (par exemples l'estomac d'un cheval ou les poumons d'un chien), tandis que le microbiome représente l'ensemble des gènes de ces microorganismes. L'étude du microbiote réfère donc à une approche taxonomique même si le séquençage est impliqué (par exemple via le séquençage du gène de l'ARNr 16S), alors que l'analyse du microbiome est souvent réservée aux études portant sur le matériel génétique via la méta-génomique. Les deux termes sont cependant souvent utilisés comme synonymes dans la littérature. Les termes « faune » et « flore » ne sont en revanche plus appropriés. Les communautés bactériennes sont les plus étudiées et participent largement à l'homéostasie des écosystèmes. Dans la suite de ce manuscrit, le terme « microbiote » fera d'ailleurs référence au microbiote bactérien.

Le terme « taxon », au pluriel « taxa », peut être employé lorsque le rang taxonomique (espèce, genre, famille, ordre, classe, phylum, règne ; figure 9) n'est pas spécifié.

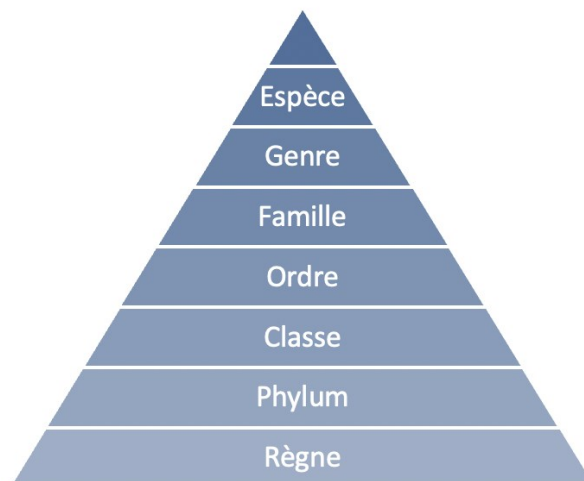


Figure 9 - Classification taxonomique

Une population bactérienne réfère à un ensemble de bactéries appartenant au même taxon, comme *Streptococcus* et *Actinobacillus* qui correspondent à deux populations bactériennes et deux taxa distincts. L'ensemble des populations présentes dans un même milieu forment alors une communauté bactérienne. L'unité taxonomique opérationnelle, en anglais operational taxonomic unit (OTU), renvoie au niveau taxonomique auquel les analyses bio-informatiques ont été réalisées (exemples : au niveau de l'espèce ou du genre). Les séquences ayant un haut niveau de similarité, souvent à plus de 97 %, sont regroupées sous le même OTU. Si l'analyse est réalisée au niveau du genre, un même OTU peut aussi bien contenir des espèces identiques ou différentes, appartenant en revanche toutes au même genre. A l'inverse, lors d'analyse au niveau de l'espèce, un même OTU ne contient que des séquences appartenant vraisemblablement à la même espèce.

La biodiversité, correspondant à la variation biologique dans un milieu, ne peut pas être caractérisée par une seule valeur. Plusieurs concepts et indices ont ainsi été développés pour pouvoir analyser la diversité dans un milieu donné (l' α -diversité) ou bien comparer la diversité de plusieurs milieux directement entre eux (la β -diversité). La figure 10 reprend ces principaux concepts.

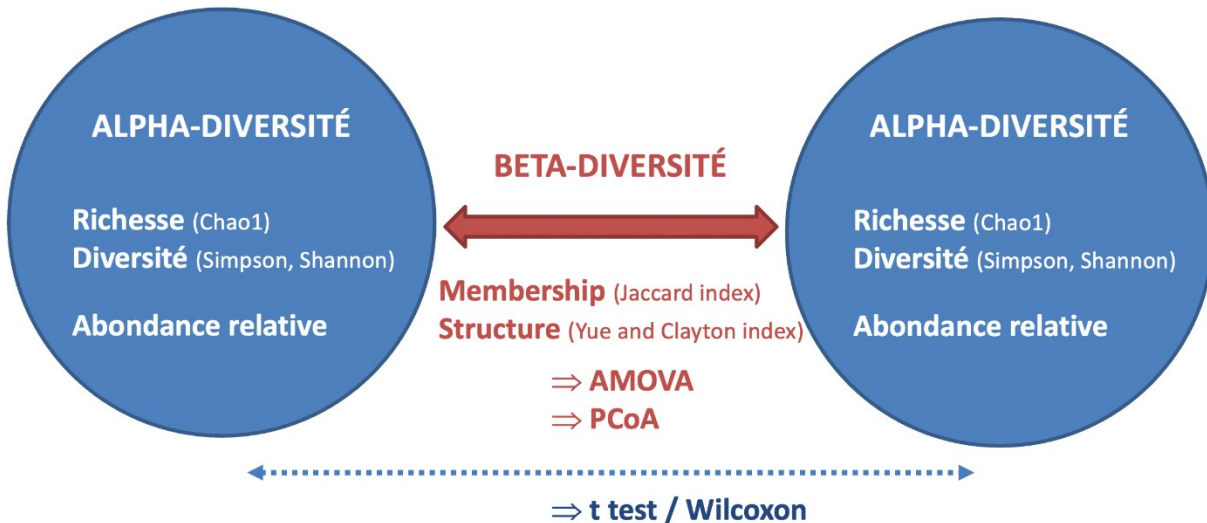


Figure 10 - Concepts de base de l' α -et β -diversité (AMOVA : analysis of molecular variance ; PCoA : principal coordinate analysis)

L' α -diversité permet de caractériser les propriétés propres à un seul échantillon ou milieu. Elle englobe deux notions principales : la richesse et l'uniformité ("evenness"). La richesse représente le nombre de taxa différents retrouvés dans l'échantillon, tandis que l'evenness correspond à la distribution de chaque

taxon au sein de l'échantillon donné. Plus un échantillon est disparate et non homogène, plus l'évenness est petit. Le concept de diversité regroupe à la fois la richesse et l'évenness. Ainsi, la diversité d'un milieu est plus faible qu'un autre si le tirage aléatoire et en série de deux éléments bactériens offre plus de chance de tirer les mêmes taxa. Des indices mathématiques ont été développés afin de mieux caractériser et quantifier ces notions. L'indice Chao est ainsi un indicateur de la richesse, alors que les indices de Shannon et de Simpson réfèrent à la diversité⁶⁵. Une fois ces indices calculés au sein de chaque échantillon, ils peuvent être comparés entre eux par le biais de tests statistiques usuels (exemples : test de t, test de Mann-Whitney).

Au sein de chaque échantillon, la charge bactérienne peut également être rapportée. Elle constitue la quantité absolue de bactéries retrouvées dans le milieu, toutes espèces confondues. Elle peut notamment être mesurée par PCR quantitative ou digital droplet PCR (ddPCR), cette charge correspondant alors à la quantité d'ADN bactérien. L'abondance relative des taxa s'avère être un autre paramètre intéressant dans l'étude du microbiote. Elle correspond à la quantité de séquences appartenant à un taxon donné, par rapport à la quantité totale de séquences obtenues. Ces données sont souvent représentées sous forme de diagrammes en bâton, comme illustrées par la figure 11.

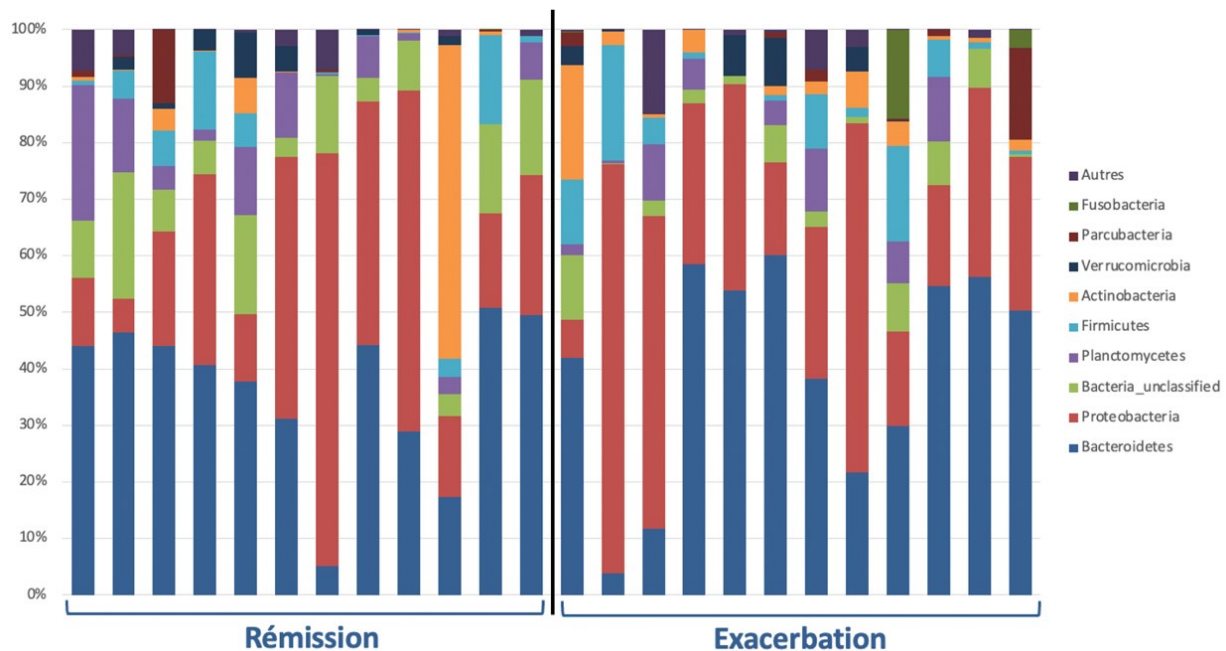


Figure 11 - Exemple de diagramme en bâton d'abondances relatives des phyla majoritaires au sein de deux groupes (groupe rémission : n = 12 ; groupe exacerbation : n = 12)

Dans ce cas, il est préférable que chaque individu soit reporté graphiquement, et donc éviter d'imager seulement les moyennes des groupes, étant donné que d'importantes variations interindividuelles peuvent subvenir. De la même manière, la charge bactérienne et les abondances relatives de plusieurs échantillons peuvent être comparées entre elles en ayant recours à des tests statistiques usuels.

La β -diversité offre l'avantage de comparer directement des milieux ou échantillons différents entre eux. Elle comprend deux notions importantes : le membership et la structure. Le membership correspond aux populations bactériennes partagées entre les milieux, alors que la structure y ajoute une notion d'abondance relative pour chacune des populations partagées. Par exemple, une modification du membership mais non de la structure implique que des taxa minoritaires sont davantage retrouvés dans un groupe par rapport à l'autre. En revanche, si le membership est inchangé entre deux groupes mais que la structure varie, il est facile de pointer une variation d'abondance relative de certains taxa entre les deux groupes, sans pour autant recenser ou perdre de façon importante d'autres populations bactériennes. Là encore, différents indices mathématiques permettent d'analyser la β -diversité, comme l'indice de Jaccard pour le membership et l'indice de Yue et Clayton pour la structure. A contrario des analyses statistiques usuelles employées pour l' α -diversité, il faut ici avoir recours à des tests statistiques particuliers, comme le test AMOVA (analysis of molecular variance). En complément de ces analyses, la β -diversité de différents milieux peut être comparée par le biais de méthodes graphiques (figure 11), telles que le principal coordinate analysis (PCoA) ou le non-metric multidimensional scaling (NMDS). Ces graphiques, généralement en 2D ou 3D, sont construits à partir d'une matrice de distance répertoriant le nombre de fois qu'un taxon est mis en évidence dans une communauté. Chaque axe du graphique est annoté d'un pourcentage de variation, par exemple 32 % sur le premier axe et 25 % sur le second, soit dans ce cas-ci un graphique 2D représentant 57 % de la variation totale entre les données. Plus deux points sont rapprochés sur le graphique, plus les communautés bactériennes des deux individus en question sont similaires.

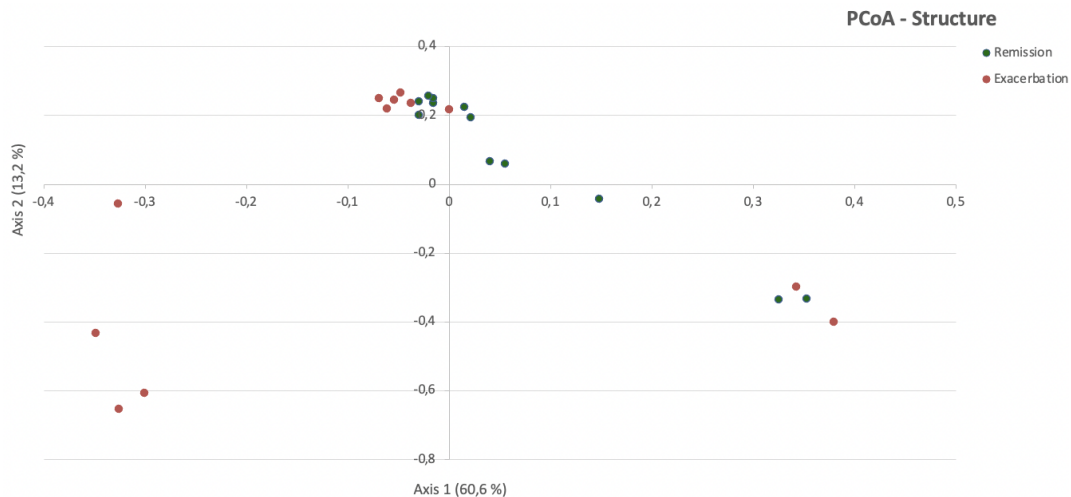


Figure 12 - Exemple de PCoA de la structure représentant deux groupes

Enfin, l'analyse LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size), développée par The Huttenhower Lab, constitue une analyse statistique complexe permettant de prendre en compte tous les taxa, même les plus minoritaires, afin de comparer les communautés bactériennes de différents milieux. Ces résultats se présentent souvent tels que la figure 13.

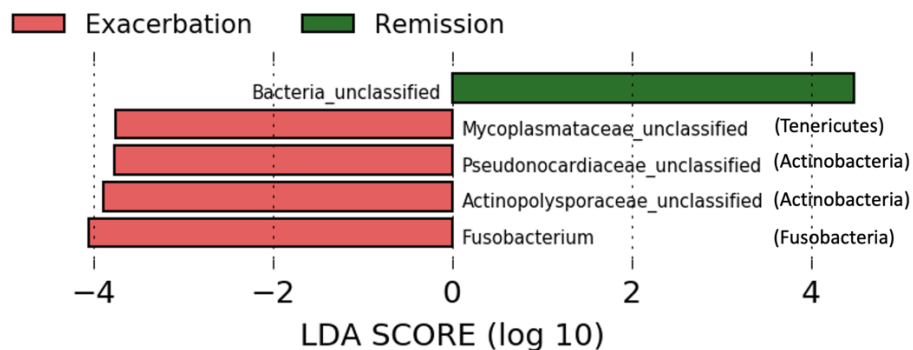


Figure 13 - Exemple de diagramme provenant de l'analyse LEfSe au niveau du genre entre deux groupes (rémission/exacerbation)

b. Interrelations hôte-microorganisme

Les microorganismes prennent une place à part entière au sein d'écosystèmes vivants et entretiennent des relations étroites avec leurs hôtes. Il a en effet été estimé que plus de la moitié des cellules contenues dans le corps humain serait d'origine microbienne⁶⁶. Chaque interface externe du corps, comme la peau,

les intestins, les systèmes respiratoires et reproducteurs, sont colonisés par un microbiote propre en accord avec les conditions locales. Le tractus digestif, riche en nutriments mais pauvre en oxygène, contient de nombreuses bactéries anaérobies. A l'inverse, la peau, qui est directement en contact avec l'oxygène ambiant et pauvre en nutriments, voit davantage se développer des bactéries aérobies⁶⁷.

L'émergence de méthodes indépendantes de la culture bactérienne a permis de redéfinir les bactéries classées pathogènes⁶⁸. En effet, des bactéries initialement considérées comme purement pathogènes ont par la suite été détectées chez des sujets sains. Outre la présence de bactéries pathogènes primaires, le déclenchement de maladies pourrait être consécutif à une variation dans la quantité absolue de bactéries commensales, à une variation dans leurs abondances relatives ou aux conditions de l'environnement local influençant l'homéostasie. Le terme « dysbiose » décrit ainsi un changement dans la composition du microbiote normal⁶⁹. Certaines maladies, telles que des maladies auto-immunes, métaboliques, inflammatoires, allergiques et neurologiques, peuvent être influencées par des altérations du microbiote⁷⁰.

Les interactions de l'hôte avec les bactéries commensales sont plus complexes qu'avec les agents pathogènes primaires. Différents types d'interaction entre l'hôte et les microorganismes sont décrits, par exemples :

- Symbionte : relation obligatoire et bénéfique pour les deux partis.
- Amphibionte : interaction pathogénique ou symbiotique selon les circonstances.
- Mutualisme : les deux partis tirent un avantage de l'interaction.
- Neutralisme : aucun des partis bénéficie ou pâtit de l'interaction.
- Commensalisme : un seul des deux partis tire un bénéfice de l'interaction.
- Parasitisme : un seul parti tire un bénéfice alors que l'autre n'a en retour que des inconvénients.

La symbiose est fréquemment rencontrée dans les interactions hôte-microbiote. Par exemple, chez l'humain, les bactéries du genre *Escherichia* contenues dans l'intestin synthétisent la vitamine K, molécule essentielle entre autres à la coagulation, en utilisant les aliments ingérés par l'hôte⁷¹.

Afin d'assurer au mieux l'équilibre local, les bactéries ont aussi développé la faculté de se réguler entre elles, comme par la compétition des ressources nutritives ou la sécrétion de substances aux propriétés

antibiotiques⁷². Des études in vitro et in vivo chez la souris ont en effet montré que les bactéries du genre *Prevotella* réduisent l'activité des *Haemophilus*, en diminuant notamment le taux d'IL-12p70^{73,74}.

Les bactéries considérées comme pathogènes primaires usent de moyens plus directs pour déclencher une maladie. Leurs propriétés et facteurs de virulence peuvent en effet leur permettre d'envahir leur hôte, générer de l'inflammation par le biais de la production de diverses toxines, ou encore éviter leur destruction en inhibant la phagocytose. Un exemple serait *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent de la tuberculose, bactérie qui n'est pas considérée comme faisant partie du microbiote respiratoire chez humain en santé.

Les interactions entre les virus et fungi avec l'hôte rentrent également en jeu dans le maintien de l'équilibre local et le déclenchement de maladies. Ces notions ne seront en revanche pas développées dans le présent mémoire.

c. Notions générales sur le microbiote bactérien respiratoire

Les poumons, longtemps considérés comme stériles, sont en réalité pourvus d'un microbiote spécifique diverse mais de faible biomasse. L'étude des poumons a d'ailleurs été initialement exclu de l'Human Microbiome Project de 2008, qui visait à caractériser le microbiote de 18 régions anatomiques du corps humain en ayant recours à des techniques de séquençage massif⁷⁵. En 2010, une première étude sur le microbiote pulmonaire humain, utilisant le séquençage de nouvelle génération, visait à recenser les communautés bactériennes retrouvées chez des individus sains, atteints d'asthme ou de maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) et révélait ainsi que les voies respiratoires inférieures ne sont pas stériles, même chez les sujets sains⁷⁶. La faible charge en microorganismes des poumons explique cette découverte tardive, le microbiote respiratoire équivalant à environ 6 % du microbiote total chez l'humain⁷⁷.

Le microbiote pulmonaire est dynamique et est influencé par l'apport en microorganismes en provenance de l'environnement et des voies respiratoires supérieures, par leur élimination, par leur croissance au niveau pulmonaire et par les conditions locales comme la température, le pH, les nutriments, la tension en oxygène et les défenses locales⁷⁸.

En état de santé, l'immigration et l'élimination sont les deux principales dynamiques qui régissent le microbiote pulmonaire⁷⁹. A l'inverse, lors de maladies pulmonaires chroniques, le microbiote est

davantage influencé par les conditions locales et par le taux de croissance de ses membres et des pressions de sélection s'installent alors.

Le continuum direct avec les voies respiratoires supérieures, l'inhalation d'air et les micro-aspirations constituent les entrées des microorganismes dans les poumons. Chez l'humain, les micro-aspirations semblent être prépondérantes, comme en témoignent les compositions bactériennes proches entre le microbiote oral et celui pulmonaire⁸⁰.

Outre que la toux, les cellules épithéliales pulmonaires jouent un rôle important dans la défense contre les agents pathogènes et le maintien des communautés bactériennes commensales, en étant la première interface entre les substances inhalées (dont les micro-organismes) et le tissu pulmonaire. Les défenses locales incluent la fonction de barrière de cet épithélium, la clairance muco-ciliaire, la phagocytose par les macrophages alvéolaires adjacents, la production de peptides antimicrobiens et de médiateurs pro- et anti-inflammatoires, la faculté à transporter des immunoglobulines et de transmettre des signaux au système immunitaire comme via les Toll-like receptors⁶⁷. Cette interface permet ainsi d'orienter le système immunitaire vers la tolérance ou bien le déclenchement d'inflammation. Une perte d'équilibre dans les interactions hôte-microbiote peut ainsi mener au déclenchement de maladies.

Après la naissance, le microbiote pulmonaire de l'enfant se développe et se diversifie dès les premiers jours. Initialement davantage composé des phyla Firmicutes et Proteobacteria, les poumons s'enrichissent en Bacteroidetes avec l'âge⁸¹. La composition bactérienne d'un poumon immature chez un nouveau-né serait un bon prédicteur du développement d'allergies, et notamment d'asthme. Durant le jeune âge, les dysbioses pulmonaires pourraient en effet affecter le microbiote de manière irréversible et avoir des conséquences sur l'immunité⁸²⁻⁸⁴. L'hypothèse de l'hygiène, énoncée par le physiologiste britannique David Strachan en 1989, stipule qu'un microbiote diversifié en bas âge semble promouvoir le développement équilibré du système immunitaire, incluant la tolérance aux microbes inoffensifs. Ainsi, des stimulations antigéniques bactériennes précoces permettraient de réduire le développement d'asthme et de rhinite allergique en favorisant la tolérance d'antigènes inoffensifs par le système immunitaire^{85,86}. Un microbiote diversifié semble aussi nécessaire pour une régulation immunitaire appropriée tout au long de la vie⁸⁷.

L'avènement des techniques de laboratoire, par le biais du séquençage de nouvelle génération et de la PCR quantitative, a permis de caractériser le microbiote respiratoire de chevaux sains^{3,4,6,88}.

Les quatre phyla majoritairement retrouvés sont : Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes et Bacteroidetes^{4,6}. Selon les études, les familles *Moraxellaceae* et *Bacillaceae* et les genres *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Sphingomonas* et *Pantoea* sont les plus abondants dans les voies respiratoires.

Certaines études ayant eu recours à la culture bactérienne pour caractériser les bactéries présentes au niveau des voies respiratoires supérieures (nez ou nasopharynx) de chevaux sains ont mis en évidence la prédominance des genres *Bacillus*, *Streptococcus* (notamment *equi* subsp. *zooepidemicus*), *Staphylococcus* et *Pantoea*⁸⁹.

Chez l'humain, le microbiote pulmonaire d'individus sains est majoritairement représenté par les phyla Bacteroidetes, Firmicutes et Proteobacteria. Les genres davantage retrouvés dans les poumons sont : *Prevotella*, *Veillonella*, *Streptococcus* et *Pseudomonas*⁶⁸. Le présent manuscrit vise avant tout à détailler l'espèce équine et n'est donc pas exhaustif concernant les études en médecine humaine.

Il a été démontré que le microbiote pulmonaire diffère de celui des voies respiratoires supérieures, tant chez l'humain⁶⁸ que chez le cheval^{3,4}. Les voies respiratoires supérieures s'avèrent notamment plus riches (comprennent davantage de taxa différents) que les voies respiratoires inférieures.

L'environnement joue également un rôle crucial dans la constitution du microbiote pulmonaire³. Le type d'alimentation, notamment, impacte le microbiote pulmonaire puisque certains composés de la digestion sont transportés systémiquement jusqu'aux poumons et peuvent favoriser des états inflammatoires (via une alimentation riche en lipide)⁹⁰ ou au contraire avoir des effets anti-inflammatoires (via une alimentation riche en fibres)⁹¹.

L'influence de l'asthme et des traitements sur le microbiote pulmonaire sera élaborée dans la suite du manuscrit. De nombreuses autres maladies pulmonaires en médecine humaine ont toutefois été aussi associées à des dysbioses pulmonaires, comme chez les patients atteints de MPOC⁹², de fibrose kystique⁹³, de fibrose pulmonaire idiopathique⁹⁴ et de cancer pulmonaire⁹⁵. Le lien de causalité reste inconnu, à savoir si la dysbiose pulmonaire entraîne la maladie ou bien si cette dysbiose est plutôt consécutive aux changements de l'environnement local lors d'affection pulmonaire^{96,97}.

3. Méthodes d'analyse du microbiome bactérien

a. Différentes techniques d'analyse du microbiome bactérien

Traditionnellement, la culture était la technique de choix pour caractériser les bactéries. Cette modalité comporte toutefois plusieurs limites. Certaines bactéries peuvent en effet avoir une croissance fastidieuse

en milieu de culture traditionnel, favorisant en conséquence la détection d'autres bactéries moins exigeantes. Cette méthode n'est donc pas optimale dans l'étude du microbiote, sachant qu'environ 70 % des bactéries retrouvées dans l'hôte humain ne pourraient pas croître en culture traditionnelle⁵⁴. La culture reste également une méthode très limitée à la caractérisation bactérienne, puisque son application est encore plus restreinte pour l'analyse des fungi et des virus.

Le développement de techniques indépendantes de la culture, d'abord la PCR à partir de 1983 puis le séquençage à partir de 2005, va permettre une détection plus fine et spécifique des microorganismes, et notamment des bactéries ne pouvant pas croître sur gélose^{98,99}.

Lorsqu'un microorganisme précis est recherché, et non pas l'ensemble des bactéries présentes dans un milieu, la PCR reste la technique de choix avec le recours à des amorces spécifiques de l'agent recherché. La PCR quantitative (qPCR) du gène de l'ARNr 16S, visant des séquences conservées entre les différents taxa bactériens, apporte en revanche une quantification globale de la charge bactérienne, sans égard à l'espèce. Le nombre de copies des gènes 16S varie selon les bactéries. Le nombre de copies obtenu après la PCR donne ainsi une approximation de la charge bactérienne et peut être utilisé pour comparer des échantillons entre eux, si pour autant leurs compositions sont assez similaires.

La méthode digital droplet PCR (ddPCR ou PCR digitale en gouttelettes), technique employée dans l'étude de ce manuscrit, s'avère être plus sensible que la qPCR traditionnelle¹⁰⁰. Son principe est de répartir l'ADN dans plusieurs milliers de gouttelettes, permettant ainsi de réaliser autant de PCR indépendantes. La réaction de PCR est détectée par fluorescence. Le nombre de gouttelettes fluorescentes par rapport à leur nombre total est compté pour en déduire un nombre de copie/ μL d'ADN détecté.

Le séquençage massif offre lui la possibilité de pouvoir révéler plusieurs gènes provenant d'espèces bactériennes différentes, sans la nécessité de les isoler les uns des autres pour pouvoir les séquencer. Au cours des dernières années, l'étude du microbiome a d'ailleurs pris un réel essor avec le séquençage de nouvelle génération (next-generation sequencing, NGS), permettant la détection rapide et relativement précise de faibles quantités de matériel génétique. Contrairement au séquençage Sanger, première méthode de séquençage, le NGS permet de séquencer plusieurs brins en parallèle et aboutit donc à un volume d'analyse nettement plus important⁶³. Plusieurs types de séquençage de nouvelles générations sont désormais disponibles, tels que les techniques Illumina, Roche 454, Ion Torrent, PacBio et Nanopore.

Ces techniques plus sensibles et spécifiques requièrent toutefois davantage d'équipements et des compétences d'analyse en bio-informatique. De plus, la détection bactérienne par PCR ne permet pas de différencier les microorganismes vivants des morts.

Les ribosomes bactériens et des archées, assurant la traduction des ARN messagers (ARNm) en protéines, sont composés d'environ cinquante protéines et de trois ARN ribosomiaux (ARNr) : l'ARNr 5S et l'ARNr 23S retrouvés dans la grande sous-unité du ribosome (appelée 50S), et l'ARNr 16S composant la petite sous-unité (appelée 30S). L'ARNr 16S est un ARN non codant composé d'environ 1500 nucléotides. Certaines sections de ce gène sont hautement conservées et sont retrouvées chez toutes les espèces bactériennes. Ces régions conservées sont entrecoupées de 9 régions variables (V1 à V9) qui diffèrent entre les bactéries (figure 14).

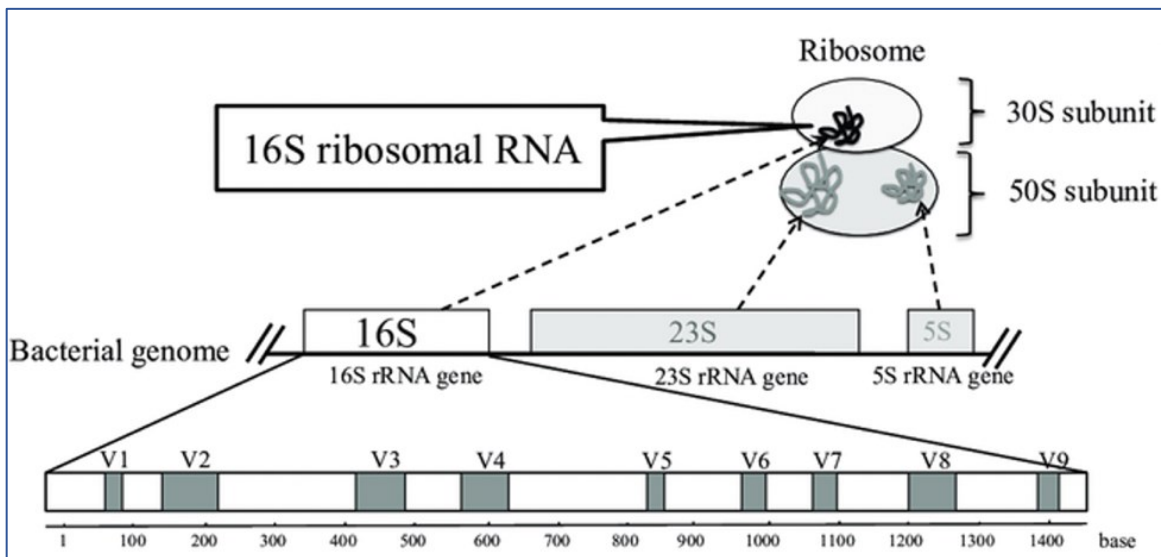


Figure 14 - Gène de l'ARNr 16S (d'après : <https://doi.org/10.7888/juoeh.38.223>)

L'une des techniques de séquençage bactérien repose ainsi sur l'amplification PCR par le biais d'amorces liant les régions hautement conservées du gène de l'ARNr 16S suivi du séquençage des régions hypervariables. Le séquençage de la région V4 est le plus couramment utilisé, cette région permettant l'obtention de résultats phylogénétiques plus précis par rapport aux autres régions variables¹⁰¹. Le séquençage complet (full-length sequencing) du gène de l'ARNr 16S reste cependant la technique la plus précise, permettant de se rendre jusqu'à l'identification de l'espèce et de la sous-espèce¹⁰². Les principales étapes du séquençage du gène de l'ARNr 16S sont décrites dans la figure 15.

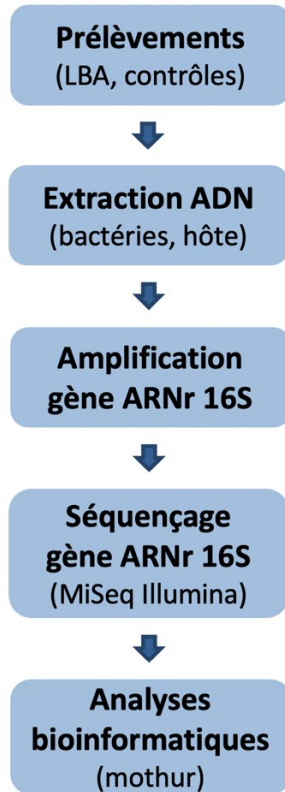


Figure 15 - Principales étapes du séquençage bactérien

Une autre technique du séquençage, la métagénomique globale (ou shotgun sequencing), consiste à fragmenter en courts fragments tout l'ADN présent dans un échantillon et les séquencer à l'aide d'un séquenceur haut débit.

Chaque stratégie de séquençage a son avantage. La métagénomique globale est plus précise en séquençant l'ensemble du génome d'une bactérie alors que le séquençage du gène de l'ARNr 16S est plus ciblé et sélectif en ne s'intéressant qu'à un seul gène bactérien. La métagénomique permet ainsi de décrire le fonctionnement global du microbiome en séquençant l'ensemble des gènes présents, qu'ils soient bactériens, viraux ou encore de l'hôte. Elle offre la possibilité de combiner classification taxonomique (jusqu'à l'espèce voire la sous-espèce) et analyses fonctionnelles des gènes, en s'affranchissant des biais possibles par le séquençage ciblé de la région 16S. Les algorithmes de traitements des données issues de la métagénomique sont néanmoins beaucoup plus complexes que pour les analyses du séquençage 16S, notamment dans le cadre de l'analyse du microbiome bactérien respiratoire de faible biomasse, et cette technique est plus onéreuse à mettre en œuvre^{103,104}. La méthode du séquençage de la région V4 du gène de l'ARNr 16S via une plateforme Illumina MiSeq est davantage détaillée dans la portion suivante du manuscrit.

D'autres techniques d'analyse du microbiome ont aussi été développées, telles que les analyses méta-transcriptomiques ou méta-protéomiques, visant à détecter l'ARNm ou des protéines bactériennes respectivement⁶³. La métabolomique peut aussi s'avérer intéressante pour l'étude des composés produits par les bactéries.

Chez le cheval, les prélèvements respiratoires les plus utilisés pour l'étude du microbiote pulmonaire sont les lavages trachéaux et les lavages broncho-alvéolaires^{3,4}. Le sputum expectoré et le recours à des brosses endobronchiques sont aussi décrits en médecine humaine^{9,76}. Les expectorations ne peuvent pas être provoquées chez les chevaux, et chez les humaines, elles ne reflètent en revanche pas précisément le microbiote des voies respiratoires profondes. Les brosses endobronchiques pourraient en revanche être utilisées chez les chevaux.

b. Séquençage de nouvelle génération avec la technique Illumina

Le séquençage via la plateforme Illumina repose sur la lecture de nucléotides fluorescents et l'assemblage par chevauchement de petits fragments d'ADN allant jusqu'à 250-300 paires de base (pb) afin de recomposer les gènes bactériens^{105,106}. Les séquenceurs peuvent aujourd'hui générer de 4 millions à 20 milliards de séquences par analyse.

Cette technologie utilise l'amplification clonale et le séquençage par synthèse. Le processus permet d'identifier simultanément les bases d'ADN lorsqu'elles sont incorporées dans la chaîne d'acide nucléique, chaque base émettant un signal de fluorescence unique lorsqu'elle est ajoutée au brin en cours de synthèse.

Les différents types de séquençage comportent 3 grandes étapes successives :

- Préparation de la banque (ou librairie) : fragmentation aléatoire de l'ADN en petites séquences et mise en place d'adaptateurs (courtes séquences spécifiques) à leurs extrémités ;
- Amplification : grâce à des méthodes d'amplification clonale et de PCR ;
- Séquençage : selon différentes approches en fonction de la technologie utilisée.

Les adaptateurs aux extrémités des fragments d'ADN ont deux fonctions principales : l'accrochage et l'amplification sur une cellule de flux (flow cell), correspondant à une plaque en verre où s'effectuent les réactions de séquençage ; l'hybridation d'une amorce servant de point de départ pour le séquençage.

Les différentes étapes de l'amplification avec la technique Illumina sont les suivantes (figure 16 A) :

1/ Hybridation d'une séquence simple brin d'origine (O), grâce à la complémentarité de leurs adaptateurs avec les oligonucléotides attachés à la surface de la cellule de flux.

2/ Synthèse d'un brin complémentaire (C) par une ADN polymérase.

3/ Dénaturation pour séparer le brin complémentaire néosynthétisé et le brin d'origine, suivi d'un lavage pour retirer la séquence d'origine.

4/ Hybridation de l'extrémité libre du brin néoformé à un oligonucléotide complémentaire fixé à proximité sur la cellule de flux.

5/ Synthèse d'un brin complémentaire identique à la séquence d'origine (O), formant un pont double-brins.

6/ Dénaturation du pont.

7-8/ Répétitions des étapes d'hybridation, synthèse et dénaturation, permettant la formation de plusieurs séquences identiques à la séquence d'origine. Ce type de procédé est nommé amplification en pont (bridge amplification).

9/ Dénaturation pour séparer les brins complémentaires entre eux, suivi d'un lavage pour retirer toutes les séquences complémentaires du brin d'origine.

10/ Persistance des brins identiques à la séquence d'origine, qui seront séquencés.

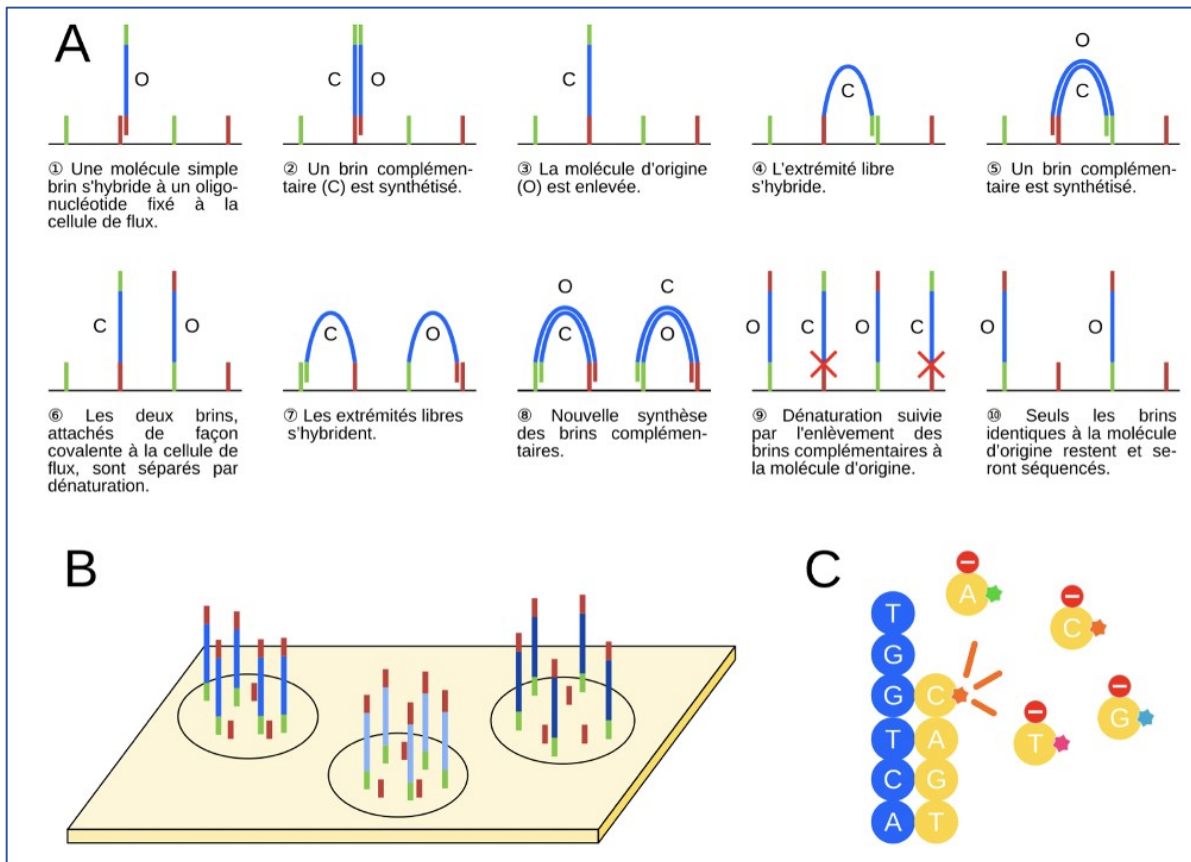


Figure 16 - Figure 16 : Principe de la technologie Illumina (d'après : <https://planet-vie.ens.fr>). A : Étapes de l'amplification avec la technique Illumina ; B : Multiples amplifications en parallèle sur la cellule de flux ; C : Formation du brin complémentaire par incorporation de nucléotides fluorescents.

Cette étape d'amplification est nécessaire à l'obtention d'un signal suffisamment important au moment du séquençage.

D'autres lots de brins identiques, correspondant à l'amplification d'autres fragments de la banque d'ADN à séquencer, sont disposés à d'autres endroits de la cellule de flux (figure 16 B).

À l'issue de l'étape d'amplification, des amorces de séquençage s'hybrident à tous les brins et servent de point de démarrage du séquençage. Un seul nucléotide marqué d'un émetteur fluorescent (longueur d'onde propre à chaque nucléotide) est incorporé à chaque cycle, suivi par une étape d'imagerie afin de déterminer quel nucléotide a été incorporé dans chaque brin (figure 16 C). Le nombre de cycles détermine la longueur du fragment. La longueur d'onde et l'intensité du signal émis déterminent le nucléotide associé. Ce type de séquençage est appelé « séquençage par synthèse ».

Le séquençage Illumina est une méthode assez sensible avec un faible taux d'erreur, abordable financièrement et rapidement effectuée en quelques jours¹⁰⁷. Le séquençage des courtes séquences obtenues ne permet en revanche pas d'analyser avec justesse jusqu'au niveau de l'espèce, la précision taxonomique maximale permettant généralement seulement une analyse jusqu'au niveau du genre.

c. Analyses bio-informatiques des données de séquençage du gène de l'ARNr 16S

Après amplification et séquençage, les gènes de l'ARNr 16S des différentes bactéries peuvent être différenciés grâce à leurs régions variables, comme vu précédemment. Une fois les données brutes extraites, différents modules d'analyse peuvent être employés pour obtenir des analyses taxonomiques et phylogénétiques, ainsi que de l' α -diversité et de la β -diversité notamment. La plateforme informatique mothur, développée depuis 2009 et employée dans notre étude, est un système fiable et relativement facile à utiliser¹⁰⁸. QIIME est un autre programme souvent employé.

Les principales étapes de l'analyse bio-informatique consiste en la filtration des séquences pour écarter celles erronées, le regroupement (ou clustering) et la classification des séquences.

L'étape de filtration permet d'écarter les séquences comportant des erreurs, telles que les séquences trop courtes ou trop longues, les séquences uniques, les séquences contenant de nombreux homopolymères (répétitions de motifs de nucléotides), les chimères et les ambiguïtés. Les chimères sont des séquences artéfactuelles, produites au cours de la PCR lorsqu'une séquence en cours d'élongation se détache de sa matrice et se ré-hybride à un autre brin matrice lors des cycles suivants. Ces chimères, composées de séquences de plusieurs brins originaux, ne sont donc pas issues de l'échantillon initial mais composent tout de même la librairie de séquençage. Les séquences possédant des schémas de nucléotides similaires sont regroupées et les brins sont appariés, permettant ainsi la construction de séquences continues. Les OTU, correspondant pour rappel à un regroupement de séquences fortement similaires (seuil habituellement fixé au-dessus de 97 % d'homologie), sont ensuite regroupés puis comparés aux séquences de référence contenues dans diverses banques de données informatiques publiques, telles que Silva pour l'alignement des séquences, Ribosome Database Project (RDP) ou Greengenes pour la classification bactérienne.

D'autres méthodes d'analyse proposent d'avoir recours aux variants de séquence d'amplicon, ou « amplicon sequence variants » (ASV), à la place des OTU. Il s'agit d'un regroupement de séquences

quasiment identiques (allant jusqu'à la variation d'un seul nucléotide), augmentant ainsi la résolution de la classification. Néanmoins, cette méthode n'est pas toujours conseillée pour l'étude de microbiotes complexes, car elle a notamment tendance à faussement augmenter l' α -diversité et à réduire le recouvrement entre les échantillons analysés¹⁰⁹.

Bien que des guides d'utilisation soient disponibles, des connaissances de base en informatique et bio-statistique sont nécessaires pour parfaire l'analyse du microbiote. Le traitement des données brutes demande aussi une grande disponibilité de mémoire vive sur l'ordinateur utilisé¹⁰⁸.

d. Biais de techniques et d'analyses

Bien qu'étant une méthode essentielle pour l'analyse du microbiome, le séquençage de nouvelle génération n'est pas infaillible. Bien comprendre les biais majeurs imputables à cette technique et à son analyse permet de limiter les conclusions erronées¹⁰⁹. Une manière de limiter les biais de techniques et d'analyse est d'incorporer des contrôles positifs (échantillons contenant des communautés bactériennes synthétiques pleinement caractérisées)¹¹⁰ et des contrôles négatifs d'environnement¹¹¹. Ceci est d'autant plus important dans l'analyse de microbiote de faible biomasse, comme c'est le cas dans notre étude d'analyse du microbiote pulmonaire. La problématique des contaminants sera davantage étayée dans la portion discussion du manuscrit.

Le séquençage peut mener à des biais de sélection durant différentes étapes du processus. La conservation des échantillons, avant analyses, devrait être réalisée à - 20 °C, ou - 80 °C sur du long-terme, pour éviter de détériorer la qualité de l'ADN. Les cycles de congélation-décongélation sont également proscrits. L'extraction d'ADN peut s'avérer fastidieuse chez certaines bactéries plus résistantes à la lyse cellulaire (comme les mycobactéries), menant à une sous-estimation de ces dernières. L'étape d'amplification PCR peut ensuite être entravée par des inhibiteurs. Dans le cadre de séquençage du gène de l'ARNr 16S, le choix des amorces spécifiques est fondamental. Une étude a d'ailleurs montré que certaines amorces ont tendance à favoriser le phylum Verrucomicrobia, tandis que d'autres ciblent davantage les Actinobacteria¹¹². L'amplification PCR peut aussi mener à la formation de chimères, pouvant en conséquence faussement augmenter la richesse bactérienne des échantillons étudiés. Les plateformes d'analyse, comme mothur, ont néanmoins développé des stratégies pour filtrer et écarter ces chimères des analyses définitives. La technique PCR employée peut aussi aider à diminuer la production des

chimères, en minimisant notamment le nombre de cycles PCR¹⁰⁹. Enfin, les erreurs lors de la préparation de la librairie de séquence ou du séquençage lui-même restent fréquentes, avec notamment des substitutions, insertions ou délétions de bases¹¹³. Les erreurs introduites au moment de la préparation des librairies sont principalement des erreurs de PCR, tandis que les erreurs de séquençage *sensu stricto* sont des erreurs de lecture par le séquenceur.

Le séquençage n'apporte pas de quantification absolue des bactéries, à défaut des qPCR et ddPCR, mais permet l'analyse d'abondances relatives. Ces analyses peuvent toutefois mener à des conclusions erronées. Par exemple, la diminution d'une population en particulier entraîne forcément l'augmentation compensatoire des autres, sans pour autant signer une réelle augmentation absolue de ces autres bactéries⁶³.

De plus, comme déjà mentionné plus haut, cette technique peut parfois être limitée à une classification taxonomique au niveau du genre pour les techniques ne séquençant que de courts brins d'ADN. Les taxa avec une faible abondance relative sont également plus à risque de rester sous-représentés même après l'étape d'amplification PCR, limitant leur détection lors du séquençage⁶³. L'identification dépend aussi de la qualité des banques de références publiques, toutes étant incomplètes et comprenant donc des séquences non identifiées, voire des séquences erronées.

4. Microbiote bactérien pulmonaire dans l'asthme

Le séquençage de nouvelle génération a permis l'étude du microbiote respiratoire de chevaux atteints d'asthme léger à modéré^{4,6} ou sévère³. Plusieurs études en médecine humaine rapportent aussi les caractéristiques du microbiote pulmonaire de patients atteints de maladies pulmonaires chroniques, dont l'asthme^{5,114}.

a. Effets de la maladie sur le microbiote pulmonaire

Le microbiote pulmonaire chez les humains et les chevaux atteints d'asthme diffère de celui de sujets sains. La dysbiose observée pourrait contribuer à l'inflammation persistante rapportée chez les sujets malades et jouer un rôle dans la pathophysiologie de l'asthme. En effet, l'inflammation, la bronchoconstriction et le remodelage tissulaire occasionnés lors d'asthme pourraient secondairement modifier les conditions locales au niveau pulmonaire. Ces changements de l'environnement pulmonaire induiraient une dysbiose des communautés bactériennes, pouvant en retour contribuer à l'inflammation locale et favoriser les crises d'exacerbation⁷⁸. La figure 17 en illustre les principaux mécanismes.

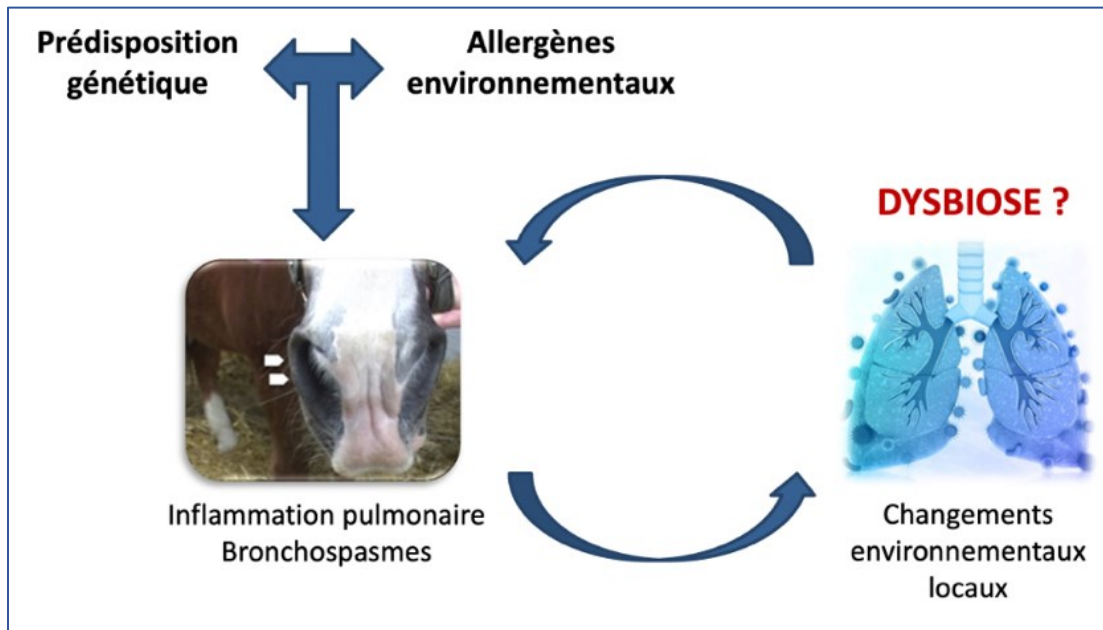


Figure 17 - Dysbiose dans l'asthme équin

Une dysbiose respiratoire inférieure est rapportée chez les chevaux atteints d'asthme léger à modéré⁴. En effet, le microbiote pulmonaire, exploré par séquençage du gène de l'ARNr 16S de prélèvements trachéaux dans cette étude, diffère entre un groupe de chevaux atteints d'asthme léger à modéré et un groupe contrôle. Une variation dans l'abondance relative de six OTU est ainsi révélée, avec notamment une augmentation de l'abondance relative de *Streptococcus* chez les sujets malades. Toutefois, tous les chevaux de l'étude présentaient de la toux, la distinction entre les deux groupes s'opérant selon l'inflammation pulmonaire révélée à la cytologie des LBA.

La β -diversité (comparaison directe des communautés bactériennes entre deux groupes) au niveau pulmonaire diffère aussi entre des chevaux atteints d'asthme sévère et des individus sains³. Dans une étude basée sur le séquençage du gène de l'ARNr 16S à partir de LBA, cette différence était d'autant plus marquée lorsque les chevaux étaient exposés à un environnement antigénique, déclenchant de l'inflammation pulmonaire et de la bronchoconstriction chez les animaux prédisposés. Les analyses d'abondance relative des taxa ne semblent en revanche pas fluctuer, même si une tendance à la surreprésentation de la famille *Pasteurellaceae* est observée chez les chevaux atteints d'asthme sévère dans cette même étude.

Dans une autre cohorte de 12 chevaux atteints d'asthme sévère (étude personnelle en cours de rédaction), la β -diversité est influencée par les phases d'exacerbation et de rémission, et ce sans changements majeurs de l'alimentation et de l'environnement. Cette étude met ainsi en lumière l'impact du statut de

la maladie sur le microbiote pulmonaire. Les *Pasteurellaceae* étaient aussi davantage retrouvés dans les LBA des chevaux en phase d'exacerbation de la maladie par rapport à la période de rémission.

Dans ces deux dernières études, l' α -diversité ne variait pas entre les deux groupes et aucune différence dans le microbiote des voies respiratoires supérieures n'avait été observée entre les individus sains et malades.

En médecine humaine, une dysbiose pulmonaire a également été rapportée entre des patients sains et atteints d'asthme. Plusieurs études révèlent notamment une augmentation de l'abondance relative du phylum Proteobacteria, avec majoritairement des augmentations relatives de *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* et *Neisseria* lors d'asthme^{5,76,114}. Le phylum Proteobacteria a également été associé à de l'hyperréactivité bronchique chez des patients atteints d'asthme difficilement contrôlable⁸², à une détérioration et une instabilité du score du Asthma Control Questionnaire (ACQ)⁵ et à l'expression de gènes associés à la voie des Th17⁵. En phase d'exacerbation de la maladie, *Haemophilus influenzae* est la bactérie la plus fréquemment détectée, seule ou en combinaison^{5,115}. Cette bactérie n'est en revanche plus retrouvée chez plusieurs patients en rémission, accentuant l'hypothèse d'un rôle d'*Haemophilus* dans le déclenchement de crise d'asthme ou bien d'une surcroissance lors de changements environnementaux locaux consécutifs à l'inflammation pulmonaire.

Différents phénotypes inflammatoires d'asthme sont également répertoriés chez l'humain, à savoir les phénotypes éosinophilique, non éosinophilique (neutrophilique, pauci-granulocytique) et mixte. Les phénotypes non éosinophiliques sont généralement associés à une moins bonne réponse aux traitements conventionnels¹¹⁶. L'asthme de type éosinophilique implique la voie de signalisation T helper 2 (Th2). Plusieurs études ne rapportent aucune dysbiose bactérienne ni association entre le microbiote pulmonaire et les marqueurs inflammatoires de la voie Th2 chez des individus atteints d'asthme éosinophilique, contrairement à ce qui a été rapporté pour l'asthme de type neutrophilique^{5,117}. Une étude a toutefois révélé une association entre l'inflammation éosinophilique sur sputum et la concentration en interleukine 13 (cytokine liée à la voie Th2) avec les charges bactériennes de deux bactéries (*Porphyromonas pasteri* et *Veillonella rogosae*)¹¹⁸. Les genres *Streptococcus* et *Neisseria* ont également davantage été recensés chez les patients atteints d'asthme éosinophilique par rapport aux autres phénotypes inflammatoires¹¹⁷. A l'inverse, le phénotype neutrophilique serait secondaire à l'activation des voies de signalisation Th1 ou Th17. Une dysbiose pulmonaire de ce phénotype a été rapportée, caractérisée par une communauté bactérienne distincte, moins riche et moins diverse par rapport aux autres phénotypes

inflammatoires^{5,115,117,119}. La diminution de l' α -diversité pourrait être consécutive à la hausse relative du phylum Proteobacteria, notamment des genres *Haemophilus* et *Moraxella*. L'inflammation neutrophilique sur sputum a également été associée à la présence d'*Haemophilus*, *Streptococcus* et *Moraxella catarrhalis*. Ces bactéries sont d'ailleurs surreprésentées chez les individus dont l'asthme est résistant aux traitements¹²⁰.

Le microbiote pulmonaire semble aussi différer selon la présence d'atopie ou non chez les humains atteints d'asthme. Durack et ses collaborateurs ont ainsi mis en évidence des communautés bactériennes divergentes entre les individus atteints d'atopie ou non, avec notamment un enrichissement en *Prevotella*, *Actinomyces* et *Lactobacillus* chez les sujets atopiques, tandis que les non-atopiques détiennent davantage d'*Aggregatibacter*, d'*Haemophilus* et des bactéries appartenant au phylum Actinobacteria¹²¹. Une autre étude a révélé un enrichissement en *Allobaculum*, *Leucobacter*, *Stenotrophomonas* et *Pseudonocardia* chez les patients atteints d'asthme et d'atopie⁸.

L'association entre le développement d'asthme juvénile et la présence d'*Haemophilus influenzae*, de *Streptococcus pneumoniae* et de *Moraxella catarrhalis* dans le nasopharynx de nouveau-nés est aussi en faveur de l'implication d'une dysbiose bactérienne dans le déclenchement de l'asthme¹²².

Une clarification du rôle du microbiote dans l'asthme permettrait une meilleure compréhension de la pathogénie et pourrait mener au développement de nouveaux traitements spécifiques, afin de mieux réguler ce microbiote.

b. Effets des traitements antibiotiques sur la maladie et le microbiote pulmonaire

La mise en évidence de dysbiose pulmonaire chez les patients atteints d'asthme soulève la question du recours aux antibiotiques dans le traitement de cette affection respiratoire chronique, afin de diminuer la charge de bactéries néfastes et potentiellement aider au rétablissement du microbiote pulmonaire normal.

Une étude menée chez des chevaux atteints d'asthme sévère a montré une amélioration du score clinique et de l'activité myéloperoxydase des neutrophiles chez les individus recevant une combinaison thérapeutique comprenant un corticostéroïde (dexaméthasone per os), un bronchodilatateur (clenbutérol per os) et un antibiotique (ceftiofur intramusculaire). Aucune amélioration n'a été observée dans le groupe

contrôle, ne recevant que la dexaméthasone et le clenbutérol. Cette étude n'a toutefois pas permis de révéler de différence significative quand les groupes étaient comparés entre eux, ni de mettre en évidence d'amélioration d'autres paramètres inflammatoires (comptage de neutrophiles aux LBA, score de mucus, activité d'interleukines)¹²³. Dans une autre étude, un traitement à base de ceftiofur en monothérapie chez des chevaux atteints d'asthme sévère n'a apporté aucune amélioration de la fonction et de l'inflammation pulmonaires, même si les cultures trachéales étaient majoritairement positives chez ces chevaux¹²⁴. L'utilisation d'antibiotique dans le traitement de l'asthme équin, notamment du ceftiofur, reste donc controversée.

En médecine humaine, les antibiotiques de la classe des macrolides sont d'intérêt pour le traitement de patients atteints d'asthme neutrophilique, grâce à leurs propriétés immunomodulatrices. Plusieurs études ont ainsi rapporté une diminution de la neutrophilie des voies respiratoires dans des cas réfractaires ainsi qu'une baisse de l'hyperréactivité bronchique avec un traitement aux macrolides, tel que l'azithromycine et la clarithromycine^{125,126}. Des études *in vitro* et *in vivo* chez le rongeur révèlent une inhibition de la prolifération et du remodelage du muscle lisse dans les voies respiratoires inférieures suite à l'emploi de macrolides^{127,128}, ce qui pourrait expliquer la diminution de l'hyperréactivité bronchique. L'emploi sur une longue période d'azithromycine, combiné au traitement standard de l'asthme, apporte aussi une amélioration de la qualité de vie et une diminution de la fréquence des crises d'exacerbations chez les patients dont l'asthme est mal contrôlé¹²⁹. Une diminution de la charge d'*Haemophilus influenzae* est d'ailleurs notée suite à un traitement d'azithromycine¹³⁰ ; pour rappel, cette bactérie est fréquemment isolée chez les individus en exacerbation d'asthme.

L'utilisation des macrolides en supplément des thérapies conventionnelles de l'asthme reste néanmoins controversée. Une revue systématique récente sur l'azithromycine n'a en effet montré que peu d'effet positif global quant à son utilisation pour le traitement de l'asthme¹³¹. Les dernières recommandations de 2022 conseillent leur emploi pour le traitement de l'asthme sévère en dernier recours, lors d'absence de réponse aux traitements conventionnels, compte tenu notamment du risque accru de développement de résistances bactériennes¹³². Ces recommandations n'ont cependant pas pris en compte les données les plus récentes sur le sujet, notamment concernant l'efficacité sur certains phénotypes inflammatoires.

Chez des chevaux présentant un asthme sévère neutrophilique, l'administration d'azithromycine sur une courte durée a permis de diminuer significativement les interleukines (IL)-8 et IL-1 β , réputées chimio-attractives des neutrophiles, sans pour autant améliorer l'inflammation, la fonction et le remodelage pulmonaires¹²⁴. Un traitement prolongé d'azithromycine pendant 5 mois, combinée à des inhalations de

corticostéroïdes (fluticasone), a quant à lui favorisé la diminution du nombre de neutrophiles aux LBA. La combinaison de traitement n'a en revanche pas davantage amélioré la fonction pulmonaire et le remodelage tissulaire des voies respiratoires inférieures lorsque celui-ci était comparé à un traitement seul de fluticasone¹³³. Une meilleure caractérisation de l'effet des macrolides dans le traitement de l'asthme sévère s'avère ainsi nécessaire avant d'en recommander l'utilisation générale.

Les effets des traitements usuels de l'asthme, à savoir les corticostéroïdes et les bronchodilatateurs, sur l'inflammation, la fonction et le microbiote pulmonaires seront développés dans la suite du manuscrit.

c. Effets du microbiote sur la réponse aux traitements

Le microbiote pulmonaire peut influencer la réponse thérapeutique lors de prise en charge de l'asthme en médecine humaine. Des changements dans la composition du microbiote pulmonaire sont en effet associés à une résistance aux corticostéroïdes. En comparaison d'individus cortico-sensibles sans expansion bactérienne, les sujets cortico-résistants à un traitement de prednisolone orale pendant 7 jours présentaient des altérations de la structure de leur communauté bactérienne, comme en témoignent la réduction des genres *Prevotella* et *Veillonella*, la réduction du phylum Fusobacteria et l'expansion des phyla Actinobacteria et Proteobacteria. Dans cette même étude, une expansion de bactéries Gram-négatives était également mise en évidence chez la moitié des patients cortico-résistants ; ces bactéries qui pourraient en retour activer la voie de signalisation TAK1 (transforming growth factor- β -associated kinase-1) / MAPK (mitogen-activated protein kinase) et induire ainsi une résistance aux corticostéroïdes¹³⁴. Une autre étude a aussi révélé que les individus cortico-résistants à un traitement inhalatoire de fluticasone pendant 6 semaines présentaient davantage de bactéries appartenant aux familles *Microbacteriaceae* et *Pasteurellaceae* (dont *Haemophilus*)¹²¹. De manière intéressante, une augmentation de la voie de dégradation des xénobiotiques a également été recensée chez ces patients cortico-résistants.

Aucune étude chez le cheval ne s'est penchée à l'heure actuelle sur le lien entre le microbiote pulmonaire et l'efficacité des traitements corticostéroïdes.

III. EFFETS DES CORTICOSTEROÏDES DANS LE TRAITEMENT DE L'ASTHME

Les corticostéroïdes sont couramment employés dans le traitement de l'asthme humain et équin afin de contrôler l'inflammation et d'améliorer la fonction pulmonaire, notamment lorsque les conditions

environnementales sont difficilement modifiables ou pour accélérer l'amélioration des signes cliniques⁶². Néanmoins, leur pouvoir immunosuppresseur pourrait altérer la diversité et la composition des communautés bactériennes et promouvoir la surcroissance de certaines bactéries au niveau des poumons, qui en retour seraient à même de favoriser l'inflammation locale et la recrudescence des signes cliniques. L'effet des corticostéroïdes, tout comme celui des bronchodilatateurs, sur le remodelage tissulaire chez les individus atteints d'asthme ne sera pas développée dans le présent mémoire.

1. Effets des corticostéroïdes sur le microbiote pulmonaire

L'impact des corticostéroïdes sur le microbiote pulmonaire a été rapporté en médecine humaine^{7-9,121} et chez des chevaux atteints d'asthme modéré^{4,6}, mais leur effet dans l'asthme équin sévère est à ce jour inconnu. Il s'avère aussi difficile de standardiser les études sur des sujets humains et de s'affranchir de l'effet de l'environnement sur le microbiome. Notre étude vise ainsi à étayer l'impact des corticostéroïdes sur le microbiote pulmonaire de chevaux atteints d'asthme sévère hébergés ensemble dans un environnement strictement contrôlé. Les chevaux constituent d'ailleurs un bon modèle d'asthme neutrophilique permettant d'étudier certains aspects difficiles à évaluer chez les humains¹.

Le mécanisme par lequel les corticostéroïdes influent sur le microbiote pulmonaire n'est pas encore bien élucidé. Ils pourraient agir localement directement via leurs effets immunomodulateurs et anti-inflammatoires. L'administration orale de dexaméthasone augmente en effet le nombre de lymphocytes T régulateurs dans le LBA de chevaux asthmatiques sévères¹³⁵. La dexaméthasone par voie intramusculaire diminue aussi l'expression génique de l'IL-5, un médiateur de l'inflammation éosinophilique, et du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) dans le LBA de chevaux atteints d'asthme léger à modéré¹³⁶.

Une autre hypothèse consiste à penser que les corticostéroïdes pourraient dans un premier temps améliorer la fonction pulmonaire et donc modifier les conditions locales, conduisant en second lieu à une modification des communautés bactériennes en réponse aux changements environnementaux. La figure 18 condense ces deux hypothèses.

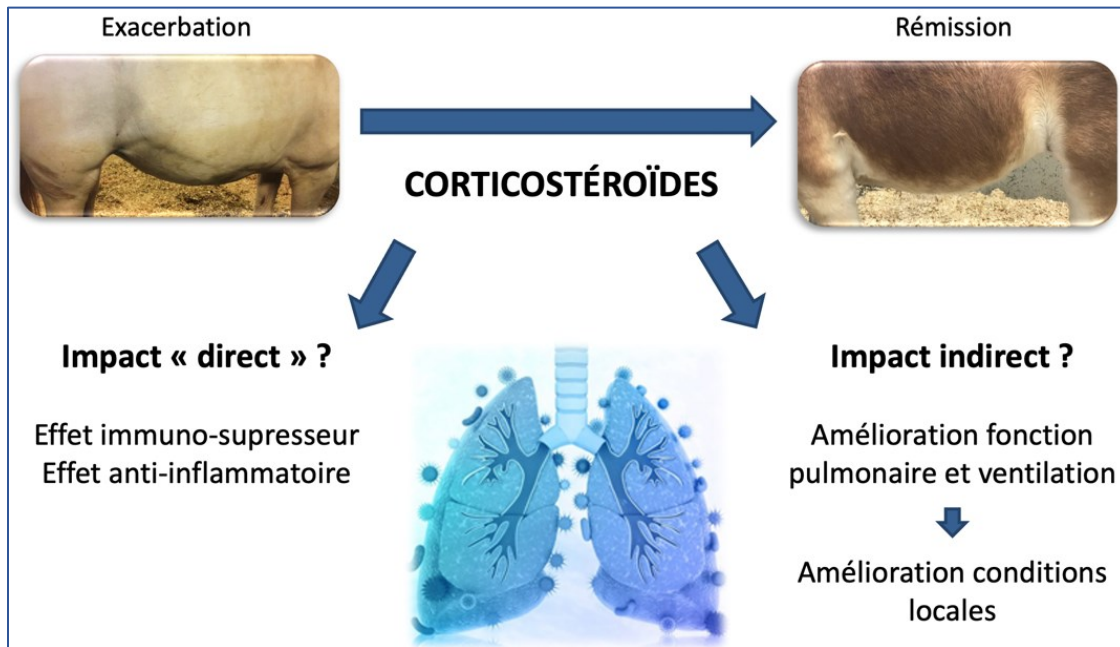


Figure 18 -Potentiels mécanismes d'action des corticostéroïdes sur le microbiote pulmonaire

Le microbiote pulmonaire humain est affecté par l'utilisation de corticostéroïdes, qu'ils soient parentéraux ou inhalés^{7,121}. Après l'administration de corticostéroïdes oraux chez des patients atteints d'asthme, plusieurs modifications d'abondances relatives de populations bactériennes ont en effet été répertoriées au niveau bronchique, avec un enrichissement du phylum Proteobacteria contre une diminution relative des phyla Bacteroidetes et Fusobacteria. Cette même étude révélait aussi, au niveau du genre, une augmentation relative de *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Rickettsia* contre une diminution de *Prevotella*⁷. L'emploi de fluticasone inhalée sur une période de 6 semaines chez des patients cortico-sensibles atteints d'asthme induisait un enrichissement de la famille *Microbacteriaceae* et des genres *Moraxella* et *Neisseria*, contre une diminution relative du genre *Fusobacterium*¹²¹. Aucun effet des corticostéroïdes sur la charge bactérienne et la β -diversité n'était en revanche rapporté dans cette dernière étude.

Deux autres études sur le microbiote pulmonaire de patients atteints d'asthme ont également mis en évidence des perturbations des communautés bactériennes suite à l'usage de corticostéroïdes. Un enrichissement du genre *Acinetobacter* est en effet retrouvé chez les sujets recevant un traitement inhalatoire de corticostéroïdes, à l'opposé des malades ne recevant pas de corticothérapie. Plusieurs associations de bactéries avec l'emploi de corticostéroïdes, oraux ou inhalés, ont aussi été répertoriées dans cette même étude⁸. La seconde étude, analysant les sputum de patients atteints d'asthme, recense des communautés bactériennes distinctes à l'analyse de la β -diversité entre des sujets recevant ou non

des corticostéroïdes inhalés. Des modifications dans l'abondance relative de plusieurs genres bactériens sont aussi recensées, avec l'enrichissement de 2 genres contre la diminution relative de 13 autres genres chez les patients traités. Une tendance à retrouver un microbiote bactérien proche de celui d'individus sains est notée chez les individus traités, par rapport à ceux ne recevant pas de corticostéroïdes. L' α -diversité ne semble en revanche pas affectée par la corticothérapie⁹.

Enfin, une étude récente s'est penchée sur l'effet de la combinaison corticostéroïdes inhalés et bronchodilatateurs, versus un traitement bronchodilatateur seul, sur le microbiote bronchique de patients atteints de MPOC. Une diminution de la richesse et de la diversité bactérienne est ainsi rapportée chez les patients traités avec la combinaison de traitements, contrairement au groupe ne recevant que des bronchodilatateurs. En revanche, aucune modification significative de la charge bactérienne, mesurée par ddPCR, ne survient dans cette étude. La β -diversité varie après traitement dans deux groupes, mais la combinaison fluticasone-salmétérol semble à l'origine de davantage de changements dans l'abondance relative de bactéries, avec notamment une diminution relative de la famille des *Pasteurellaceae* et du genre *Haemophilus*¹³⁷.

En médecine équine, une altération du microbiote trachéal a été rapportée suite à l'administration de dexaméthasone intramusculaire chez des chevaux atteints d'asthme modéré⁴. Ce traitement a en effet mené à une modification des communautés bactériennes en modulant l'abondance relative de 11 OTU et en favorisant notamment l'enrichissement des genres *Streptococcus* et *Bacteroides*. Une tendance à la diminution de l'évenness est aussi notée dans cette étude, sans être pour autant significative après correction statistique.

Aucun effet sur le microbiote trachéal chez des chevaux atteints d'asthme modéré n'a en revanche été observé après nébulisation de la formulation injectable de dexaméthasone¹³⁶. Par ailleurs, il a été montré que la dexaméthasone nébulisée, au travers de deux dispositifs différents, n'améliore pas la fonction pulmonaire de chevaux atteints d'asthme sévère^{138,139}. L'absence d'effet de la nébulisation de dexaméthasone sur le microbiote trachéal, à l'inverse de son administration parentérale, met ainsi l'accent sur l'importance des modifications environnementales locales, suite à l'amélioration de la fonction pulmonaire et de la ventilation, sur le microbiote pulmonaire.

Avec l'usage des corticostéroïdes dans le traitement des maladies pulmonaires chroniques, le risque de développer secondairement une pneumonie infectieuse à cause de leur pouvoir immunosuppresseur et de la dysbiose engendrée est pointé du doigt. Une revue de littérature rend compte de ce risque en

médecine humaine lors d'administration prolongée de corticostéroïdes inhalés, notamment de fluticasone. Les patients atteints de MPOC s'avèrent aussi plus à risque de pneumonie que les sujets atteints d'asthme¹⁴⁰. Une étude, chez des individus atteints de MPOC, a montré que les corticostéroïdes inhalés pourraient agir sur l'immunité innée en diminuant la clairance bactérienne par suppression de la cathélicidine, un peptide antimicrobien, suite à l'augmentation de la protéase cathepsine D¹⁴¹. En résumé, le microbiote pulmonaire de sujets atteints d'asthme, que ce soit chez l'humain ou chez le cheval, est influencé par les traitements corticostéroïdes puisqu'ils mènent à la modification de l'abondance relative de plusieurs bactéries et modulent les analyses de β -diversité. Le mécanisme d'action par lequel ils agissent n'est en revanche pas encore entièrement élucidé.

2. Effets des corticostéroïdes sur la fonction pulmonaire chez le cheval

Dans le traitement de l'asthme, les corticostéroïdes visent à améliorer la fonction respiratoire. Plusieurs études recensent leur efficacité en quelques jours, tant par voie systémique qu'inhalée. La voie systémique présente l'avantage d'être plus rapide à agir que la voie inhalée et, dans les cas sévères, plus efficace. Les corticostéroïdes systémiques comportent en contrepartie plus d'effets secondaires.

Les différents corticostéroïdes inhalés n'ont pas encore fait l'objet d'études d'efficacité et d'innocuité comparatives dans l'espèce équine, mais leur efficacité individuelle a bien été démontrée.

En tant que nouvel arsenal thérapeutique, le ciclésone, corticostéroïde homologué chez le cheval et administré via un dispositif spécialement conçu pour l'espèce, a dernièrement fait ses preuves pour le traitement de l'asthme équin. Chez des chevaux atteints d'asthme sévère, le ciclésone s'avère aussi efficace que la dexaméthasone orale¹⁴². Ce traitement améliore aussi le score clinique et la qualité de vie de chevaux atteints d'asthme sévère par rapport aux chevaux ne recevant qu'un placebo¹⁴³.

Des études antérieures ont également montré l'efficacité du budésone¹⁴⁴, de la fluticasone^{55,145} et de la béclométhasone^{41,146}. La dexaméthasone nébulisée, en revanche, n'améliore pas la fonction pulmonaire mais supprime toute de même l'axe hypothalamo-pituitaire-adrénalien^{138,139}. La fluticasone combinée au salmétérol, un β 2-agoniste longue action, est rapportée pour normaliser rapidement la fonction pulmonaire, sans bronchospasme résiduel, suggérant un effet synergique des corticostéroïdes et des β 2-agonistes¹⁴⁵.

Par voie systémique, la dexaméthasone, la prednisolone et la triamcinolone sont les trois principales molécules utilisées. Le recours à la prednisone est en revanche à éviter chez le cheval, en raison de sa très faible biodisponibilité orale et de son inefficacité clinique dans le traitement de l'asthme^{147,148}. Par voie intraveineuse^{146,149-151} ou orale¹⁵², la dexaméthasone améliore la fonction pulmonaire en l'espace de 3 jours chez des chevaux atteints d'asthme sévère. La prednisolone diminue aussi l'obstruction des voies aériennes chez des chevaux atteints d'asthme sévère, mais à un niveau inférieur à la dexaméthasone¹⁵². La triamcinolone intramusculaire maintient une amélioration de la fonction pulmonaire pendant environ 4 semaines chez des chevaux atteints d'asthme sévère. Ce même traitement administré par voie intra-articulaire a aussi amélioré l'obstruction respiratoire, ce qui laisse présumer dans ce cadre qu'une amélioration des performances sportives chez un cheval pourrait être secondaire à l'amélioration d'une affection respiratoire plutôt que locomotrice¹⁵³.

L'amélioration de la fonction pulmonaire se traduit aussi par une meilleure ventilation, via l'augmentation de la P_aO_2 et la diminution de la P_aCO_2 . Une tendance à l'amélioration des gaz sanguins artériels est ainsi observée avec l'administration de béclométhasone⁴¹.

3. Effets des corticostéroïdes sur l'inflammation pulmonaire chez le cheval

L'inflammation pulmonaire, objectivée par la présence de cellules inflammatoires dans le LBA, reste plus élevée chez les chevaux atteints d'asthme sévère traités avec des corticostéroïdes par rapport à ceux dont le traitement repose sur des changements environnementaux⁴⁸. Une persistance de l'inflammation neutrophilique est également observée dans les LBA de chevaux recevant des corticostéroïdes mais maintenus dans un environnement antigénique en parallèle⁵⁵. Plus particulièrement, la dexaméthasone, qu'elle soit administrée par voie intraveineuse^{154,155}, intramusculaire^{4,156} ou bien oralement^{157,158}, ne résout habituellement pas l'inflammation pulmonaire. Il en est de même pour les traitements inhalatoires à base de fluticasone^{55,156,159}, budésonide¹⁴⁴ et béclométhasone¹⁶⁰. Une étude a toutefois révélé une amélioration de la neutrophilie au LBA chez des chevaux maintenus dans un environnement antigénique avec un traitement de béclométhasone, sans pour autant parvenir à une normalisation des valeurs¹⁶¹. Certaines études révélant des effets positifs des corticostéroïdes sur l'inflammation pulmonaire sont tout de même à interpréter avec un regard critique, compte tenu de l'absence de groupe contrôle ou bien de la mise en œuvre simultanée de mesures environnementales^{162,163}.

En revanche, la combinaison corticostéroïdes et bronchodilatateurs inhalés semble synergique, puisque le traitement de fluticasone et salmétérol pendant 8 semaines a permis une diminution de la neutrophilie pulmonaire chez des chevaux atteints d'asthme sévère, alors que cette amélioration n'était pas obtenue chez les chevaux ne recevant que l'un ou l'autre des traitements¹⁴⁵.

L'effet anti-inflammatoire des corticostéroïdes se traduit également par une diminution de l'expression génique de plusieurs marqueurs inflammatoires dans les LBA de chevaux atteints d'asthme. La fluticasone, par exemple, entraîne une diminution de l'ARNm de l'IL-8 dans le LBA, sans toutefois atteindre la diminution observée avec des mesures environnementales⁵⁵. La dexaméthasone diminue l'expression des gènes de l'IL-5 et du TNF- α dans les LBA de chevaux atteints d'asthme léger à modéré¹³⁶, réduit la formation de NETs (neutrophil extracellular traps) chez des chevaux atteints d'asthme sévère, et diminue significativement les lymphocytes T régulateurs dans le LBA¹³⁵.

Les résultats de ce type d'études fluctuent beaucoup lors de modifications environnementales concomitantes à l'institution d'un traitement corticostéroïde. Dans ce cadre, l'ajout de dexaméthasone aboutit à une plus grande diminution de l'expression des gènes de l'IL-8, IL-2 et IL-1 β comparativement à un changement d'alimentation seul¹⁶⁴. En phase d'exacerbation, un traitement de dexaméthasone couplé à des modifications environnementales induit aussi une diminution de l'expression des gènes de l'IL-6 et TNF- α ¹⁶⁵. A l'inverse, un traitement de fluticasone, en parallèle d'un changement alimentaire, n'a pas entraîné de diminution de l'expression génique de cytokines pro-inflammatoires malgré une amélioration de la neutrophilie du LBA¹⁶³.

En combinant les résultats de la majorité des études, la gestion environnementale s'impose ainsi comme la plus importante à mettre en œuvre pour améliorer l'inflammation pulmonaire dans l'asthme équin. Les glucocorticoïdes quant à eux ont des effets anti-inflammatoires, mais subjectivement moindre qu'attendus pour une classe de molécule qui améliore la fonction pulmonaire de façon marquée. Davantage d'études sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques associés à l'usage de corticostéroïdes dans l'asthme équin.

4. Effets secondaires des corticostéroïdes chez le cheval

Les principaux effets adverses des corticostéroïdes comprennent la suppression de l'axe hypothalamo-pituitaire-adrénalien (HPA), l'immunosuppression et la fourbure chez les animaux prédisposés⁶². Ces effets

sont plus marqués avec les glucocorticostéroïdes systémiques, ce pourquoi nous avons entre autres choisi d'étudier des formulations inhalées dans l'étude.

L'évaluation de l'axe HPA est un moyen d'estimer l'absorption systémique des corticostéroïdes et donc le risque de développer des effets secondaires. L'axe HPA est soumis à un rétrocontrôle négatif lorsque des glucocorticostéroïdes endogènes ou exogènes stimulent l'hypothalamus, entraînant alors une diminution de la production d'ACTH par l'hypophyse et finalement de la production de cortisol par les glandes surrénales. Parmi les différents corticostéroïdes, le ciclesonide semble être le seul à ne pas induire de suppression de l'axe HPA¹⁴². Les propriétés pharmacocinétiques du ciclesonide, une très faible biodisponibilité orale et une activation locale au niveau pulmonaire, rendent en effet le risque d'impact systémique négligeable¹⁶⁶. Les autres glucocorticostéroïdes étudiés (systémiques ou par inhalation) entraînent une suppression de quelques heures à quelques semaines (pour la triamcinolone)^{139,144,146,151,167,168}. Plus particulièrement pour la fluticasone, étudiée dans ce mémoire, l'effet sur l'axe HPA varie selon les études, allant de l'absence de suppression à une suppression à court terme (12-24 h) et jusqu'à 72 h de suppression partielle avec des doses élevées¹⁶⁹.

La suppression de l'axe HPA pourrait théoriquement entraîner un hypocorticisme après l'arrêt du médicament, mais cette affection n'a pas été rapportée chez les chevaux atteints d'asthme. Néanmoins, il est recommandé d'administrer les corticostéroïdes le matin pour minimiser la perturbation du rythme circadien endogène des chevaux¹⁷⁰.

L'apparition de fourbure suite à un traitement de corticostéroïdes reste anecdotique et une étude sur une large population de chevaux n'a pas mis en évidence d'association entre un traitement de prednisolone et l'apparition de fourbure¹⁷¹. Dans une autre étude, la prednisolone a au contraire été associée à la récurrence de signes de fourbure, mais pas à son déclenchement pour la première fois¹⁷². Le mécanisme d'action n'est d'ailleurs pas bien élucidé et pourrait comprendre une augmentation de la résistance à l'insuline, une perturbation de la perfusion tissulaire dans le sabot ou encore une croissance anormale des kératinocytes⁶².

En résumé, la fourbure induite par l'usage de corticostéroïdes est rarement rencontrée chez les chevaux atteints d'asthme traités par voie systémique aux doses recommandées, bien qu'elle reste une complication potentielle à prendre en compte chez les animaux prédisposés. Le recours aux inhalations de corticostéroïdes n'a en revanche encore jamais été associé au déclenchement de fourbure.

L'immunosuppression intervient davantage lors d'emploi de corticostéroïdes sur du long terme, avec notamment la description de cas de pneumonies après un usage par voie systémique¹⁷³. L'administration de dexaméthasone et d'isoflupredone chez des chevaux atteints d'asthme sévère a en effet mené à une augmentation des neutrophiles contre une diminution des lymphocytes¹⁵¹, ce qui n'avait pas été rapporté avec un traitement long de fluticasone¹⁷⁴.

La dexaméthasone a aussi été associée à l'augmentation de la concentration sérique en fer pouvant favoriser des proliférations bactériennes¹⁷⁵ et à la suppression de production d'immunoglobulines G post-vaccination¹⁷⁶.

Les corticostéroïdes peuvent avoir des effets sur le métabolisme, en augmentant les concentrations en glucose et triglycérides¹⁷⁷ et en favorisant la résistance à l'insuline¹⁷⁸. Les glucocorticoïdes altèrent aussi le métabolisme du calcium, en favorisant notamment le développement d'ostéonécrose¹⁷⁹. Les effets minéralocorticoïdes peuvent enfin mener à des perturbations ioniques, comme de l'hypokaliémie suite à un traitement d'isoflupredone¹⁵¹. L'hyperadrénocorticisme est très rarement rapporté chez le cheval, et fait suite à des erreurs de dosages¹⁸⁰.

La voie inhalée doit ainsi être favorisée pour limiter l'impact systémique des corticostéroïdes, notamment lors d'administration prolongée, afin de limiter la survenue d'effets adverses. Malgré les effets secondaires, la voie systémique reste à privilégier lors d'obstruction respiratoire marquée puisque le bronchospasme, la toux et l'accumulation de mucus empêchent une bonne diffusion des formulations inhalées dans les voies respiratoires profondes.

IV. EFFETS DES BRONCHODILATEURS DANS LE TRAITEMENT DE L'ASTHME

Les bronchodilatateurs, connus principalement pour lever le bronchospasme chez les patients atteints d'asthme, détiennent également des propriétés anti-inflammatoires¹⁸¹.

1. Effets des bronchodilatateurs sur le microbiote pulmonaire

Peu d'études à notre connaissance se penchent sur les effets des bronchodilatateurs sur le microbiote pulmonaire chez des individus atteints d'asthme, que ce soit chez l'humain ou chez le cheval. Hormis une

action plausible sur le microbiote pulmonaire secondairement à l'amélioration de la fonction pulmonaire et de la ventilation, les bronchodilatateurs pourraient également agir directement sur le microbiote local, du fait de leurs effets anti-inflammatoires et contre le remodelage tissulaire. Une étude *in vitro* et *in vivo* chez un modèle murin a d'ailleurs révélé que l'inhalation de salbutamol et de salmétérol diminuent la clairance de *Haemophilus influenzae* des voies aériennes, pouvant ainsi engendrer une dysbiose et un risque de déclencher une infection pulmonaire¹⁸².

2. Effets des bronchodilatateurs sur la fonction pulmonaire chez le cheval

Dans l'asthme, les β 2-agonistes agissent principalement en favorisant la relaxation du muscle lisse des voies respiratoires, permettant en retour la dilatation des voies aériennes et donc la levée de l'obstruction des voies respiratoires.

Les bronchodilatateurs atténuent rapidement, mais seulement transitoirement, l'obstruction respiratoire lors d'asthme équin. Une méta-analyse récente recense d'ailleurs leur efficacité pour améliorer la fonction pulmonaire chez des chevaux atteints d'asthme¹⁸³.

Les β 2-agonistes, tels que le salbutamol par voie inhalatoire et le clenbutérol par voie systémique, sont les plus fréquemment utilisés. Le salmétérol, défini comme β 2-agoniste longue action, a été montré pour maintenir une amélioration de la fonction pulmonaire pendant 6 heures¹⁸⁴. Ces molécules possèdent aussi d'autres propriétés potentiellement bénéfiques dans le traitement de l'asthme équin, telles que l'amélioration de la clairance muco-ciliaire¹⁸⁵.

Les anticholinergiques, comme l'atropine et le N-butylscopolamine, sont très efficaces pour soulever le bronchospasme, mais leurs effets sont de très courte durée et leur utilisation reste plutôt limitée au test de bronchodilatation dans le cadre de la recherche et ils comportent davantage d'effets secondaires. Ces deux molécules entraînent également une diminution de la P_aCO_2 10 et 30 minutes après administration, sans pour autant apporter d'amélioration significative de la PaO_2 ⁴⁰.

3. Effets des bronchodilatateurs sur l'inflammation pulmonaire chez le cheval

Bien que des études *in vitro* aient révélé des effets anti-inflammatoires des β 2-agonistes, les preuves *in vivo* sont rares.

En améliorant la fonction pulmonaire, les β 2-agonistes administrés en monothérapie pourraient malheureusement masquer la détérioration sous-jacente de l'inflammation des voies respiratoires¹⁸⁶. En

médecine humaine, leur usage régulier en monothérapie est en effet désormais déconseillé car ils tendent à diminuer le contrôle de l'asthme et augmentent la mortalité. Ils induisent en effet une vasodilatation et une bronchodilatation, ce qui pourrait faciliter l'afflux de cellules inflammatoires dans les voies respiratoires ou participer à l'épaississement de leur paroi.

4. Effets secondaires des bronchodilatateurs chez le cheval

Le recours aux β 2-agonistes en monothérapie pour la gestion de l'asthme n'est pas recommandé puisqu'ils n'ont pas d'impact sur l'inflammation pulmonaire, détiennent seulement une courte durée d'action et que leur emploi seul engendre une perte d'efficacité progressive (tachyphylaxie)¹⁴⁵. Cette tachyphylaxie, soit la sous-régulation de la densité des récepteurs au niveau des lymphocytes chez le cheval, serait prévenue par l'administration combinée de corticostéroïdes¹⁸⁷.

Des complications d'ordre digestif et cardiovasculaire ont été rapportées avec l'utilisation d'anticholinergiques chez le cheval^{40,188}. L'atropine, notamment, est rapportée pour induire des iléus et des signes de colique. L'administration de β 2-agonistes peut provoquer des effets secondaires rapides et retardés. Les effets secondaires survenant rapidement se manifestent en même temps que l'effet pharmacologique de la molécule et sont principalement représentés par une tachycardie et une transpiration excessive. Dans moins de 10 % des cas, des effets secondaires après l'administration orale de clenbutérol sont ainsi décrits, comme de la transpiration excessive, des trémulations musculaires et de l'excitation. Enfin, l'aminophylline et la théophylline peuvent également être à l'origine d'hyperesthésie, d'hyperexcitabilité et de trémulations musculaires.

Cette revue de littérature a permis d'introduire l'asthme équin, en développant notamment des caractéristiques pathophysiologiques, diagnostiques et thérapeutiques, ainsi que de développer des points clés à l'analyse du microbiote pulmonaire et plus particulièrement l'impact de l'asthme sur les communautés bactériennes. Les deux dernières portions ont axé sur les principales modalités de traitement de l'asthme, les corticostéroïdes et les bronchodilatateurs, en décrivant leurs actions sur le microbiote, la fonction et l'inflammation pulmonaires.

Notre étude, orientée sur l'analyse du microbiote respiratoire chez le cheval, a ainsi pour but d'identifier si les corticostéroïdes inhalés influent sur le microbiote pulmonaire de chevaux atteints d'asthme sévère.

2EME PARTIE : ARTICLE

Présentation de mémoire par article.

Soumission à l'*American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* prévue en été 2022, en suivant les critères de rédaction propre au journal avec notamment le respect d'une portion « Methods » courte.

Un « Online Data Supplement » a donc été ajouté afin de pouvoir notamment détailler les méthodes de l'étude.

Contribution prépondérante de l'étudiante (Estelle Manguin) dans l'organisation du projet, l'acquisition, l'analyse et l'interprétation des données ainsi que dans l'écriture du manuscrit. Juliette Jamon eu la charge de scorer le mucus trachéal à l'aveugle et a révisé la portion de l'étude y attendant. Valérie Dubuc et Kristine Picotte ont participé à l'acquisition des données ainsi qu'à la révision du manuscrit. Dr Robert Dickson, notre collaborateur, a contribué à l'analyse et à l'interprétation des données, ainsi qu'à la révision du 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 de l'article sont placées entre parenthèses tandis que celles du supplément des méthodes sont entre crochets, afin de pouvoir les distinguer des références propres au manuscrit.

Inhaled corticosteroids influence pulmonary microbiota in severe equine asthma

Estelle Manguin¹, Juliette Jamon¹, Valérie Dubuc¹, Kristine Picotte¹, Robert P. Dickson², Mathilde Leclere¹

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

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

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

Keywords: asthma, corticosteroids, horses, microbiota, pulmonary disease, 16S rRNA gene

List of abbreviations: AMOVA: analysis of molecular variance; ANOVA: analysis of variance; BAL: bronchoalveolar lavage; BALF: bronchoalveolar lavage fluid; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; ddPCR: digital droplet polymerase chain reaction; DNA: deoxyribonucleic acid; ICs: inhaled corticosteroids; LABA: long-acting β 2-agonist; LDA: linear discriminant analysis; LEfSe: linear discriminant analysis effective size; OTU: operational taxonomic units; PaO₂: arterial partial pressure of oxygen; PaCO₂: arterial partial pressure of carbon dioxide; PCoA: principal coordinate analysis; PBS: phosphate buffered saline; RDP: Ribosomal Database Project; rRNA: ribosomal ribonucleic acid

DECLARATIONS

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.

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 (protocol #18-Rech-1760).

Human Ethics Approval Declaration: Authors declare human ethics approval was not needed for this study.

I. ABSTRACT

The use of inhaled corticosteroids (ICs) influence the respiratory microbiota. In patients with asthma, it is however difficult to separate the immunomodulatory effects of ICs from their indirect effects via improvement of ventilation. Our objective was to determine if ICs alter the lung microbiota independently from their effects on lung function, in an equine model of severe neutrophilic asthma. To do so, we treated horses with severe asthma with either bronchodilators alone, or in combination with ICs. Twelve horses in exacerbation received long-acting β_2 -agonist (LABA, salmeterol) or ICs/LABA (fluticasone/salmeterol) by inhalation for 2 weeks. Lung function and bronchoalveolar lavages (BAL) were performed before and after treatment. Quantification and sequencing of the 16S rRNA gene were performed on BAL fluid, using digital droplet PCR and the Illumina MiSeq platform. Data were processed using the software package mothur v.1.44.2. Lung function improved with both treatments. In the LABA group, pulmonary bacterial load and the relative abundance of Actinobacteria and Verrucomicrobia phyla decreased with treatment ($P < 0.05$ for both), and β -diversity differed from baseline ($P = 0.007$). The relative abundance of families and genera belonging to the Bacteroidetes phylum increased with ICs/LABA ($P < 0.05$). The pulmonary microbiota is influenced by treatments and the differences observed between the ICs/LABA and LABA groups suggest that the changes in bacterial communities observed in other studies with ICs treatment are not solely due to improved ventilation. However, it is too early to determine if these effects are positive or detrimental to the lung environment.

II. INTRODUCTION

The lungs contain a low but diverse biomass composed of bacteria, fungi, and other micro-organisms. The role of bacterial infection or colonization in the development of asthma is uncertain, but it could be a contributing factor to exacerbations of clinical signs (1). The pulmonary inflammation induced by antigen inhalation and the associated bronchoconstriction could change the local environment of the lungs (decreased oxygen tension, lower pH, increased mucus), promoting bacterial growth of some species to the detriment of others. This change in microbiota composition (dysbiosis) could in turn stimulate the local immune response and contribute to pulmonary inflammation. In people and in horses, the pulmonary microbiota is influenced by several factors, such as disease (2), the environment (3), and medication (4-6). In human asthma, changes in the composition of the lung microbiota are associated with pulmonary function and lung inflammation (7), as well as with corticosteroids resistance (8).

Corticosteroids are widely used to treat asthma as they are effective at controlling airway inflammation and improving pulmonary function (9). Corticosteroids can induce systemic as well as local immunosuppression within the respiratory tract (10,11). Inhaled corticosteroids could potentially influence pulmonary microbiota and promote the overgrowth of specific bacteria, which may in turn contribute to recrudescence of disease. Studies have also shown that corticosteroids can influence the pulmonary microbiota, by modulating relative abundances of different taxa, and influencing composition and diversity (β -diversity and α -diversity) (6,12-14). Recently, such effects of ICs have been described in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (15). However, the mechanisms involved have not been clearly elucidated. They could have immunomodulatory-mediated effects; but they could also have ventilation-mediated effects, altering the microbiota mainly by restoring better ventilation, restoring the normal local environment.

Severe equine asthma affects almost 15 % of adult horses in northern regions (16) and is characterized by reversible airway inflammation and airflow limitation. In genetically predisposed horses, exacerbations are induced by inhalation of antigens mostly present in hay (β -glucans, mites, endotoxins). Clinical exacerbations can be controlled with corticosteroid administration, bronchodilators, and decreased exposure to antigens (17). Clinical signs include wheezes, increased respiratory efforts, cough, and increased mucus. Diagnosis is based on the presence of compatible clinical signs when exposed to offending allergens, and documentation of pulmonary inflammation with bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology and documenting airflow limitation with lung function testing (17). Clinical exacerbations

are associated with an increase in pulmonary resistance and elastance, hypoxemia, and pulmonary inflammation (eosinophils, mast cells or neutrophils in the milder forms, predominantly neutrophils in the severe form). The impact of inhaled corticosteroids on the pulmonary microbiota of horses with severe asthma is unknown.

The main objective of this study was to determine if ICs alter the lung microbiota independently from their effects on lung function. To do so, we compare the pulmonary microbiota of horses treated with either bronchodilators (LABA) alone or in combination with ICs. We also compared the efficacy between treatments, with lung function data, blood gas analysis and BALF cytology. The hypothesis was that horses receiving ICs in addition to LABA would have different profiles of their lung microbiota than horses treated with LABA alone, despite similar improvement in lung function.

III. METHODS

1. Horses

Twelve adult horses with severe asthma belonging to the Equine Asthma Research Laboratory of University of Montreal were studied. Physiological data and history are found in the online supplement. Starting 6 weeks prior to the study, and throughout the study duration, horses were housed in the same barn, on wood shavings, with daily turnouts. They were fed the same dry hay and concentrates. The experimental protocol was performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines and was approved by the Animal Care Committee of the University of Montreal (protocol #18-Rech-1760).

2. Experimental design

Once all horses were in clinical exacerbation, they were assigned to two different treatment groups by ranked randomization based on airway resistance. For 2 weeks, the group ICs/LABA received the combination fluticasone and salmeterol (Advair® 250 HFA MDI, GlaxoSmithKline, 2 500/250 µg q12 h, n = 6) while the group LABA received salmeterol alone (Sigma-Aldrich, 250 µg q8 h, n = 6). The goal was that both groups would have similar improvement of lung function, to isolate the ICs effects from the effects of the improvement of function. Drug dosages have previously shown to improve function in severe equine asthma (18,19). Clinical scores, tracheal mucus, lung function, BALF inflammation, 16S rRNA gene quantification and sequencing were assessed pre- and post-treatment.

3. Clinical score, tracheal score, and lung function

Clinical scores were assessed by personnel blinded to group allocation (20). Tracheal mucus scores were done by a person blinded to time, horse identification and group allocation, based on anonymized images taken during endoscopy (see data supplement) (21). Lung function was measured on standing, unsedated horses, using an esophageal catheter and a pneumotachograph (22). Gas exchange was assessed by arterial blood gas analysis sampled from the facial artery (arterial partial pressure of oxygen (P_aO_2) and carbon dioxide (P_aCO_2)) (see data supplement).

4. Sample collection

BALF was collected on standing, sedated horses using a 2.5 m videoendoscope (Olympus Medical Systems Corp, Olympus Canada Inc., Richmond Hill, ON, Canada) as previously described (23). To avoid upper airway contamination, the videoendoscope was first advanced in a protective sheath through the nasal passages until it reached the trachea. Then the videoendoscope was further advanced out of the sheath and into the right main bronchi until it lodged in a bronchus of approximately 10.5 mm in diameter. Additional details about the BALF collection and control specimens are provided in the data supplement.

5. Sample processing

Total DNA was extracted from samples using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen Toronto, ON, CA) following the manufacturer's instructions, with minor modifications (see data supplement). The V4 region of the bacterial 16S rRNA gene was amplified and sequenced using the Illumina MiSeq platform (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) with a MiSeq Reagent Kit V2 (2x250 bp cycles) according to the manufacturer's instructions with modifications for low-biomass samples (see data supplement). Bacterial 16S rRNA gene was also quantified using digital droplet PCR (ddPCR) (see data supplement).

6. Data analysis

Sequence data were processed using the software mothur v.1.44.2, following the Standard Operating Procedure previously described (24,25). Good quality reads were clustered in operation taxonomic units (OTU) at the genus, family and phylum levels and classified according to the Ribosomal Database Project (RDP) databank. Additional details are provided in the data supplement.

IV. RESULTS

1. Horses

There was no significant difference between groups for age, sex, and weight (Supplementary Table E1). As expected, horses were in clinical exacerbation of the disease with antigen exposure before the treatment period. They had increased respiratory efforts and coughing. Treatments improved clinical scores in both groups ($P = 0.024$ and $P = 0.039$ in ICs/LABA and LABA group, respectively), without difference between groups ($P = 0.28$) (Figure 1).

2. Lung function

Horses developed airway obstruction with antigen exposure, characterized by lung resistance greater than 1 cmH₂O/L/sec. Treatments improved lung resistance, lung elastance, and difference in pleural pressure in both groups ($P < 0.0001$, $P = 0.0004$, and $P < 0.0001$ in ICs/LABA group; $P = 0.0057$, $P = 0.0013$, and $P = 0.0006$ in LABA group), without significant difference between groups ($P = 0.08$, $P = 0.44$, and $P = 0.13$) (Figure 1).

Most of horses developed mild to moderate hypoxemia and hypercapnia with antigen exposure. Arterial blood gas analyzes did not differ between groups before treatments (P_{aO_2} : $P = 0.68$; P_{aCO_2} : $P = 0.46$). P_{aO_2} improved with ICs/LABA treatment ($P = 0.028$), whereas P_{aCO_2} did not change with treatments ($P = 0.0504$) (Figure 2).

Both groups had nearly similar improvement of lung function.

3. Lung inflammation

As expected, horses developed lung inflammation with antigen exposure, characterized by bronchoalveolar lavage neutrophilia and increased tracheal mucus score. There was no significant effect of treatment in either group (tracheal mucus: $P = 0.31$ in LABA group and $P = 0.61$ in ICs/LABA group; BAL neutrophilia: $P = 0.14$ in LABA group and $P = 0.66$ in ICs/LABA group), which was expected considering the absence of environmental change (Supplementary Figure E1).

4. Bacterial DNA load

There was a small but significant reduction in the amount of 16S rRNA gene copies addressed by ddPCR after LABA treatment only ($P = 0.0496$; Supplementary Figure E2). There was no significant difference between groups and after ICs/LABA treatment ($P = 0.16$, and $P = 0.15$, respectively).

5. Sequencing results

Control specimens

Taxa detected in control specimens were significantly distinct from those detected in BALF specimens ($P < 0.001$, AMOVA). The five most abundant operational taxonomic units (OTUs) detected in control specimens (47.8 % of all sequences), were classified as *Pseudomonas* (OTU1), *Flavobacterium* (OTU2 and OTU3), *Bacillus* (OTU5), and an unclassified *Enterobacteriaceae* (OTU6). Collectively, these OTUs represented 23.4 % of sequences detected in BALF specimens, especially OTU2 and OTU3 which represented 14.3 % and 7.4 % respectively. Since these OTUs, belonging mostly to the *Flavobacterium* and *Pseudomonas* genera, could represent environmental and procedural contaminants, we repeated relative abundance, α - and β -diversity analyzes by excluding these 2 genera. We found no major differences between analyzes with or without these genera, so no taxa were excluded from the final analysis.

Number of reads

A total of 865 858 reads passed all quality filters and were retained for microbiota analysis from a total of 1 163 783 reads. A subsample of 4 132 reads per sample was used for α - and β -diversity analysis to decrease potential bias caused by nonuniform sample sizes. Coverage after subsampling and removing sequences found twice or less was on average 99,9 %.

Relative abundance of the most common phyla, families, and genera

The relative abundances of the most common phyla, families, and genera found in each group are presented in Figures 3.

Sequences were classified into 23 different phyla, 4 of them accounting for 78.4 % of the total number of sequences. The majority of OTUs were assigned to the Bacteroidetes (on average 35.8 %) and the Proteobacteria phyla (29.9 %), followed by the Firmicutes (6.7 %) and Planctomycetes phyla (6.0 %). Bacteria that were unclassified at the phylum level represented 11.6 % of sequences. Among the 10 most common phyla (relative abundance > 1%), no significant differences were found between groups before and after treatments. However, treatment with LABA only resulted in a decrease of Actinobacteria ($P = 0.031$) and Verrucomicrobia phyla ($P = 0.022$), which was not observed with ICs/LABA (Figure 4A).

The 19 most common families (> 1% abundance) found in BALF samples represented together 82.3 % of all sequences. Other than the bacteria unclassified at the family level, the 4 most common families were *Flavobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Planctomycetaceae*, and *Comamonadaceae* (representing overall 24.2 %, 10.2 %, 6.0 %, and 5.3 % of all sequences, respectively). Among the 19 most common families, Bacteroidetes unclassified at the family level were relatively enriched after ICs/LABA treatment ($P = 0.034$).

Moraxellaceae (Proteobacteria phylum) were enriched in LABA group compared to ICs/LABA group before treatment ($P = 0.028$). Except for these two families, no significant differences for others common families were found between groups and time-points (Figure 4B).

The 21 most common genera (> 1% abundance) found in BALF samples represented together 77.3 % of all sequences. Other than the bacteria unclassified at the genus level, the 4 most common genera were *Flavobacterium*, *Pasteurellaceae* unclassified at the genus level, *Comamonadaceae* unclassified at the genus level, Bacteroidetes unclassified at the genus level (representing overall 22.8 %, 6.6 %, 5.2 %, and 4.9 % of all sequences, respectively). Among these 21 most common genera, Bacteroidetes unclassified at the genus level were relatively enriched after ICs/LABA treatment ($P = 0.034$), as they were at the family level. *Acinetobacter* (Proteobacteria phylum, *Moraxellaceae* family) was also enriched in LABA group compared to ICs/LABA group before treatment ($P = 0.028$). No other significant differences for other common genera were found between groups and time-points (Figure 4C).

Relative abundance analyzed using the LEfSe method at the genus level

The difference in relative abundance at the genus level was also analyzed using LEfSe (Figure 5). This method combines statistical significance with biological consistency and effect size estimation, and allows for comparison of low-abundance genera.

Bacteria unclassified at the genus level decreased with both treatments. Three other genera were significantly overrepresented after ICs/LABA treatment. The LEfSe analysis further supported the increase in relative abundance of members of Bacteroidetes phylum observed in the relative abundance analysis, and identified two other genera that were overrepresented in ICs/LABA group, including *Acinetobacter* (Proteobacteria phylum, *Moraxellaceae* family) and genera belonging to *Microbacteriaceae* family (Actinobacteria phylum).

α -diversity: richness and diversity within samples

The Chao richness estimator, the Inverse Simpson index, and the Shannon diversity index were used for characterization of α -diversity. No significant changes were found between groups or time-points (Figure 6).

β -diversity: structure and membership at the genus level between samples

β -diversity (structure and membership) was compared between groups with the PCoA plots and the AMOVA test at the genus level. In terms of membership, the samples did not cluster significantly ($P =$

0.325) (Figure 7A). In contrast, the samples differed significantly between pre- and post-LABA groups ($P = 0.007$) in the structure's PCoA plot (Figure 7B).

Correlation between sequencing, bacterial quantification, lung function, lung inflammation, and clinical score

During exacerbation of asthma (pre-treatment period), some markers of severity were associated with a decrease of diversity or an increase of bacterial load (Inverse Simpson index/nasal score: $r = -0.59$, $P = 0.045$; ddPCR/ P_aCO_2 : $r = 0.59$, $P = 0.049$). After treatments, a reduced lung inflammation was associated with a decreased bacterial load ($r = 0.85$, $P = 0.001$).

V. DISCUSSION

Inhaled corticosteroids influence the pulmonary microbiota independently of their effects on lung function

This study investigated the differences in pulmonary microbiota between horses with severe equine asthma treated with either LABA alone or in combination with ICs. This study confirmed that the pulmonary microbiota is influenced by treatments and that the differences observed between the ICs/LABA and LABA groups suggest that ICs can alter the lung microbiota independently from their effects on lung function. With LABA alone, there was a decrease in bacterial load, a decrease in the relative abundance of Actinobacteria and Verrucomicrobia phyla, and a modified β -diversity. These changes were expected with improvement of lung function and ventilation, without the anti-inflammatory effect of glucocorticoids. On the other hand, the improvement of lung function in the group treated with the combination ICs/LABA was only associated with changes in the relative abundance of certain taxa (an increase in *Acinetobacter* genus, in members of Bacteroidetes phylum, and in taxa belonging to the Actinobacteria), with no effect on bacterial load and β -diversity. Interestingly, an increase of members of Bacteroidetes phylum has been also observed in the trachea of horses treated with intramuscular dexamethasone (26), and humans with asthma receiving ICs had greater abundance of *Acinetobacter* genus compared to those without ICs treatment (13).

In human asthma, ICs are reported to modulate the relative abundances of different taxa (5,13,14). In addition, some studies report a change in β -diversity with ICs treatment (14), contrary to others (5). To our knowledge, no effect on α -diversity or bacterial load were previously reported with inhalation of corticosteroids (5,14).

Intramuscular dexamethasone in horses with moderate asthma influenced tracheal microbiota (26), however, no significant differences were found with nebulized dexamethasone (27). Interestingly, the nebulization of injectable dexamethasone did not improve lung function in horses with severe asthma (28,29). The lack of influence of nebulized dexamethasone on pulmonary microbiota in the Leguillette and Bond study could therefore support that ICs have more effects via improvement of ventilation than via direct effects on respiratory microbiota.

Potential mechanisms of action of corticosteroids on pulmonary microbiota

The mechanisms by which ICs influence the lung microbiota has not been clearly elucidated. They could act "directly" on bacteria, with their immuno-modulatory and anti-inflammatory effects (26,30); or they could improve lung function first and modulate local microbiota consequently (31). Another explanation could be a selective pressure exerted by ICs treatment, favoring the growth of bacteria capable of metabolizing corticosteroids (5). In this study, the lack of decrease in bacterial load following ICs/LABA treatment, contrary to LABA treatment alone, favors the hypothesis that ICs could promote bacterial growth of some taxa to the detriment of others. This assumption is reinforced by the results of the relative abundances and the LEfSe analyzes, which highlighted taxa overrepresented after ICs/LABA treatment. However, it is premature to conclude whether these effects are positive or detrimental. Indeed, corticosteroids have already been implicated in the secondary development of pneumonia in human patients with asthma or COPD (30), and macrolide antibiotic administration has been used in addition to bronchodilators and corticosteroids to improve lung function in asthmatic human patients (32). Perhaps bacterial overgrowth in horses with asthma treated with corticosteroids should be controlled to improve treatment success, especially in cases with a poor response to corticosteroids therapy.

Recent studies also reported effects of ICs on the pulmonary mycobiota and revealed imbalances of trans-kingdom network between fungal and bacterial microbiota in humans with asthma (13,14).

Influences of lung function and inflammation on microbiota analysis

In people, asthma exacerbation could be associated with a decreased pulmonary bacterial load and a decrease of α -diversity indices (2,6). However, another study reported an increased α -diversity during exacerbation, a negative correlation between bacterial load and respiratory hyperreactivity, and no increase of global bacterial load (7). Horses in exacerbation of asthma presented a higher richness compared to remission period, but no effect on diversity and bacterial load were reported in that same study (33). Here, a more severe disease based on P_aCO_2 and nasal score was associated with an increased

bacterial load and a decreased α -diversity, respectively. In post-treatment period, a decreased bacterial load was also associated with a lower lung inflammation.

Strengths and limits of the study

Strengths of this study include strict attention to the quality of the methods, with the inclusion of negative controls at sample collection, during extraction, and throughout sequencing. Another strength of this study was the technique used to collect BALF samples and to avoid upper respiratory tract contaminations. Finally, all horses were housed on the same barn and received the same food to avoid confounding variables since environmental management influence pulmonary microbiota (33). However, horses presented with severe clinical score were sometimes turned out longer than others during the study period. These variations could explain differences observed between groups before treatment, as reported with *Moraxellaceae* family and *Acinetobacter* genus.

The limits of this study included the fact that bronchodilators could have direct influence on the microbiota (34), and not only secondary to the improvement of lung function. In addition, horses receiving ICs/LABA had a slightly better ventilation than horses receiving only LABA, but an experimental model with horses receiving only ICs was not feasible.

Contamination from the environment or from commercial kits is a critically important issue in microbiome analysis, particularly when samples contain a low biomass like pulmonary microbiota. Here, *Flavobacterium* and *Pseudomonas* genera could represent true environmental or procedural contaminants. They could also be part of pulmonary microbiota and removing them could falsely increase relative abundances of other bacteria. Currently, no clear consensus to manage suspect contaminations are formulated in microbiome analysis. We re-run the analysis with and without contaminants and concluded that the results were not affected by their presence. Small sample size in each group ($n = 6$) could also have impaired our ability to detect differences in community profiles between treatment groups. The results presented in this manuscript must be interpreted with consideration of the small sample size and might not generalize well to other equine populations. Finally, the relatively large number of unclassified bacteria could limit the detection of differences between communities.

Future directions

To investigate if the microbiota look like that of remission status after ICs treatment, it would be interesting to compare the pulmonary microbiota of horses treated with either medication or allergen avoidance. In addition, it would be of interest to analyze the duration of microbiota alteration following treatments.

Finally, mycobiota, metagenomics and functional pathway analyzes are still poorly described in horses and deserve furthers studies.

VI. CONCLUSION

The pulmonary microbiota is influenced by treatments and the differences observed between the ICs/LABA and LABA groups suggest that the changes in bacterial communities are not only due to improved ventilation. However, it is too early to determine if the effects of ICs are positive or detrimental to the lung environment.

VII. FIGURES

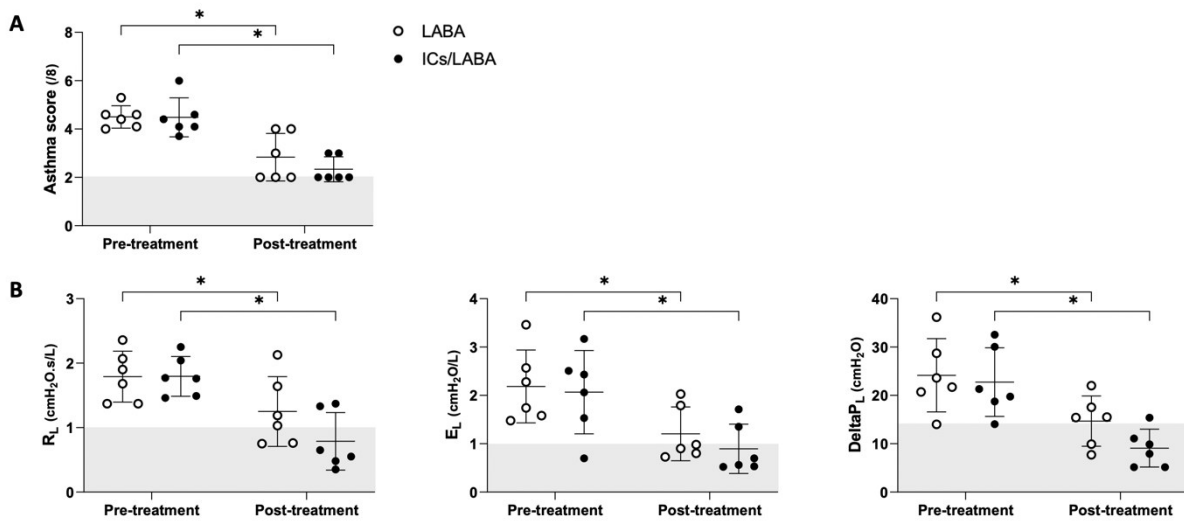


Figure 19 - (figure 1 article) : Asthma score (A) and standard lung mechanics (DeltaPL: difference in pleural pressure, RL: lung resistance, EL: lung elastance) (B) in horses with severe asthma before and after treatments. Open circles: horses treated with LABA. Solid circles: horses treated with ICs/LABA. Black lines represent the mean and SD. Grey area represents normal values in healthy horses.

*: significant difference within group.

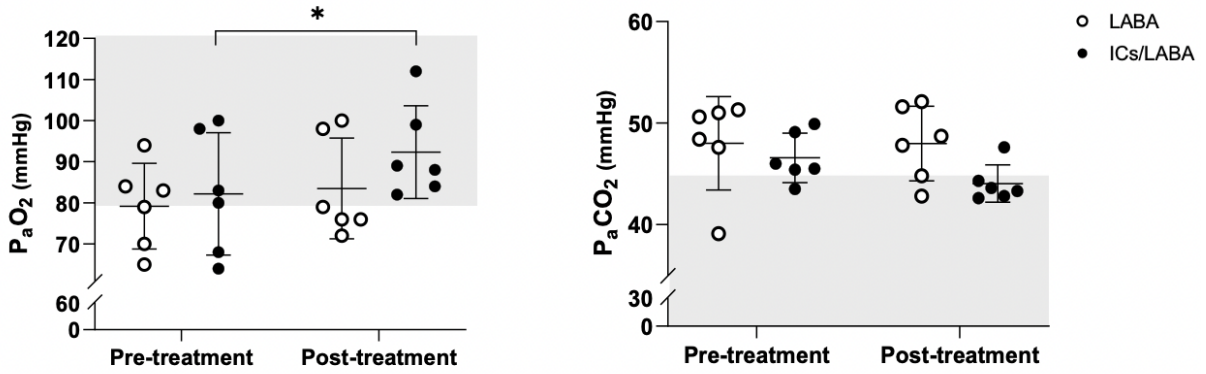


Figure 20 - (figure 2 article) : Arterial blood gas analyzes (P_aO_2 : arterial partial pressure of oxygen, P_aCO_2 : arterial partial pressure of carbon dioxide) in horses with severe asthma before and after treatments. Open circles: horses treated with LABA. Solid circles: horses treated with ICs/LABA. Black lines represent the mean and SD. Grey area represents normal values in healthy horses.

*: significant difference within group

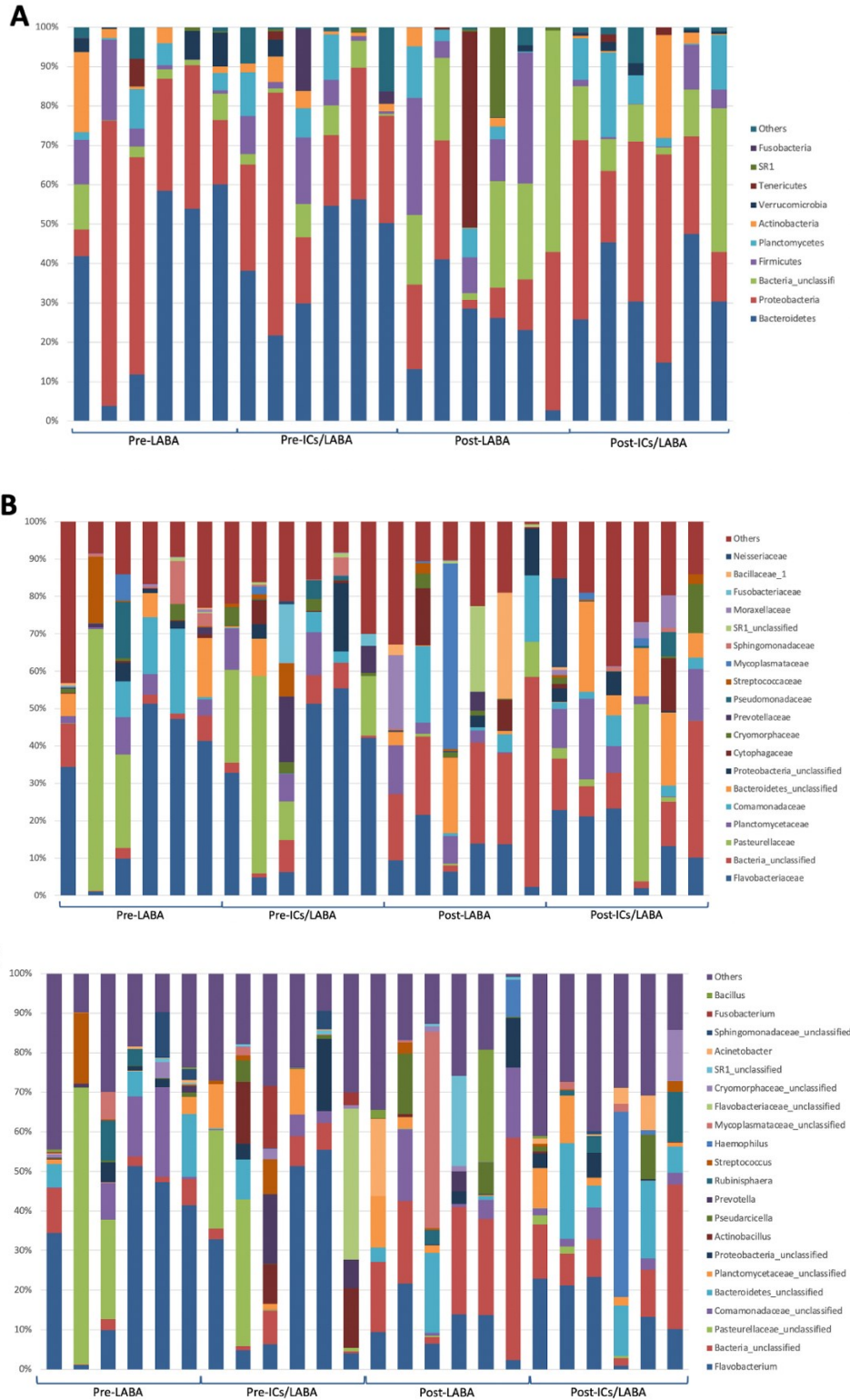


Figure 21 - (figure 3 article) : Relative abundance of predominant bacteria at the phylum (A), family (B), and genus (C) levels. Only the 10 most common phyla, the 19 most common families, and the 21 most common genera are represented

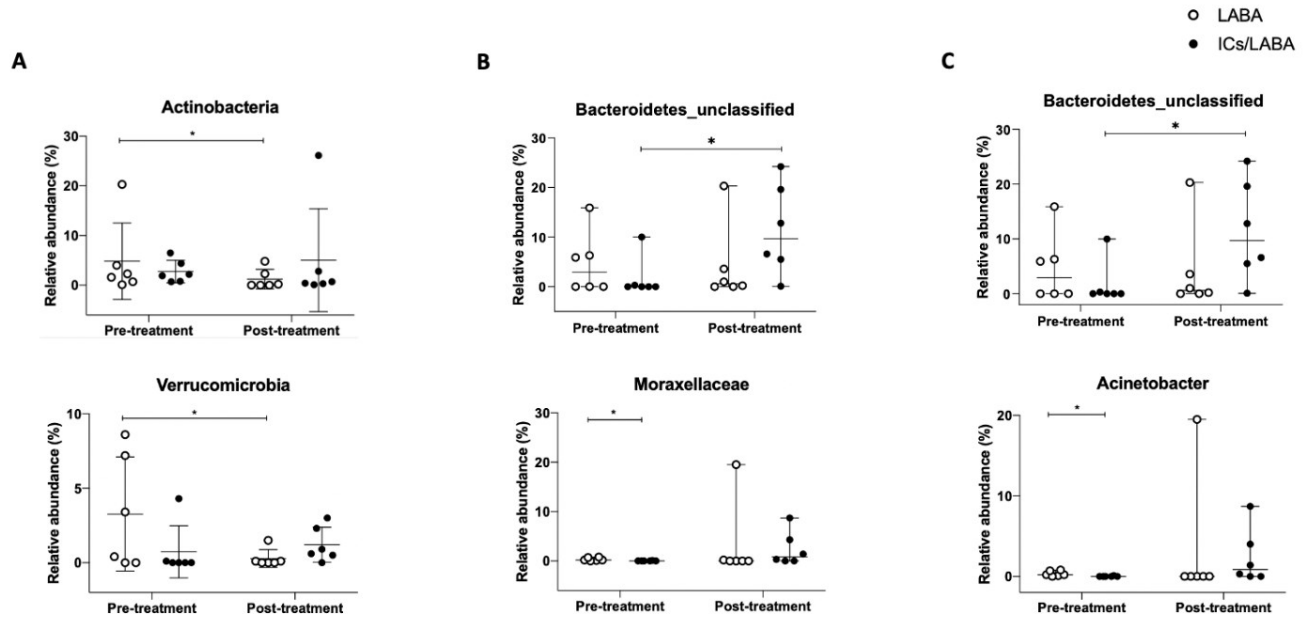


Figure 22 - (figure 4 article) : Relative abundance of predominant bacteria at the phylum (A), family (B), and genus (C) levels. Open circles: horses treated with LABA. Solid circles: horses treated with ICs/LABA. Black lines represent the mean and SD. *: significant difference within group

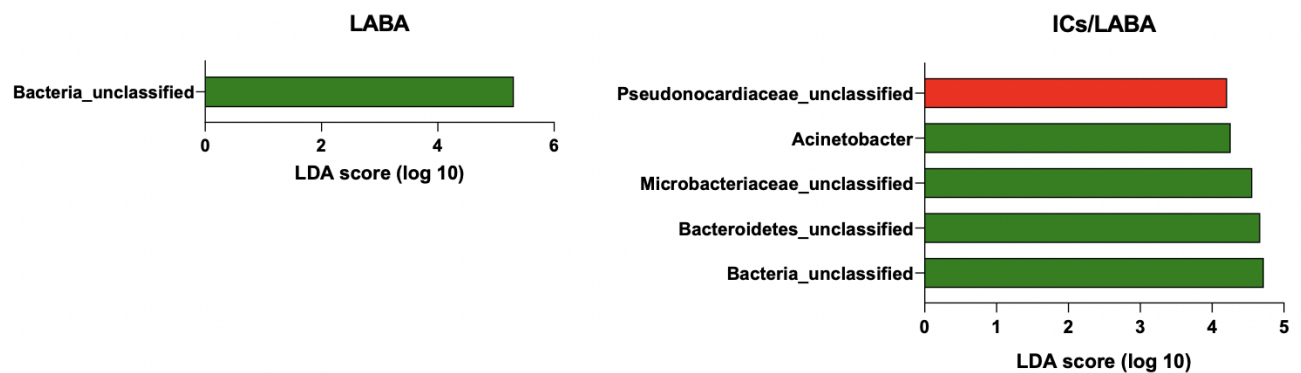


Figure 23 - (figure 5 article) : Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis showing genera that were significantly differentially abundant before (in red) and after (in green) treatments

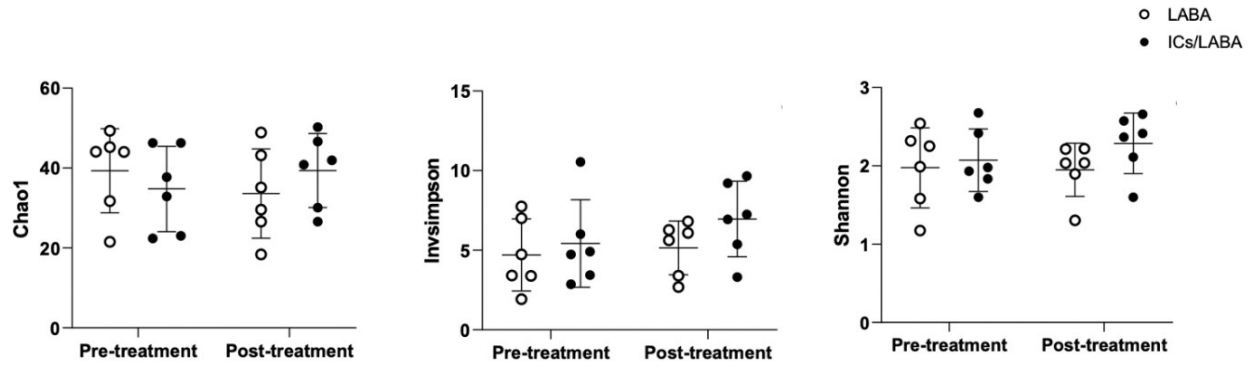


Figure 24 - (figure 6 article) : Indices of alpha diversity at the genus level of taxonomy. Open circles: horses treated with LABA. Solid circles: horses treated with ICs/LABA. Black lines represent the mean and SD

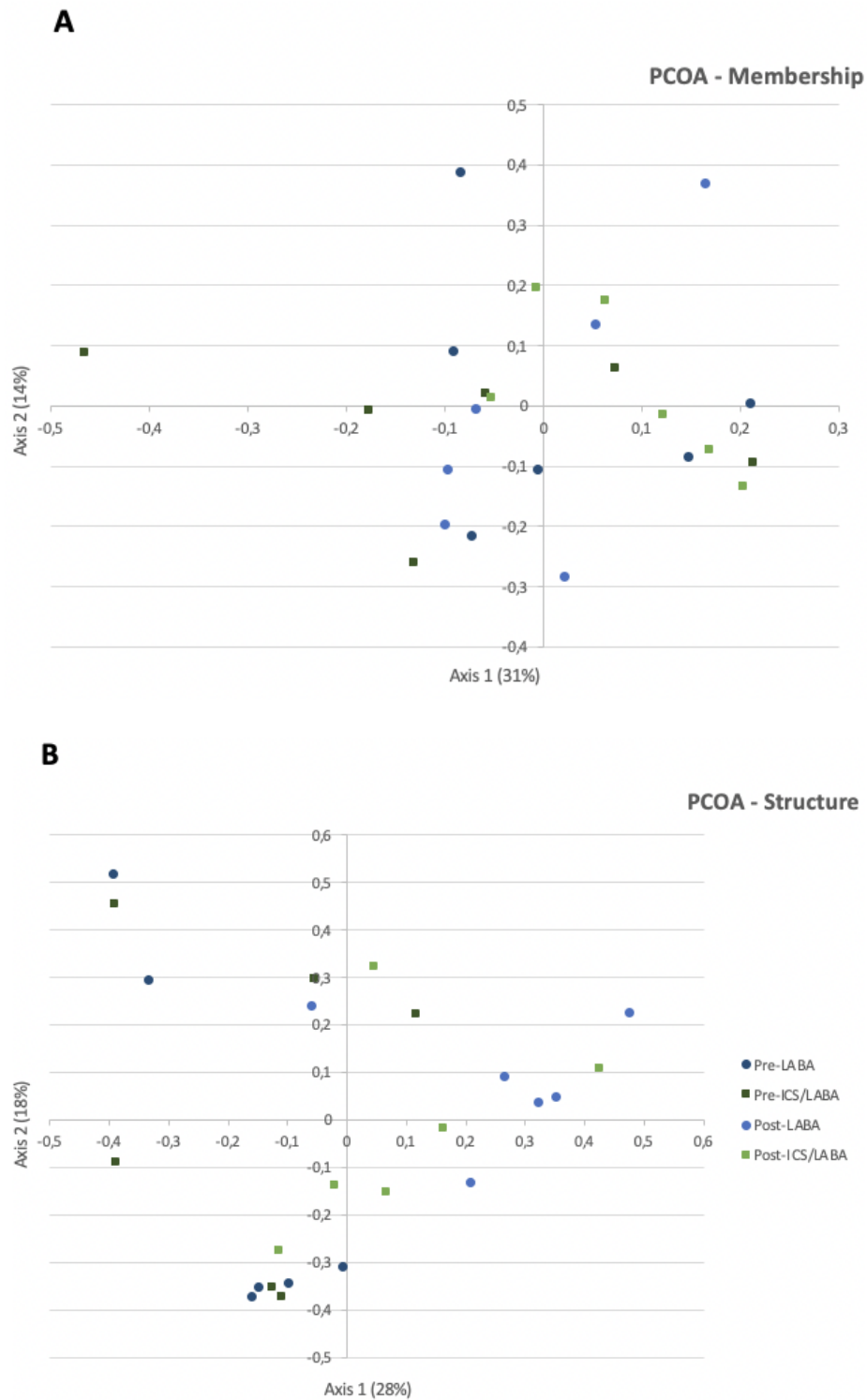


Figure 25 - (figure 7 article) : Principal coordinate analysis (PCoA) of bacterial communities at the genus level by horses. Bidimensional representation of the principal coordinate analysis of bacterial communities' membership using the Classic Jaccard index (A) and structure using the Yue and Clayton index (B).

VIII. ONLINE DATA SUPPLEMENT

Methods

Treatment modalities

Fluticasone/salmeterol combination was administered by means of an equine aerosol chamber (AeroHippus, Trudell Medical International, Canada), following the manufacturer instructions. Salmeterol powder was solubilized in sterile phosphate buffered saline (PBS) at a concentration of 250 µg/ml, using Tween20 (Sigma-Aldrich). Salmeterol was administered using a face-tight mask equipped with a mobile ultrasonic nebulizer (SaHoMa, NEBU-TEC International, Germany).

Clinical score

Nasal and abdominal scores were added to obtain a combined clinical score ranging from 2 to 8, as previously described [1]. Nasal flaring was scored from 1 to 4 as follows: 1 = no flaring, 2 = slight, occasional flaring of nostrils, 3 = moderate flaring of nostrils, and 4 = severe continuous flaring of nostrils. The abdominal component of breathing was scored from 1 to 4 as follows: 1 = no abdominal component, 2 = slight abdominal movement, 3 = moderate abdominal movement, and 4 = severe, marked abdominal movement.

Lung function

Standard lung mechanics was assessed on standing, unsedated horses, as previously described [2]. Briefly, transpulmonary pressure was estimated by means of an esophageal balloon and respiratory flows detected using a heated pneumotachograph connected to a face-tight mask placed on the nose of the horse. Pulmonary resistance and elastance were then computed using dedicated software (Labdat/Anadat program on MS-DOS, and flexiWare software, SCIREQ, Canada). A single-compartment linear model of the lung was employed, expressed as: $\Delta P_L = (E_L \times V) + (R_L \times Q) + k$, where ΔP_L : transpulmonary pressure, E_L : pulmonary elastance, V : tidal volume, R_L : pulmonary resistance, Q : respiratory flow, and k : transpulmonary end-expiratory pressure.

Arterial blood samples were taken using minimal restraint (head collar) in unsedated horses breathing ambient air. All samples were collected anaerobically into pre-heparinized syringes (Arterial Blood Gas Sampler 9025TRU, Vyair Medical Inc., Mettawa, IL, USA) by direct needle puncture of the transverse facial. A minimum of 0.5 mL of blood was collected, and samples were analyzed immediately using an automated handheld blood-gas analyzer (i-STAT, Abbott Point of Care, Abbott Laboratories, Chicago, IL,

USA). Partial pressure of oxygen (P_{aO_2}) and partial pressure of carbon dioxide (P_{aCO_2}) were recorded. Correction for the rectal temperature was performed.

Tracheal mucus score

Tracheo-bronchoscopy was performed on standing, sedated (detomidine (Dormosedan, Zoetis, Parsippany, NJ, USA) 0.008-0.1 mg/kg IV, and butorphanol (Torbugesic, Zoetis, Florham Park, NJ, USA) 0.01-0.02 mg/kg IV) horses using a 2.5 m fiber-optic videoendoscope (Olympus, GIF-H180, Olympus Canada Inc., Richmond Hill, ON, Canada). To avoid upper airway contamination, the videoendoscope was first advanced in a protective sheath through the nasal passages until the trachea. Then the videoendoscope was further advanced out of the sheath and into the proximal-mid trachea.

Tracheal mucus accumulation was scored from 0 to 5, as previously described [3], with 0 corresponding to no mucus, 1 to little mucus accumulation in small blobs, 2 to moderate mucus accumulation, 3 to marked, stream forming mucus blobs, 4 to large, pool-forming accumulation, and 5 to extreme accumulation of mucus. A score greater than 2 was considered abnormal [4].

Bronchoalveolar lavage

BALF was collected as previously described [5]. After tracheal mucus scoring, the videoendoscope was further advanced into the right main bronchi until it lodged in 10 mm diameter bronchi while infusing 60 to 120 mL of sterile lidocaine 0.5 %. Two boluses of 250 mL of sterile prewarmed isotonic saline (0.9 % NaCl) were infused and quickly aspirated.

Smears were prepared by cytocentrifugation (Cytospin model II, Shandon Southern Instruments, Sewickley, PA, USA) and stained with a modified Wright-Giemsa (DiffQuick, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Differential count was performed on 400 nucleated cells, excluding epithelial cells.

All samples were put immediately on ice and processed within 2 hours. 15 ml of samples for quantification and sequencing were frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Remaining BALF cells were centrifuge at 1 600 rpm at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, washed twice in PBS 1X and total cell count was determined (ADAM automatic Cell Counter, Montreal-Biotech Inc., Montreal, QC, CA).

Between each BAL, the videoendoscope and the protective sheath were disinfected with multi-enzymatic solution, immersed for 10 minutes in a 1 % concentrated 21.4 % W/W Potassium monopersulfate solution (Virkon[®], 02125021, Vetoquinol Inc., Lavaltrie, QC, Canada), and rinsed with ultra-pure injectable pharmaceutical grade water.

Control specimens

Prior to each BAL procedure, 50 mL of sterile saline was instilled through the main channel of the videoendoscope, collected in sterile tubes, and further processed as BALF samples (scope rinse specimens). Twenty reagent control specimens were also collected since reagents used in DNA isolation and library preparation contain bacterial DNA that can contaminate BALF samples [6]. Samples from the air in the barn (n = 3), the air in the biological safety cabinet (n = 2), lidocaine (n = 4) and sterile water (n = 4) instilled during BAL procedure were also collected, quantified, and sequenced.

DNA extraction

Five ml of each sample was centrifuged for 30 min at 13 200 revolutions per minute. Supernatant was removed and the pellet was resuspended in 100 µl of PBS. DNA extraction was performed with the QIAGEN DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada) on samples following manufacturer's instructions with minor modifications. An enzymatic lysis buffer was used for pre-treatment instead of mechanical lysis, and the elution volume was 50 µl instead of 100 µl.

After DNA extraction, 20 µl of each sample was sent to the University of Michigan Medical School to perform bacterial quantification by ddPCR and high throughput sequencing.

High throughput sequencing

Sequencing was performed using the MiSeq IEMFileVersion 4 platform (Illumina) with a MiSeq Reagent Kit V2 (500 cycles) according to the manufacturer's instructions with modifications for low-biomass samples. The V4 region of the bacterial 16S rRNA gene was amplified by PCR using published primers, as previously recommended [7]. Briefly, Accuprime High Fidelity Taq was used in place of Accuprime Pfx SuperMix. Primary PCR cycling conditions were 95 °C for two minutes, followed by 20 cycles of touchdown PCR (95 °C 20 sec, 60 °C 20 sec and decreasing 0.3 °C each cycle, 72 °C 5 min), then 20 cycles of standard PCR (95 °C for 20 sec, 55 °C for 15 sec, and 72 °C for 5 min), and it finished with 72 °C for 10 min.

Digital droplet PCR

Bacterial DNA was quantified using a QX200 Droplet Digital PCR System (BioRad, Hercules, CA, USA). Primers and cycling conditions were performed according to a previously published protocol [8]. Specifically, primers were 5'- GCAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' (63F) and 5'- CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3' (355R). The cycling protocol was: 1 cycle at 95 °C for 5 min, 40 cycles at 95 °C for 15 sec and 60 °C for 1 min, 1 cycle at 4 °C for 5 min, and 1 cycle at 90 °C for 5 min all at a ramp rate of 2 °C/sec. The BioRad C1000

Touch Thermal Cycler (BioRad, Hercules, CA, USA) was used for PCR cycling. Droplets were quantified using the Bio-Rad Quantisoft software (BioRad, Hercules, CA, USA). Two replicates were used per sample.

Data analysis

Sequence data were processed using the software mothur v.1.44.2, following the Standard Operating Procedure using a minimum sequence length of 250 base pairs, as previously described [9,10]. Good quality reads were clustered in OTU (97 % similarity) at the genus, family and phylum levels and classified according to the Ribosomal Database Project (RDP) databank. Sequences that were present ≤ 2 times were removed from analysis.

Statistical analyses were performed using commercial software (GraphPad Prism 8.0.1; mothur v.1.44.2). Normality was assessed by visual inspection and by statistical tests. Data not normally distributed were transformed (arcsine square root transformation). Parametric (analysis of variance (ANOVA)) or non-parametric (Wilcoxon matched-pairs signed rank test, Mann-Whitney test, Mantel-Haenszel test, Cochran-Mantel-Haenszel test) tests were used when appropriate. Age, sex, and weight were compared between groups with t tests and Fisher's exact tests. For all statistical tests, values of $P < 0.05$ were considered significant.

For relative abundance analysis, samples were normalized to the percent of total reads and we restricted analysis to major taxa (relative abundance greater than 1 %). All taxa were included in diversity analysis.

α -diversity, which give characteristics of individual samples (richness: total number of taxa, evenness: distribution of taxa, and diversity: mathematical equation that takes into account richness and evenness), was assessed by the Chao richness estimator, Simpson index, and Shannon index. β -diversity allows direct comparison between samples. The Jaccard index and the Yue and Clayton index were used to analyze β -diversity by comparing community membership (that considers the different taxa) and structure (that considers the different taxa and their distribution within the community), respectively.

β -diversity was compared using the analysis of molecular variance (AMOVA) tests and was also explored visually using principal coordinate analysis (PCoA). Differences between groups were further explored using linear discriminant analysis effective size (LEfSe), which uses factorial Kruskal-Wallis sum-rank and a Wilcoxon rank-sum to detect features with biological significance by comparing the abundance in all populations, including those with low abundance. Finally, LEfSe uses linear discriminant analysis (LDA) to estimate the effect size of each differentially abundant feature. Alpha values for the factorial Kruskal-Wallis test among classes and for the pairwise Wilcoxon test between subclasses were set to 0.05.

Threshold on the logarithmic LDA score for discriminative features was set to 2.0 and the strategy for multiclass analysis was set to all-against-all.

Spearman correlations were also done between indices of α -diversity, bacterial quantification, lung function, lung inflammation, and clinical score at both time points (pre- and post-treatment).

Identification of procedural contaminants

As detailed above, we collected control specimens to identify the influence of procedural contamination. Specimens were processed in a randomized order to minimize the risk of false pattern formation due to reagent contamination. We compared the bacterial taxa detected in control specimens and in BALF using AMOVA and by comparing relative abundances of taxa between samples.

No bacterial taxa were excluded from final analysis.

References

- [1] Robinson NE, Olszewski MA, Boehler D, Berney C, Hakala J, Matson C, et al. Relationship between clinical signs and lung function in horses with recurrent airway obstruction (heaves) during a bronchodilator trial. *Equine Vet J.* 2000;32(5):393-400.
- [2] 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.
- [3] Gerber V, Straub R, Marti E, Hauptman J, Herholz C, King M, et al. Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Vet J.* 2004;36(7):576-82.
- [4] Couëtill LL, Cardwell JM, Gerber V, Lavoie JP, Léguillette R, Richard EA. Inflammatory Airway Disease of Horses--Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med.* 2016;30(2):503-15.
- [5] Lapointe JM, Lavoie JP, Vrins AA. Effects of triamcinolone acetonide on pulmonary function and bronchoalveolar lavage cytologic features in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res.* 1993;54(8):1310-6.
- [6] Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol.* 2014;12:87.
- [7] Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108 Suppl 1(Suppl 1):4516-22.

[8] Sze MA, Abbasi M, Hogg JC, Sin DD. A comparison between droplet digital and quantitative PCR in the analysis of bacterial 16S load in lung tissue samples from control and COPD GOLD 2. PLoS One. 2014;9(10):e110351.

[9] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol. 2009;75(23):7537-41.

[10] Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. Appl Environ Microbiol. 2013;79(17):5112-20.

Supplementary table

Tableau 4 - (Supp Table E1) : Age (years), sex, breed, and weight (kg) of horses including in the study

Treatment group	Age	Sex	Breed	Weight
LABA (n = 6)	28	Mare	Quarter Horse associated-breed	445
	15	Mare	Quarter Horse associated-breed	514
	12	Gelding	Canadian	646
	10	Gelding	Quarter Horse	577
	19	Mare	Paint	593
	14	Gelding	Quarter Horse associated-breed	499
ICs/LABA (n = 6)	14	Gelding	Quarter Horse	480
	15	Mare	Quarter Horse associated-breed	555
	18	Mare	Quarter Horse	508
	27	Gelding	Quarter Horse	520
	16	Mare	Paint associated-breed	559
	14	Mare	Thoroughbred	479

Supplementary figures

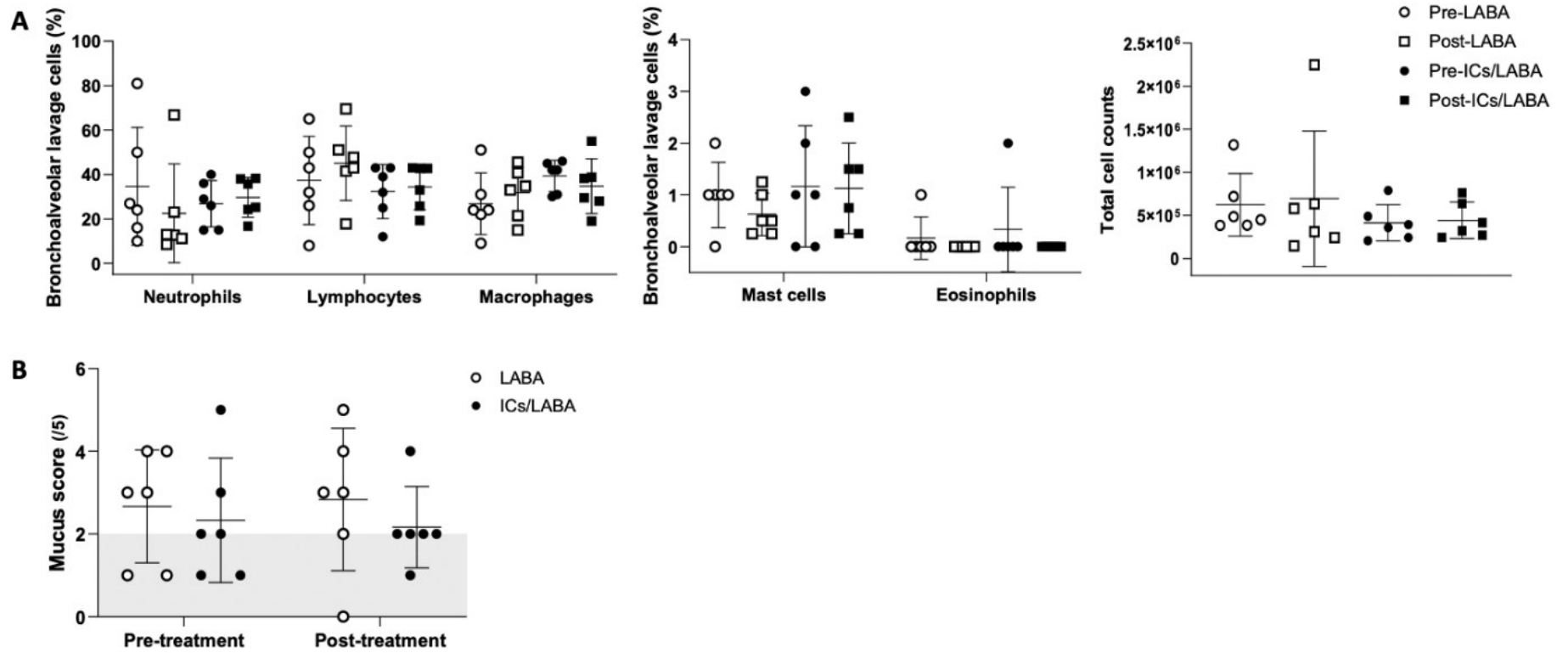


Figure 26 - (Supp Figure E1 article) : Bronchoalveolar lavage cells (A) and mucus score (B) in horses with severe asthma before and after treatments. Black lines represent the mean and SD. Grey area represents normal values in healthy horses

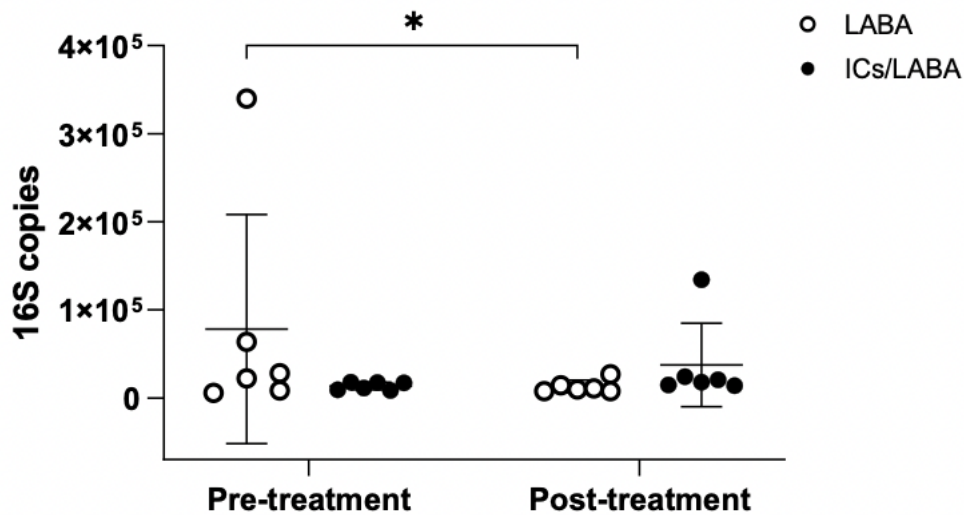


Figure 27 - (Supp Figure E2 article) : Bacterial 16S rRNA gene quantification by digital droplet PCR in horses with severe asthma before and after treatments. Open circles: horses treated with LABA. Solid circles: horses treated with ICs/LABA. Black lines represent the mean and SD.
*: significant difference within group

REFERENCES

- (1) Huffnagle GB, Dickson RP, Lukacs NW. The respiratory tract microbiome and lung inflammation: a two-way street. *Mucosal immunology* 2017;10:299-306.
- (2) Huang YJ, Nariya S, Harris JM, et al. The airway microbiome in patients with severe asthma: Associations with disease features and severity. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:874-884.
- (3) Vandenberghe LE, Enaud R, Urien C, et al. Type 2-high asthma is associated with a specific indoor mycobiome and microbiome. *J Allergy Clin Immunol* 2021;147:1296-1305.e1296.
- (4) Dickson RP, Morris A. Macrolides, inflammation and the lung microbiome: untangling the web of causality. *Thorax* 2017;72:10-12.
- (5) Huang YJ, Marsland BJ, Bunyavanich S, et al. The microbiome in allergic disease: Current understanding and future opportunities-2017 PRACTALL document of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology and the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2017;139:1099-1110.
- (6) Denner DR, Sangwan N, Becker JB, et al. Corticosteroid therapy and airflow obstruction influence the bronchial microbiome, which is distinct from that of bronchoalveolar lavage in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:1398-1405.e1393.
- (7) Huang YJ, Nelson CE, Brodie EL, et al. Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:372-381 e371-373.

- (8) Goleva E, Jackson LP, Harris JK, et al. The effects of airway microbiome on corticosteroid responsiveness in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:1193-1201.
- (9) Léguillette R, Tohver T, Bond SL, et al. Effect of Dexamethasone and Fluticasone on Airway Hyperresponsiveness in Horses With Inflammatory Airway Disease. *J Vet Intern Med* 2017;31:1193-1201.
- (10) Cohn LA. The Influence of Corticosteroids on Host Defense Mechanisms. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1991;5:95-104.
- (11) Leclere M. Corticosteroids and Immune Suppressive Therapies in Horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2017;33:17-27.
- (12) Durack J, Lynch SV, Nariya S, et al. Features of the bronchial bacterial microbiome associated with atopy, asthma, and responsiveness to inhaled corticosteroid treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2017;140:63-75.
- (13) Sharma A, Laxman B, Naureckas ET, et al. Associations between fungal and bacterial microbiota of airways and asthma endotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2019;144:1214-1227.e1217.
- (14) Huang C, Yu Y, Du W, et al. Fungal and bacterial microbiome dysbiosis and imbalance of trans-kingdom network in asthma. *Clinical and translational allergy* 2020;10:42.
- (15) Leitao Filho FS, Takiguchi H, Akata K, et al. Effects of Inhaled Corticosteroid/Long-Acting $\beta(2)$ -Agonist Combination on the Airway Microbiome of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Randomized Controlled Clinical Trial (DISARM). *Am J Respir Crit Care Med* 2021;204:1143-1152.
- (16) 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.
- (17) Couëtil LL, Cardwell JM, Gerber V, et al. Inflammatory Airway Disease of Horses--Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med* 2016;30:503-515.
- (18) Henrikson SL, Rush BR. Efficacy of salmeterol xinafoate in horses with recurrent airway obstruction. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2001;218:1961-1965.
- (19) Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Joubert P, et al. Corticosteroids and antigen avoidance decrease airway smooth muscle mass in an equine asthma model. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2012;47:589-596.
- (20) Robinson NE, Olszewski MA, Boehler D, et al. Relationship between clinical signs and lung function in horses with recurrent airway obstruction (heaves) during a bronchodilator trial. *Equine Vet J* 2000;32:393-400.
- (21) Gerber V, Straub R, Marti E, et al. Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Vet J* 2004;36:576-582.
- (22) Jean D, Vrins A, Lavoie JP. Monthly, daily, and circadian variations of measurements of pulmonary mechanics in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of veterinary research* 1999;60:1341-1346.

- (23) Lapointe JM, Lavoie JP, Vrins AA. Effects of triamcinolone acetonide on pulmonary function and bronchoalveolar lavage cytologic features in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of veterinary research* 1993;54:1310-1316.
- (24) Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology* 2009;75:7537-7541.
- (25) Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, et al. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and environmental microbiology* 2013;79:5112-5120.
- (26) 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.
- (27) Bond SL, Workentine M, Hundt J, et al. Effects of nebulized dexamethasone on the respiratory microbiota and mycobacteria and relative equine herpesvirus-1, 2, 4, 5 in an equine model of asthma. *J Vet Intern Med* 2020;34:307-321.
- (28) de Wasseige S, Picotte K, Lavoie JP. Nebulized dexamethasone sodium phosphate in the treatment of horses with severe asthma. *J Vet Intern Med* 2021;35:1604-1611.
- (29) 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;51:641-645.
- (30) Iannella H, Luna C, Waterer G. Inhaled corticosteroids and the increased risk of pneumonia: what's new? A 2015 updated review. *Therapeutic advances in respiratory disease* 2016;10:235-255.
- (31) Dickson RP, Martinez FJ, Huffnagle GB. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *Lancet (London, England)* 2014;384:691-702.
- (32) Kanoh S, Rubin BK. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. *Clinical microbiology reviews* 2010;23:590-615.
- (33) 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. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2019;60:189-197.
- (34) Maris NA, Florquin S, van't Veer C, et al. Inhalation of beta 2 agonists impairs the clearance of nontypable *Haemophilus influenzae* from the murine respiratory tract. *Respir Res* 2006;7:57.

3EME PARTIE : DISCUSSION GENERALE

L'étude présentée dans ce manuscrit est incluse dans un design expérimental plus vaste qui comporte un suivi longitudinal de 2 groupes au travers de 4 temps successifs, ouvrant ainsi sur plusieurs perspectives. La figure 28 rend compte du design expérimental complet.

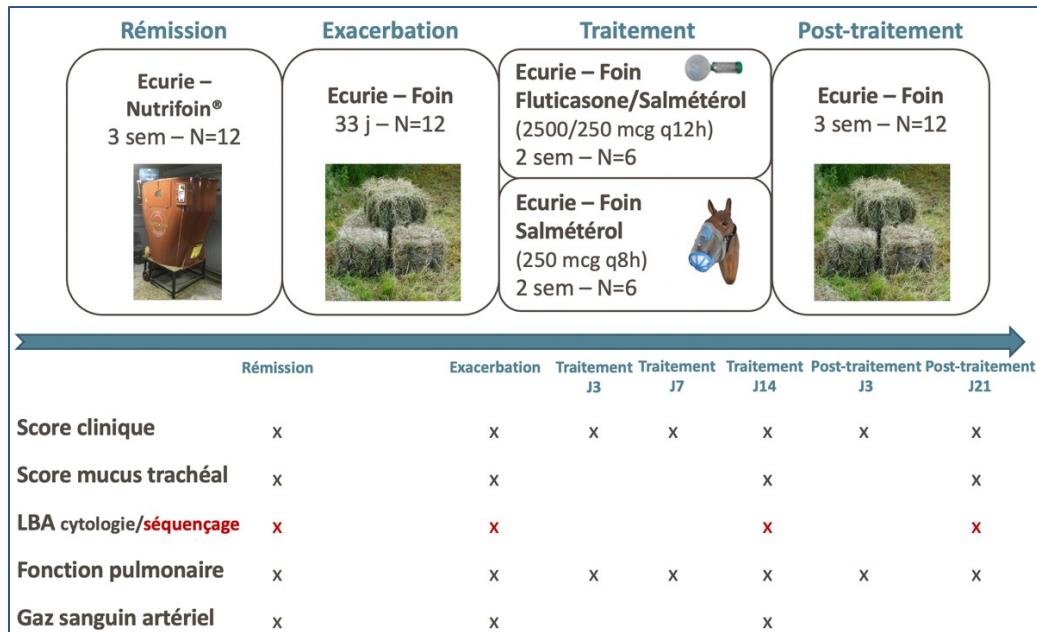


Figure 28 - Design expérimental complet

I. SYNTHÈSE DES RESULTATS

Cette étude a permis d'identifier si les corticostéroïdes inhalés influent sur le microbiote pulmonaire, indépendamment de leurs effets sur la fonction pulmonaire. L'objectif était ainsi de comparer le microbiote pulmonaire de chevaux atteints d'asthme sévère traités avec des bronchodilatateurs (salmétérol – groupe LABA) seulement ou combinés avec un corticostéroïde (fluticasone/salmétérol – groupe IC₅/LABA). Le groupe LABA, faisant office de contrôle, était étudié pour déceler les changements sur le microbiote pulmonaire suite à une amélioration de la fonction pulmonaire et de la ventilation. Le fait d'opposer et de comparer les deux modalités de traitement, salmétérol seul ou la combinaison fluticasone/salmétérol, permettait ainsi d'isoler les potentiels effets immunomodulateurs des

corticostéroïdes à condition que l'amélioration de la fonction pulmonaire soit équivalente dans les deux groupes.

1. Effets des corticostéroïdes et des bronchodilatateurs sur le microbiote pulmonaire

Cette étude a permis de confirmer l'influence des corticostéroïdes et bronchodilatateurs sur le microbiote pulmonaire. Plus particulièrement, les différences observées entre les groupes IC_s/LABA et LABA suggèrent que les corticostéroïdes inhalés peuvent altérer le microbiote pulmonaire indépendamment de leurs effets sur la fonction pulmonaire. Le tableau 5 synthétise les résultats d'analyse du microbiote.

Tableau 5 - Synthèse des résultats de l'étude

	Amélioration fonction (LABA)	Amélioration fonction + ICs (ICs/LABA)
Charge bactérienne	↓	∅
Alpha-diversité	∅	∅
Abondances relatives	↓ Actinobacteria ↓ Verrucomicrobia	↑ Bacteroidetes
Beta-diversité	structure	∅

Suite au traitement bronchodilatateur, une réduction de la charge bactérienne associée à la diminution relative des phyla Actinobacteria et Verrucomicrobia a été observée. La structure des communautés bactériennes (β -diversité) est également modifiée après traitement dans le groupe LABA. Ces changements correspondent à ce que l'on peut attendre d'une amélioration de la fonction pulmonaire et de la ventilation, sans l'effet anti-inflammatoire des glucocorticoïdes, à condition d'exclure de potentiels effets directs des LABA sur le microbiote. En revanche, les modifications mises en évidence dans le groupe IC_s/LABA ne touchaient que l'abondance relative de certains taxa appartenant au phylum Bacteroidetes, à la famille *Microbacteriaceae* (phylum Actinobacteria) et au genre *Acinetobacter* (phylum Proteobacteria, famille *Moraxellaceae*), sans changement de la charge bactérienne ou de la β -diversité.

Dans cette étude, l'absence de diminution de la charge bactérienne suite au traitement IC_s/LABA, contrairement au traitement LABA seul, peut laisser penser que les corticostéroïdes inhalés favorisent la

croissance bactérienne de certains taxa au détriment d'autres, comme de bactéries appartenant au phylum Bacteroidetes. Il est néanmoins encore trop tôt pour conclure si ces effets directs des corticostéroïdes sont positifs ou néfastes. La métagénomique, avec l'étude fonctionnelle des gènes, pourrait apporter des réponses à cette question. Certaines études récentes sur l'asthme humain recensent d'ailleurs son utilisation⁹.

Le microbiote respiratoire, provenant du séquençage de sputum, chez des patients atteints d'asthme et recevant des corticostéroïdes inhalés s'avère plus proche de celui de patients sains que de celui d'individus atteints d'asthme mais non traités médicalement⁹. Il serait intéressant de comprendre si le microbiote pulmonaire de chevaux en rémission grâce à l'administration de corticostéroïdes, associé ou non à un bronchodilatateur, est semblable à celui de chevaux maintenus dans un environnement peu antigénique. Cette analyse n'a vraisemblablement encore jamais été menée chez le cheval et pourrait bien s'intégrer à notre design expérimental (figure 28). Des analyses bio-informatiques visant à comparer la 1^{ère} phase de l'étude (chevaux en rémission sous Nutrifoin®) à la 3^{ème} phase (chevaux en rémission suite à 2 semaines de traitement de corticostéroïdes et/ou bronchodilatateurs) pourraient être réalisées. L'ajout d'un groupe contrôle sain vivant dans le même environnement pourrait permettre de statuer si les traitements, qu'ils soient environnementaux ou médicaux, permettent de rétablir un microbiote pulmonaire proche de la normale.

L'analyse du groupe LABA, outre que d'isoler les effets des corticostéroïdes en le comparant au groupe IC_s/LABA, permet également de recenser les effets de l'amélioration de la fonction pulmonaire sur le microbiote pulmonaire. Il est ainsi intéressant de remarquer qu'ici la charge bactérienne diminue suite au traitement avec des bronchodilatateurs, ce qui laisse supposer que la charge augmente lors d'exacerbation et qu'une amélioration de la ventilation périphérique est bénéfique pour l'hôte, mais néfaste pour les populations microbiennes (en termes de populations totales). Une étude précédente chez les chevaux n'avait pas observée d'augmentation de la charge bactérienne avec l'exacerbation mais l'environnement changeait entre les deux phases (pâturage et foin) et la technique de quantification était moins sensible (qPCR versus ddPCR)³. Les études ne sont pas unanimes sur la variation de la charge bactérienne et, chez des sujets humains, une diminution du nombre absolu de bactéries lors des phases d'exacerbation a été observée⁵. Dans ce groupe LABA, l'influence sur la β -diversité est aussi à mettre en relation avec les diminutions relatives en membres des phyla Actinobacteria et Verrucomicrobia.

2. Effets de la combinaison fluticasone/salmétérol sur la fonction et l'inflammation pulmonaires

Cette étude a aussi permis de rapporter l'efficacité de la combinaison fluticasone/salmétérol sur la fonction et l'inflammation pulmonaires. La fonction pulmonaire, au travers des mécaniques pulmonaires et des analyses de gaz artériels, est améliorée de manière significative suite à un traitement fluticasone/salmétérol de deux semaines chez des chevaux atteints d'asthme sévère. Cet effet positif avait déjà été rapporté dans l'étude de Bullone et collègues, où la combinaison de traitement avait apporté une amélioration significative de la fonction pulmonaire dès une semaine¹⁴⁵.

En revanche, la diminution de l'inflammation pulmonaire neutrophilique notée après deux mois de traitement n'a pas été observée dans cette étude. L'effet observé dans Bullone et collègues était en soit surprenant, puisque comme mentionné dans la revue de littérature, les glucocorticoïdes ne sont habituellement pas associés à une normalisation de la neutrophilie pulmonaire s'ils ne sont pas combinés à des changements environnementaux¹⁶³. Il est toutefois intéressant de noter que l'utilisation de LABA seul n'a pas aggravé la neutrophilie pulmonaire, ce qui va à l'encontre du dogme selon lequel l'utilisation de bronchodilatateurs en monothérapie, sans changements environnementaux ou glucocorticoïdes, pourrait favoriser l'inhalation d'allergènes et aggraver l'inflammation pulmonaire. La courte durée du traitement dans cette étude pourrait toutefois expliquer cette observation.

3. Effet du statut de la maladie sur le microbiote pulmonaire

L'effet de l'exacerbation, isolé de l'effet de la diète et de l'environnement, est en cours d'étude grâce au procédé de foin huilé et permettra de répondre à certaines interrogations. Aucune comparaison directe dans un environnement contrôlé n'a en effet été effectuée entre des chevaux atteints d'asthme en phase de rémission et d'autres en phase d'exacerbation de la maladie. L'étude de Fillion-Bertrand chez les chevaux atteints d'asthme sévère, menée par notre laboratoire, s'en rapproche. Dans celle-ci, un effet de l'environnement sur le microbiote pulmonaire a été observé à la fois chez les chevaux sains et ceux atteints d'asthme³. Au sein des groupes, le microbiote pulmonaire variait selon le niveau d'exposition antigénique (herbe au pâturage, box avec du foin de qualité ou box avec du foin poussiéreux) et donc de la qualité de l'environnement. Les animaux n'étaient en revanche pas maintenus dans le même environnement tout du long et il n'y a pas eu d'analyses comparant directement les chevaux malades entre eux durant les différents temps d'étude.

Pasteurellaceae au niveau trachéal est corrélée à des signes respiratoires (toux, jetage nasal) et à de l'inflammation trachéale^{20,25,50}. Le séquençage de nouvelle génération a également révélé une surreprésentation de cette famille dans le LBA de chevaux atteints d'asthme équin sévère³.

II. LIMITES DE L'ETUDE

Cette étude comporte plusieurs limites, que nous avons cherché à minimiser ou qui peuvent expliquer certaines différences observées entre nos deux groupes en période pré-traitement. Les plus importantes sont étayées dans la portion suivante.

1. Possibles biais du modèle expérimental

Afin de juger si les corticostéroïdes inhalés ont des effets immunomodulateurs sur le microbiote pulmonaire, en faisant abstraction des effets indirects via l'amélioration de la fonction pulmonaire, notre modèle expérimental devait offrir une amélioration de la fonction pulmonaire équivalente dans les deux groupes de traitement.

Nos résultats révèlent une amélioration significative de la fonction respiratoire (résistance pulmonaire, élastance pulmonaire, différence de la pression pleurale) à l'issue de 14 jours d'administration d'un bronchodilatateur seul (salmétérol – groupe LABA) ou de sa combinaison avec un corticostéroïde (fluticasone/salmétérol – groupe IC_s/LABA), sans différence significative entre les deux groupes. En revanche, une amélioration de la P_aO₂ est seulement observée suite au traitement fluticasone/salmétérol. Notre modèle expérimental reste donc très bon mais imparfait, d'après cette différence d'efficacité sur la fonction pulmonaire, et pourrait apporter un biais dans l'analyse des données. En effet, en offrant davantage d'amélioration de la ventilation, le traitement IC_s/LABA pourrait induire des changements sur le microbiote pulmonaire différents de ceux du groupe LABA.

De plus, les chevaux ne recevant que le bronchodilatateur (groupe LABA) constituent le groupe contrôle de l'étude, c'est à dire le groupe dont les changements du microbiote pulmonaire seraient seulement consécutifs à l'amélioration des conditions environnementales locales. Nous assumons donc ici que les bronchodilatateurs n'influencent pas directement sur le microbiote pulmonaire. Or, comme déjà mentionné dans la portion consacrée aux bronchodilatateurs, ces-derniers pourraient détenir des propriétés anti-inflammatoires et leur action limitant la clairance d'*Haemophilus influenzae* dans un modèle murin a déjà

été démontrée¹⁸². Ce type d'influence directe sur le microbiote pulmonaire pourrait ainsi compliquer nos analyses. Néanmoins, puisque le même bronchodilatateur a été administré dans nos deux groupes, notre modèle expérimental permet tout de même d'isoler les effets immunomodulateurs des corticostéroïdes. Un effet synergique ou antagoniste sur le microbiote pulmonaire des corticostéroïdes et des bronchodilatateurs reste à déterminer.

2. Possibles biais de méthodologie

Une première limite inhérente à la méthodologie choisie est le faible nombre de chevaux dans chaque groupe (n = 6 par groupe), pouvant impacter la puissance statistique et donc limiter la mise en évidence de différences significatives entre nos deux groupes. En comparaison d'autres études sur l'analyse du microbiote chez le cheval, notre effectif par groupe s'avère équivalent³ ou proche^{4,6}, les deux études de Bond comportant 3 groupes de 3, 3 et 7 chevaux pour la première, de 4, 8 et 8 chevaux pour la seconde.

De plus, les résultats de notre étude révèle des différences significatives dans l'abondance relative de deux taxa majoritaires en période pré-traitement, à savoir une surreprésentation de la famille *Moraxellaceae* et du genre *Acinetobacter* dans le groupe LABA par rapport au groupe IC_s/LABA. Aucune autre différence significative n'a en revanche été observée entre les deux groupes en période pré-traitement, tant en ce qui concerne le sexe, l'âge, le poids, le score clinique, la fonction pulmonaire, l'inflammation pulmonaire, la charge bactérienne, les indices d' α -diversité et l'analyse de la β -diversité. Une allocation des groupes au hasard, après avoir ordonnée les degrés de sévérités basés sur la résistance pulmonaire, avait aussi été effectuée pour distribuer les chevaux dans les deux groupes de façon la plus homogène possible avant de débiter la période de traitement. Malgré cette randomisation ordonnée (ranked randomization), des différences de sévérité de la maladie peuvent persister entre les groupes.

Le microbiote pulmonaire est influencé par différents facteurs externes, dont l'environnement (habitat et alimentation). Afin de limiter cet impact, les chevaux de l'étude étaient maintenus dans le même habitat et recevaient la même alimentation avant et pendant le traitement. Les individus ayant la clinique la plus sévère durant la période d'exacerbation en pré-traitement ont toutefois pu être davantage sortis au paddock. Cette régie au cas par cas pourrait créer des différences entre les individus et les groupes. Enfin, la variabilité inter-individuelle et intra-individuelle au cours du temps complique aussi l'analyse des données⁶⁹.

Les méthodes d'administration des médications, qui diffèrent dans l'étude, pourrait aussi mener à des biais d'analyses. Étant donné que le salmétérol seul n'est pas disponible en Amérique du Nord sous forme inhalatoire, à l'opposé de la combinaison fluticasone/salmétérol, nous avons dû opter dans cette étude pour une administration par nébulisation. Il est ainsi possible que les concentrations locales en salmétérol ne soient pas tout à fait similaires entre les deux groupes, puisque l'efficacité d'administration peut varier selon les dispositifs pour une même molécule, et un potentiel effet du diluant employé n'est pas exclu. De plus, la tolérance des chevaux à chaque administration n'a pas été recensée et peut varier d'un individu à l'autre. Les animaux du troupeau d'étude sont toutefois familiarisés avec ce genre de manipulation et les personnes administrant les traitements avaient été formées au préalable.

Dans cette étude, les LBA ont toujours été effectués de manière standardisée dans le poumon droit. L'idéal aurait été de cibler les mêmes bronches d'un prélèvement à l'autre, afin de comparer au mieux entre les deux temps. L'asthme reste toutefois une affection pulmonaire diffuse, limitant les hétérogénéités d'une localisation à l'autre dans les voies respiratoires centrales. Nous avons eu aussi recours au même endoscope pour toutes nos manipulations chez un effectif dont la taille et le poids étaient proches, ce qui laisse entendre que les prélèvements auraient pu être effectués à des endroits proches de manière répétée entre les différents chevaux.

3. Problématique des contaminants

Les contaminations constituent un problème majeur dans les analyses du microbiome, notamment en ce qui concerne les écosystèmes ne contenant qu'une faible biomasse comme le microbiote pulmonaire¹⁰⁹. Toutes les étapes du séquençage, allant de la prise d'échantillon, la conservation, l'extraction d'ADN, l'amplification par PCR et le séquençage en lui-même peuvent mener à des contaminations environnementales ou, parfois, entre les échantillons.

Pour limiter les contaminations lors du prélèvement, nous avons eu recours à une gaine protectrice stérile enveloppant l'endoscope lors des LBA, afin de réduire la contamination de l'échantillon par le microbiote des voies respiratoires supérieures lors du passage du nez, du pharynx, larynx et trachée supérieure³. Les manipulations en laboratoires peuvent aussi mener à des contaminations. Des kits commerciaux, utilisés

notamment pour les étapes d'extraction d'ADN et de séquençage, contiennent en effet une certaine charge bactérienne¹⁸⁹. De la même manière, tout produit utilisé pour les prélèvements ou en contact avec peuvent induire une part de contamination. Il s'avère ainsi important d'avoir recours à des échantillons contrôles durant chaque étape des manipulations pour s'assurer de la véracité des résultats d'analyse finaux. Dans l'étude, nous avons réalisé différents types de contrôles négatifs : rinçages d'endoscope avant d'effectuer les prélèvements, eau stérile et lidocaïne utilisées pour les prélèvements, air sur le site de prélèvement et au laboratoire, réactifs utilisés lors de l'extraction, l'amplification et le séquençage, tubes « blancs » lors des étapes du séquençage (contenant seulement les réactifs).

La gestion des potentiels contaminants n'est pas unanime. Certains proposent de retirer toutes les séquences retrouvées dans les contrôles, tandis que d'autres préfèrent avoir recours à des seuils basés sur la comparaison des abondances relatives des taxa entre les échantillons et les contrôles¹¹¹. Dans cette étude, nous avons choisi de conserver toutes les séquences, après avoir veillé à ce que les potentiels contaminants n'impactent pas les résultats d'analyses. En effet, l'analyse de la β -diversité entre un groupe recensant les échantillons contrôles et l'autre les LBA a bien confirmé la distinction entre les deux types d'échantillon ($p < 0,001$, AMOVA). Les cinq OTU les plus abondants dans les échantillons contrôle, *Pseudomonas* (OTU1), *Flavobacterium* (OTU2 et OTU3), *Bacillus* (OTU5) et une entérobactérie non classée (OTU6), représentaient 47,8 % de l'ensemble des séquences détectées. Ces mêmes OTU étaient retrouvés à hauteur de 23,4 % dans les LBA, en particulier les OTU2 et OTU3 (14,3 % et 7,4 % respectivement).

Les figures 30 et 31 présentent les OTU majoritaires (> 1% d'abondance relative) recensés dans les échantillons contrôle et dans les LBA. Les genres *Flavobacterium* et *Pseudomonas*, retrouvés en importante proportion à la fois dans les échantillons contrôles et les LBA, pourraient représenter des contaminants environnementaux. Les analyses ont alors été répétées en excluant ces deux genres, mais aucune différence majeure entre les analyses avec ou sans exclusion n'a été mise en évidence. En fin de compte, aucun taxon ou OTU n'a été exclu de l'analyse finale présentée dans l'article.

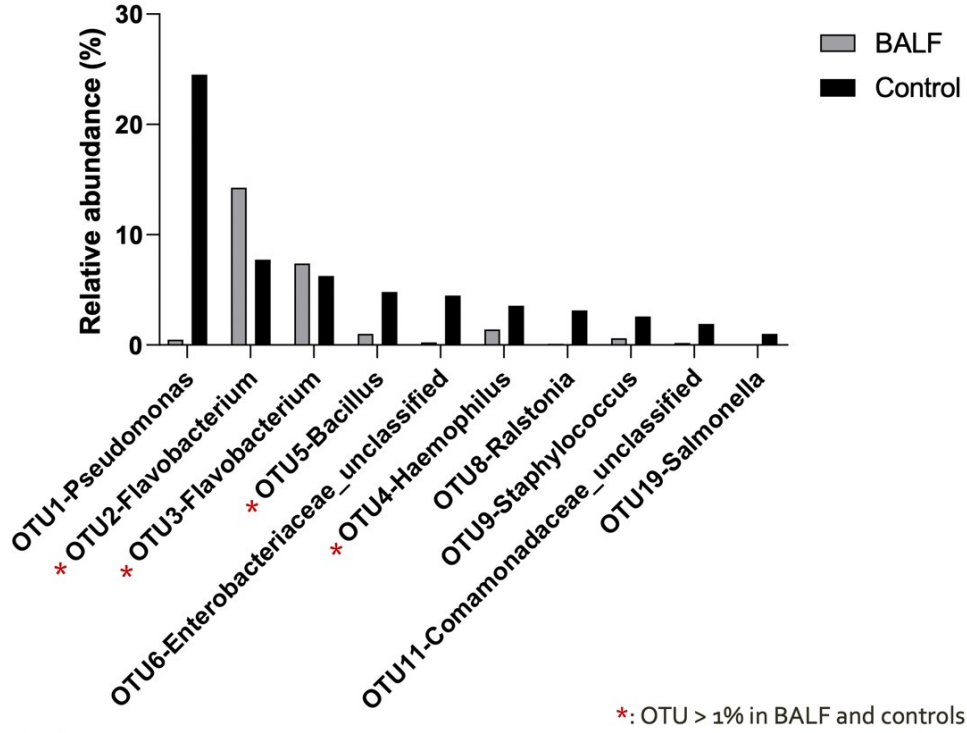


Figure 30 - Distribution des OTUs majoritaires au sein des contrôles

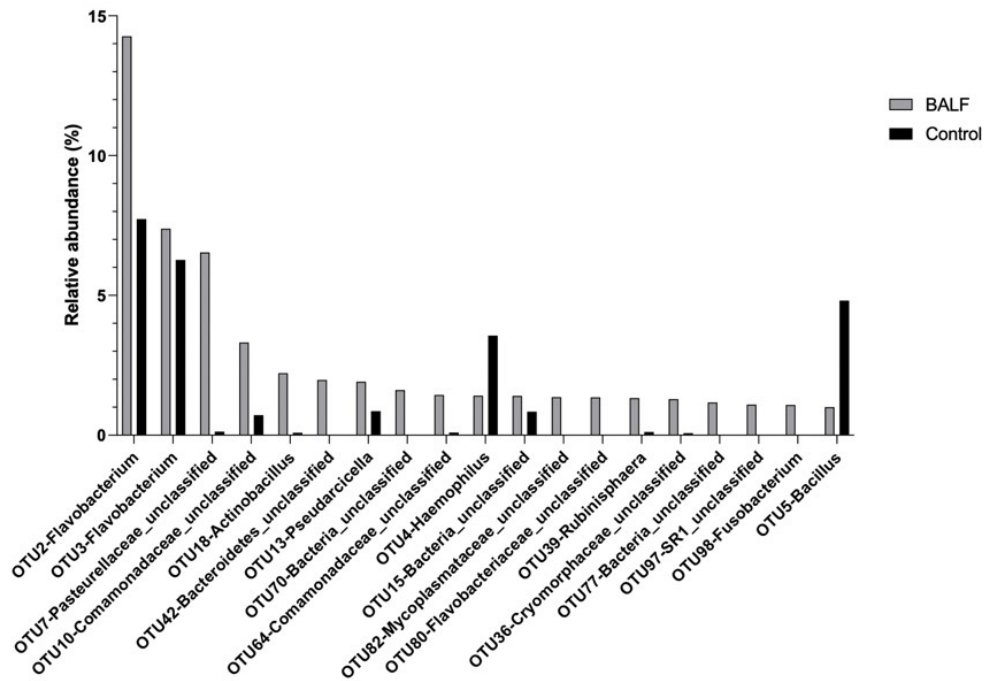


Figure 31 - Distribution des OTUs majoritaires au sein des LBA

III. PERSPECTIVES

1. Persistance des effets des corticostéroïdes sur le microbiote pulmonaire

Les premiers résultats de cette étude révèlent un impact des corticostéroïdes sur le microbiote pulmonaire de chevaux atteints d'asthme sévère. A l'image de la persistance dans le temps des perturbations secondaires à l'usage d'antibiotiques sur le microbiote intestinal¹⁹⁰, il serait intéressant d'étudier si les corticostéroïdes ont des effets durables sur le microbiote pulmonaire de chevaux atteints d'asthme.

Dans notre étude, la combinaison fluticasone/salmétérol maintient un effet positif sur la fonction pulmonaire jusqu'à 3 jours après l'arrêt des traitements (données non présentées dans l'article), en conservant une diminution de la différence en pression pleurale (DeltaP_L) comme visualisé sur la figure 32.

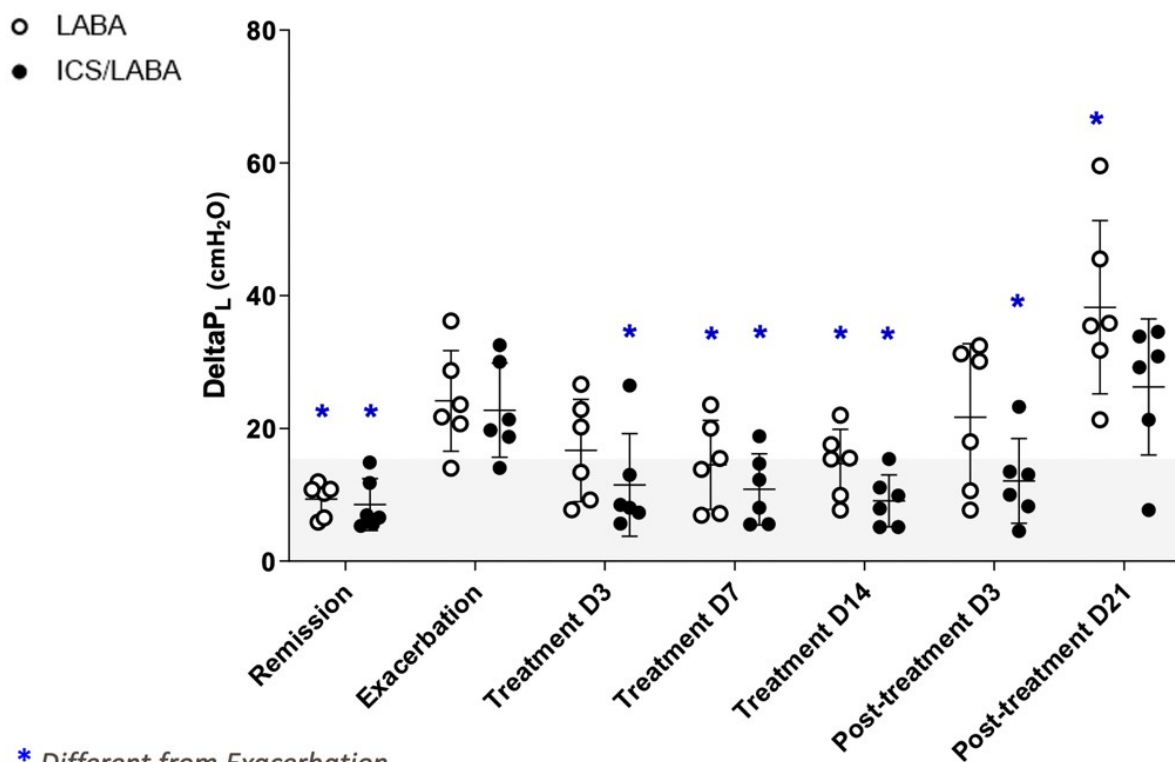


Figure 32 - Evolution de DeltaP_L sur toute la période l'étude entre les groupes ICs/LABA et LABA

Les effets des corticostéroïdes sur le microbiote pulmonaire pourraient ainsi persister quelques jours. Pour y répondre, une étude longitudinale consistant à suivre de manière rapprochée l'évolution du microbiote pulmonaire devrait être menée. En revanche, notre design expérimental et les prélèvements recueillis

après 3 semaines de l'arrêt des traitements ne permettent pas des analyses assez rapprochées. Une proposition pourrait être d'étudier deux groupes de chevaux atteints d'asthme, maintenus dans un environnement antigénique contrôlé et traités pendant 15 jours avec la combinaison fluticasone/salmétérol pour le premier groupe et avec du salmétérol seulement pour le second groupe (groupe contrôle). A l'issue de ces deux semaines, l'ensemble des chevaux pourraient conserver un traitement de salmétérol, afin de les maintenir en phase de rémission et donc de minimiser l'impact du statut de la maladie sur les données du microbiote. Un arrêt total des traitements, en conservant les chevaux dans le même environnement, aurait en effet pour conséquence de les ramener en phase d'exacerbation.

2. Effets des corticostéroïdes sur le mycobiote et les interrelations bactéries-fungi

Même si la majorité des travaux se sont penchés sur l'étude du microbiote bactérien pulmonaire, l'impact du règne des fungi et des relations entre les bactéries et les fungi s'avèrent être un nouveau domaine d'étude riche et prometteur. De la même manière, les interrelations entre les intestins et les poumons sont désormais davantage passées au crible afin de mieux comprendre la pathophysiologie de l'asthme^{191,192}. Plusieurs études, en médecine humaine et chez le cheval⁶, ont d'ailleurs cherché à comparer le mycobiote (l'ensemble des fungi constituant un milieu) d'individus sains à celui de patients atteints d'asthme, ainsi qu'à explorer les interrelations entre les deux règnes bactérien et fongique^{8,9}.

Dans l'asthme humain, l'usage de corticostéroïdes inhalés a été associé à une modification du mycobiote du sputum, avec l'enrichissement de 8 genres et la diminution relative de 7 autres⁹. Une tendance à se rapprocher du mycobiote de patients sains chez les individus traités, par rapport à ceux ne recevant pas de traitement pour l'asthme, a aussi été démontrée dans cette même étude. En revanche, les patients atteints d'asthme, traités avec des corticostéroïdes inhalés ou non, voient le nombre de corrélations entre les abondances relatives de bactéries et de fungi drastiquement diminuer. La maladie et les traitements corticostéroïdes inhalés sont ainsi à l'origine d'un déséquilibre du microbiote au sens large et des interrelations entre les règnes bactérien et fongique. Dans une seconde étude, les corticostéroïdes inhalés ont, de la même façon, mené à la perturbation de l'abondance relative de deux taxa fongiques appartenant au genre *Penicillium* au niveau pulmonaire⁸. Plusieurs associations ont également ici été notées entre certains fungi et l'emploi de corticostéroïdes inhalés. Enfin, le recours aux corticostéroïdes chez des humains atteints d'asthme a été associé à une surreprésentation d'*Aspergillus fumigatus*¹⁹³.

Chez le cheval, la dexaméthasone nébulisée n'a pas induit de modification sur le mycobiote des voies respiratoires inférieures de chevaux atteints d'asthme léger à modéré, mais a conduit aux changements d'abondance relative de 8 genres au niveau nasal⁶. Il serait intéressant de poursuivre les recherches chez le cheval, en ayant recours notamment à des corticostéroïdes inhalés réputés efficaces dans l'asthme équin. De plus, cet axe de recherche n'a pas encore été développé dans l'asthme équin sévère, et aucune étude chez le cheval ne s'est penchée sur les interrelations entre les bactéries et fungi au niveau pulmonaire.

3. Effets des corticostéroïdes sur l'axe intestins-poumons

Le microbiote intestinal est un partenaire clé du microbiote pulmonaire. Des liens étroits ont en effet été mis en évidence entre ces deux entités anatomiques^{67,191}. Les manifestations respiratoires sont fréquentes lors de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. A l'inverse, l'effet protecteur du microbiote digestif est reconnu dans les infections respiratoires. Ces échanges entre les deux compartiments peuvent s'effectuer par voie directe ou indirecte, soit par ensemencement de bactéries d'origine intestinale au niveau pulmonaire soit via la production de molécules immunomodulatrices circulant d'un compartiment à l'autre. Toute dysbiose intestinale pourrait ainsi avoir des conséquences sur l'homéostasie pulmonaire, et vice versa.

Chez les humains, les nouveau-nés présentant une dysbiose intestinale suite à l'emploi d'antibiotiques, avec notamment une diminution de la diversité en bactéries et fungi, sont davantage à risque de développer de l'asthme durant l'enfance. Une expansion fongique au niveau intestinal a aussi été associée à l'augmentation des cas d'asthme¹⁹¹. Enfin, le microbiote fécal d'adultes atteints d'asthme diffère de celui d'individus sains, et une association a été recensée entre le microbiote fécal, la fonction pulmonaire et la sensibilisation aux allergènes¹⁹⁴.

Une étude chez le cheval, comparant le microbiote fécal de chevaux atteints d'asthme sévère à celui d'individus sains, a révélé que l'adaptation du microbiote intestinal suite à un changement d'environnement diffère entre les deux groupes, avec notamment davantage de modifications des bactéries peu abondantes au sein des chevaux malades¹⁹⁵. Il est ainsi suggéré que l'inflammation systémique induite par le système immunitaire régulé à la hausse chez les chevaux atteints d'asthme pourrait influencer l'environnement intestinal. En retour, le microbiote intestinal altéré pourrait affecter l'inflammation systémique et pulmonaire. A l'heure actuelle, l'effet des corticostéroïdes sur l'axe intestins-

poumons, notamment chez le cheval, est peu exploré et pourrait être d'intérêt pour mieux comprendre l'impact des corticostéroïdes sur le microbiote pulmonaire.

CONCLUSION

En somme, notre étude a permis de confirmer que le microbiote pulmonaire de chevaux atteints d'asthme sévère est influencé par les inhalations de corticostéroïdes et de bronchodilatateurs. Plus particulièrement, les différences observées entre les groupes IC_s/LABA et LABA suggèrent que les corticostéroïdes inhalés peuvent altérer le microbiote pulmonaire indépendamment de leurs effets sur la fonction pulmonaire. Le mécanisme par lequel ils agissent sur le microbiote pulmonaire n'a pas encore été clairement élucidé. Dans cette étude, l'absence de diminution de la charge bactérienne suite au traitement IC_s/LABA, contrairement au traitement LABA seul, favorise l'hypothèse que les corticostéroïdes inhalés pourraient conduire à une croissance bactérienne de certains taxa au détriment d'autres. Il est néanmoins trop tôt pour conclure si ces effets directs sont positifs ou néfastes. Les corticostéroïdes, ayant été impliqués dans le développement secondaire de pneumonies chez des patients humains, il s'avère cohérent de se demander si la dysbiose bactérienne chez les chevaux atteints d'asthme traités avec des corticostéroïdes devrait être contrôlée pour améliorer l'efficacité du traitement, en particulier lors de mauvaise réponse à la corticothérapie.

Références bibliographiques

1. Bullone M, Lavoie JP. Asthma "of horses and men"--how can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences? *Molecular immunology* 2015;66:97-105.
2. Couëtil LL, Cardwell JM, Gerber V, et al. Inflammatory Airway Disease of Horses--Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med* 2016;30:503-515.
3. 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. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2019;60:189-197.
4. 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.
5. Huang YJ, Nariya S, Harris JM, et al. The airway microbiome in patients with severe asthma: Associations with disease features and severity. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:874-884.
6. Bond SL, Workentine M, Hundt J, et al. Effects of nebulized dexamethasone on the respiratory microbiota and mycobacteria and relative equine herpesvirus-1, 2, 4, 5 in an equine model of asthma. *J Vet Intern Med* 2020;34:307-321.
7. Denner DR, Sangwan N, Becker JB, et al. Corticosteroid therapy and airflow obstruction influence the bronchial microbiome, which is distinct from that of bronchoalveolar lavage in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:1398-1405.e1393.
8. Sharma A, Laxman B, Naureckas ET, et al. Associations between fungal and bacterial microbiota of airways and asthma endotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2019;144:1214-1227.e1217.
9. Huang C, Yu Y, Du W, et al. Fungal and bacterial microbiome dysbiosis and imbalance of trans-kingdom network in asthma. *Clinical and translational allergy* 2020;10:42.
10. 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.
11. Robinson NE, Karmaus W, Holcombe SJ, et al. Airway inflammation in Michigan pleasure horses: prevalence and risk factors. *Equine Vet J* 2006;38:293-299.
12. 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;34:337-342.
13. Dauvillier J, Ter Woort F, van Erck-Westergren E. Fungi in respiratory samples of horses with inflammatory airway disease. *J Vet Intern Med* 2019;33:968-975.
14. Costa LR, Johnson JR, Baur ME, Beadle RE. Temporal clinical exacerbation of summer pasture-associated recurrent airway obstruction and relationship with climate and aeroallergens in horses. *American journal of veterinary research* 2006;67:1635-1642.
15. Gerber V, Baleri D, Klukowska-Rötzler J, et al. Mixed inheritance of equine recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med* 2009;23:626-630.
16. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology (Carlton, Vic)* 2011;16:1027-1046.
17. Robinson NE, Derksen FJ, Berney C, Goossens L. The airway response of horses with recurrent airway obstruction (heaves) to aerosol administration of ipratropium bromide. *Equine Vet J* 1993;25:299-303.
18. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Gélinas-Lymburner E, et al. Effect of antigenic exposure on airway smooth muscle remodeling in an equine model of chronic asthma. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2011;45:181-187.

19. Bullone M, Hélie P, Joubert P, Lavoie JP. Development of a Semiquantitative Histological Score for the Diagnosis of Heaves Using Endobronchial Biopsy Specimens in Horses. *J Vet Intern Med* 2016;30:1739-1746.
20. Wood JL, Newton JR, Chanter N, Mumford JA. Association between respiratory disease and bacterial and viral infections in British racehorses. *Journal of clinical microbiology* 2005;43:120-126.
21. 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.
22. Christley RM, Hodgson DR, Rose RJ, et al. A case-control study of respiratory disease in Thoroughbred racehorses in Sydney, Australia. *Equine Vet J* 2001;33:256-264.
23. 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.
24. 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.
25. Newton JR, Wood JL, Chanter N. A case control study of factors and infections associated with clinically apparent respiratory disease in UK Thoroughbred racehorses. *Preventive veterinary medicine* 2003;60:107-132.
26. Fogarty U, Buckley T. Bronchoalveolar lavage findings in horses with exercise intolerance. *Equine Vet J* 1991;23:434-437.
27. Manguin E, Pépin E, Boivin R, Leclere M. Tracheal microbial populations in horses with moderate asthma. *J Vet Intern Med* 2020;34:986-995.
28. 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.
29. Wood JL, Newton JR, Chanter N, Mumford JA. Inflammatory airway disease, nasal discharge and respiratory infections in young British racehorses. *Equine Vet J* 2005;37:236-242.
30. Couetil L, Ivester K, Barnum S, Pusterla N. Equine respiratory viruses, airway inflammation and performance in thoroughbred racehorses. *Veterinary microbiology* 2021;257:109070.
31. Fortier G, van Erck E, Fortier C, et al. Herpesviruses in respiratory liquids of horses: putative implication in airway inflammation and association with cytological features. *Veterinary microbiology* 2009;139:34-41.
32. Houtsma A, Bedenice D, Pusterla N, et al. Association between inflammatory airway disease of horses and exposure to respiratory viruses: a case control study. *Multidisciplinary respiratory medicine* 2015;10:33.
33. Vandenput S, Votion D, Duvivier DH, et al. Effect of a set stabled environmental control on pulmonary function and airway reactivity of COPD affected horses. *Vet J* 1998;155:189-195.
34. 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;21:1060-1066.
35. Couëtill LL, Rosenthal FS, DeNicola DB, Chilcoat CD. Clinical signs, evaluation of bronchoalveolar lavage fluid, and assessment of pulmonary function in horses with inflammatory respiratory disease. *American journal of veterinary research* 2001;62:538-546.
36. Wichtel M, Gomez D, Burton S, et al. Relationships between equine airway reactivity measured by flowmetric plethysmography and specific indicators of airway inflammation in horses with suspected inflammatory airway disease. *Equine Vet J* 2016;48:466-471.
37. Richard EA, Fortier GD, Denoix JM, et al. Influence of subclinical inflammatory airway disease on equine respiratory function evaluated by impulse oscillometry. *Equine Vet J* 2009;41:384-389.
38. Sánchez A, Couëtill LL, Ward MP, Clark SP. Effect of airway disease on blood gas exchange in racehorses. *J Vet Intern Med* 2005;19:87-92.

39. Lavoie JP, Phan ST, Blais D. Effects of a combination of detomidine and butorphanol on respiratory function in horses with or without chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of veterinary research* 1996;57:705-709.
40. de Lagarde M, Rodrigues N, Chevigny M, et al. N-butylscopolammonium bromide causes fewer side effects than atropine when assessing bronchoconstriction reversibility in horses with heaves. *Equine Vet J* 2014;46:474-478.
41. Ammann VJ, Vrins AA, Lavoie JP. Effects of inhaled beclomethasone dipropionate on respiratory function in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Equine Vet J* 1998;30:152-157.
42. McGorum BC, Dixon PM, Halliwell RE, Irving P. Comparison of cellular and molecular components of bronchoalveolar lavage fluid harvested from different segments of the equine lung. *Research in veterinary science* 1993;55:57-59.
43. Richard EA, Fortier GD, Lekeux PM, Van Erck E. Laboratory findings in respiratory fluids of the poorly performing horse. *Vet J* 2010;185:115-122.
44. Courouce-Malblanc A, Deniau V, Rossignol F, et al. Physiological measurements and prevalence of lower airway diseases in Trotters with dorsal displacement of the soft palate. *Equine veterinary journal Supplement* 2010:246-255.
45. Moore BR, Krakowka S, Robertson JT, Cummins JM. Cytologic evaluation of bronchoalveolar lavage fluid obtained from standardbred racehorses with inflammatory airway disease. *American journal of veterinary research* 1995;56:562-567.
46. Ivester KM, Couëtil LL, Moore GE. An observational study of environmental exposures, airway cytology, and performance in racing thoroughbreds. *J Vet Intern Med* 2018;32:1754-1762.
47. 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;22:1022-1028.
48. Bullone M, Joubert P, Gagné A, et al. Bronchoalveolar lavage fluid neutrophilia is associated with the severity of pulmonary lesions during equine asthma exacerbations. *Equine Vet J* 2018;50:609-615.
49. Gerber V, Straub R, Marti E, et al. Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Vet J* 2004;36:576-582.
50. 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;46:150-155.
51. Holcombe SJ, Robinson NE, Derksen FJ, et al. Effect of tracheal mucus and tracheal cytology on racing performance in Thoroughbred racehorses. *Equine Vet J* 2006;38:300-304.
52. Christley RM, Hodgson DR, Rose RJ, et al. Coughing in thoroughbred racehorses: risk factors and tracheal endoscopic and cytological findings. *Vet Rec* 2001;148:99-104.
53. 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. *Australian veterinary journal* 2003;81:685-687.
54. Suau A, Bonnet R, Sutren M, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and environmental microbiology* 1999;65:4799-4807.
55. Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Joubert P, et al. Corticosteroids and antigen avoidance decrease airway smooth muscle mass in an equine asthma model. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2012;47:589-596.
56. Jochmans-Lemoine A, Picotte K, Beauchamp G, et al. 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;52:564-571.

57. Vandepuut S, Istasse L, Nicks B, Lekeux P. Airborne dust and aeroallergen concentrations in different sources of feed and bedding for horses. *The veterinary quarterly* 1997;19:154-158.
58. Orard M, Hue E, Couroucé A, et al. The influence of hay steaming on clinical signs and airway immune response in severe asthmatic horses. *BMC veterinary research* 2018;14:345.
59. Nicol C. Understanding equine stereotypies. *Equine veterinary journal Supplement* 1999:20-25.
60. 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:e114079.
61. Mönki J, Saastamoinen M, Karikoski N, et al. Effects of Bedding Material on Equine Lower Airway Inflammation: A Crossover Study Comparing Peat and Wood Shavings. *Frontiers in veterinary science* 2021;8:656814.
62. Mainguy-Seers S, Lavoie JP. Glucocorticoid treatment in horses with asthma: A narrative review. *J Vet Intern Med* 2021;35:2045-2057.
63. Costa M, Weese JS. Methods and basic concepts for microbiota assessment. *Vet J* 2019;249:10-15.
64. Costa MC, Weese JS. Understanding the Intestinal Microbiome in Health and Disease. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2018;34:1-12.
65. Kim BR, Shin J, Guevarra R, et al. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *Journal of microbiology and biotechnology* 2017;27:2089-2093.
66. Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* 2016;164:337-340.
67. Gosens R, Hiemstra PS, Adcock IM, et al. Host-microbe cross-talk in the lung microenvironment: implications for understanding and treating chronic lung disease. *The European respiratory journal* 2020;56.
68. Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. The role of the bacterial microbiome in lung disease. *Expert review of respiratory medicine* 2013;7:245-257.
69. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature reviews Genetics* 2012;13:260-270.
70. Erturk-Hasdemir D, Kasper DL. Resident commensals shaping immunity. *Current opinion in immunology* 2013;25:450-455.
71. Suvarna K, Stevenson D, Meganathan R, Hudspeth ME. Menaquinone (vitamin K2) biosynthesis: localization and characterization of the menA gene from *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 1998;180:2782-2787.
72. Liévin V, Peiffer I, Hudault S, et al. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 2000;47:646-652.
73. Larsen JM, Musavian HS, Butt TM, et al. Chronic obstructive pulmonary disease and asthma-associated Proteobacteria, but not commensal *Prevotella* spp., promote Toll-like receptor 2-independent lung inflammation and pathology. *Immunology* 2015;144:333-342.
74. Larsen JM, Steen-Jensen DB, Laursen JM, et al. Divergent pro-inflammatory profile of human dendritic cells in response to commensal and pathogenic bacteria associated with the airway microbiota. *PloS one* 2012;7:e31976.
75. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, et al. The human microbiome project. *Nature* 2007;449:804-810.
76. Hilty M, Burke C, Pedro H, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PloS one* 2010;5:e8578.
77. Zakharkina T, Heinzl E, Koczulla RA, et al. Analysis of the airway microbiota of healthy individuals and patients with chronic obstructive pulmonary disease by T-RFLP and clone sequencing. *PloS one* 2013;8:e68302.
78. Dickson RP, Martinez FJ, Huffnagle GB. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *Lancet (London, England)* 2014;384:691-702.

79. Dickson RP, Erb-Downward JR, Martinez FJ, Huffnagle GB. The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annual review of physiology* 2016;78:481-504.
80. Venkataraman A, Bassis CM, Beck JM, et al. Application of a neutral community model to assess structuring of the human lung microbiome. *mBio* 2015;6.
81. Gollwitzer ES, Saglani S, Trompette A, et al. Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nature medicine* 2014;20:642-647.
82. Huang YJ, Nelson CE, Brodie EL, et al. Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:372-381 e371-373.
83. Bosch A, de Steenhuijsen P, WAA, van Houten MA, et al. Maturation of the Infant Respiratory Microbiota, Environmental Drivers, and Health Consequences. A Prospective Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;196:1582-1590.
84. Man WH, van Houten MA, Mérelle ME, et al. Bacterial and viral respiratory tract microbiota and host characteristics in children with lower respiratory tract infections: a matched case-control study. *The Lancet Respiratory medicine* 2019;7:417-426.
85. Stein MM, Hrusch CL, Gozdz J, et al. Innate Immunity and Asthma Risk in Amish and Hutterite Farm Children. *The New England journal of medicine* 2016;375:411-421.
86. von Mutius E. The microbial environment and its influence on asthma prevention in early life. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:680-689.
87. Cahenzli J, Köller Y, Wyss M, et al. Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels. *Cell Host Microbe* 2013;14:559-570.
88. Rodríguez N, Whitfield-Cargile CM, Chamoun-Emanuelli AM, et al. Nasopharyngeal bacterial and fungal microbiota in normal horses and horses with nasopharyngeal cicatrix syndrome. *J Vet Intern Med* 2021;35:2897-2911.
89. Hansson I, Johansson KE, Persson M, Riihimäki M. The clinical significance of *Nicoletella semolina* in horses with respiratory disorders and a screening of the bacterial flora in the airways of horses. *Veterinary microbiology* 2013;162:695-699.
90. Caesar R, Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, et al. Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell metabolism* 2015;22:658-668.
91. Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature medicine* 2014;20:159-166.
92. Sze MA, Dimitriu PA, Hayashi S, et al. The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:1073-1080.
93. Quinn RA, Adem S, Mills RH, et al. Neutrophilic proteolysis in the cystic fibrosis lung correlates with a pathogenic microbiome. *Microbiome* 2019;7:23.
94. Huang Y, Ma SF, Espindola MS, et al. Microbes Are Associated with Host Innate Immune Response in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;196:208-219.
95. Tsay JJ, Wu BG, Badri MH, et al. Airway Microbiota Is Associated with Upregulation of the PI3K Pathway in Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;198:1188-1198.
96. Budden KF, Shukla SD, Rehman SF, et al. Functional effects of the microbiota in chronic respiratory disease. *The Lancet Respiratory medicine* 2019;7:907-920.
97. Shukla SD, Budden KF, Neal R, Hansbro PM. Microbiome effects on immunity, health and disease in the lung. *Clinical & translational immunology* 2017;6:e133.
98. Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature methods* 2008;5:16-18.
99. Bartlett JM, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2003;226:3-6.
100. Taylor SC, Laperriere G, Germain H. Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. *Scientific reports* 2017;7:2409.

101. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, et al. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and environmental microbiology* 2013;79:5112-5120.
102. Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY, et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature communications* 2019;10:5029.
103. Durazzi F, Sala C, Castellani G, et al. Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota. *Scientific reports* 2021;11:3030.
104. Peterson D, Bonham KS, Rowland S, et al. Comparative Analysis of 16S rRNA Gene and Metagenome Sequencing in Pediatric Gut Microbiomes. *Frontiers in microbiology* 2021;12:670336.
105. Quail MA, Kozarewa I, Smith F, et al. A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system. *Nature methods* 2008;5:1005-1010.
106. Meyer M, Kircher M. Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harbor protocols* 2010;2010:pdb.prot5448.
107. Gloor GB, Hummelen R, Macklaim JM, et al. Microbiome profiling by illumina sequencing of combinatorial sequence-tagged PCR products. *PloS one* 2010;5:e15406.
108. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology* 2009;75:7537-7541.
109. Boers SA, Jansen R, Hays JP. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2019;38:1059-1070.
110. Evaluation of 16S rDNA-based community profiling for human microbiome research. *PloS one* 2012;7:e39315.
111. Dumont-Leblond N, Veillette M, Racine C, et al. Development of a robust protocol for the characterization of the pulmonary microbiota. *Communications biology* 2021;4:164.
112. Walters W, Hyde ER, Berg-Lyons D, et al. Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. *mSystems* 2016;1.
113. Schirmer M, Ijaz UZ, D'Amore R, et al. Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. *Nucleic acids research* 2015;43:e37.
114. Marri PR, Stern DA, Wright AL, et al. Asthma-associated differences in microbial composition of induced sputum. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:346-352.e341-343.
115. Simpson JL, Daly J, Baines KJ, et al. Airway dysbiosis: Haemophilus influenzae and Tropheryma in poorly controlled asthma. *The European respiratory journal* 2016;47:792-800.
116. Pavord ID, Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. *Lancet (London, England)* 1999;353:2213-2214.
117. Taylor SL, Leong LEX, Choo JM, et al. Inflammatory phenotypes in patients with severe asthma are associated with distinct airway microbiology. *J Allergy Clin Immunol* 2018;141:94-103.e115.
118. Son JH, Kim JH, Chang HS, et al. Relationship of Microbial Profile With Airway Immune Response in Eosinophilic or Neutrophilic Inflammation of Asthmatics. *Allergy, asthma & immunology research* 2020;12:412-429.
119. Yang X, Li H, Ma Q, et al. Neutrophilic Asthma Is Associated with Increased Airway Bacterial Burden and Disordered Community Composition. *BioMed research international* 2018;2018:9230234.
120. Green BJ, Wiriyaichaiyorn S, Grainge C, et al. Potentially pathogenic airway bacteria and neutrophilic inflammation in treatment resistant severe asthma. *PloS one* 2014;9:e100645.

121. Durack J, Lynch SV, Nariya S, et al. Features of the bronchial bacterial microbiome associated with atopy, asthma, and responsiveness to inhaled corticosteroid treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2017;140:63-75.
122. Bisgaard H, Hermansen MN, Buchvald F, et al. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. *The New England journal of medicine* 2007;357:1487-1495.
123. Husulak ML, Manning ST, Meachem MD, et al. Does antimicrobial therapy improve outcomes in horses with severe equine asthma and a positive tracheal wash bacterial culture? *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 2018;82:184-191.
124. Mainguy-Seers S, Vargas A, Labrecque O, et al. Randomised study of the immunomodulatory effects of azithromycin in severely asthmatic horses. *Vet Rec* 2019;185:143.
125. Simpson JL, Powell H, Boyle MJ, et al. Clarithromycin targets neutrophilic airway inflammation in refractory asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:148-155.
126. Piacentini GL, Peroni DG, Bodini A, et al. Azithromycin reduces bronchial hyperresponsiveness and neutrophilic airway inflammation in asthmatic children: a preliminary report. *Allergy and asthma proceedings* 2007;28:194-198.
127. Stamatiou R, Paraskeva E, Boukas K, et al. Azithromycin has an antiproliferative and autophagic effect on airway smooth muscle cells. *The European respiratory journal* 2009;34:721-730.
128. Wu LQ, Wang RL, Dai YR, et al. Roxithromycin suppresses airway remodeling and modulates the expression of caveolin-1 and phospho-p42/p44MAPK in asthmatic rats. *International immunopharmacology* 2015;24:247-255.
129. Gibson PG, Yang IA, Upham JW, 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 (London, England)* 2017;390:659-668.
130. Taylor SL, Leong LEX, Mobegi FM, et al. Long-Term Azithromycin Reduces Haemophilus influenzae and Increases Antibiotic Resistance in Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2019;200:309-317.
131. Tian BP, Xuan N, Wang Y, et al. The efficacy and safety of azithromycin in asthma: A systematic review. *Journal of cellular and molecular medicine* 2019;23:1638-1646.
132. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *The European respiratory journal* 2014;43:343-373.
133. Mainguy-Seers S, Boivin R, Pournali Dogaheh S, et al. Effects of azithromycin on bronchial remodeling in the natural model of severe neutrophilic asthma in horses. *Scientific reports* 2022;12:446.
134. Goleva E, Jackson LP, Harris JK, et al. The effects of airway microbiome on corticosteroid responsiveness in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:1193-1201.
135. Boivin R, Vargas A, Cano P, Lavoie JP. Glucocorticosteroids administration is associated with increased regulatory T cells in equine asthmatic lungs. *Veterinary immunology and immunopathology* 2018;201:67-71.
136. Bond SL, Hundt J, Léguillette R. Effect of injected dexamethasone on relative cytokine mRNA expression in bronchoalveolar lavage fluid in horses with mild asthma. *BMC veterinary research* 2019;15:397.
137. Leitao Filho FS, Takiguchi H, Akata K, et al. Effects of Inhaled Corticosteroid/Long-Acting $\beta(2)$ -Agonist Combination on the Airway Microbiome of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Randomized Controlled Clinical Trial (DISARM). *Am J Respir Crit Care Med* 2021;204:1143-1152.
138. de Wasseige S, Picotte K, Lavoie JP. Nebulized dexamethasone sodium phosphate in the treatment of horses with severe asthma. *J Vet Intern Med* 2021;35:1604-1611.
139. 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;51:641-645.
140. Iannella H, Luna C, Waterer G. Inhaled corticosteroids and the increased risk of pneumonia: what's new? A 2015 updated review. *Therapeutic advances in respiratory disease* 2016;10:235-255.

141. Singanayagam A, Glanville N, Cuthbertson L, et al. Inhaled corticosteroid suppression of cathelicidin drives dysbiosis and bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Science translational medicine* 2019;11.
142. Lavoie JP, Bullone M, Rodrigues N, et al. 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;51:779-786.
143. Pirie RS, Mueller HW, Engel O, et al. 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;53:1094-1104.
144. Lavoie JP, Leclere M, Rodrigues N, et al. Efficacy of inhaled budesonide for the treatment of severe equine asthma. *Equine Vet J* 2019;51:401-407.
145. Bullone M, Vargas A, Elce Y, et al. Fluticasone/salmeterol reduces remodelling and neutrophilic inflammation in severe equine asthma. *Scientific reports* 2017;7:8843.
146. Rush BR, Raub ES, Thomsen MM, et al. Pulmonary function and adrenal gland suppression with incremental doses of aerosolized beclomethasone dipropionate in horses with recurrent airway obstruction. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2000;217:359-364.
147. Couëtill LL, Chilcoat CD, DeNicola DB, et al. Randomized, controlled study of inhaled fluticasone propionate, oral administration of prednisone, and environmental management of horses with recurrent airway obstruction. *American journal of veterinary research* 2005;66:1665-1674.
148. Peroni DL, Stanley S, Kollias-Baker C, Robinson NE. Prednisone per os is likely to have limited efficacy in horses. *Equine Vet J* 2002;34:283-287.
149. Cesarini C, Hamilton E, Picandet V, Lavoie JP. Theophylline does not potentiate the effects of a low dose of dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction. *Equine Vet J* 2006;38:570-573.
150. Robinson NE, Jackson C, Jefcoat A, et al. Efficacy of three corticosteroids for the treatment of heaves. *Equine Vet J* 2002;34:17-22.
151. Picandet V, Léguillette R, Lavoie JP. Comparison of efficacy and tolerability of isoflupredone and dexamethasone in the treatment of horses affected with recurrent airway obstruction ('heaves'). *Equine Vet J* 2003;35:419-424.
152. 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;42:316-321.
153. Bessonnat A, Picotte K, Lavoie JP. Intra-articular triamcinolone acetonide improves lung function in horses with severe asthma. *Equine Vet J* 2020;52:131-135.
154. Lavoie JP, Léguillette R, Pasloske K, et al. Comparison of effects of dexamethasone and the leukotriene D4 receptor antagonist L-708,738 on lung function and airway cytologic findings in horses with recurrent airway obstruction. *American journal of veterinary research* 2002;63:579-585.
155. Lavoie JP, Pasloske K, Joubert P, et al. Lack of clinical efficacy of a phosphodiesterase-4 inhibitor for treatment of heaves in horses. *J Vet Intern Med* 2006;20:175-181.
156. Léguillette R, Tohver T, Bond SL, et al. Effect of Dexamethasone and Fluticasone on Airway Hyperresponsiveness in Horses With Inflammatory Airway Disease. *J Vet Intern Med* 2017;31:1193-1201.
157. Vargas A, Boivin R, Cano P, et al. Neutrophil extracellular traps are downregulated by glucocorticosteroids in lungs in an equine model of asthma. *Respir Res* 2017;18:207.
158. Gerber V, Schott li HC, Robinson NE. Owner assessment in judging the efficacy of airway disease treatment. *Equine Vet J* 2011;43:153-158.
159. Robinson NE, Berney C, Behan A, Derksen FJ. Fluticasone propionate aerosol is more effective for prevention than treatment of recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med* 2009;23:1247-1253.

160. Couëtil LL, Art T, de Moffarts B, 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;20:399-406.
161. Rush BR, Flaminio MJ, Matson CJ, et al. Cytologic evaluation of bronchoalveolar lavage fluid from horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *American journal of veterinary research* 1998;59:1033-1038.
162. Couroucé-Malblanc A, Fortier G, Pronost S, et al. Comparison of prednisolone and dexamethasone effects in the presence of environmental control in heaves-affected horses. *Vet J* 2008;175:227-233.
163. Giguère S, Viel L, Lee E, et al. Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Veterinary immunology and immunopathology* 2002;85:147-158.
164. DeLuca L, Erb HN, Young JC, et al. The effect of adding oral dexamethasone to feed alterations on the airway cell inflammatory gene expression in stabled horses affected with recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med* 2008;22:427-435.
165. Pietra M, Peli A, Bonato A, et al. Equine bronchoalveolar lavage cytokines in the development of recurrent airway obstruction. *Vet Res Commun* 2007;31 Suppl 1:313-316.
166. Mukker JK, Singh RSP, Derendorf H. Ciclesonide: A Pro-Soft Drug Approach for Mitigation of Side Effects of Inhaled Corticosteroids. *Journal of pharmaceutical sciences* 2016;105:2509-2514.
167. Lapointe JM, Lavoie JP, Vrins AA. Effects of triamcinolone acetonide on pulmonary function and bronchoalveolar lavage cytologic features in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of veterinary research* 1993;54:1310-1316.
168. Munoz T, Leclere M, Jean D, Lavoie JP. Serum cortisol concentration in horses with heaves treated with fluticasone propionate over a 1 year period. *Research in veterinary science* 2015;98:112-114.
169. Leclere M. Corticosteroids and Immune Suppressive Therapies in Horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2017;33:17-27.
170. Toutain PL, Oukessou M, Autefage A, Alvinerie M. Diurnal and episodic variations of plasma hydrocortisone concentrations in horses. *Domestic animal endocrinology* 1988;5:55-59.
171. Jordan VJ, Ireland JL, Rendle DI. Does oral prednisolone treatment increase the incidence of acute laminitis? *Equine Vet J* 2017;49:19-25.
172. Welsh CE, Duz M, Parkin TDH, Marshall JF. Disease and pharmacologic risk factors for first and subsequent episodes of equine laminitis: A cohort study of free-text electronic medical records. *Preventive veterinary medicine* 2017;136:11-18.
173. Mair TS. Bacterial pneumonia associated with corticosteroid therapy in three horses. *Vet Rec* 1996;138:205-207.
174. Dauvillier J, Felipe MJ, Lunn DP, et al. Effect of long-term fluticasone treatment on immune function in horses with heaves. *J Vet Intern Med* 2011;25:549-557.
175. Smith JE, DeBowes RM, Cipriano JE. Exogenous corticosteroids increase serum iron concentrations in mature horses and ponies. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1986;188:1296-1298.
176. Slack J, Risdahl JM, Valberg SJ, et al. Effects of dexamethasone on development of immunoglobulin G subclass responses following vaccination of horses. *American journal of veterinary research* 2000;61:1530-1533.
177. French K, Pollitt CC, Pass MA. Pharmacokinetics and metabolic effects of triamcinolone acetonide and their possible relationships to glucocorticoid-induced laminitis in horses. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 2000;23:287-292.
178. Brennan KM, Urschel KL. Recovery of insulin sensitivity in mature horses after a 3 week course of dexamethasone therapy. *Equine Vet J* 2014;46:718-721.

179. Glade MJ, Krook L. Glucocorticoid-induced inhibition of osteolysis and the development of osteopetrosis, osteonecrosis and osteoporosis. *The Cornell veterinarian* 1982;72:76-91.
180. Cohen ND, Carter GK. Steroid hepatopathy in a horse with glucocorticoid-induced hyperadrenocorticism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1992;200:1682-1684.
181. Tattersfield AE. Current issues with beta2-adrenoceptor agonists: historical background. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2006;31:107-118.
182. Maris NA, Florquin S, van't Veer C, et al. Inhalation of beta 2 agonists impairs the clearance of nontypable *Haemophilus influenzae* from the murine respiratory tract. *Respir Res* 2006;7:57.
183. Calzetta L, Crupi R, Roncada P, et al. Clinical efficacy of bronchodilators in equine asthma: Looking for minimal important difference. *Equine Vet J* 2020;52:305-313.
184. Henrikson SL, Rush BR. Efficacy of salmeterol xinafoate in horses with recurrent airway obstruction. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2001;218:1961-1965.
185. Norton JL, Jackson K, Chen JW, et al. Effect of clenbuterol on tracheal mucociliary transport in horses undergoing simulated long-distance transportation. *J Vet Intern Med* 2013;27:1523-1527.
186. Knight JM, Mak G, Shaw J, et al. Long-Acting Beta Agonists Enhance Allergic Airway Disease. *PloS one* 2015;10:e0142212.
187. Abraham G, Brodde OE, Ungemach FR. Regulation of equine lymphocyte beta-adrenoceptors under the influence of clenbuterol and dexamethasone. *Equine Vet J* 2002;34:587-593.
188. Couetil L, Hammer J, Miskovic Feutz M, et al. Effects of N-butylscopolammonium bromide on lung function in horses with recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med* 2012;26:1433-1438.
189. Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC biology* 2014;12:87.
190. Costa MC, Stämpfli HR, Arroyo LG, et al. Changes in the equine fecal microbiota associated with the use of systemic antimicrobial drugs. *BMC veterinary research* 2015;11:19.
191. Enaud R, Prevel R, Ciarlo E, et al. The Gut-Lung Axis in Health and Respiratory Diseases: A Place for Inter-Organ and Inter-Kingdom Crosstalks. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2020;10:9.
192. Nguyen LD, Viscogliosi E, Delhaes L. The lung mycobiome: an emerging field of the human respiratory microbiome. *Frontiers in microbiology* 2015;6:89.
193. Fraczek MG, Chishimba L, Niven RM, et al. Corticosteroid treatment is associated with increased filamentous fungal burden in allergic fungal disease. *J Allergy Clin Immunol* 2018;142:407-414.
194. Begley L, Madapoosi S, Opron K, et al. Gut microbiota relationships to lung function and adult asthma phenotype: a pilot study. *BMJ open respiratory research* 2018;5:e000324.
195. Leclere M, Costa MC. Fecal microbiota in horses with asthma. *J Vet Intern Med* 2020;34:996-1006.