



Caractérisation microbiologique des expectorations de patients MPOC en exacerbation

Mémoire

Éric Jubinville

Maîtrise en microbiologie
Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Éric Jubinville, 2015

Résumé

Les patients atteints d'une maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) ont des exacerbations menant à une perte de leur qualité de vie. La documentation est incomplète quant à l'identité des microorganismes responsables, due à l'utilisation d'approches classiques, telle la culture de microorganismes. L'utilisation de nouvelles approches telles les méthodes d'écologie microbienne et le séquençage de nouvelle génération basées sur la biologie moléculaire permet l'identification de microorganismes, et ce, sans culture. Le microbiome de patients MPOC contrôlés, stables et exacerbés ont été comparés. Une diminution de *Proteobacteria* ou de *Firmicutes* vers une augmentation de *Firmicutes* ou de *Proteobacteria* respectivement a été observée lors des exacerbations. Le microbiome de patients MPOC contrôlés a été comparé à trois mois d'intervalle. Un débalancement de leur microbiome vers les *Proteobacteria* a été observé après trois mois. Ces résultats pourront mener à des traitements plus appropriés et plus ciblés afin d'accroître la qualité de vie des patients.

Abstract

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients are often affected with exacerbation lowering their quality of life. The scientific community is unclear on which microorganism is responsible. This confusion is due mostly because of the culture techniques that are used to evaluate the presence of pathogens. The use of new approaches such as microbial ecology techniques and next generation sequencing based on molecular biology can identify the presence of bacteria without the need of culture. The microbiome of control, stable and exacerbated COPD patients was compared. Principal microbiome shift during exacerbation was a proportional reduction in *Proteobacteria* or *Firmicutes* and enrichment in *Firmicutes* or *Proteobacteria* respectively. The microbiome of control COPD patients was compared at baseline and three months later. Their microbiome shifted over a period of three months towards *Proteobacteria*. This study could lead to a better understanding of exacerbation and a better quality of life for COPD patients.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux.....	xi
Liste des abréviations et des sigles.....	xiii
Dédicace.....	xv
Remerciements.....	xvii
Introduction.....	1
La maladie pulmonaire obstructive chronique.....	2
La classification de la MPOC.....	4
Les causes de la maladie et de l'inflammation.....	5
Les causes de la maladie.....	5
Les causes de l'inflammation.....	8
Les exacerbations.....	9
Les bactéries.....	10
Les virus.....	11
Les microorganismes atypiques.....	11
Le déclenchement des exacerbations.....	12
Méthodes d'échantillonnage des voies respiratoires inférieures.....	15
Les méthodes d'écologie microbienne de type profilage et le séquençage de nouvelle génération.....	17
La bio-informatique dans l'analyse du microbiome.....	22
Le microbiome du poumon.....	25
Hypothèses de travail.....	29
Objectifs spécifiques.....	29
Méthodologie.....	31
Recrutement et comité d'éthique.....	31
Collecte et traitement de l'expectoration.....	32
Traitement de l'expectoration pour l'analyse de la biodiversité.....	33
Souches.....	34
Extraction d'ADN et d'ARN.....	34

Transcription inverse.....	35
Clonage de produits PCR d'origine virale pour les courbes standards.....	35
qPCR.....	36
Le pyroséquençage.....	37
Traitement et contrôle qualité des séquences brutes.....	38
Analyse taxonomique et d'OTU.....	38
.....	39
PCR avant les méthodes DGGE et l'ARISA.....	39
Électrophorèse sur gel d'agarose.....	40
Dosage et purification des produits PCR.....	41
Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant.....	42
L'analyse automatisée d'espaceur intergène de ribosome.....	42
Les analyses des profils microbiens.....	43
Les statistiques.....	44
Développement.....	45
Caractéristiques de la cohorte de patients MPOC.....	45
Utilisation de méthodes de profilage pour obtenir des profils microbiens utilisables dans l'analyse de la biodiversité des expectorations de patients MPOC.....	46
Comparaison du microbiome de patients MPOC lorsque ces derniers sont stables par opposition à lorsqu'ils sont exacerbés.....	50
Utilisation du pyroséquençage dans le but de découvrir des bactéries non suspectées lors d'exacerbation.....	62
Détermination de la charge bactérienne et virale dans des expectorations de patients MPOC.....	65
Comparaison du microbiome d'expectoration de patients MPOC contrôle après trois mois d'intervalle.....	69
Conclusion.....	73
Annexe.....	87

Liste des figures

Figure 1 : Les effets néfastes de la fumée de cigarette sur les voies respiratoires. p. 2

Figure 2 : Le principe derrière la méthode de l'électrophorèse de gel sur gradient dénaturant (*Denaturing Gel Gradient Electrophoresis*). p. 18

Figure 3 : Le principe derrière la méthode de l'analyse automatisée d'espaceur intragène de ribosome (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*). p. 20

Figure 4 : Phylogénie des principales bactéries impliquées dans la MPOC. Annexe p. 88

Figure 5 : Cheminement des séquences dans le logiciel Mothur. p. 39

Figure 6 : Migration sur gel DGGE des échantillons S10, C17, E1, S11, C18, S12, un contrôle négatif PCR et deux consortiums bactériens (M). p. 46

Figure 7 : Migration de l'ADN du consortium bactérien sur gel d'acrylamide du séquenceur de type ABI. p. 48

Figure 8 : Migration de l'ADN de l'échantillon S11 sur gel d'acrylamide du séquenceur de type ABI. p. 48

Figure 9 : Dendrogramme avec une corrélation Pearson-UPGMA de profil bactérien en ARISA de la cohorte de patients MPOC. p. 49

Figure 10 : Dendrogramme avec une corrélation Pearson-UPGMA de profil bactérien en DGGE des échantillons S1-S8 et E1-E8. p. 50

Figure 11 : Dendrogramme avec une corrélation Pearson-UPGMA de profil bactérien en ARISA des échantillons S1-S8 et E1-E8. p. 51

Figure 12 : Courbe de raréfaction obtenue avec 30 échantillons. p. 53

Figure 13 : Taxonomie aux phylums bactériens des échantillons 1-36. p. 55

Figure 14 : Taxonomie au genre bactérien des échantillons 1-36. p. 56

Figure 15 : Distribution des genres bactériens des échantillons 1-36. p. 57

Figure 16 : Arbre phylogénétique Relaxed Neighbor-Joining avec une matrice Bray-Curtis selon la distance entre les échantillons de patients MPOC. p. 58

Figure 17 : Abondance des phyla bactériens chez des patients à risque d'exacerbation. p. 60

Figure 18 : Abondance des genres bactériens chez des patients à risque d'exacerbation. p. 61

Figure 19 : Abondance des phyla bactériens dans les échantillons de patients en exacerbation. p. 63

Figure 20 : Abondance des genres bactériens dans les échantillons de patients en exacerbation. p. 64

Figure 21 : Diagramme en boîte avec la médiane de la charge virale de différents virus respiratoires chez des patients MPOC contrôles, stables et exacerbés. p. 65

Figure 22 : Diagramme en boîte avec la médiane de la charge bactérienne de différentes bactéries pathogènes chez des patients MPOC contrôles, stables et exacerbés. p. 67

Figure 23 : Charge bactérienne totale des patients MPOC déterminée par qPCR. p. 68

Figure 24 : Dendrogramme avec une corrélation Pearson-UPGMA de profil bactérien en ARISA des échantillons C18-0 à C21-0 et C18-3 à C21-3. p. 70

Figure 25 : Abondance des phyla bactériens dans les échantillons de patients MPOC contrôle à trois mois d'intervalle. p. 71

Figure 26 : Abondance des genres bactériens dans les échantillons de patients MPOC contrôle à trois mois d'intervalle. p. 72

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des différents stades de la MPOC. p. 5

Tableau 2 : Amorces et sondes utilisées. Annexe p. 87

Tableau 3 : Caractéristiques de la cohorte. p. 45

Tableau 4 : Indice de biodiversité. p. 54

Tableau 5 : Quantité moyenne de bactéries spécifiques par gramme d'expectoration de patients MPOC à différents stades de la maladie. p. 68

Liste des abréviations et des sigles

AAT : alpha antitrypsine
ARISA : L'analyse automatisée d'espaceur intergène de ribosome (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*)
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN : Acide ribonucléique
ARNr : Acide ribonucléique ribosomale
CBA : Cytométrie avec un ensemble de billes (*Cytometric bead array*)
CRP : *C-reactive protein*
CVF : Capacité vitale forcée
dNTP : désoxyribonucléotides
DGGE : Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (*Denaturing Gel Gradient Electrophoresis*)
DTT: Dithiothréitol
EBV : Virus Epstein-Barr
EN : élastase de neutrophiles
IUCPQ : Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec
LBA : Lavage broncho-alvéolaire
NTC : *No template control*
MPOC : Maladie pulmonaire obstructive chronique
OMS : Organisation mondiale de la Santé
pb : paire de base
PCR : Réaction de polymérase en chaîne
qPCR : Réaction de polymérase en chaîne quantitative
SLPI : Inhibiteur de leucoprotéase sécrétoire (*Secretory leukocyte protease inhibitor*)
TAE : *Tris Acetic EDTA*
TBE : *Tris Borate EDTA*
TRFLP : Polymorphisme des longueurs des fragments de restriction terminaux (*Terminal restriction fragment length polymorphism*)
TSA: *Tryptic soy agar*
VEMS : Volume expiratoire maximal à une seconde
VRS : Virus respiratoire syncytial

Dédicace

Je dédie ce modeste travail et ma profonde gratitude à ma mère et mon père pour l'éducation qu'ils m'ont prodiguée; avec tous les moyens et au prix de tous les sacrifices qu'ils ont consenti à mon égard, pour le sens du devoir qu'ils m'ont enseigné depuis mon enfance.

Remerciements

J'aimerais remercier premièrement la personne qui m'a fait confiance avec ce projet de recherche et qui m'a accepté dans son équipe de travail. Merci Caroline Duchaine, tu es pour moi une chercheuse exceptionnelle avec ton professionnalisme ainsi qu'avec ton sens de l'humour, ton écoute et ta générosité débordante.

J'aimerais aussi remercier mes parents Pierre Jubinville et Marjolaine Roy qui m'ont supporté et qui m'ont motivé depuis le début et qui continuent toujours de le faire. Merci aux membres de mon comité aviseur Steve Charette, Élyse Bissonnette et ma co-directrice Julie Milot pour leur support et leur conseil tout au long de mon projet. Merci aussi à nos collaborateurs, François Maltais et Roger C. Levesque.

Merci aux infirmières de recherche, principalement Marie-Josée Breton qui a pris en charge le recrutement de patients ainsi que toute l'aide qu'elle m'a apportée. Merci à l'équipe du Dr Louis-Philippe Boulet, dont Marie-Ève Boulay, Philippe Prince et Mylène Bertrand de m'avoir enseigné les techniques reliées aux expectorations, ainsi que pour m'avoir donné accès à leur espace de travail.

J'aimerais aussi remercier trois personnes que j'apprécie énormément soit Marc Veillette, Nathalie Turgeon et Valérie Létourneau tant pour les réponses à mes multiples questions qu'à leur enthousiasme d'enseigner leur savoir aux étudiants. J'aimerais finalement remercier mes collègues de tous les jours, mes amis, Hamza M'Barèche, Évelyne Brisebois, Laetitia Bonifait, Léa Gauthier-Levesque, Vanessa Dion-Dupont, Kevin Michel, Pascale Blais-Lecours, Daniel Verreault, Nicolas Groulx, Phillipa Perrott, Gillina Bezemer, Jonathan Pilote, Marie-Ève Dubuis, Maude Talbot, Gabrielle Gagné et tous les membres du centre de recherche de l'institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec. Je remercie aussi les organismes subventionnaires, le FRQS et le CRIUCPQ pour leur bourse de maîtrise et la fondation JD Bégin pour le pyroséquençage.

Introduction

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), 16,7 % des décès en 2008 ont été causés par des maladies pulmonaires comme les infections des voies respiratoires inférieures, la tuberculose, les cancers reliés aux poumons et les maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC). Plus particulièrement, la MPOC est actuellement la 4^e cause de décès mondiale avec 3,2 millions de morts par année (5,8 %) [1]. De plus, l'OMS projette que la MPOC sera la 3^e cause de décès dans le monde d'ici 2030 [2].

La projection de l'OMS semble valide, puisque la population canadienne est vieillissante et l'âge est un facteur très important dans cette maladie. En effet, selon Statistique Canada le nombre de personnes âgées va dépasser le nombre d'enfants en 2017 [3]. En 2009, 4,2 % des Canadiens âgés de 35 ans et plus étaient atteints de la MPOC, la maladie étant retrouvée tant chez les hommes (4 %) que chez les femmes (4,5 %) [4]. Au Québec, plus de 386 000 personnes sont atteintes de MPOC soit une personne sur 18 [5]. Si l'on compare le Québec au reste du pays, il est actuellement la deuxième province avec le plus haut taux de patients atteints de MPOC, l'Ontario étant au premier rang [6].

Ceci est sans compter le fardeau économique relié à la MPOC. Un rapport de 2009 avait projeté qu'en 2010 aux États-Unis plus de 29,5 milliards de dollars seraient nécessaires pour les soins directs aux patients atteints de MPOC comparativement à 15,6 milliards de dollar pour les patients atteints d'asthme [7]. Ce calcul n'avait pas pris en considération les soins indirects pour les patients, c'est-à-dire les consultations dans les hôpitaux, l'absentéisme au travail ou à l'école, etc. En plus de ces statistiques et ces chiffres reliés à la maladie, il faut savoir que la MPOC est actuellement irréversible ce qui en fait un sujet de recherche tout à fait justifiable et important.

La maladie pulmonaire obstructive chronique

La maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) se caractérise par une obstruction et une inflammation chronique des voies respiratoire habituellement progressive pouvant évoluer vers une insuffisance respiratoires aggravant ainsi la qualité de vie des patients [8]. Ces phénomènes défavorables sont associés dans la majorité des cas à la présence d'emphysème et/ou de bronchite chronique qui sont des maladies pulmonaires présentant un syndrome obstructif chronique ou MPOC (Figure 1). L'emphysème et la bronchite chronique ont été décrits pour la première fois lors d'un congrès de médecins en 1959 et le terme MPOC a été utilisé pour la première fois en 1965 par William Briscoe, un politicien de l'époque [9].

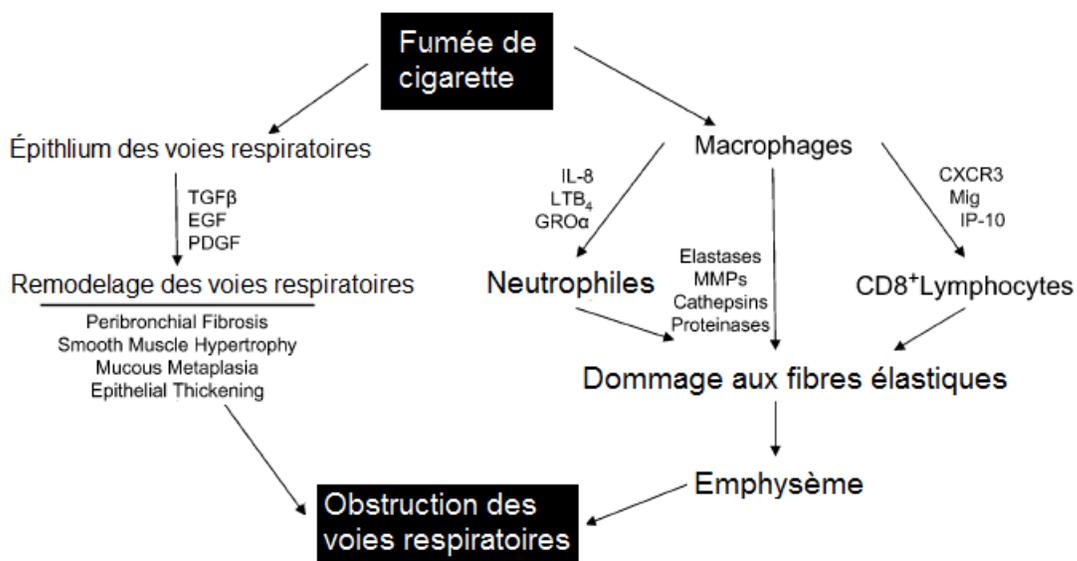


Figure 1 : **Les effets néfastes de la fumée de cigarette sur les voies respiratoires.** La fumée de cigarette endommage l'épithélium des voies respiratoires en causant du remodelage et active les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes. Adapté de Sharafkhane *et al.* (2008).

L'emphysème se caractérise par la détérioration et une perte d'élasticité des sacs alvéolaires responsables des échanges gazeux au sang, à cause de l'inflammation chronique [10]. En effet, les parois des alvéoles se détruisent peu à peu influençant ainsi la majorité des voies respiratoires [11]. Cette inflammation chronique est due à l'inhalation d'agent toxique comme la fumée de cigarette et cela a comme conséquence le recrutement accru de macrophages et de neutrophiles dans les poumons. Ceux-ci sécrètent énormément de molécules destructrices (protéases) qui s'attaquent aux envahisseurs, mais aussi aux tissus pulmonaires (alvéoles). La destruction des alvéoles a comme impact l'apparition de zones non ventilées et de zones perfusées. Les patients doivent alors inspirer et expirer davantage pour atteindre leur quantité d'oxygène métabolique et expulser le gaz carbonique produit [12]. De plus, l'hyperinflation (augmentation de la taille des alvéoles) dû à la perte d'élasticité entraîne, lorsque la maladie devient sévère, de l'hypoxie (manque d'oxygène) et de l'hypercapnie (rétention de gaz carbonique) [12]. En effet, l'augmentation de la taille des poumons atteint un maximum dû à l'espace restreint de la cavité thoracique. Les patients sont alors limiter dans leur respiration.

Les patients atteints de bronchite chronique ont comme symptômes de la toux, des expectorations abondantes et chroniques et une respiration sifflante. La bronchite chronique a comme inconvénient de persister pour de longues durées (présence de toux et d'expectorations durant 3 mois consécutifs par an sur 2 ans) comparativement aux bronchites aiguës qui ne persistent que quelques jours et s'estompent par la suite [11].

Chez les patients MPOC avec bronchite chronique, il y a une production exagérée de mucus dans les voies respiratoires. Au début du processus inflammatoire, il y a un remodelage de l'épithélium des voies respiratoires, c'est-à-dire une augmentation de l'épaisseur de manière graduelle de l'épithélium bronchique. Cet épaissement, en partie causé par l'accumulation de protéines sur les parois bronchiques, a comme conséquence un rétrécissement progressif des voies bronchiques rendant plus difficile le transport de l'air jusqu'aux alvéoles et une

accumulation de mucus dans les bronches. Par la suite, il y a un remplacement des cellules ciliées par des cellules à mucus et une hypertrophie (grossissement des cellules) des glandes sécrétrices de mucus aggravant la congestion des voies respiratoires. Enfin, les élastases sécrétées par les neutrophiles, induisent une hypersécrétion des glandes à mucus en présence de fumée de cigarette [13].

La classification de la MPOC

Avant de décrire les causes de la maladie, il est important d'en expliquer la classification afin de bien comprendre la population de patients qui a été étudiée. La classification de la MPOC se base sur les fonctions pulmonaires et sur les symptômes du patient. Les fonctions pulmonaires sont caractérisées à l'aide de la spirométrie. Cette dernière fût inventée en 1842. À l'époque elle servait à mesurer le volume d'air inspiré, mais pas le débit. Il faudra attendre jusqu'en 1942 lorsque Tiffeneau décrira les principes derrière les débits d'air. C'est de là que provient le terme le rapport de Tiffeneau (volume expiratoire maximal à une seconde/capacité vitale forcée) (VEMS/CVF) [14]. La spirométrie actuelle permet de calculer différents paramètres de la respiration comme le volume courant, le volume de réserve expiratoire, le VEMS, la CVF, le rapport VEMS/CVF, etc. Pour bien se situer, un contrôle sain (aucun symptôme comme la toux et des expectorations après l'utilisation de bronchodilatateur pré-spirométrie) a un VEMS plus grand que 80 % et un rapport VEMS/CVF plus grand que 0,70 sans aucun symptôme.

Il y a actuellement cinq stades de la maladie : à risque, léger (GOLD I), modéré (GOLD II), sévère (GOLD III) et très sévère (GOLD IV) [15]. Les patients à risque sont caractérisés par un VEMS supérieur à 80 % mais inférieur à 100% de la prédite et un rapport de Tiffeneau plus grand que 0,70 et présentent quelquefois de la toux et des expectorations. Des fumeurs ou ex-fumeurs peuvent être retrouvés dans cette catégorie. Les patients atteints d'une MPOC légère (GOLD I)

ont un VEMS supérieure à 80% mais un rapport en dessous de 0,70 %. Le stade modéré (GOLD II) de la maladie se caractérise par un VEMS entre 50 et 79 % avec un rapport plus petit que 0,70. La chute du VEMS s'explique principalement par une obstruction bronchique ne permettant pas une respiration dite normale. Les patients commencent à ressentir de la fatigue lors de marche en pente. Le stade sévère (GOLD III) se décrit par un VEMS entre 30 et 49 % et un rapport VEMS/CVF en dessous de 0,70. Les patients doivent habituellement s'arrêter quelques instants lorsqu'ils marchent sur un terrain plat pour reprendre leur souffle et présentent des symptômes de dyspnée. Il y a aussi les très sévères (GOLD IV) avec un VEMS inférieur à 30%. À ce stade, les patients sont très limités dans leurs déplacements et, dans la plupart des cas, requièrent l'assistance d'un respirateur à oxygène.

Tableau 1 : **Caractéristiques des différents stades de la MPOC**

Stades	VEMS	Tiffeneau	Détails
À risque	>80%	>0,70	Quelques fumeurs et ex-fumeur sans symptômes
GOLD I	>80%	<0,70	Quelques symptômes (dyspnée, expectorations)
GOLD II	50-79%	<0,70	Début d'obstruction bronchique
GOLD III	30-49%	<0,70	Essoufflé lors de marche
GOLD IV	<30%	<0,70	Assistance avec de l'oxygène

Les causes de la maladie et de l'inflammation

Les causes de la maladie

La cigarette

L'agent causal numéro un de cette maladie en Amérique du Nord est la fumée de cigarette et donc indirectement le tabac [16]. Il y a plus de 7000 composés chimiques libérés lors de la combustion de la cigarette qui viennent attaquer le système immunitaire. Un exemple serait le méthanol [17] qui est un des composé retrouvé lors de la combustion du tabac. Parmi les 7000 produits chimiques

retrouvés dans la fumée secondaire de cigarette, près de 250 sont connus comme étant dangereux pour la santé humaine [18].

La pollution

Le contexte de la MPOC est différent dans les pays en voie de développement. La pollution de l'air semble être un facteur de plus en plus important que ce soit dans l'air extérieur ou dans l'air intérieur. La pollution extérieure provient principalement des industries et des automobiles. La pollution industrielle varie dans le temps selon la température et les émissions de gaz [19]. La présence de particule en suspension, d'ozone (O₃) et de dioxyde d'azote (NO₂) dans l'air a comme répercussion d'augmenter les infections virales pulmonaires [20]. La pollution produite par les automobiles est aussi importante dans la maladie. En effet, une étude a démontré que les femmes, à la base plus susceptible que les hommes à la pollution de l'air [21, 22], qui habitent à 100 m d'une route très passante ont 1,79 fois plus de chance de développer une MPOC que ceux qui habitent plus loin [23].

La pollution intérieure peut provenir de plusieurs sources comme les produits désinfectants, les pesticides à usage domestique, la fumée secondaire et les appareils de combustion ou de chauffage. Les plus connues ayant un lien avec la MPOC sont la fumée secondaire et l'utilisation d'appareils de combustion ou de chauffage. La fumée secondaire se définit comme étant la fumée expirée par les fumeurs et qui se dégage soit d'une cigarette, d'un cigare ou d'une pipe [24].

Actuellement, près de 50 % de la population mondiale utilise la combustion de biomasse pour créer de l'énergie [18], soit pour l'éclairage, le chauffage ou pour la cuisson. Une variété de produits est utilisée dans la combustion comme les restes d'épi de maïs, le bois ou les excréments d'animaux. Cette combustion dégage des composés néfastes dans l'air qui sont dangereux pour les poumons lors d'une exposition chronique [25]. Une étude a comparé les poumons de femmes fumeuses ayant une MPOC et celles ayant une MPOC causée par la combustion

de biomasse. Ils ont démontré que les femmes fumeuses avaient un plus grand taux d'emphysème et plus de métaplasie, la transformation d'un tissu cellulaire différencié en un autre tissu cellulaire, des cellules pulmonaires. Cependant, les femmes ayant une MPOC causée par la combustion de biomasse avaient plusieurs dépôts pigmentés ainsi que des cicatrices et de la fibrose (destruction du tissu) sur les parois respiratoires [26].

La cause génétique

Un faible pourcentage de la population a des anomalies génétiques qui augmentent leur susceptibilité à développer de l'emphysème et par la suite une MPOC. En effet, environ 1 à 2 % des patients MPOC ont une déficience en protéine alpha-1-antitrypsine (AAT). La protéine est un inhibiteur de protéases, elle a donc comme rôle de dégrader les protéases plus spécifiquement les élastases provenant des neutrophiles. Une absence d'AAT favorise une augmentation de la concentration en élastase de neutrophiles (EN) dans le sérum de patients. Indirectement, les EN sont impliquées dans le processus d'inflammation alvéolaire, c'est-à-dire l'emphysème des patients MPOC [27, 28].

Autres causes

Finalement, certains facteurs favorisant la MPOC peuvent se développer très tôt dans le développement de l'enfant. En effet, si la mère est fumeuse lors de sa grossesse, l'enfant a beaucoup plus de chance de développer des problèmes respiratoires ultérieurs, dont la MPOC. De plus, un enfant a beaucoup plus de chance de développer une MPOC suite à un asthme en jeune âge, s'il n'est pas suivi rigoureusement [29].

Les causes de l'inflammation

Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer les processus inflammatoires chez les patients MPOC. Le stress oxydatif, la balance protéase/antiprotéase et l'apoptose seraient tous des mécanismes impliqués dans l'inflammation chronique des patients [30-33]. Le relargage de facteurs de nécrose tumorale, d'élastase de neutrophiles et de perforines par les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes T respectivement favoriserait l'inflammation dans les poumons due à l'inhalation de fumée de cigarette [34].

Les macrophages ont pour rôle principal d'éliminer les bactéries présentes dans les voies respiratoires via la phagocytose. Malgré leur quantité qui est augmentée chez les patients MPOC, leur capacité à phagocyter les bactéries et à les éliminer est diminuée par des mécanismes très peu connus [35]. L'hypothèse actuelle est que les motifs moléculaires associés aux pathogènes à la surface des bactéries changeraient de conformation et rendraient les macrophages incapables d'effectuer la phagocytose [36]. De plus, les macrophages perdraient aussi leur habileté à éliminer les cellules apoptotiques (neutrophiles en autre) favorisant la persistance de l'inflammation chez les patients MPOC [37].

La quantité de neutrophiles est aussi augmentée dans le poumon des patients. Lors de leurs arrivées au site d'inflammation, ils libèrent à leur tour des médiateurs comme IL-8 (impliqué dans le recrutement des neutrophiles), des espèces d'oxygènes réactives (*Reactive oxygen species*) ainsi que des protéases [38]. Les neutrophiles ont habituellement un temps de vie très court et deviennent des cellules apoptotiques rapidement. Cependant, puisque les macrophages ne peuvent pas les éliminer par voie de phagocytose il y a une persistance de matériel neutrophilique dans l'environnement cellulaire [39]. Cette persistance favorise la présence d'inflammation chronique. De plus, les neutrophiles sont habituellement attirés vers un site d'inflammation pulmonaire selon un gradient chimiotactique créant un chemin en minimisant les dommages à travers les vaisseaux sanguins. Cependant, la migration des neutrophiles chez les patients

MPOC se fait de manière beaucoup plus hasardeuse augmentant ainsi les dommages faits à l'organisme [40].

Il existe commercialement des trousse qui ont été créés chez Becton Dickinson pour le diagnostic et la présence d'interleukines inflammatoires chez l'homme ciblant IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF, et IL-12p70. Toutefois, un des facteurs causant le plus d'inflammation chez les patients MPOC est l'apparition d'exacerbation [41]. Plusieurs marqueurs ont aussi été identifiés afin de déterminer la présence d'inflammation chez les patients, tant au site local d'inflammation que systémique. L'IL-1 β et le CXCL10 du sang et les éosinophiles périphériques sont des biomarqueurs de la présence de bactéries, de virus ou d'éosinophiles associés aux exacerbations de patients MPOC [42]. Les patients exacerbés ayant des microorganismes potentiellement pathogènes ont quant à eux une concentration d'IL-1 β , d'IL-8 et IL-10 [43] plus élevée démontrant une inflammation locale et un taux élevé de protéine réactive-C (*C-reactive protein*, CRP) dans le sang confirmant une inflammation systémique [44, 45].

Les exacerbations

Les patients atteints de MPOC sont souvent aux prises avec des épisodes d'exacerbation aiguë de leurs symptômes entraînant ainsi une perte supplémentaire de qualité de vie [46]. Les causes de ces exacerbations demeurent incomprises. Chez plus de 60 à 70 % des cas, la cause suspectée est une infection des voies respiratoires inférieures. Une étude de Sykes et collaborateurs en 2007 a démontré que 50 % de leurs patients MPOC avaient une infection bactérienne lors d'exacerbation, 66 % une infection virale et 25 % une co-infection [47]. Les périodes d'exacerbations sont beaucoup plus fréquentes en période hivernale qu'en période estivale tant dans l'hémisphère Nord que Sud [48]. La concentration bactérienne, c'est-à-dire la quantité de bactéries retrouvées dans une expectoration, n'est toutefois pas plus élevée lorsque les patients sont en exacerbation par rapport à une phase stable de la maladie [49, 50].

Les bactéries

La communauté scientifique s'accorde sur la présence possible de quatre bactéries pathogènes prédominantes lors d'exacerbations. En ordre d'importance, les bactéries sont *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* et *Pseudomonas aeruginosa* [51-54]. Il a été démontré que la présence de *H. influenzae* et de *M. catarrhalis* dans les voies respiratoires inférieures augmente de trois à cinq fois la concentration de cytokines inflammatoires comme l'IL-23, l'IL-12p70 et l'IL-10 comparativement à une flore commensale (*Prevotella* spp.) [55]. Plus précisément, la bactérie *M. catarrhalis* est responsable d'environ 10 % des cas d'exacerbations [56] et son principal mécanisme d'affection est de déstabiliser l'équilibre protéase/antiprotéase qui règne au niveau pulmonaire. En effet, ce microorganisme diminue la concentration des inhibiteurs de leuco protéase sécrétoire (SLPI) et de ce fait vient augmenter la concentration des EN [57]. Très peu de détails sont retrouvés sur la bactérie *S. pneumoniae* et son lien avec la MPOC.

D'un autre côté, le stade de la maladie est un important facteur dans la biodiversité microbienne. Il a été démontré que plus le stade de la maladie est avancé, en présence d'un VEMS plus petit que 50 %, plus il y a une concentration élevée de *P. aeruginosa* et de *H. influenzae* [58]. Plus le stade de la maladie est avancé plus la biodiversité des patients MPOC ressemble à celle des patients atteints de fibrose kystique. En effet, comme pour la fibrose kystique, les souches mucoïdes et multirésistantes de *P. aeruginosa* voient leur présence augmenter avec la sévérité de la MPOC [59, 60]. Il est important de savoir que plus la maladie progresse, plus le risque d'exacerbation est élevé [61] et plus il y a de chance d'être colonisé par des microorganismes pathogènes comme *P. aeruginosa* [62]. De plus, il a aussi été démontré que les patients colonisés par *P. aeruginosa* ont une biodiversité microbienne beaucoup plus faible [63, 64] et un taux de mortalité plus élevé [65]. Finalement, *P. aeruginosa* a un potentiel inflammatoire beaucoup plus important que celui de *H. influenzae* et que ce dernier provoque davantage d'inflammation que la bactérie *M. catarrhalis* [66].

Les virus

Actuellement, il y a beaucoup moins d'information sur les principaux virus respiratoires retrouvés lors d'exacerbation. Les plus présents lors d'exacerbation sont les rhinovirus, suivis du virus de l'influenza A et B confondus et du virus respiratoire syncytial (VRS A et B) [67, 68]. Cette étude a aussi démontré que les virus présents dans les expectorations de patients MPOC sont beaucoup plus présents dans les pays d'Europe comparativement à ceux identifiés en Amérique du Nord. De plus, la différence géographique des épisodes d'exacerbation influence la biodiversité virale des échantillons d'expectoration. Cela fait en sorte que d'une région du monde à l'autre et d'un pays à l'autre, la biodiversité des patients en exacerbation peut être différente.

Les microorganismes atypiques

Il y a aussi plusieurs microorganismes atypiques qui ont été isolés dans les expectorations de patients MPOC par exemple : *Legionella pneumophila* [69], *Mycobacterium poriferae* [70], *Chlamydia pneumoniae* [71, 72], *Streptococcus pseudopneumoniae* [73] et *Pneumocystis jirovecii* [74, 75]. Ce dernier est un champignon associé dans la majorité des cas à une co-infection avec le VIH. Il s'agit d'un champignon opportuniste qui se retrouve seulement chez les patients immunosupprimés. Le virus Epstein-Barr (EBV) a aussi été identifié dans les expectorations de patients MPOC. La découverte d'EBV est toutefois controversée [76, 77]. Selon des études, le mécanisme d'action d'EBV serait de diminuer la production de l'IFN γ impliqué dans l'immunité innée, soit la première ligne de défense du système immunitaire. Récemment, de l'acide ribonucléique (ARN) du virus de la mosaïque du tabac a été identifié dans la salive de fumeurs [78]. Selon les résultats et les conclusions de cette étude, ce virus, n'ayant pas comme cible les cellules humaines, pourrait tout de même venir altérer la transcription au niveau cellulaire et altérer les cellules humaines. D'un autre côté, une étude récente a démontré la présence de bactéries viables dans la fumée de cigarette [79]. Il pourrait donc y avoir un lien direct avec l'étude de Marin et collaborateurs en 2012

qui démontre que les patients ayant fumé plus de paquets de cigarettes par année ont plus d'infections bactériennes et une augmentation de la sévérité des symptômes [44].

Le déclenchement des exacerbations

Actuellement, il y a beaucoup de recherches qui tentent de déterminer comment les exacerbations surviennent et quels sont les éléments déclencheurs de ces épisodes. Le groupe de recherche dirigé par Sanjay Sethi a travaillé surtout sur la présence des bactéries dans les expectorations et sur l'acquisition de nouvelles souches bactériennes. Ce dernier s'est rendu compte que lors d'exacerbation, il y avait apparition de nouvelles souches pathogènes. En effet, il a été possible de le démontrer avec des techniques identifiant des protéines uniques à chaque souche à la surface des cellules et en les comparant aux nouvelles acquisitions. Cependant, chez les patients stables, il n'y avait pas de nouvelles souches qui étaient détectées, ceci supportant sa nouvelle théorie d'acquisition de souches pathogènes. Il a été démontré à maintes reprises que l'acquisition d'une nouvelle souche de bactérie a comme conséquence d'augmenter le risque d'exacerbation [60, 80-83].

D'un autre côté, certains chercheurs se sont intéressés à la présence de virus pathogènes. L'apparition des méthodes basées sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR) a permis d'identifier que certains virus pouvaient aussi être responsables des exacerbations et que les bactéries ne seraient pas les seuls microorganismes impliqués [84]. En effet, l'étude de Kherald et collaborateurs a démontré une présence importante de virus lors d'exacerbation et a émis comme hypothèse que les virus proviennent des voies respiratoires supérieures puis se dirigent vers les voies respiratoires inférieures avec le temps [85]. L'hypothèse avait déjà été suggérée par Hurst en 2006, en démontrant que 25 % des microorganismes des patients MPOC retrouvés dans les voies respiratoires inférieures sont aussi trouvés dans les voies respiratoires supérieures [86].

Plus spécifiquement au niveau des virus, une autre hypothèse concernant le déclenchement des exacerbations est que des virus tels le VRS et l'Influenza sont capable d'augmenter l'adhérence de bactéries comme *H. influenzae* et *S. pneumoniae* aux cellules épithéliales humaines. Par différents mécanismes, les bactéries aidées des virus viendraient se lier davantage aux cellules épithéliales favorisant leur longévité et leur survie.

Les mécanismes utilisés sont toutefois différents pour chaque virus [87]. Les rhinovirus, par exemple, viennent dissocier une protéine importante impliquée dans les jonctions serrées, le zona occludens-1 (ZO-1), et retrouvée dans les barrières épithéliales humaines augmentant ainsi la liaison, la translocation et la persistance des bactéries [88]. Des études récentes utilisant des humains comme modèle ont permis de recréer les caractéristiques immunologiques et symptomatiques d'une exacerbation chez les patients MPOC en les inoculant avec du rhinovirus [89, 90]. Les patients inoculés avaient une augmentation des concentrations de cytokines inflammatoires comme l'IL-8 et l'IFN β ainsi qu'une augmentation des EN. En référence à cette étude, il a pu être démontré qu'après l'infection virale des patients avec des rhinovirus, il y avait une surinfection bactérienne secondaire qui s'installait dans la majorité des patients [91]. Un des mécanismes proposés par les chercheurs est que les rhinovirus sont capables de scinder des peptides antimicrobiens comme les SLPI et l'élafine. Le scindement des peptides antimicrobiens aiderait à établir l'infection bactérienne secondaire dépourvue d'attaque du système immunitaire. Les hypothèses précédentes sont appuyées par une étude de Hutchinson et collaborateurs en 2007 qui décrit que les exacerbations causées potentiellement par *H. influenzae* sont précédées de symptômes viraux [92].

Il y a aussi l'hypothèse des infections à recrudescence par des virus latents comme les adénovirus. Matsuse et collaborateurs en 1992 a retrouvé le gène E1A codant pour une protéine importante des adénovirus chez les patients MPOC [93]. Selon l'étude, les infections aux adénovirus commencent dès le jeune âge et les virus persistent sous forme latente à l'intérieur de l'hôte. Les virus diminueraient

l'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité de classe 1 à la surface des cellules infectées pour déjouer le système immunitaire. Toutefois, des études plus récentes ont démontré que la détection des adénovirus n'est pas fréquente chez les patients MPOC [92, 94]. Le VRS semble aussi être un virus qui persiste longtemps à l'intérieur des voies respiratoires chez les patients MPOC. Il se protège à l'aide de différents mécanismes pour déjouer le système immunitaire [95, 96].

Il existe aussi des prédispositions génétiques qui accroissent le risque d'exacerbation chez les patients MPOC. En effet, une étude a démontré qu'un polymorphisme menant à une carence en lectine fixant le mannose sur les cellules immunitaires augmente le risque de faire une exacerbation avec des symptômes beaucoup plus sévères [97]. Les lectines fixant le mannose sont des récepteurs sur les cellules immunitaires qui ont pour rôle de reconnaître les microorganismes envahissants via le mannose. Bref, cette carence sur les cellules immunitaires a pour conséquence qu'elles ne peuvent pas, par exemple, reconnaître des microorganismes potentiellement pathogènes.

Les autres hypothèses expliquant les exacerbations sont qu'elles pourraient être causées par un évènement d'ordre environnemental comme la pollution, la température, les allergènes ou par d'autres conditions médicales telles que l'insuffisance cardiaque, l'ischémie myocardique ou les embolies pulmonaires [98]. Malgré les effets nocifs connus de la pollution extérieure et intérieure dans la MPOC [18], les preuves à l'appui que la pollution de l'air joue un rôle direct sur les périodes d'exacerbation sont très faibles.

Les exacerbations dans la MPOC sont très complexes et peuvent impliquer plusieurs microorganismes pathogènes, comorbidités et facteurs environnementaux [99]. En bref, la communauté scientifique n'est pas en accord dans un contexte microbiologique sur l'identité des bactéries ou des virus pouvant causer des exacerbations aiguës chez les patients MPOC. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de bien mettre en évidence les microorganismes impliqués dans les exacerbations de patients MPOC.

Méthodes d'échantillonnage des voies respiratoires inférieures

Il existe actuellement une polémique dans le domaine d'échantillonnage pulmonaire visant à déterminer quelle est la meilleure méthode disponible pour récolter un spécimen des voies respiratoires inférieures [100]. En effet, le choix d'une méthode adéquate d'échantillonnage est important pour l'interprétation des résultats. Quelques critères peuvent être utilisés afin de déterminer la meilleure méthode pour le projet en question. Est-ce que les patients dans l'étude acceptent l'utilisation de méthode invasive ou non? Quels sont les données étudiées avec le prélèvement? Combien d'échantillons seront obtenus dans l'étude [100]? En effet, certaines techniques sont très défavorables pour les patients MPOC modérés ou sévères, par exemple un lavage broncho-alvéolaire (LBA) diminue régulièrement le VEMS du patient, amène un sentiment d'inconfort et vient affaiblir ses capacités pulmonaires. Comparativement, une induction saline pour obtenir un échantillon d'expectoration est beaucoup moins dommageable pour le patient. De plus, l'obtention d'expectoration induite ou spontanée est beaucoup plus facile à obtenir en termes de nombre d'échantillons que l'utilisation de spécimen de poumon entier et/ou de biopsie pulmonaire. Évidemment, l'ampleur du projet (projet pilote ou non) et les aspects monétaires viennent jouer un rôle important dans la décision. Il a été démontré que les voies respiratoires supérieures et les voies respiratoires inférieures ont une biodiversité très différente l'une de l'autre et que la méthode d'échantillonnage influe sur les résultats [101]. De plus, l'endroit où l'échantillonnage est effectué influence la biodiversité microbienne par exemple lors de lavages broncho-alvéolaires ou lors de l'utilisation de biopsies de poumon [64].

Une autre controverse est actuellement présente dans le domaine. En effet, qu'est-ce qui aie échantillonné? Est-ce vraiment représentatif des voies respiratoires inférieures ou est-ce de la contamination des voies supérieures (salive, etc.) [100]? Dans le cadre de mon projet de maîtrise, l'analyse d'expectorations semblait être la meilleure méthode et la plus utilisée afin de caractériser la flore microbienne des patients MPOC [102]. L'étude de Marin et collaborateurs en 2012 a permis de

démontrer que les échantillons d'expectoration induite ou spontanée sont similaires en terme de population de cellules inflammatoires [44]. De plus, plus la quantité d'expectoration est élevée plus l'échantillon est représentatif des voies respiratoires inférieures [103].

Dans un contexte où la MPOC deviendra la 3^e cause de décès dans le monde en 2030 [2], il est nécessaire de détecter ces microorganismes potentiellement responsables d'exacerbations. Cependant, en clinique, l'analyse des échantillons repose sur la culture des bactéries suspectées. Il est bien connu que la culture de microorganismes se limite aux agents recherchés et occulte la présence de microorganismes non cultivables [104]. Des données récentes suggèrent que des bactéries anaérobies pourraient jouer un rôle dans les exacerbations [105, 106]. Pourtant, ces agents microbiens sont rarement recherchés. De plus, aucune détection n'est effectuée pour les virus respiratoires de façon routinière dans les hôpitaux.

Lors d'infections microbiennes, dépendamment de la sévérité de l'affection, un traitement à l'aide d'antibiotiques et de cortisone est souvent prescrit [107]. Cependant, bien que dans la plupart des cas l'administration d'antibiotiques soit efficace, il arrive, chez certains patients, qu'elle n'apporte pas suffisamment d'amélioration dans la condition de celui-ci et qu'un autre antibiotique doit être prescrit [108]. Cette pratique peut avoir un impact sur l'émergence de microorganismes comme *P. aeruginosa* présentant une capacité à former des biofilms (matrice extracellulaire très complexe), des résistances aux antibiotiques, mais aussi sur les couts associés au traitement. L'étude de Nseir et collaborateurs en 2006 a démontré que l'utilisation inadéquate d'antibiotiques initialement utilisés dans le traitement augmente le risque de mortalité des patients MPOC [109]. Une mauvaise utilisation des antibiotiques reflète une méconnaissance des agents microbiens pouvant mener aux exacerbations et que de nouvelles méthodes d'analyses beaucoup plus modernes doivent être utilisées.

Les méthodes d'écologie microbienne de type profilage et le séquençage de nouvelle génération

L'utilisation de méthodes d'écologie microbienne de type profilage comme l'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE) [110-112] et l'analyse automatisée d'espaceur intergène de ribosome (ARISA) [113-115] basées sur la biologie moléculaire permet de mettre en lumière la présence d'espèces microbiennes dans divers environnements, et ce, sans tenir compte de la cultivabilité des microorganismes.

La méthode DGGE permet de séparer plusieurs fragments d'acide désoxyribonucléique (ADN) de même longueur sur un gel contenant un gradient de concentration d'un agent dénaturant comme l'urée et le formamide (Figure 2). La technique requiert premièrement d'effectuer une amplification PCR du gène de l'ARNr 16S. La majorité des publications se servant de la DGGE comme méthode de profilage utilise les amorces de Muyzer qui donne un fragment PCR de 212 pb situé entre les régions variables V1 et V3 du gène de l'ARNr 16S [112]. Muyzer est le premier scientifique à avoir décrit la méthode de la DGGE. Par la suite, les fragments d'ADN migrent à travers une matrice d'acrylamide. La concentration d'acrylamide est déterminée selon la taille du fragment obtenu après l'amplification PCR. Plus le fragment est court, plus la concentration en acrylamide doit être élevée et vice-versa. Dans le cas des fragments de Muyzer, une concentration de 8% a été utilisée.

La méthode DGGE est basée sur la composition en paires de base GC du fragment d'ADN amplifié par PCR : plus le fragment d'ADN contient un pourcentage élevé de paires de bases GC, plus le fragment migre longtemps sur le gel. Ceci est dû aux liaisons hydrogènes des paires de bases GC qui sont plus difficilement dénaturées (trois liaisons hydrogènes) que les liaisons des paires de bases AT (deux liaisons hydrogènes). De plus, une pince GC (une séquence G-C de 30 à 50 pb) est ajoutée à une des deux amorces utilisées lors de la PCR afin d'empêcher la séparation complète des brins d'ADN lors de la migration sur le gel.

L'identification des bandes sur gels DGGE est possible lorsqu'un consortium de bactéries connues (habituellement présent dans les échantillons analysés) a aussi été déposé parallèlement aux échantillons.

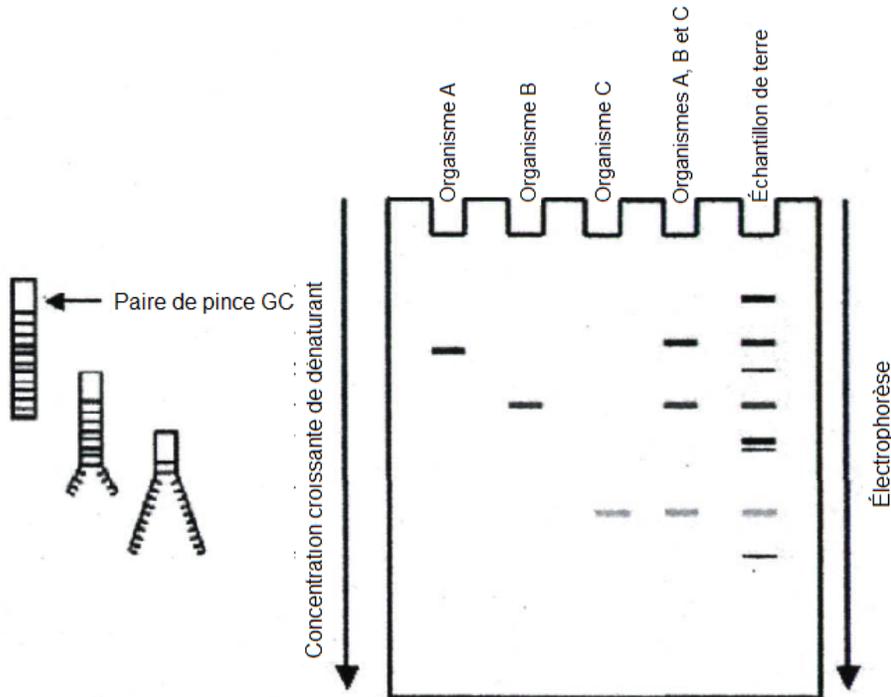


Figure 2 : Le principe derrière la méthode de l'électrophorèse de gel sur gradient dénaturant (*Denaturing Gel Gradient Electrophoresis*). Les fragments d'ADN migrent sur un gel contenant un gradient de dénaturant. La paire de pinces GC permet au fragment d'ADN de ne pas se dénaturer complètement. Chaque bande observée représente une espèce bactérienne distincte. Adaptée de Christine Berthiaume, (2010).

Très peu d'études ont utilisé la DGGE pour l'analyse des expectorations de patients MPOC. Purcell et collaborateurs en 2011 ont démontré avec la technique de la DGGE que les principaux microorganismes présents étaient *H. influenzae*, *S. pneumoniae* et *M. catarrhalis* [116]. La DGGE a comme avantage la détection de microorganismes non cultivables comparativement à la méthode traditionnelle basée sur la culture microbienne. De plus, elle permet de séparer plusieurs bactéries selon leurs séquences. Il existe toutefois des désavantages à l'utilisation de cette technique. Premièrement, la DGGE est une technique favorisant les

microorganismes majoritaires et donc les éléments minoritaires ne seront pas détectés sur gel [117] puisqu'il existe une compétition entre les séquences lors de la réaction PCR. En effet, si l'on retrouve plus de *S. pneumoniae* au départ avant l'amplification que *H. influenzae* en terme de proportion, *S. pneumoniae* sera amplifié exponentiellement plus que *H. influenzae*. De plus, la méthode DGGE se limite à une taille de fragment maximum de 600 pb, puisque sinon le pourcentage d'acrylamide nécessaire pour faire migrer les fragments serait trop petit et le gel serait trop fragile pour être manipulé. Étant donné que les fragments sont habituellement de petite taille, ceux envoyés au séquençage contiennent beaucoup moins d'information et rendent l'identification beaucoup plus ardue [118]. De plus, deux fragments d'ADN de séquences différentes peuvent potentiellement se dénaturer au même pourcentage d'agent dénaturant et ainsi migrer de façon similaire sur le gel.

L'ARISA est une technique basée sur la variation dans la longueur du fragment retrouvé entre les gènes de l'ARNr 16S et 23S des bactéries (Figure 3). Le fragment intergénique code la plupart du temps pour des ARN de transfert et est donc bien conservé chez les bactéries. En utilisant une des deux amorces (amorce anti-sens) couplées à un fluorochrome spécifique vers la fin du gène de l'ARNr 16S et vers le début du gène de l'ARNr 23S, il est possible d'amplifier le fragment intergénique. Le fragment d'intérêt sera doté d'un fluorochrome. La région intergénique, entre les gènes de l'ARNr 16S et 23S, est d'une longueur variable d'une espèce et/ou d'une souche à l'autre. Il est donc possible de discerner entre plusieurs souches bactériennes lors d'identification de bactéries [119]. L'échantillon de fragment d'ADN après PCR est analysé dans un appareil à chromatographie par capillarité (ABI Bio Analyzer). Par exemple, un fragment d'ADN de 200 pb migre sur le gel d'acrylamide dans le capillaire, puis passe devant un laser et puisque le fragment a été amplifié avec une amorce contenant un fluorochrome, il est possible de le détecter et de le quantifier. Par la suite, un chromatographe qui représente la taille des fragments en paire de base sous forme de pic sur l'axe des abscisses (propre à chaque espèce) par rapport à son intensité de fluorescence sur l'axe de l'ordonnée (la quantité) est généré. L'ARISA

n'a jamais été utilisée pour la caractérisation de la biodiversité des expectorations de patients MPOC. Toutefois, elle a déjà été utilisée avec d'autres échantillons complexes tels du sol, des eaux, etc [120-122].

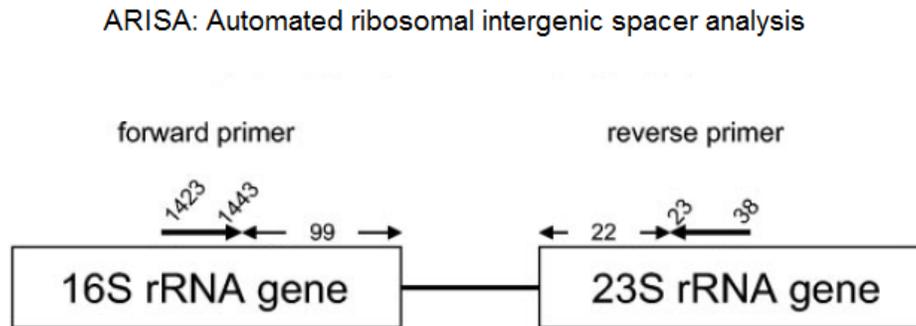


Figure 3 : Le principe derrière la méthode de l'analyse automatisée d'espaceur intragène de ribosome (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*). Position de l'amorce ITSf/ITSr_{eu} utilisée pour la méthode ARISA sur l'opéron des ribosomes 16S et 23S des bactéries et le nombre de nucléotides appartenant à chacun des ARNr. Adaptée de Cardinal *et al.* (2004).

La technique ARISA a comme avantage de pouvoir détecter la présence de bactéries non cultivables comme la DGGE et d'être extrêmement facile et rapide à utiliser, puisqu'elle ne requiert qu'une PCR en terme de méthodologie. De plus, l'analyse des données est beaucoup plus objective que l'analyse des résultats DGGE, puisque la détection des pics se fait à l'aide d'un appareil. Il existe quelques désavantages comme dans le cas de la DGGE. La compétition lors de la réaction PCR est toujours présente lors de l'ARISA et défavorise les éléments minoritaires de l'échantillon. Il se pourrait aussi que deux bactéries différentes aient toutes les deux un fragment de même longueur entre leur région intergénique ce qui ferait en sorte que les fragments migrent à la même position sur le gel et qu'on obtienne un chromatographe quasi identique [118]. De plus, il n'est pas possible de séquencer les bactéries détectées avec l'ARISA, comparativement à la DGGE.

D'autres méthodes de profilage comme le polymorphisme des longueurs des fragments de restriction terminaux (TRFLP) a permis de démontrer que les patients en santé, les fumeurs et ceux atteints de MPOC sévère avaient une flore microbienne pulmonaire totalement différente [123]. La TRFLP est une technique qui ressemble énormément à celle d'ARISA. La différence est qu'elle est basée sur la position de sites de restriction autour d'un gène ciblé. À l'aide d'enzyme de restriction, le fragment récupéré va migrer sur un séquenceur et la longueur du fragment permet d'être comparé avec un autre échantillon [124, 125].

L'arrivée des méthodes d'écologie microbienne de type profilage a fait en sorte que plusieurs nouveaux microorganismes, non suspectés à l'origine, ont pu être détectés et sont maintenant recherchés chez les patients MPOC [51]. L'emploi de méthodes de biologie moléculaire permet aussi d'évaluer de manière statistique l'homologie des populations microbiennes entre différents échantillons.

Il n'existe pas de région universelle comme le 16S chez les virus et les champignons, c'est pour cela qu'il y a très peu de données sur le virome et le « fungiome » retrouvés dans les voies respiratoires. Toutefois, il existe une technique permettant de cibler un virus spécifique pour déterminer sa présence et de le quantifier. En effet, la PCR quantitative (qPCR), basée sur la biologie moléculaire, sera favorisée pour la détection des virus respiratoires puisque les virus sont extrêmement fastidieux à mettre en culture et à identifier par des techniques traditionnelles [126].

Plusieurs nouvelles technologies sont maintenant utilisées pour caractériser la biodiversité d'un échantillon complexe (le séquençage de nouvelle génération tels le pyroséquençage 454, la technologie MiSeq, etc.) et continueront de progresser dans les prochaines années. D'après le plus récent congrès sur le microbiome du poumon [100], le pyroséquençage 454 est la technique la plus utilisée pour étudier le microbiome de patients MPOC. En effet, le pyroséquençage du gène codant pour l'acide ribonucléique ribosomal (ADNr) 16S permet de décrire et de classer phylogénétiquement la biodiversité d'un échantillon. Le premier avantage à cette technique est un gain de temps et d'argent puisqu'elle ne requière pas de clonage

pour l'identification des espèces. Le plus grand avantage est la description jusqu'au genre bactérien de la biodiversité retrouvée dans l'échantillon. Bref, le pyroséquençage semble être une méthode adéquate pour étudier les bactéries présentes lors d'exacerbation.

Il existe toutefois des désavantages à l'utilisation du pyroséquençage. En effet, cette technique a un coût relativement élevé, c'est-à-dire environ 3000 \$ pour 1/8 de plaque. De plus, la taille des fragments qui sont amplifiés n'est pas suffisante pour permettre une identification jusqu'à l'espèce. Cela a pour effet qu'il n'est pas possible de déterminer s'il y a du *P. aeruginosa* parmi les *Pseudomonas* détectés. De plus, la quantité d'informations générées par le séquençage de nouvelle génération est phénoménale. Il est donc nécessaire d'utiliser la bio-informatique pour être en mesure d'analyser la totalité de ces données.

La bio-informatique dans l'analyse du microbiome

Avant d'entrer plus en détail, voyons quelques définitions. Le microbiome se décrit comme étant une population microbienne assemblée dans un endroit donné à un moment donné, par exemple dans le poumon en exacerbation. Le microbiote quant à lui se décrit comme les microorganismes spécifiques à la population du microbiome. Deux grandes percées scientifiques permettent aujourd'hui d'étudier le microbiome de différents environnements. Grâce au projet sur le génome humain, plusieurs avancées et efforts ont été déployés pour développer des techniques de séquençage à la fine pointe de la technologie [127]. L'autre avancée majeure a été faite dans le domaine de la bio-informatique. En effet, les logiciels bio-informatiques permettent actuellement d'analyser une quantité phénoménale d'information provenant des procédés de séquençage [128].

Les logiciels bio-informatiques les plus utilisés pour l'analyse du microbiome sont Mothur [129] et QIIME [130]. Le logiciel utilisé pour mon projet a été Mothur. Ces deux logiciels ont pour utilité d'effectuer un nettoyage très précis dans les

séquences obtenues. En effet, les séquences suivantes sont supprimées : (1) contenant des N(s) (nucléotides non identifiés) (2) les séquences trop courtes ou trop longues (<330 pb et >600 pb) (3) ceux avec un mauvais appariement de l'amorce sens et (4) les séquences contenant des homopolymères. Un homopolymère est par exemple une séquence répétée de 15 nucléotides identiques. Le logiciel effectue un calcul et la probabilité de retrouver 15 nucléotides de suite est improbable, donc la séquence est éliminée. Les séquences provenant de mitochondries et de chloroplastes sont éliminés en les comparant à une banque de données appropriées. Les séquences sont par la suite comparées à des banques de données pour cibler la présence de chimère. Une chimère est un produit hybride entre plusieurs séquences qui se sont appariées ensemble [131]. Tous les nucléotides après l'amorce anti-sens sont aussi éliminés de la séquence. Pour finir, après le nettoyage, le logiciel permet de regrouper, de comparer en effectuant des tests statistiques et ultimement d'identifier jusqu'au genre bactérien la multitude de séquences retrouvées dans l'échantillon de départ (Figure 4, Annexe).

Les unités utilisées pour comparer et décrire le microbiome sont les *Organizational taxonomic unit* (OTU). Un OTU représente une séquence d'ADN 16S et cette séquence est reliée à un genre bactérien. La richesse (*Richness*) correspond au nombre d'OTU différents dans la population pour un échantillon. L'abondance (*Evenness*) se décrit comme la proportion des différents OTU par rapport à la population et l'émergence se définit comme l'émergence d'un OTU au détriment des autres [132].

Plusieurs tests peuvent être effectués pour caractériser les échantillons. Les indices de Chao, de Simpson et de Shannon sont les principaux tests. L'indice de Chao est un estimateur d'OTU dans l'échantillon même. Le calcul se base sur le nombre d'espèces observées dans la population, mais aussi sur les singletons obtenus au départ. Un singleton est une séquence avec un pourcentage d'identité trop faible pour être associé avec d'autres séquences donnant la même

identification. Par exemple, deux séquences donnant comme genre bactérien *Streptococcus*, mais une séquence avec une longueur de 450 pb et l'autre 400 pb.

$$S_{chao1} = S_{obs} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)}$$

S_{chao1} = La richesse estimée

S_{obs} = Le nombre d'espèces observées

n_1 = Le nombre d'OTU avec seulement une séquence "singletons"

n_2 = Le nombre d'OTU avec seulement deux séquences "doubletons"

L'indice de Shannon est directement relié à l'indice de Simpson. C'est un indice de biodiversité, donc plus l'indice est élevé plus la population est diversifiée (varie de 0 à l'infini selon le nombre d'échantillons analysés).

$$H_{shannon} = - \sum_{i=1}^{S_{obs}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

S_{obs} = Le nombre d'OTU observés

n_i = Le nombre d'individus dans le i ième OTU

N = Le nombre total d'individus dans la communauté

Brièvement, l'indice de Simpson est la probabilité de piger, au hasard deux individus identiques, dans la même population. Dans ce cas-ci, c'est la probabilité d'obtenir deux séquences identiques dans le lot de séquence. Donc, plus l'indice de Simpson est élevé (varie entre 0 et 1) plus la population étudiée est homogène et dans ce cas-ci plus le patient est infecté par un seul genre bactérien.

$$D_{simpson} = \frac{\sum_{i=1}^{S_{obs}} n_i (n_i - 1)}{N (N - 1)}$$

S_{obs} = Le nombre d'OTU observés

n_i = Le nombre d'individus dans le i ième OTU

N = Le nombre total d'individus dans la communauté

Avec le logiciel Mothur, il est possible de créer des arbres phylogénétiques avec des matrices de distance de style Bray-Curtis [133]. Par la suite, après avoir obtenu la matrice de distance, il est possible de l'intégrer dans un modèle Neighbor Joining [134]. Le problème avec le Neighbor Joining est qu'il peut seulement traiter un petit volume de données. Lorsque plus de 148 200 séquences sont traitées, le temps nécessaire pour construire l'arbre serait beaucoup trop long. Il existe une méthode améliorée, le Relaxed Neighbor Joining ou Clearcut [135] qui élimine l'étape de calcul en boucle ce qui rend la construction de l'arbre beaucoup plus rapide tout en gardant la même qualité.

Le microbiome du poumon

Le poumon a souvent été décrit comme un organe stérile [136, 137], et ce, grâce à plusieurs mécanismes de défense comme les cellules dendritiques et les macrophages alvéolaires qui s'attaquent aux envahisseurs en les transportant aux ganglions lymphatiques avoisinants. Les méthodes de culture utilisées pour identifier la présence de microorganismes étaient aussi responsables du statut de « stérilité » des poumons, puisque celles-ci ne sont pas aussi sensibles que les méthodes actuellement utilisées comme le séquençage de nouvelle génération. Il existe toutefois quelques études qui démontraient l'isolement de microorganismes provenant du microbiome buccal dans des échantillons provenant des voies respiratoires inférieures avec des approches de culture [138-141]. Cependant, les résultats étaient la plupart du temps expliqués par la contamination des

échantillons par la voie orale ou par des aspirations lors du sommeil [142, 143]. C'est pour ces raisons que les poumons n'ont pas été inclus initialement dans l'un des projets les plus prometteurs le *Human Microbiome Project* [144].

Avant d'aller directement aux poumons, il est important de bien expliquer le microbiome de quelques régions du corps. L'équipe de Nasizde a décrit le microbiome de la salive de 120 patients sains à travers le monde. Ils ont trouvé en ordre de priorité : *Firmicutes* (~37,8 %), *Proteobacteria* (~28 %), *Bacteroidetes* (~20 %) et *Actinobacteria* (~7 %) [145, 146]. Les *Firmicutes* sont des Gram positifs et les *Proteobacteria* sont des Gram négatifs. Une autre étude a porté sur le microbiome des narines de patients sains ainsi que dans l'oropharynx. Ils ont échantillonné les sept patients sains avec des écouvillons. Les cinq phylums principaux dans les narines étaient : *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, et *Fusobacteria* [145]. Ces données sont appuyées par une étude décrivant le microbiome de la bouche (les dents, la langue, le palais, etc.) où il retrouve principalement les mêmes phylums bactériens : *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* et *Fusobacteria* en ordre de priorité équivalent à 96 % des taxons identifiés [147]. Pour ce qui est du microbiome de l'oropharynx des patients sains, il retrouve cinq principaux phylums : *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* et *Actinobacteria* [145].

Avec toutes ces avancées technologiques, plusieurs études récentes démontrent que les poumons ne sont définitivement pas des organes stériles [64, 101, 123, 148]. Sze *et al.* ont démontré en étudiant des tissus pulmonaires que le microbiome de patients non-fumeurs sains regroupe des *Proteobacteria* (~63 %), des *Bacteroidetes* (26 %), et des *Actinobacteria* (4 %) [123]. Cependant, les patients atteints de MPOC sévère avaient comme population bactérienne : *Proteobacteria* (44 %), *Bacteroidetes* (28 %), *Firmicutes* (16 %), *Actinobacteria* (6 %) et *Tenericutes* (5 %) [123]. Les chercheurs décrivent entre autres, appuyés par d'autres équipes de recherche [148-150], que les patients MPOC modérés, sévères et très sévères ont une augmentation de la présence de *Firmicutes* comparativement aux patients contrôles. Cependant, les recherches d'Erb-

Downward démontrent que le phylum le plus important chez les patients MPOC très sévères est le groupe des *Proteobacteria*. Le groupe de Huang *et al.* a émis l'hypothèse qu'il existerait possiblement deux principaux phylums impliqués dans la MPOC soit des patients avec un microbiome principalement dominé par les *Proteobacteria* et un autre par les *Firmicutes* [151]. Selon cette littérature très peu d'étude ont comparé le microbiome de patients MPOC stables avec celui de patients MPOC exacerbés et aucune étude s'est intéressé à l'évolution du microbiome dans le temps.

Morris *et al.* ont étudié le microbiome de la bouche de 19 fumeurs et de 45 non-fumeurs, à l'aide de lavages buccaux, et des poumons, à l'aide de LBAs, afin de déterminer si les bactéries de la bouche pouvaient être les colonisateurs des poumons. Les populations microbiennes détectées dans la bouche ressemblaient à celles retrouvées dans les poumons. De plus, il y avait une différence entre le microbiome buccal des fumeurs et des non-fumeurs, mais aucune différence significative entre les fumeurs et non-fumeurs dans les poumons [152]. Ce résultat avait aussi été observé par Erb-Downward avec une cohorte beaucoup plus petite [64]. Cependant, lorsqu'on regarde plus précisément, dans l'étude de Morris, il y avait une diminution de l'abondance relative des *Bacteroidetes* et des *Proteobacteria* chez les fumeurs [152]. Le fait de fumer semble donc avoir un effet beaucoup plus direct sur le microbiome des voies respiratoires supérieures, mais des variations peuvent aussi être observées dans les poumons. Un autre fait intéressant est que les deux genres bactériens les plus abondants dans les LBAs étaient *Haemophilus* et *Enterobacteriaceae*.

Hypothèses de travail

- 1) Les méthodes de profilage permettent l'obtention de profils microbiens utilisables dans l'analyse de la biodiversité des expectorations de patients MPOC.
- 2) Le microbiome d'expectoration de patients MPOC est différent lorsque ces derniers sont stables par opposition à lorsqu'ils sont exacerbés.
- 3) Le pyroséquençage permet de révéler la présence de bactéries non suspectées lors d'exacerbation.
- 4) Les exacerbations des patients MPOC sont associées à une infection virale ou une augmentation de la charge bactérienne.
- 5) Le microbiome d'expectoration de patients MPOC contrôle change avec le temps.

Objectifs spécifiques

- 1) Caractériser la composition microbiologique des expectorations de patients MPOC, plus à risque d'exacerber, à l'état stable et exacerbé.
- 2) Caractériser la composition microbiologique des expectorations de patients MPOC contrôle, moins à risque d'exacerber, à l'état stable.

Méthodologie

Recrutement et comité d'éthique

Vingt et un patients MPOC ont été recrutés pour cette étude. Le projet a été accepté par le comité d'éthique local (numéro : 20 886). Tous les patients ont signé le formulaire de consentement nécessaire à l'étude. Les 21 patients ont été séparés en deux groupes distincts. Premièrement, le groupe plus à risque d'exacerbation était formé de 16 patients ayant eu au moins une exacerbation dans les six derniers mois. Les patients plus à risques ont été vus lors de deux visites, lorsqu'ils étaient stables et lorsqu'ils étaient en période d'exacerbation (S1 à S16 et E1 à E16, respectivement). Pour chacune de leur visite, un échantillon d'expectoration et un prélèvement sanguin étaient demandés.

Deuxièmement, le groupe contrôle moins à risque était constitué de cinq patients (C17 à C21) n'ayant pas eu d'exacerbation depuis un an et n'ayant pas de maladie infectieuse. Ces derniers ont été aussi vus deux fois, lorsqu'ils étaient stables et trois mois après leur première visite (C17-0/C17-3 à C21-0/C21-3). Un échantillon d'expectoration et un de sang ont été récoltés lors de la première visite lorsque les patients étaient stables, mais seulement un échantillon d'expectoration a été demandé trois mois plus tard.

Tous les patients avaient un VEMS ≤ 80 % et un rapport VEMS/CVF ≤ 70 %. De plus, ils devaient avoir un historique d'au moins 10 paquets-années (exemple : un paquet de cigarettes par jour pendant dix ans), être stables depuis un mois et être en mesure de générer des expectorations à l'état stable. Advenant le cas contraire, les patients étaient exclus de l'étude. Les patients atteints de VIH, de tuberculose (et autres maladies infectieuses chroniques) et les asthmatiques étaient exclus de l'étude. Les patients ont été recrutés par l'équipe de recherche en MPOC, la clinique MPOC ou par les soins respiratoires à domicile de l'IUCPQ (co-investigateurs : D^{re} Julie Milot et D^r François Maltais). Les patients devaient contacter le personnel de recherche dès le début d'un épisode d'exacerbation afin

de pouvoir obtenir un spécimen de sécrétion bronchique avant que le traitement antimicrobien ne soit amorcé.

Collecte et traitement de l'expectoration

Les expectorations des patients MPOC ont été recueillies de façon spontanée ou à la suite d'une induction. Pour induire l'expectoration, une solution saline (eau salée) a été administrée par nébulisation. Durant la nébulisation, si nécessaire et à toutes les sept minutes par la suite, il était demandé aux patients d'essayer d'expectorer dans un récipient stérile. La nébulisation était arrêtée après un maximum de 21 minutes ou si le patient ne se sentait pas bien ou que son VEMS chutait. Pour les patients vus en exacerbation à la première visite, un délai d'un mois et demi était attendu avant de les revoir à l'état stable.

Tous les échantillons d'expectoration ont été traités avec un délai maximal de deux heures. Le mucus a été sélectionné en enlevant le maximum de salive possible afin de minimiser la contamination par la flore des voies supérieures respiratoires et orales. Brièvement, l'expectoration était déposé dans une boîte de pétri en plastique, puis avec l'aide de pince stérile des mouvements de rotation étaient effectués pour éliminer la salive puisqu'elle était plus liquide que le mucus. Une quantité minimum de 200 mg était nécessaire pour effectuer les deux techniques (microbiome et caractérisation cellulaire). En dessous de 200 mg, les analyses du microbiome étaient priorisées. Pour s'assurer qu'il n'y avait pas beaucoup de cellules épithéliales provenant de la bouche, l'échantillon de mucus dans la boîte de pétri a été regardé sous microscope inversé à 20X. L'échantillon était considéré comme non contaminé lorsqu'il y avait moins de dix cellules épithéliales par champ. Si un compte de cellules épithéliales était trop élevé, l'étape de nettoyage était refaite. L'échantillon était par la suite pesé et séparé en deux aliquotes.

Le premier aliquote a été lavé avec du tampon phosphate (PBS) 1X pH 7,1 afin de récupérer les cytokines libérées par les cellules inflammatoires. Après le

traitement, le mucus a été mis en contact avec du dithiothéirol (DTT) 2X. Le DTT est un agent mucolytique capable de briser les ponts disulfures dans le mucus rendant ainsi l'expectoration moins mucoïde [153]. Par la suite, une filtration est faite pour éliminer le surplus de mucus qui n'a pas été traité par le DTT. Un compte de viabilité et un décompte cellulaire ont été effectués avec un hématimètre sous microscope à 40X. Ensuite, deux lames d'environ un million de cellules chacune étaient préparées et colorées avec le kit Diff-Quik pour effectuer un compte différentiel [154]. Les cellules identifiées lors des comptes différentiels étaient les macrophages, les neutrophiles, les éosinophiles, les lymphocytes, les cellules bronchiques et les cellules pavimenteuses de la bouche.

Le deuxième échantillon d'expectoration était directement pesé et congelé à -80 °C jusqu'à l'extraction d'ADN et d'ARN. De plus, les patients exacerbés fournissaient un échantillon supplémentaire d'expectoration. Ce dernier était envoyé au service de microbiologie de l'hôpital pour la culture de bactéries et champignons pathogènes retrouvés dans les voies respiratoires.

Traitement de l'expectoration pour l'analyse de la biodiversité

Les échantillons ont été dégelés complètement sur glace pendant dix minutes. Avant d'effectuer l'extraction d'ARN, les échantillons ont été inoculés avec 1×10^7 de phage MS2. Ce dernier servait de contrôle interne d'extraction d'ARN, de transcription inverse et de contrôle positif lors de la qPCR. Par la suite, les échantillons étaient incubés une heure à 37 °C avec un volume de DTT (100 mg d'expectoration = 100 µl de DTT 10X). Les échantillons étaient homogénéisés toutes les dix minutes pendant l'heure d'incubation [155]. Les échantillons étaient par la suite séparés en deux pour premièrement extraire l'ARN et deuxièmement l'ADN.

Souches

Le bactériophage MS2 Her-462 provenaient de la collection Félix-D'Hérelle de l'Université Laval [156]. La croissance de MS2 s'est fait sur un tapis bactérien en présence de sa souche hôte, le CD46 soit *Escherichia coli* ATCC-15597 [157] sur *Tryptic Soy Agar* (TSA) à 37 °C pendant 48 heures. Sept souches bactériennes ont été utilisées: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853 a été cultivé sur TSA à 25 °C pendant 48 heures, *Streptococcus pneumoniae* Her-1054 a été cultivé sur du TSA à 37 °C, 5 % CO₂ pendant 72 heures, *Moraxella catarrhalis* ATCC-8176 a été cultivé sur gélose sang à 37 °C, 5 % CO₂ pendant 48 heures et *Haemophilus influenza* ATCC-49247 a été cultivé sur gélose chocolat à 37 °C, 5 % CO₂ pendant 48 heures. D'autres souches ont aussi été utilisées : *Staphylococcus aureus* ATCC-25423 a été cultivé sur TSA à 37 °C, pendant 24 heures, *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC-13637 a été cultivé sur TSA à 25 °C, pendant 24 heures et *Escherichia coli* ATCC-35217 a été cultivé sur TSA à 37 °C, pendant 24 heures.

Extraction d'ADN et d'ARN

L'ADN des souches bactériennes ont été extraits avec la trousse QIAmp DNA mini kit de Qiagen en suivant le protocole du fabricant. Le protocole des Gram positifs a été utilisé pour *S. pneumoniae*. L'ADN et l'ARN des 36 échantillons d'expectoration ont été extraits avec la trousse MOBIO PowerLyzer DNA extraction et la trousse AMBION MagMax viral RNA/DNA respectivement en suivant le protocole suggéré par chacun des fabricants. L'ARN a été élué dans 50 µl de tampon d'éluion fourni par la trousse préchauffée à 56°C et une étape de transcription inverse a été faite immédiatement après. L'ARN supplémentaire qui n'a pas été transcrit en ADN complémentaire a été conservé à -80°C. L'ADN bactérien a été élué dans 50 µl de tampon d'éluion fourni avec la trousse et congelé à -20 °C. L'ADN a été quantifié

avec le spectrophotomètre NanoDrop 2000 en utilisant 1 µl d'ADN extrait et le tampon d'éluion comme référence.

Transcription inverse

L'étape de transcription inverse a été faite avec la trousse IScript cDNA. Le cycle thermique a été le suivant : cinq minutes à 25 °C, 30 minutes à 42 °C et cinq minutes à 85 °C sur l'appareil à PCR-terminal DNA Engine DYAD Peltier Thermal Cycler. La réaction s'est faite dans un volume de 40 µl contenant 30 µl d'ARN extrait auparavant, 8 µl de mélange réactionnel 5X iScript et 2 µl de transcriptase inverse iScript. Les ADNc ont été conservés à -20 °C.

Clonage de produits PCR d'origine virale pour les courbes standards

La trousse de clonage utilisée était le pGC Blue Cloning & amplification de Lucigen. Le protocole du fabricant a été utilisé avec quelques modifications. Le clonage de VRS A et B, adénovirus et rhinovirus ont été effectués avec de l'ADNc de chaque virus gracieuseté du Dre Hamelin provenant du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL). Le but était de créer des courbes standard facilement utilisables. Après avoir phosphorylé les amorces de chaque virus [158], 2,5 µl d'amorces ont été utilisés pour la PCR subséquente. Le protocole PCR-terminal utilisé pour les quatre virus respiratoires était : 95 °C pendant 3 minutes, 95 °C pendant 10 secondes, 55 °C pendant 30 secondes et 72 °C pendant 45 secondes le tout répété 35 fois et une période d'élongation finale de 10 minutes à 72 °C. L'ADN polymérase Taq de Feldan (Québec, Canada) a été utilisée pour les clonages de VRS A et B, adénovirus et rhinovirus. L'utilisation de cette enzyme demandait une étape supplémentaire de clonage soit l'ajout d'un G en position 5' afin d'être capable d'effectuer la ligation avec des extrémités cohésives. Les

produits PCR ont été déposés sur un gel d'agarose 2 % puisqu'ils étaient de petite taille (environ 100 pb chacun). Une purification des produits PCR a été effectuée telle que recommandé par le fabricant avec la trousse QIAmp PCR purification. L'ADN purifié a été dosé avec l'appareil NanoDrop 2000 en utilisant 1 µl d'ADN et le maximum d'ADN a été utilisé pour la ligation pour chaque clonage. Le temps de ligation était de deux heures pour chaque clonage et le plasmide utilisé était le *pGC blue cloning vector*. Le produit de ligation était par la suite congelé à -20 °C. La transformation s'est effectuée le lendemain avec 4 µl de solution de ligation pour chaque clonage.

qPCR

Une qPCR ciblant la totalité des bactéries présentes [159] et des qPCR ciblant quatre bactéries spécifiques (*P. aeruginosa* [160], *S. pneumoniae* [161], *H. influenza* [162] et *M. catarrhalis* [163]) ont été effectués en utilisant des amorces déjà décrites dans la littérature. De plus, six virus respiratoires ont été ciblés par qPCR : Influenza A [164] et B [164], VRS A [165] et B [165], adénovirus [166] et rhinovirus [167]. La qPCR MS2 a été développée par un ancien étudiant du laboratoire [168]. Les gènes ciblés, les séquences des amorces et des sondes sont décrites en annexe dans le Tableau 2. Les courbes standards ont été effectuées avec de l'ADN génomique provenant des quatre souches bactériennes et pour les virus des plasmides provenant de clonage ont été utilisés. L'ADN de *S. pneumoniae* a été utilisé pour les courbes standards bactéries totales, puisque ce microorganisme était le plus souvent retrouvé dans les échantillons. Les réactions qPCR se faisaient dans un volume total de 15 µl et les réactifs provenaient de Bio-Rad. Les réactifs étaient détaillées comme suit: 7,5 µl de Supermix 2X (tampon 2X contenant les dNTPs, iTaq DNA polymérase, 6 mM MgCl₂ et des stabilisateurs), 0,15 µl d'amorce sens 100 µM, 0,15 µl d'amorce anti-sens 100 µM (IDT), 0,15 µl de sonde 10 µM (IDT), 2 µl d'ADN ou d'ADNc provenant de patients. Les solutions étaient complétées avec de l'eau Sigma pour arriver à un volume final de 15 µl

dans la plaque qPCR de 384 puits. Le cycle thermique qPCR pour les bactéries et les virus étaient le même : 94 °C pendant 3 minutes, 94 °C pendant 15 secondes et 60 °C pour 60 secondes répétés 39 fois. L'eau Sigma était utilisée à titre de contrôle négatif de qPCR. Toutes les réactions de qPCR ont été faites manuellement dans des plaques opaques de 384 puits et étaient par la suite introduites dans le thermocycleur CFX 384 Real-Time system de Bio-Rad. Toutes les validations nécessaires avant la qPCR ont été faites : un gradient de température pour déterminer la température idéale d'hybridation pour les amorces, un dosage de sonde a aussi été fait ainsi que des tests de spécificité faits avec les ADN des bactéries ciblés en qPCR. L'efficacité de toutes les qPCR était entre 90 % et 110 % et le R² se situait entre 0,96 et 1. Les analyses des qPCR ont été faites avec le programme de Bio-Rad CFX Manager v3.0. Toutes les réactions de qPCR étaient faites en duplicata pour les échantillons inconnus ainsi que pour les contrôles positifs et les contrôles sans amplifications.

Le pyroséquençage

Les amorces utilisées proviennent d'une publication récente [169]. Les codes à barres utilisés provenaient de Extended MID set (Roche - TCB 2009-005). La réaction PCR contenait: tampon 1X Q5 (NEB), 200 µM de chaque dNTP (Feldan Bio), 0,2 µM de chaque amorce 454 primer (IDT), 1 U de Q5 High-Fidelity DNA polymerase (NEB), et 1 µl d'ADN. Le cycle thermique PCR était le suivant : 98 °C pendant 30 secondes et 30 cycles à 98 °C pendant 10 secondes, 55 °C pendant 30 secondes, 72 °C pendant 30 secondes et 72 °C pendant 5 minutes. Les produits PCR ont été purifiés avec Axyprep Mag PCR Clean-up kit (Axygen, 35 µl de billes/50 µl de réaction PCR). Les produits purifiés étaient vérifiés avec un bioanalyzer 2100 avec DNA 7500 chips (Agilent). Les produits étaient dosés avec le Nanodrop 2000 et mélangés pour avoir un ratio équimolaire. Le séquençage s'est fait sur l'appareil Roche 454 GS-FLX Titanium à la Plate-forme d'Analyses Génomiques de l'Université Laval (Québec, QC).

Traitement et contrôle qualité des séquences brutes

Le logiciel utilisé pour effectuer le traitement des séquences obtenues à la suite du pyroséquençage a été Mothur (v1.30; <http://www.mothur.org/>) [129]. Toutes les séquences brutes ont suivi une filière analytique (*pipeline*) bien précis afin d'enlever le maximum de séquences non pertinentes (Figure 5). Un premier assemblage et un alignement sont ensuite faits avec la banque de données SILVA. Les séquences ont été par la suite vérifiées manuellement avec le logiciel BioEdit V.7.2.5 en éliminant tous les « trous » et les séquences qui n'ont pas bien été alignées. Après cette étape, les singletons ont été éliminés des séquences. La dernière étape et la plus importante avait pour but d'égaliser les différents échantillons en leur donnant un nombre de séquences identiques afin de pouvoir les comparer entre eux. Un réarrangement aléatoire a été effectué en n'affectant pas les proportions des séquences identiques. Le nombre de séquences attribuées à chaque échantillon était de 3800 séquences pour cette cohorte.

Analyse taxonomique et d'OTU

Les séquences finales ont été regroupées en OTUs avec un pourcentage de similarité de 97 % en utilisant une approche « *furthest neighbor clustering* » dans Mothur. Cette identification à 97 % correspond au genre bactérien. Par la suite, des mesures de biodiversité ont été effectuées (Indice de Shannon, Indice de Simpson, et un estimateur d'OTU avec l'indice de Chao). Une courbe de raréfaction et des tests de similarité ont été effectués entre le microbiome des échantillons. L'assemblage taxonomique des OTUs a été comparé à la banque de données « *SILVA taxonomy outlines and reference sequence set* » retrouvée dans Mothur www.mothur.org/wiki/Silva_reference_files en utilisant les régions V6 à V8 du gène de l'ARNr 16S.

« PIPELINE » MOTHUR

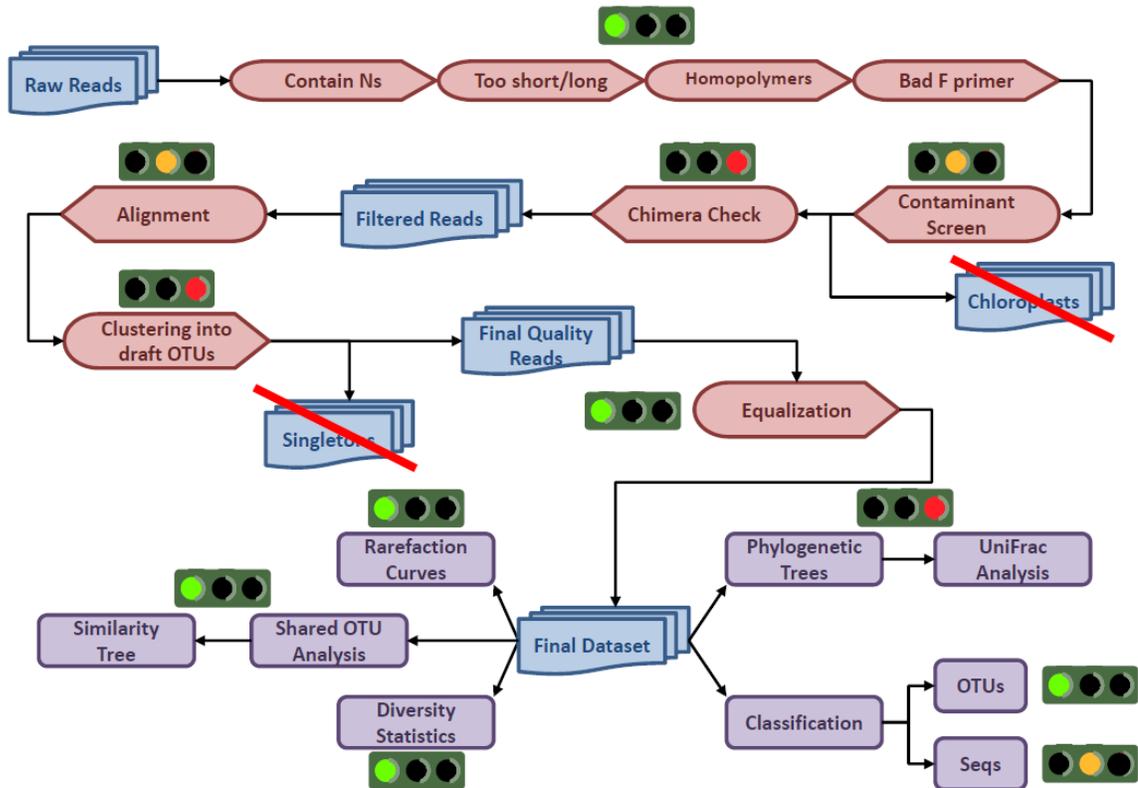


Figure 5 : **Cheminement des séquences dans le logiciel Mothur.** La lumière verte signifie un temps de calcul d'environ une heure, la lumière jaune un temps de calcul d'environ quatre à cinq heures et la lumière rouge signifie un temps de calcul d'environ un à deux jours.

PCR avant les méthodes DGGE et l'ARISA

Toutes les PCR-terminaux ont été effectuées sur le thermocycleur DNA Engine DYAD Peltier Thermal Cycler et les réactions ont été faites dans des tubes de 0,65 ml. 1 ng d'ADN a été utilisé de chaque souche pour créer un consortium bactérien. Les amorces utilisées pour les expériences de la DGGE ciblaient les régions variables V1 et V3 du gène de l'ARNr 16S et après amplification produisaient un fragment de 212 pb [112]. La solution PCR a été faite dans un

volume de 50 µl contenant : 5 µl de tampons 10X de Feldan, 10 µl de MgCl₂ (Band sharpening) 2,5 mM (5X) de Feldan, 0,5 µl de Taq polymérase Feldan 5 U/µl, 1 µl de dNTP 50-100X de Feldan, 0,25 µl d'amorce sens 341 GC (Muyzer) 100 mM, 0,25 µl d'amorce anti-sens 100 mM (IDT), 2 µl d'ADN d'échantillon et le tout complété à 50 µl avec de l'eau stérile. Le cycle thermique pour les réactions PCR dédié à la DGGE était comme suit : 94 °C pendant une minute, 65 °C pendant 45 secondes et 72 °C pendant 45 secondes répétés 39 fois, suivis d'une période d'élongation pendant cinq minutes à 72 °C et conservé à 4 °C jusqu'au gel d'électrophorèse.

La réaction PCR pour ARISA ciblait les régions intergéniques entre le gène de l'ARNr 16S et le gène de l'ARNr 23S. 1 ng d'ADN a été utilisé de chaque souche pour créer un consortium bactérien. La solution PCR était quasi-identique à celle pour la DGGE avec comme seul changement les amorces utilisées soit ITS-F et ITS-Reub-FAM [115]. Le protocole PCR pour ARISA était le suivant : 95 °C pendant trois minutes, 95 °C pendant 30 secondes, 57 °C pendant 35 secondes et 72 °C pendant 35 secondes répétés 35 fois, suivis d'une période d'élongation pendant cinq minutes à 72 °C et conservé à 4 °C.

Électrophorèse sur gel d'agarose

Tous les produits PCR à la suite d'une PCR-terminale ont été migrés sur un gel d'agarose de 1 % ou de 2 % dépendamment de la méthode préalablement utilisée. Le gel d'agarose avait pour but de voir si la réaction PCR avait fonctionné, si l'échantillon présentait des produits PCR indésirables et par la suite d'effectuer le dosage des produits PCR. Le protocole de fabrication du gel était le suivant : 0,5 g d'agarose (1 %) étaient pesé et vidé dans un erlenmeyer de 250 ml. Par la suite, 50 ml de tampon Tris, Borate, EDTA (TBE) 1X était ajouté à l'agarose. La solution était ensuite chauffée dans un appareil à micro-onde pendant 45 secondes, puis 30 secondes afin de dissoudre complètement l'agarose tout en homogénéisant à

intervalle de 15 secondes. Les gels d'agarose étaient premièrement refroidis avec de l'eau puis un ajout de 50 µl de SybrSafe dilué à 0,5 µg/ml était ajouté à la solution afin de marquer l'ADN. Le gel était ensuite coulé et un peigne adéquat de 15 puits était utilisé. Après 20 minutes de polymérisation, le peigne était enlevé et les puits étaient remplis avec 10 µl (5 µl d'ADN provenant des échantillons suivant la PCR-terminale ainsi que 5 µl de tampon de charge). 5 µl étaient utilisés du marqueur de poids moléculaire EZ-Load Precision molecular ladder de Bio-Rad. Par la suite, l'appareil d'électrophorèse était ajusté à 100 V avec un temps de migration de 45 minutes à un voltage constant. Le gel d'agarose était par la suite illuminé aux ultraviolets avec les UV transillumination Chemi Genius² Bio Imaging System et la photo était prise par le programme Gene Snap. Une image sous format .TIF était enregistrée pour les futurs dosages.

Dosage et purification des produits PCR

Le programme Gene Tools était utilisé pour quantifier l'ADN à partir de la photo prise après la migration du gel d'agarose. En sélectionnant les bandes de tailles attendues et le marqueur de poids moléculaire utilisé lors de la migration (1 kb DNA ladder de Bio-Rad) le programme permettait d'obtenir la concentration d'ADN en ng de chaque échantillon. Par la suite, la quantité d'ADN était diluée à 100 ng dans 15 µl avec de l'eau stérile pour les gels DGGE ultérieurs.

Les produits PCR provenant de la PCR ARISA n'étaient pas quantifiés, mais plutôt purifiés avec le trousse QIAquick PCR purification kit Qiagen afin d'éliminer les amorces et tous autres réactifs limitant la migration sur le chromatographe par capillarité. Le protocole utilisé pour la purification des produits PCR était le même que celui du fabricant et l'ADN était élué dans 50 µl de tampon d'éluion fourni par dans la trousse.

Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant

Les gels DGGE ont été faits avec le système de cassette Bio-Rad Universal Mutation Detection System [112]. Les gels contenaient 30 ml de solution dénaturante et avaient une épaisseur de 1 mm. Ils étaient constitués de polyacrylamide à 8 % dans du tampon 0,5 X Tris, Acetic, EDTA (TAE) avec un gradient d'agent dénaturant de 30-55 % (100 % de dénaturant étant de 7 M urée et 40 % [v/v] de formamide). Du bleu de bromophénol a été utilisé dans la solution de 55 % afin de bien voir la différence dans le gradient d'agent dénaturant. 15 µl de TEMED et 50 µl d'ammonium persulfate par gel ont été utilisés afin d'accélérer le processus de polymérisation. Ensuite, les puits ont été bien alignés et nettoyés avec l'aide d'une seringue et du tampon TAE 0,5 X. Les produits PCR (15 µl contenant 100 ng de produits PCR et 5 µl de tampon de charge) étaient par la suite déposés directement dans les puits des gels. L'électrophorèse a été faite à un voltage constant de 70 V et à une température de 60 °C pendant 999 minutes (environ 16 h 45). Après l'électrophorèse, les gels ont été incubés dix minutes en présence de SybrGold (0,5 mg/ml) un agent intercalant marquant l'ADN et du tampon TAE 0,5 X. Les gels ont été rincés deux fois pendant 15 minutes dans du tampon TAE 0,5 X mélangé avec de l'eau distillée. Ils ont été par la suite photographiés avec le système d'imagerie. Les photos étaient enregistrées sous format .TIF pour l'analyse ultérieure avec le programme Gel Compar II.

L'analyse automatisée d'espaceur intergène de ribosome

Les produits PCR purifiés avec la trousse QIAquick ont été dilués 1/15 avec de l'eau déionisée stérile dans une plaque 96 puits avant d'être envoyés au service de séquençage de la Plate-forme d'analyse génomique de l'Université Laval. Une migration des produits PCR a été faite sur un séquenceur chromatographe par capillarité de type ABI, le marqueur de poids moléculaire utilisé était le Liz -1200

(1 pb à 1200 pb) et 1 µl d'ADN de produits PCR purifiés a été déposé sur le capillaire.

Les analyses des profils microbiens

Les chromatographes d'ARISA ont été premièrement analysés avec le programme Peak Scanner v1.0. Ce programme a pour fonction de lire les fichiers .FSA reçus par le service de séquençage et d'effectuer une première analyse de qualité. Peak Scanner offre comme résultat d'analyse un chromatographe variant de 1 pb à 1200 pb, préalablement déterminé et utilisé comme marqueur de poids moléculaires, sur l'axe des abscisses et une intensité de fluorescence variant de 0 à 10 000 sur l'axe des ordonnées. Pour les analyses, tous les pics identifiés en dessous de 1000 d'intensité ont été exclus. Le premier élément à regarder sur le chromatographe était de savoir si la quantité de produits PCR était suffisante pour être détectée.

La deuxième observation à faire était de déterminer si la qualité des échantillons est bonne. Il y a donc un code de couleur fourni par le programme (Vert pour une bonne qualité, Jaune pour une qualité moyenne et Rouge pour dire que l'échantillon n'est pas analysable). Dans le cas où un échantillon était rouge, il n'est pas possible de déterminer la longueur du fragment avec le standard moléculaire. Dans le contexte de la méthode ARISA, la qualité des échantillons est très importante, puisque sans une bonne qualité il n'était pas possible d'identifier un fragment en le comparant à ceux retrouvés dans le consortium bactérien.

Les analyses microbiologiques de profilage ont été effectuées à l'aide du logiciel Gel Compar II (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgique). Avec les profils DGGE (photos de gels) et ARISA (chromatographes) obtenus il a été possible de générer des matrices de similarité calculées à l'aide d'une corrélation de Pearson et d'une analyse *unweighted pair-group method using arithmetic averages* (UPGMA). Les analyses ont été faites en suivant le protocole du manuel fourni par

la compagnie Applied Math. Le bruit de fond a été soustrait et les gels ont été normalisés avec l'aide du consortium bactérien. Toutes les bandes retrouvées en dessous de 5 % du maximum d'intensité étaient éliminées des analyses.

Les statistiques

Les données étaient exprimées selon la moyenne \pm écart-type pour les variables continues. L'ANOVA à une variable a été utilisée pour comparer les variables caractéristiques des patients. Pour quelques variables, les données brutes ont été transformées en log pour stabiliser la variance. Les valeurs P étaient basées sur ces transformations. Les hypothèses faites sur la variance ont été vérifiées avec le modèle de Brown and Forsythe's variation of Levene's test statistic. Les hypothèses de normalité univariées ont été vérifiées avec le test Shapiro-Wilk. Le coefficient de corrélation de Pearson a été utilisé pour mesurer la relation entre les variables. La présence ou l'absence d'un microorganisme pathogène humain ont été analysées selon un modèle linéaire généralisé basé sur un modèle gonflé à zéro. Ces données ont été caractérisées par la présence d'une grande portion de valeurs zéro, en plus des valeurs positives continues. Les données erronées vers la droite dans leur valeur positive ont été transformées en log pour stabiliser la variance. La densité de probabilité des données est une masse à 0 avec une probabilité p, et une fonction de densité normale a été définie sur des valeurs positives avec la probabilité 1 - p. Les résultats étaient considérés significatifs avec des valeurs $p \leq 0.05$. Toutes les analyses ont été faites avec le logiciel SAS v9.1.3 (SAS Institute Inc, Cary, NC, U.S.A.). Toutes les analyses provenant du pyroséquençage ont été effectuées avec le logiciel Mothur. Les graphiques ont été obtenus avec l'aide du logiciel GraphPad Prism v.6.

Développement

Caractéristiques de la cohorte de patients MPOC

La moyenne d'âge de la cohorte est de 69 ans \pm 6 ans avec dix hommes et 11 femmes. Le VEMS moyen est de 53,67 \pm 14,49, la CVF moyenne est de 101,32 \pm 21,71 et le ratio VEMS/CVF est de 45,35 \pm 10,08. La cohorte avait un historique tabagique moyen de 54 paquets année et il y avait 13 ex-fumeurs et six fumeurs actifs. La cohorte est principalement composée de GOLD II et de GOLD III. Le groupe de patients MPOC contrôle était plus âgé ($p < 0,0001$) (77 ans \pm 3 ans) et il était composé uniquement d'homme ($p = 0,0009$). Les patients contrôles ont en moyenne une histoire tabagique de 73 paquets année. Habituellement, plus les patients sont âgés, plus le stade de la maladie est avancé. Cependant le groupe contrôle était composé principalement de GOLD II (quatre patients) et GOLD III (un patient). Les fonctions pulmonaires des deux groupes étaient quasi identiques ($p = 0,88$) et donc, la quantité plus élevée de paquets année chez les patients MPOC contrôles ne semble pas créer un biais. Parmi les 16 patients recrutés, sept ont été vu pendant une seule visite, soit parce qu'il ne revenait jamais stable (E16) ou parce qu'ils n'ont tout simplement pas exacerbés (S10 à S15). Un patient a été exclu de l'étude (S17), car il ne respectait pas un critère (être en mesure d'expectorer à l'état stable).

Tableau 3 : **Caractéristiques de la cohorte.**

	MPOC total	MPOC contrôle	MPOC
Nombre	21	5	16
Âge (année)	69 \pm 6	77 \pm 3	66 \pm 4
Sexe	10 F / 11 M	5 M	10 F / 6 M
GOLD	1 GOLD I 9 GOLD II 9 GOLD III 2 GOLD IV	4 GOLD II 1 GOLD III	1 GOLD I 5 GOLD II 8 GOLD III 2 GOLD IV
VEMS (pp)	53,67 \pm 14,49	51,9 \pm 8,46	54,3 \pm 16,86
CVF (pp)	101,32 \pm 21,71	102,2 \pm 30,85	100,9 \pm 18,60
VEMS/CVF	45,35 \pm 10,08	47,9 \pm 14,32	44,4 \pm 8,71
Paquet année	54 \pm 16,08	73 \pm 6,67	48 \pm 7,25
Statut fumeur	6	2	4

Définition des abréviations: F = femelle, M = male; pp = pourcentage prédit.

Utilisation de méthodes de profilage pour obtenir des profils microbiens utilisables dans l'analyse de la biodiversité des expectorations de patients MPOC

La première méthode qui a été testée a été la DGGE. Les profils analysés sont très bien détaillés et il est possible d'identifier la plupart des fragments PCR sur gel DGGE (Figure 6). De plus, il est possible de remarquer qu'il y a présence de différents fragments et ceux-ci ont une intensité variable dans ces conditions PCR. L'échantillon S11 démontre une intensité très élevée d'un fragment situé à la hauteur de *H. influenzae* (flèche bleue, Figure 6) ainsi qu'une autre bande de plus faible intensité à la hauteur de *S. pneumoniae* (flèche orange, Figure 6). Cependant, la biodiversité des échantillons S11 et S10 est totalement différente en termes de variété et d'abondance. En effet, l'échantillon S10 compte environ 30 espèces différentes comparativement à S11 qui en compte quatre. En général, l'absence de bruit de fond et la clarté des gels DGGE produits font en sorte que les profils de la DGGE sont assez bien définis pour être utilisés avec le programme Gel Compar II, afin d'étudier la biodiversité des expectorations de patients MPOC.

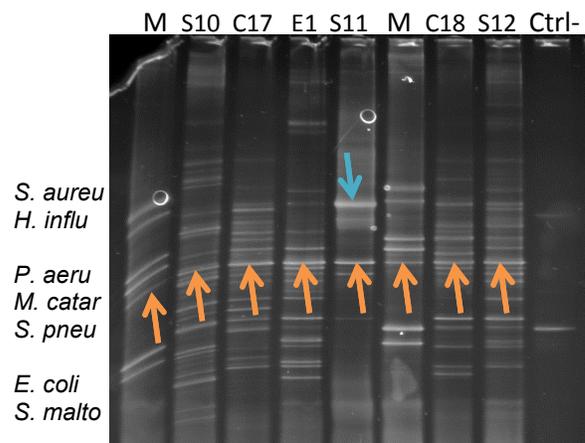


Figure 6 : Migration sur gel DGGE des échantillons S10, C17, E1, S11, C18, S12, un contrôle négatif PCR et deux consortiums bactériens (M). Cette technique démontre bien la biodiversité bactérienne d'un échantillon d'expectoration et que la technique de la DGGE se justifie bien pour étudier la biodiversité bactérienne d'échantillon complexe.

L'ARISA est la deuxième technique de profilage qui a été utilisée pour étudier la biodiversité des échantillons d'expectoration. Les résultats des chromatographes produits par cette méthode sont aussi définis et beaucoup plus précis que les bandes obtenues par DGGE (Figure 7 et 8). La ligne rouge dans les chromatographes correspond à la courbe standard qui sera utilisée comme référence pour déterminer la taille des fragments dans les échantillons. La migration d'un consortium bactérien a été utilisée afin de déterminer la taille des fragments des principales bactéries retrouvées dans les expectorations (Figure 7). Il est possible de remarquer que pour l'échantillon S11, trois pics sont obtenus d'une longueur de 330 pb, 560 pb et de 802 pb (Figure 8). Le pic de 330 pb correspond à la bactérie *S. pneumoniae*, le pic de 560 pb correspond à la bactérie *H. influenzae* et le pic de 802 pb semble être un fragment appartenant à une bactérie inconnue. Il est possible de remarquer que l'intensité de *H. influenzae* est beaucoup plus importante que celle du pic inconnu de 802 pb.

La technique ARISA a pour avantage d'être beaucoup plus simple à analyser par la présence de pics beaucoup moins nombreux qu'avec la méthode DGGE. En effet, il y a seulement trois pics sur la Figure 8, comparativement au gel DGGE de l'échantillon S11 où il y six bandes. Cette différence pourrait s'expliquer par une amplification préférentielle pour les bactéries majoritaires. Toutefois avec la technique ARISA, il n'est pas possible d'identifier les fragments inconnus, car après migration, l'échantillon est perdu.

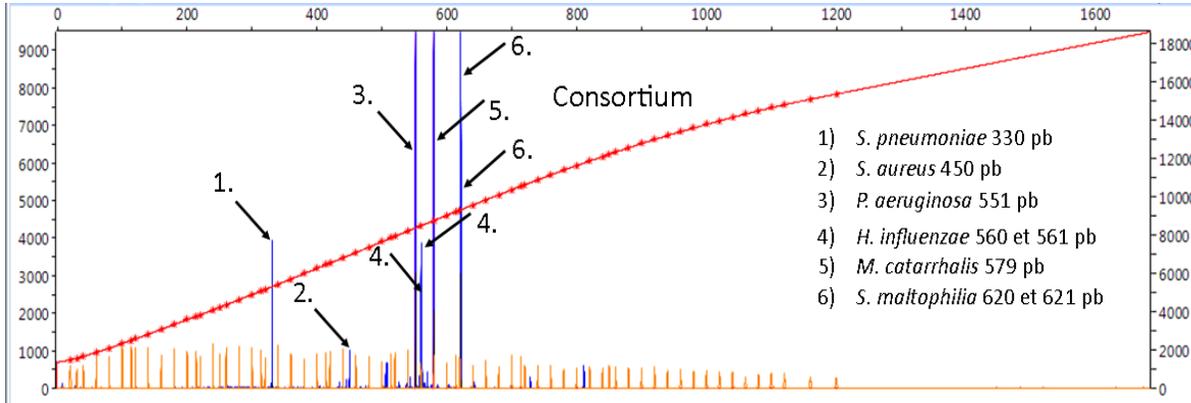


Figure 7 : Migration de l'ADN du consortium bactérien sur gel d'acrylamide du séquenceur de type ABI. Ce chromatographe démontre la faisabilité de l'utilisation de la méthode ARISA dans un contexte de biodiversité. Les numéros représentent un pic appartenant à une bactérie trouvée dans la légende.

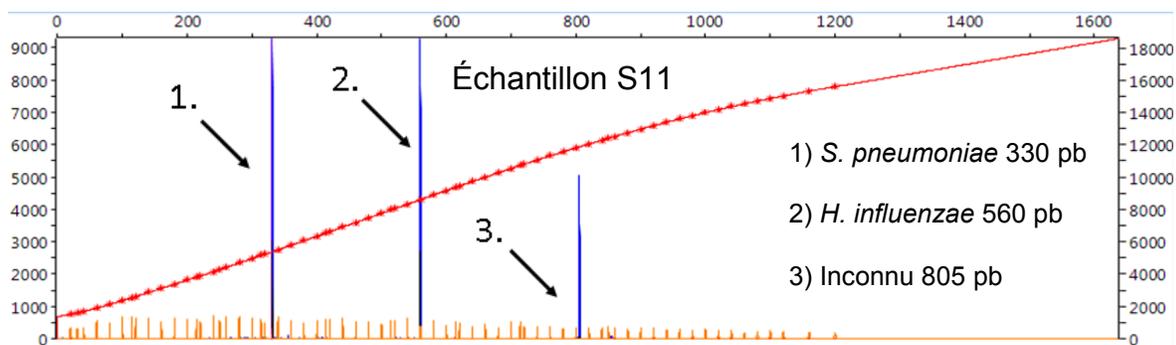


Figure 8 : Migration de l'ADN de l'échantillon S11 sur gel d'acrylamide du séquenceur de type ABI. Ce chromatographe démontre qu'il est possible après avoir fait migrer des échantillons d'identifier des fragments à des espèces bactériennes connues. Les numéros représentent un pic appartenant à une bactérie dans la légende.

L'utilisation de ces deux techniques ayant un principe totalement différent soit une basée sur la nature de la séquence du fragment PCR et l'autre basée sur la longueur du fragment PCR a permis d'obtenir des profils microbiens. Ces profils ont pu être utilisés afin d'étudier la biodiversité en effectuant des comparaisons entre chaque échantillon et statut des sujets MPOC (Figure 9). Afin de bien comprendre le dendrogramme, le pourcentage de similarité (sur l'axe horizontale

supérieure) entre les échantillons E7 et E16 est d'environ 92 %. En effet, avec cette clarté et résolution, l'ensemble des profils obtenus était de qualité suffisante pour être comparés dans le programme Gel Compar II.

Le point fort de ces deux techniques est que les résultats corrélaient. En effet, la technique ARISA donne sensiblement les mêmes pics spécifiques à chaque espèce qui sont aussi retrouvés sur les gels DGGE sous forme de bandes. De plus, l'intensité des bandes et des pics était semblable entre les deux techniques, et ceci peut être confirmé à l'aide de l'échantillon S11. Selon les résultats, la technique ARISA semble détecter davantage les espèces importantes d'un échantillon comparativement à la DGGE qui donne une vue d'ensemble de la biodiversité.

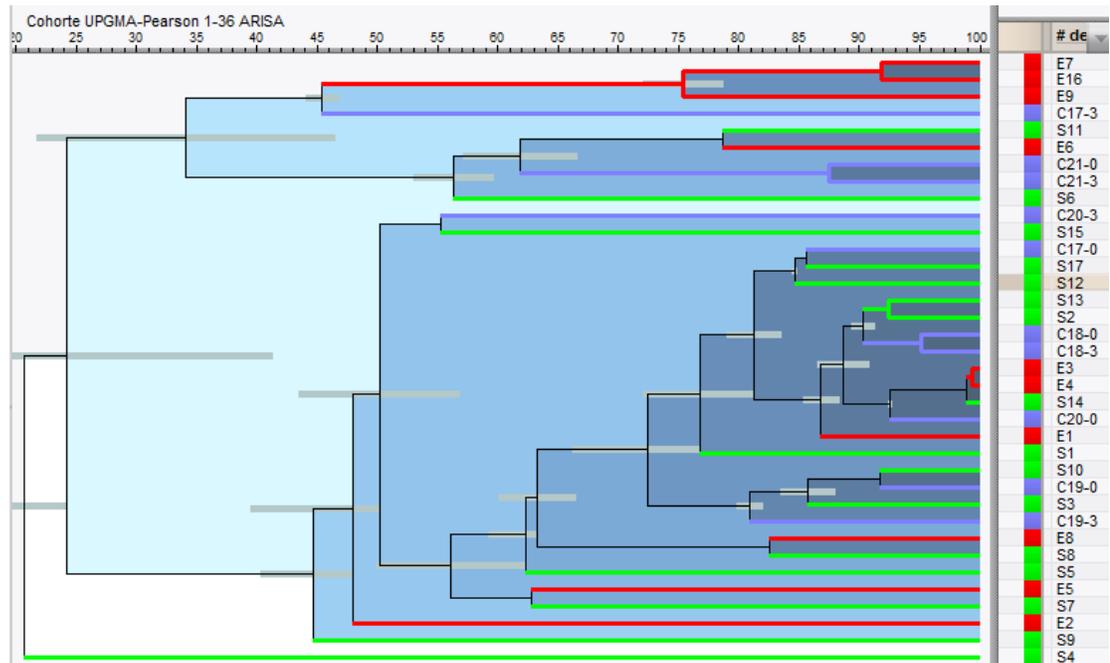


Figure 9 : Dendrogramme avec une corrélation Pearson-UPGMA de profil bactérien en ARISA de la cohorte de patients MPOC.

Les échantillons en rouge proviennent de patients exacerbés (E1 à E16), ceux en vert proviennent de patients stables (S1 à S16) et ceux en mauve proviennent de patients contrôles à la première visite et trois mois plus tard (C17-0, C17-3 à C21-0 et C21-3). Plus la zone est foncée, plus les échantillons sont similaires. Il est possible de remarquer qu'il ne semble pas y avoir de lien entre le statut de la maladie et le regroupement des échantillons.

Comparaison du microbiome de patients MPOC lorsque ces derniers sont stables par opposition à lorsqu'ils sont exacerbés.

Il est possible de remarquer que les profils DGGE ne révèlent pas la même biodiversité chez un même patient par exemple S5 et E5, E4 et S4 (Figure 10). C'est donc de dire que les bactéries retrouvées à l'état stable ne semblent pas être les mêmes qu'en exacerbation. Toutefois, les échantillons E8 et S8 démontrent une similarité d'environ 80%. Cela suggère comme hypothèse que la diversité peut aussi être la même, mais que les proportions des différentes bactéries sont changées. Bref, avec ces profils il est impossible de déterminer quelle bactérie est en lien avec l'exacerbation, il est tout de même possible d'établir que la biodiversité change complètement d'un patient à l'autre et d'un stade de la maladie à l'autre.

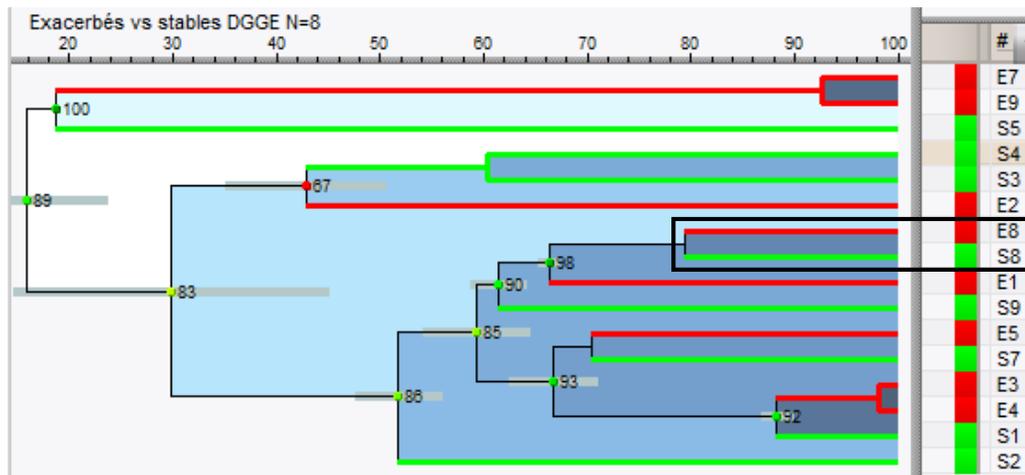


Figure 10 : **Dendrogramme avec une corrélation Pearson-UPGMA de profil bactérien en DGGE des échantillons S1-S8 et E1-E8.** Les échantillons en rouge proviennent de patients en exacerbation (E1 à E16) et les échantillons en vert proviennent de patients stables (S1 à S16). Il ne semble pas y avoir de tendance à former deux groupes différents selon le statut de la maladie.

Le même résultat est observé avec la méthode ARISA (Figure 11). En effet, il n'y a aucun regroupement des échantillons provenant d'un même patient (exemple S1 et E1), car la biodiversité est complètement différente et ce chez la majorité des patients. Toutefois, les échantillons S8 et E8 démontrent encore une fois une similarité de 80%. De plus, l'analyse de similarité a déplacé les échantillons, ce qui montre une certaine différence entre les profils obtenus en DGGE et en ARISA. Cela s'explique par un nombre de pics beaucoup moins imposant qu'en DGGE et de ce fait une analyse de similarité différente. De plus, les échantillons E3 et E4 ont une similarité très élevée probablement dû au fait qu'ils ont la même bactérie dans leur échantillon.

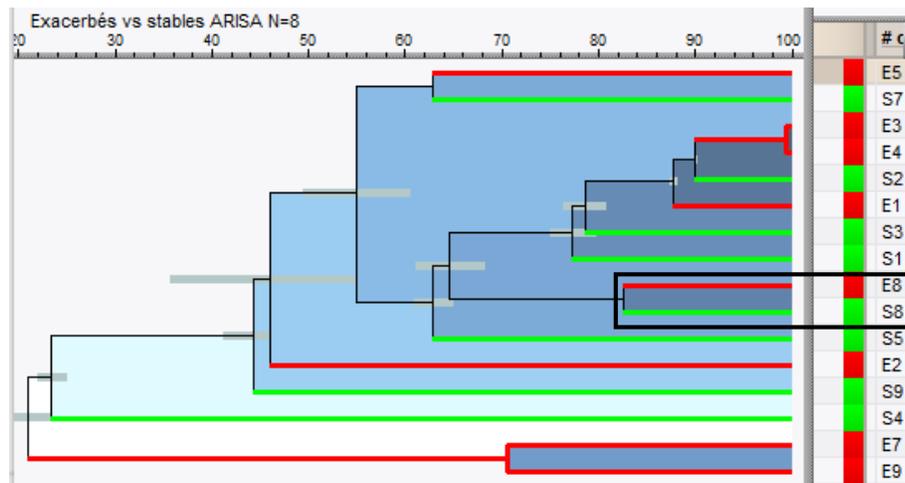


Figure 11 : **Dendrogramme avec une corrélation Pearson-UPGMA de profil bactérien en ARISA des échantillons S1-S8 et E1-E8.** Les échantillons en rouge proviennent de patients exacerbés (E1 à E16) et ceux en vert proviennent de patients stables (S1 à S16) Il ne semble pas y avoir une tendance à former deux groupes différents selon le statut de la maladie.

En général, ces deux techniques permettent de démontrer que la biodiversité varie énormément entre un état stable et exacerbé. Toutefois, il n'est pas possible d'identifier quelle bactérie est impliquée dans ce changement, d'où l'importance d'avoir recours à une analyse plus poussée comme l'utilisation du pyroséquençage. Avant de poursuivre avec les résultats obtenus en

pyroséquençage voici quelques données décrivant les séquences obtenues de la cohorte.

Un total de 387 543 séquences brutes a été obtenu lors du pyroséquençage de 48 échantillons. Après nettoyage des séquences dans Mothur, il restait un total de 148 200 séquences. Il faut savoir que les échantillons E6, E7, E8, E9, E16, S3, S6, S7, S8, S9, C17-3 et C21-3 ont été séquencés en duplicata (deux fois le même échantillon d'ADN envoyé au séquençage). Pour l'analyse de ces échantillons envoyés en duplicata une moyenne a été effectuée pour pouvoir les comparer avec les autres échantillons. Neuf échantillons (E6 (1 et 2), S6 (1 et 2), S11, S17, C21-0 et C21-3 (1 et 2)) ont dû être éliminés des analyses, car ils n'ont pas généré assez de séquences lors de l'égalisation (~ 225 séquences). Au final, 30 échantillons sont conservés après avoir fait la moyenne des échantillons envoyés en duplicata et après avoir éliminés de l'analyse ceux avec très peu de séquences.

Il est possible de remarquer que la quantité d'OTU obtenue plafonne vers 2267 et donc que la quantité de séquences sélectionnées par échantillon (3800 séquences) est adéquate pour l'analyse du microbiome (Figure 12). Le nombre de 3800 séquences a été établi et choisi après avoir nettoyé la totalité des séquences pour chaque échantillon (lors de l'étape d'égalisation dans le programme Mothur). Cependant, avec les échantillons comprenant seulement 225 séquences, il aurait fallu descendre le nombre de séquences par échantillon à 225, afin d'analyser tous les échantillons. Cette différence aurait eu comme conséquence de ne pas obtenir un plateau sur la courbe de raréfaction. Cela démontre en fait qu'il n'aurait pas été possible d'identifier le maximum d'OTU dans ces échantillons, bref qu'une très grande majorité de bactéries présentes n'auraient pas été analysée.

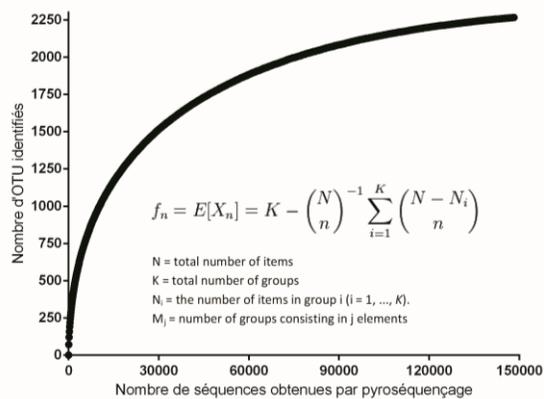


Figure 12 : Courbe de raréfaction obtenue avec 30 échantillons. Il y a présence d'un plateau avec l'échantillonnage de 148 200 séquences pour obtenir un nombre de 2267 OTU uniques.

Des tests ont été effectués pour décrire la biodiversité inter-échantillons (β -diversité). Les trois indices utilisés sont Chao, Shannon et Simpson (Tableau 4). L'avantage de ces indices est qu'il est possible de caractériser les échantillons avant même d'avoir déterminé le microbiome de ceux-ci. L'échantillon S12 présente une estimation de 595 OTUs. Cela veut dire qu'il y a potentiellement 595 bactéries différentes. L'échantillon E16 quant à lui a une estimation à 124 OTUs uniques démontrant une population beaucoup plus homogène. L'échantillon E16 a un indice de Shannon de 1,52. Cela indique que cet échantillon est peu diversifié comparativement à l'échantillon S12 qui a un indice de Shannon de 5,08. L'échantillon S12 contient probablement plus d'OTUs uniques que l'échantillon E16. L'indice de Simpson vient appuyer les données du Chao et du Shannon. L'échantillon E16 a un indice de Simpson d'environ 0,30. Il a donc une chance sur trois d'obtenir deux fois la même séquence dans l'expectoration de ces patients. L'exacerbation de l'échantillon E16 semble être causée par un faible nombre de genre bactérien. Toutefois, l'indice de Simpson de S12 est de 0,01.

Tableau 4 : **Indice de biodiversité**. Indice de Shannon, Indice de Simpson et l'estimateur d'OTU (Chao)

# Échantillon	Chao	Shannon	Simpson
S15	408,43	4,11	0,036
S14	137,11	2,45	0,195
S13	319,14	4,22	0,025
S12	595,31	5,08	0,010
S10	444,19	4,60	0,023
S9	617,12	5,06	0,012
S8	488,34	4,79	0,017
S7	388,69	4,40	0,031
S5	379,05	4,21	0,050
S4	169,88	2,88	0,159
S3	350,37	4,10	0,046
S2	199,04	3,57	0,052
S1	433,67	4,14	0,049
E16	124,00	1,52	0,318
E9	555,87	4,39	0,046
E8	481,12	4,47	0,034
E7	181,12	1,92	0,261
E5	574,00	5,04	0,019
E4	173,50	2,32	0,163
E3	338,65	3,03	0,156
E2	247,06	3,21	0,085
E1	332,16	4,21	0,032
C20-3	300,87	3,61	0,056
C20-0	426,12	4,02	0,049
C19-3	376,16	3,99	0,062
C19-0	411,60	4,56	0,018
C18-3	350,02	3,84	0,067
C18-0	409,00	4,64	0,017
C17-3	396,75	3,70	0,084
C17-0	468,67	4,84	0,017

La Figure 13 démontre la proportion de chaque phylum bactérien présent dans tous les échantillons d'expectoration de patients MPOC. On remarque que le microbiome des échantillons E4 et E16 est très homogène par la présence très importante de *Firmicutes* et de *Proteobacteria* d'environ 90-95 % respectivement.

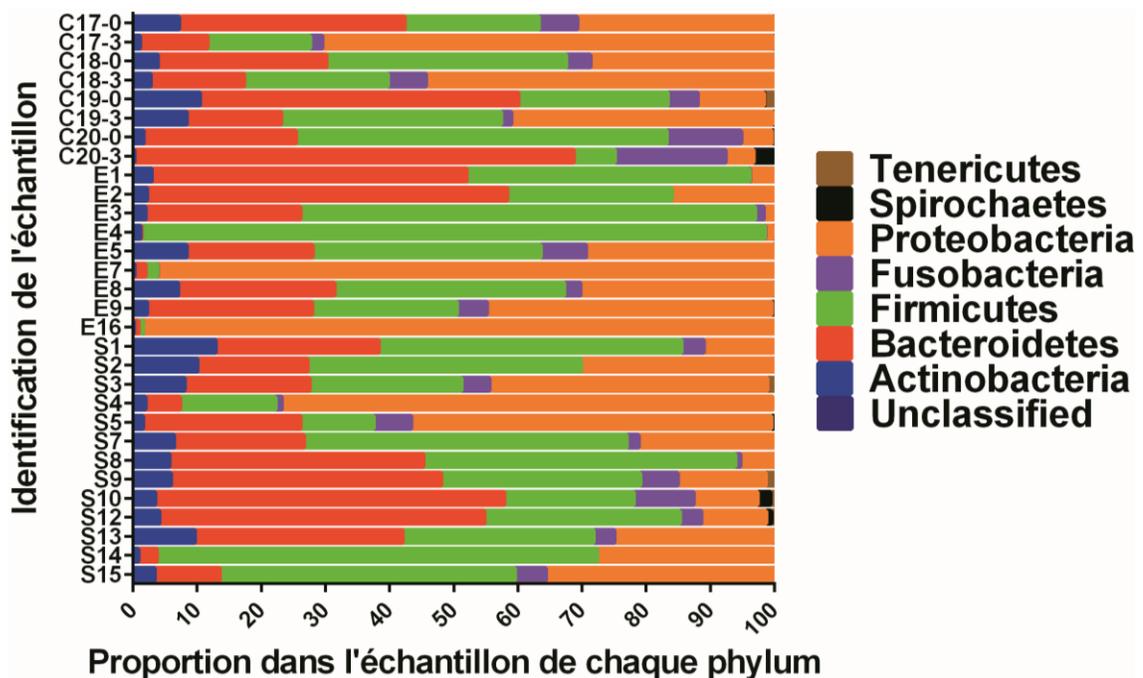


Figure 13 : **Taxonomie aux phylums bactériens des échantillons 1-36.** Chaque couleur correspond à un phylum bactérien retrouvé dans la légende. Les *Firmicutes* et les *Proteobacteria* sont les principaux phylums retrouvés dans le microbiome de cette cohorte d'expectoration de patients

En ordre de priorité, les phyla les plus importants sont les *Proteobacteria* (34,70 %), *Firmicutes* (32,02 %), *Bacteroidetes* (24,98 %), *Actinobacteria* (4,40 %), *Fusobacteria* (3,46 %), *Tenericutes* (0,23 %), *Spirochaetes* (0,20 %) et Unknown (0,04 %) (Figure 13). Pour l'analyse au genre bactérien, un seuil a été établi par rapport au nombre total de séquences afin de faciliter les comparaisons. En effet, lorsque la quantité de séquences pour un genre retrouvé dans chaque échantillon était en dessous de 0,1% (38 séquences) du total de séquences par échantillon (3800) le genre était éliminé de l'analyse. C'est ce qui explique pourquoi les figures décrivant l'analyse au genre ne sont pas à 100% de proportion, puisqu'il a été déterminé que ces genres n'ont pas un impact important. L'analyse taxonomique au genre bactérien donne la figure suivante (Figure 14).

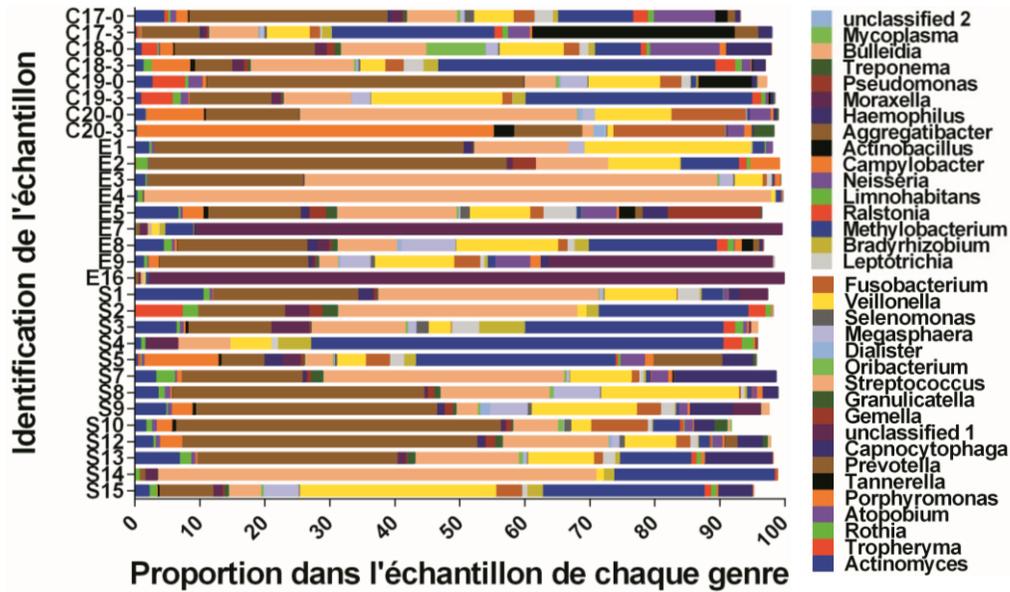


Figure 14 : **Taxonomie au genre bactérien des échantillons 1-36.** Chaque couleur correspond à un genre bactérien retrouvé dans la légende. Plus de 50 genres bactériens ont été détectés dans les échantillons d'expectoration de patients MPOC.

En ordre de priorité, les principaux genres sont *Prevotella* (20,06 %), *Streptococcus* (17,42 %), *Methylobacterium* (11,89 %), *Moraxella* (11,75 %) et *Veillonella* (8,16 %). Les genres *Haemophilus* (2,64 %) et *Pseudomonas* (0,41 %) comptaient pour seulement ~3 % du microbiome des échantillons d'expectoration de patients MPOC, malgré leur importance connu dans les exacerbations (Figure 15).

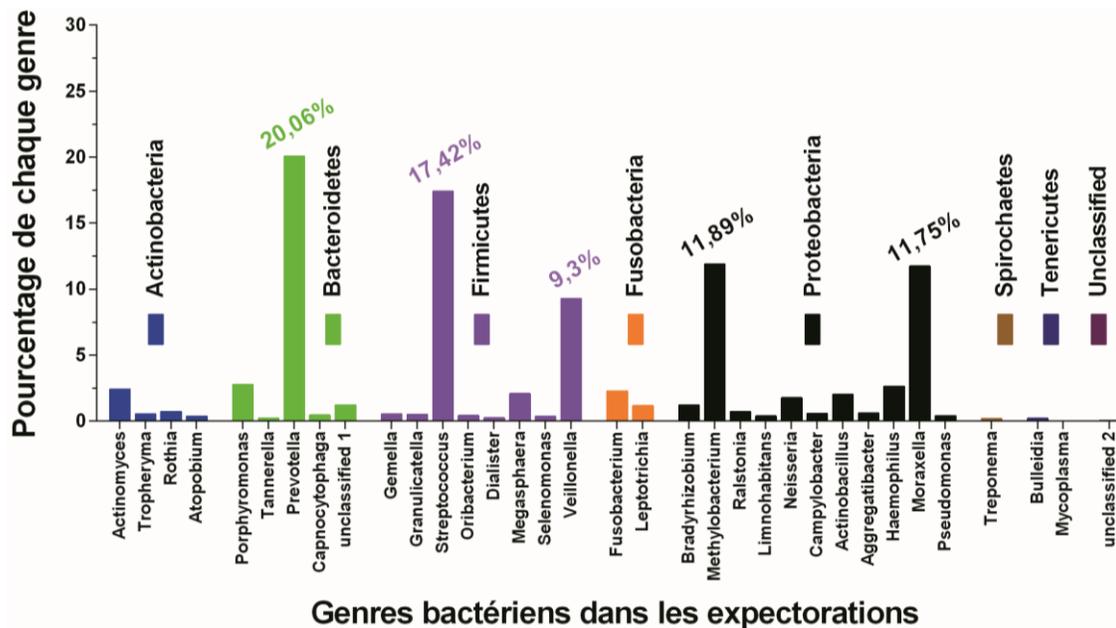


Figure 15 : **Distribution des genres bactériens des échantillons 1-36.** Le graphique démontre chaque phylum présent dans la cohorte de patients (code de couleur). Deuxièmement, sous chaque phylum important, il y a une représentation de chaque genre important dans la cohorte. Les genres *Prevotella*, *Streptococcus*, *Methylobacterium* et *Moraxella* sont les principaux genres bactériens retrouvés dans cette cohorte de patients MPOC.

La Figure 16 démontre la similarité entre tous les échantillons de patients MPOC. L'échantillon S2 est l'échantillon le plus éloigné de l'échantillon C20-3. Il est possible de remarquer qu'il n'y a aucune corrélation entre le statut des patients MPOC et le regroupement des échantillons dans cet arbre phylogénétique.

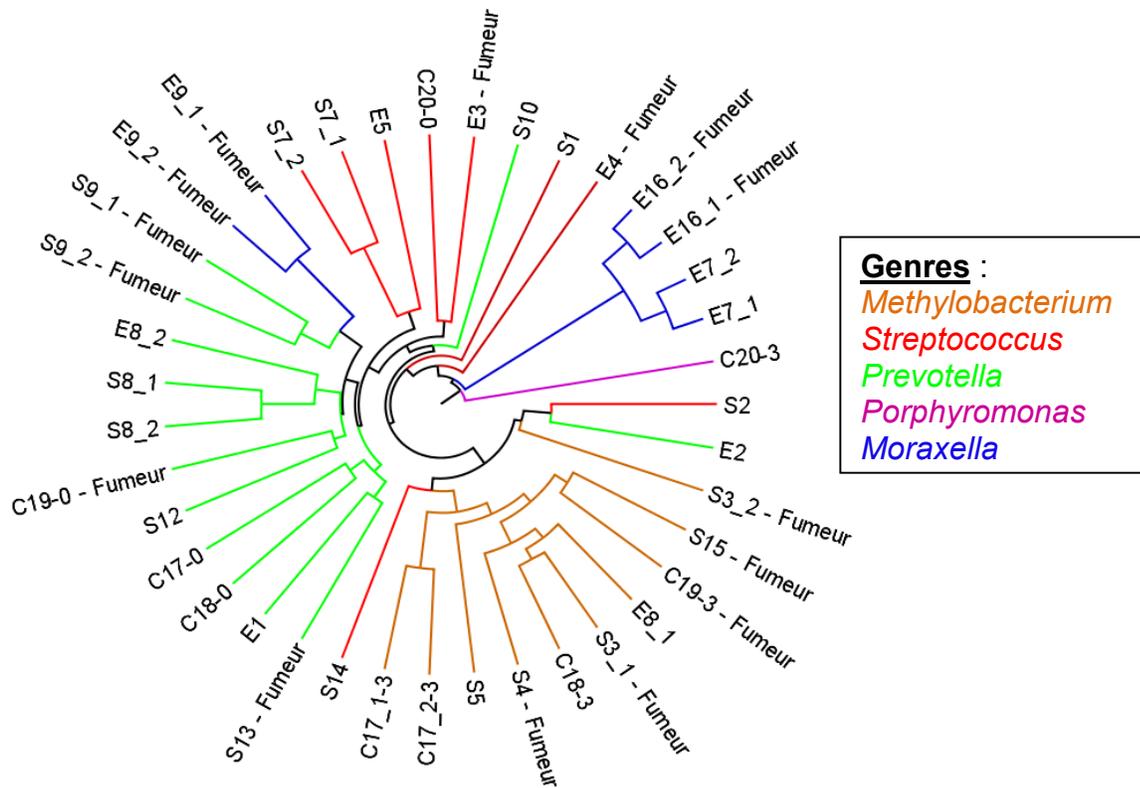


Figure 16 : **Arbre phylogénétique Relaxed Neighbor-Joining avec une matrice Bray-Curtis selon la distance entre les échantillons de patients MPOC.** Un code de couleur a été attribué au genre le plus présent dans l'échantillon. Les fumeurs sont aussi représentés à l'extérieur des branches. Il est possible de remarquer qu'il n'y a aucune corrélation entre le statut de la maladie et le regroupement des échantillons. Toutefois, une association liant les genres bactériens peut être observée.

Les échantillons peuvent aussi être groupés selon l'abondance du principal genre bactérien. Il est possible de voir qu'il y a formation de trois groupes bien définis. Premièrement, un groupe avec une abondance importante de *Methylobacterium* (Figure 16, branches en orangé), un deuxième groupe avec la présence de *Prevotella* (branches en vert) et le dernier avec une faible quantité de *Streptococcus* (branches en rouge).

Un des points très intéressants avec cet arbre est la présence de *Methylobacterium* dans les échantillons de patients MPOC actuellement fumeur.

Toutefois, ceci n'est pas significatif ($p = 0,39$). Les échantillons E9, E3, E4, E16, S3, S15, C19-3, S4, S13, C19-0 et S9 proviennent de patients fumeurs.

L'abondance relative de *Methylobacterium* est d'environ 35 % dans les échantillons S4, C19-3, S3 et S15. *Methylobacterium* est un genre bactérien qu'on retrouve naturellement sur les plantes et sur le sol, mais aussi sur les pieds des humains [170]. Ce genre bactérien utilise comme nutriment le méthanol, ainsi que des composés à plusieurs chaînes carbonées (1 à 4 carbones) [171]. De plus, la quantité de ce type de composé est augmentée chez les fumeurs [172].

L'hypothèse pour expliquer l'apparition de ce genre bactérien dans les expectorations de patients MPOC est la suivante. La production de méthanol et de composés à 1-4 carbones lors de la combustion de la cigarette peut être utilisée par les *Methylobacterium* comme source de nutriment. Ce genre bactérien est peut-être normalement retrouvé dans les poumons de sujets sains non-fumeurs. Cet apport en nutriment plus complexe chez les patients MPOC viendrait favoriser ce genre bactérien ce qui augmenterait son abondance chez les fumeurs. Des tests supplémentaires en utilisant un modèle animal mimant la MPOC pourrait être utilisé pour démontrer la plausibilité de cette hypothèse.

Est-ce que la biodiversité varie entre les échantillons stables S1-S8 et exacerbés E1-E8? Il y a des différences de proportion des phyla bactériens retrouvés dans les échantillons d'expectoration de patients MPOC (Figure 17). Il n'y a toutefois pas d'apparition de nouveau phylum bactérien. Chez trois patients (S3/E3, S4/E4, S5/E5) sur huit, il est possible de remarquer qu'il y a une plus grande abondance des *Proteobacteria* lorsque le patient est stable et une augmentation des *Firmicutes* lors de l'exacerbation (encadrés noirs). Bref, une abondance beaucoup plus faible de Gram négatif favorisant une augmentation de l'abondance de Gram positif. Toutefois, l'inverse est aussi observé chez trois patients sur huit (S7/E7, S8/E8, S9/E9), soit une augmentation des *Proteobacteria* en exacerbation et une présence importante des *Firmicutes* en état stable (Figure 17, encadrés rouges).

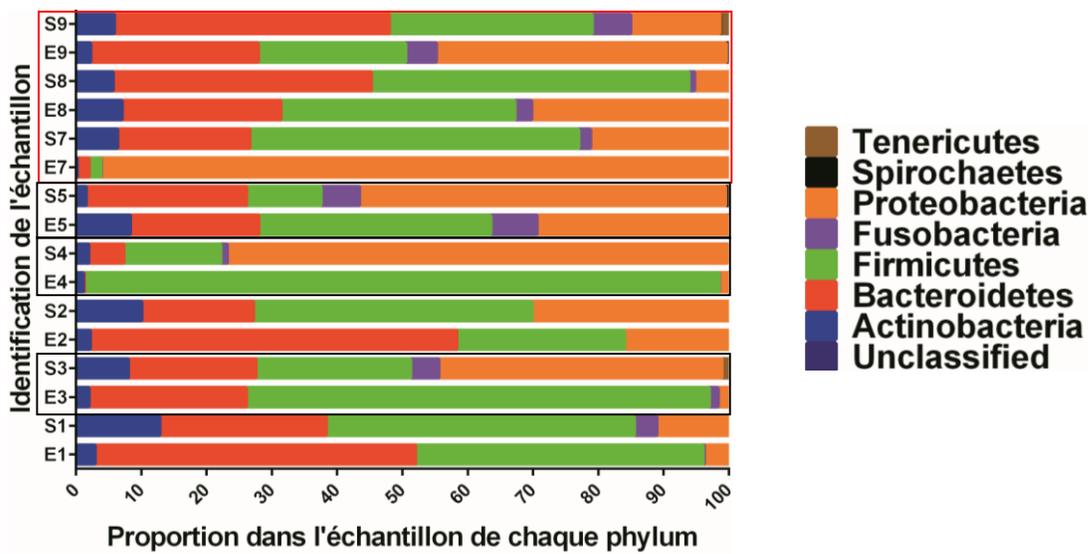


Figure 17 : **Abondance des phyla bactériens chez des patients à risque d'exacerbation.** Chaque couleur correspond à un phylum bactérien retrouvé dans la légende. Les phyla *Proteobacteria* et *Firmicutes* semblent être tout aussi importants à l'état stable qu'exacerbé.

L'analyse au genre bactérien (Figure 18) démontre une présence importante de *Methylobacterium* en période stable (S3, S4 et S5). Lors de l'exacerbation, l'abondance des *Methylobacterium* chez trois patients diminue énormément pour laisser place au genre *Streptococcus* (S3 et S4) et *Pseudomonas* (S5).

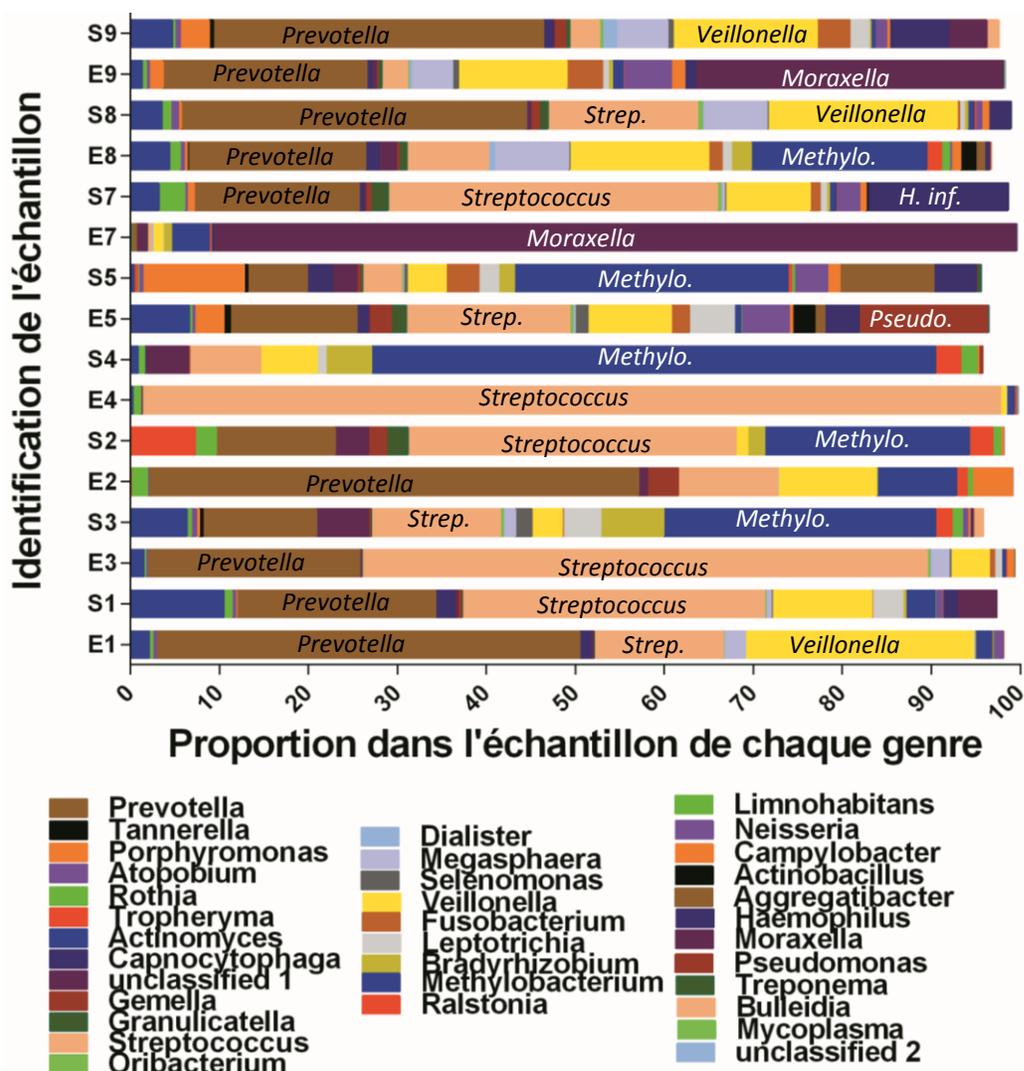


Figure 18 : **Abondance des genres bactériens chez des patients à risque d'exacerbation.** Chaque couleur correspond à un genre bactérien et les genres les plus importants ont été identifiés. Les genres *Streptococcus* et *Prevotella* semblent être tout aussi importants au niveau stable qu'exacerbé.

Les principales études sur le microbiome de patients MPOC démontrent une abondance importante des *Firmicutes* chez les patients MPOC modérés, sévères et très sévères [123, 148-150]. Une autre étude démontre toutefois l'inverse soit la présence de *Proteobacteria* chez les patients sévères [64]. Dans cette étude, les deux phyla semblent être importants et cette hypothèse avait déjà été émise par Huang *et al.* [150]. Dans ces études, les échantillons de départ étaient des lavages

broncho-alvéolaires, des tissus pulmonaires et des aspirations endo-trachéales. Toutefois, il y a la même quantité de *Bacteroidetes*, le genre bactérien le plus présent dans la bouche, soit ~25 % retrouvée dans leurs échantillons que dans les expectorations de cette cohorte. Ceci démontre que la technique de nettoyage est efficace afin de ne pas contaminer l'expectoration avec de la salive.

Le microbiome chez deux patients (S2/E2 et S1/E1) ne démontre pas les mêmes changements que ceux observés chez les six patients précédents. Dans les deux cas, il y a une abondance importante de *Streptococcus* à l'état stable, mais en exacerbation il y a une augmentation des *Bacteroidetes* du genre *Prevotella*. Malgré leur présence naturelle dans la bouche, le genre *Prevotella*, des bactéries anaérobies, semble être impliqué dans la bronchite chronique [173].

Pour finir, le microbiome des patients MPOC n'est définitivement pas le même à différents stades de la maladie. En effet, il a été possible de voir une différence dans leur microbiome à l'état stable versus en exacerbation tant avec les méthodes de profilage qu'avec le séquençage de nouvelle génération. Toutefois, les changements observés démontrent que le microbiome est patient-dépendant et qu'il semble y avoir une importance majeure des *Proteobacteria* et des *Firmicutes* dans la cohorte. Une meilleure compréhension des changements du microbiome de ces patients va permettre de leur offrir un traitement antibiotique plus éclairci.

Utilisation du pyroséquençage dans le but de découvrir des bactéries non suspectées lors d'exacerbation.

Les trois principaux phyla de cette cohorte lors d'exacerbation de patients MPOC sont les *Proteobacteria*, les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* (Figure 19). Plusieurs études ont démontré l'importance des *Firmicutes* et des *Proteobacteria* dans les exacerbations surtout pour les genres bactériens *Haemophilus* [80, 174], *Pseudomonas* [60, 175], *Moraxella* [56, 176] et *Streptococcus* [177, 178]. Toutefois, il y a peu d'études impliquant les *Bacteroidetes* dans les exacerbations

de patients MPOC. Il y a seulement une étude portant sur les bactéries anaérobies dans les bronchites chroniques [173].

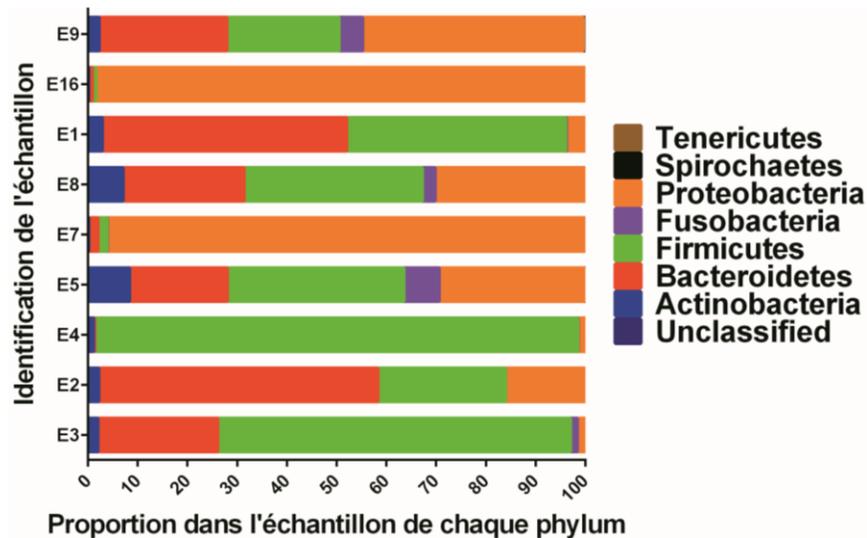


Figure 19 : **Abondance des phyla bactériens dans les échantillons de patients en exacerbation.** Chaque couleur correspond à un phylum bactérien retrouvé dans la légende. Les phyla bactériens les plus présents dans les échantillons sont *Proteobacteria* et *Firmicutes*.

Les principaux genres bactériens en exacerbation dans cette cohorte sont *Moraxella*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Methylobacterium*, *Veillonella* et *Pseudomonas* (Figure 20). Aucune étude n'a vérifié l'effet du genre *Methylobacterium*, α -*Proteobacteria*, dans les exacerbations de patients MPOC, malgré sa présence importante dans cette cohorte.

Pseudomonas a été détecté seulement dans un échantillon de patient exacerbé (E5). La patiente était âgée de 63 ans et était classée comme GOLD II. Habituellement, la détection de *Pseudomonas* se fait chez les patients sévères (GOLD III et GOLD IV) avec un stade avancé de la maladie [59, 179]. La présence de *Pseudomonas* chez des patients MPOC plus sévère et âgés pourrait être parce qu'ils ont été en contact avec des antibiotiques plus longtemps qu'un patient nouvellement diagnostiqué avec une MPOC ou que leur système immunitaire est

plus faible. De plus, l'émergence de *Pseudomonas* résistant aux antibiotiques en est la principale cause [59] et la plupart du temps ces souches de *Pseudomonas* sont beaucoup plus mucoïdes [180].

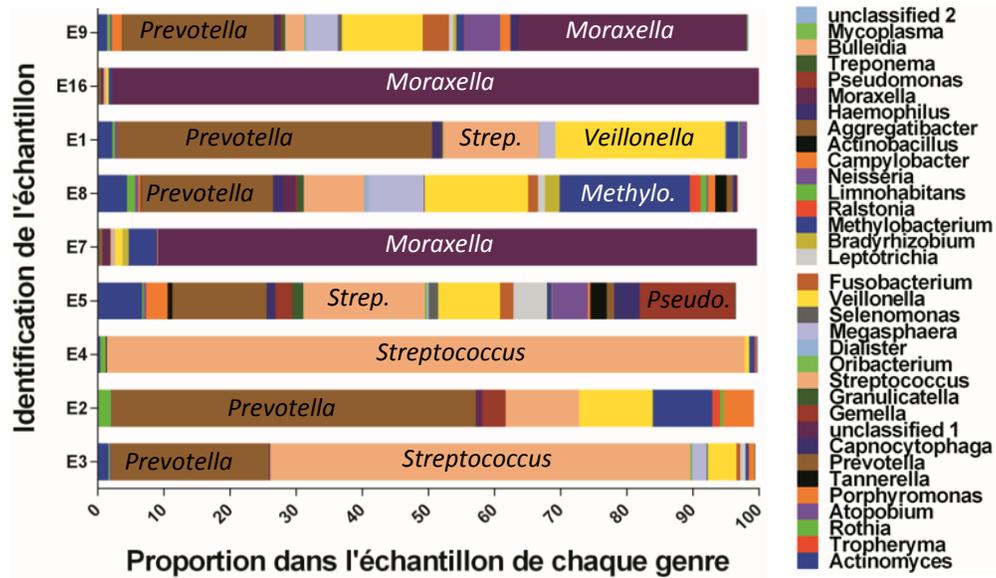


Figure 20 : **Abondance des genres bactériens dans les échantillons de patients en exacerbation.** Chaque couleur correspond à un genre bactérien et les genres importants sont identifiés. Les genres bactériens les plus présents dans les échantillons sont *Moraxella* et *Streptococcus*.

Est-ce que la présence importante d'un genre bactérien (plus de 50 % d'abondance relative) peut causer une exacerbation ou c'est tout simplement le 2-3 % d'un autre genre bactérien qui vient la déclencher? Où est-ce une combinaison de plusieurs genres bactériens? Plusieurs questions sans réponses qui devront être étudiées dans le futur.

Quelques genres bactériens comme *Methylobacterium*, *Prevotella* et *Veillonella* n'ont pas encore été démontrés comme impliqués dans les exacerbations microbiennes de patients MPOC. Toutefois, l'hypothèse initiale a été vérifiée et le

séquençage de nouvelle génération permet de révéler la présence de bactéries non suspectées lors d'exacerbation.

Détermination de la charge bactérienne et virale dans des expectorations de patients MPOC.

Les virus sont très impliqués dans la MPOC. En effet, ces derniers pourraient être à l'origine des exacerbations [92, 181]. D'après les résultats obtenus sur les 36 échantillons de patients MPOC, les virus respiratoires ne sont pas très présents dans cette cohorte de patients MPOC (Figure 21).

Charge virale dans les expectorations de patients MPOC

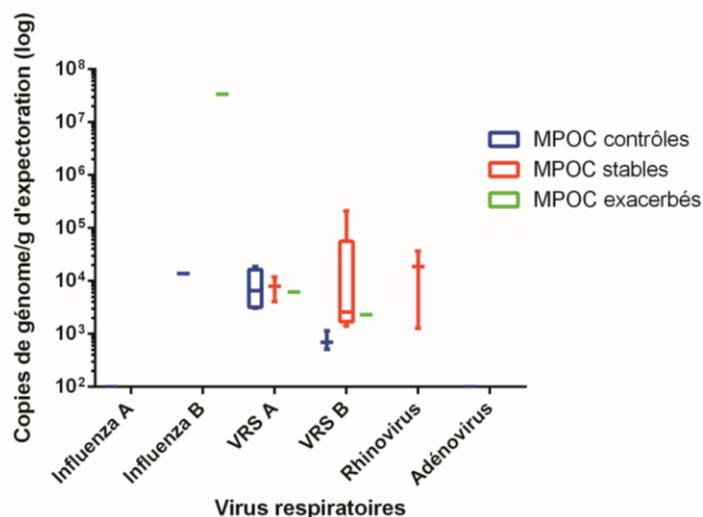


Figure 21 : **Diagramme en boîte avec la médiane de la charge virale de différents virus respiratoires chez des patients MPOC contrôles, stables et exacerbés.** Les échantillons en bleu proviennent de patients contrôles, en rouge de patients stables et en vert de patients exacerbés. Il est impossible de voir une relation entre le statut des patients et la présence d'un virus respiratoire en particulier.

Les quantités de VRS A ($p = 0,97$) et B ($p = 0,14$), et de rhinovirus ($p = 0,01$) sont très proche du seuil de détection en qPCR (résultats non montrés). L'influenza A et l'adénovirus n'ont été détectés dans aucun échantillon. Le rhinovirus est le virus

respiratoire le plus fréquemment identifié dans les expectorations de patients MPOC [181]. Ces résultats démontrent le contraire dans cette cohorte de Québec. Toutefois, malgré sa valeur p en dessous de 0,05 il est impossible de conclure d'après ces résultats, car le nombre d'échantillon est beaucoup trop faible.

Ces résultats peuvent s'expliquer par les délais de visite entre le fait que le patient ressent les premiers symptômes et sa visite à l'hôpital. En effet, il y avait un délai moyen d'environ sept jours avant de venir à l'hôpital à partir du moment où les patients pensaient être en exacerbation. L'influenza B a toutefois été détecté dans un échantillon d'expectoration de patients en exacerbation avec un compte à plus de 1×10^7 copies de génome d'Influenza B par gramme d'expectoration. La détection d'influenza B dans l'échantillon E3 s'est faite avec un délai de seulement trois jours. Une modification au protocole pourrait être apportée dans un projet futur en donnant au patient un pot stérile à la maison, afin de produire l'expectoration lorsqu'il se sent exacerbé et de se déplacer directement chez le patient pour limiter le délai d'analyse virale. Avec ce faible pourcentage de détection virale il n'est pas possible de répondre adéquatement à l'hypothèse initiale sur le lien entre le statut d'exacerbé et la présence d'un virus.

Il est possible de remarquer que la quantité de *H. influenzae* ($p = 0,46$) ne varie pas selon le statut du patient. Toutefois, les patients stables ont une quantité de *S. pneumoniae* plus importante que les deux autres groupes ($p = 0,01$). La détection de *P. aeruginosa* en qPCR a été nulle dans cette cohorte (Figure 22 et Tableau 5). Ceci peut s'expliquer par le fait que la cohorte est composée principalement de GOLD II et GOLD III. *M. catarrhalis* semble être plus présent chez les patients exacerbés, mais il n'est pas possible de conclure puisque la quantité d'échantillons positifs à l'état stable est trop faible ($p = 0,69$). Il a déjà été démontré que *M. catarrhalis* est impliqué dans environ 10 % des exacerbations de patients MPOC [57]. Bref, avec ce nombre d'échantillon, il ne semble pas y avoir une bactérie plus importante dans les expectorations de patients MPOC lorsque ces derniers sont dans un certain stade de la maladie. Fait intéressant est que les résultats en qPCR

corrélaient avec les résultats des méthodes de profilage. En effet, dans l'échantillon S11, la présence en très grande quantité de *H. influenzae* ($2,94 \times 10^8$ copies de génome par gramme d'expectoration) et de *S. pneumoniae* ($1,70 \times 10^8$ copies de génome par gramme d'expectoration) était aussi retrouvée par la présence de bandes très intenses de ces deux bactéries en DGGE et avec l'ARISA, par l'intensité des deux pics au-dessus de 9000 unités de fluorescence.

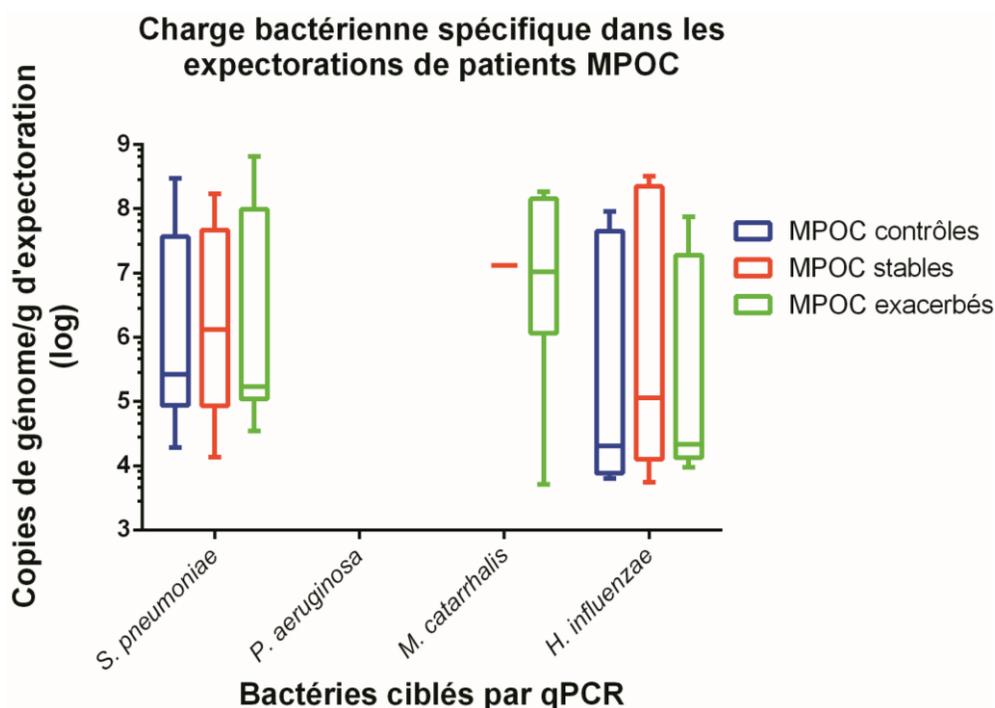


Figure 22 : **Diagramme en boîte avec la médiane de la charge bactérienne de différentes bactéries pathogènes chez des patients MPOC contrôles, stables et exacerbés.** Les échantillons en bleu proviennent de patients contrôles, en rouge de patients stables et en vert de patients exacerbés. Il ne semble pas y avoir de différences entre le statut du patient MPOC et la charge bactérienne de *S. pneumoniae* et *H. influenzae*.

Tableau 5 : **Quantité moyenne de bactéries spécifiques par gramme d'expectoration de patients MPOC à différent stade de la maladie.**

	MPOC contrôle	MPOC stable	MPOC exacerbé
<i>P. aeruginosa</i>	N/A (0/10)	N/A (0/16)	N/A (0/10)
<i>S. pneumoniae</i>	3,9 x10 ⁷ (10/10)	3 x10 ⁷ (8/16)*	9,7 x10 ⁷ (8/10)
<i>M. catarrhalis</i>	N/A (0/10)	6,6 x10 ⁶ (1/16)	5,2 x10 ⁷ (4/10)
<i>H. influenzae</i>	1,9 x10 ⁷ (8/10)	7,7 x10 ⁷ (8/16)	1,3 x10 ⁷ (6/10)
Bactéries totales	4,9 x10 ⁸ (10/10)	4,8 x10 ⁸ (16/16)	5,5 x10 ⁸ (10/10)

= significatif

Il a déjà été démontré que la charge bactérienne ne varie pas selon le statut du patient MPOC [49, 50]. L'expérience a été refaite pour confirmer les résultats publiés. La Figure 23 démontre que la quantité moyenne de copies de génome 16S (équivalent de *S. pneumoniae*) est d'environ 5 x10⁸ copies de génomes par gramme d'expectoration, et ce indépendamment du statut du patient MPOC (p = 0,447).

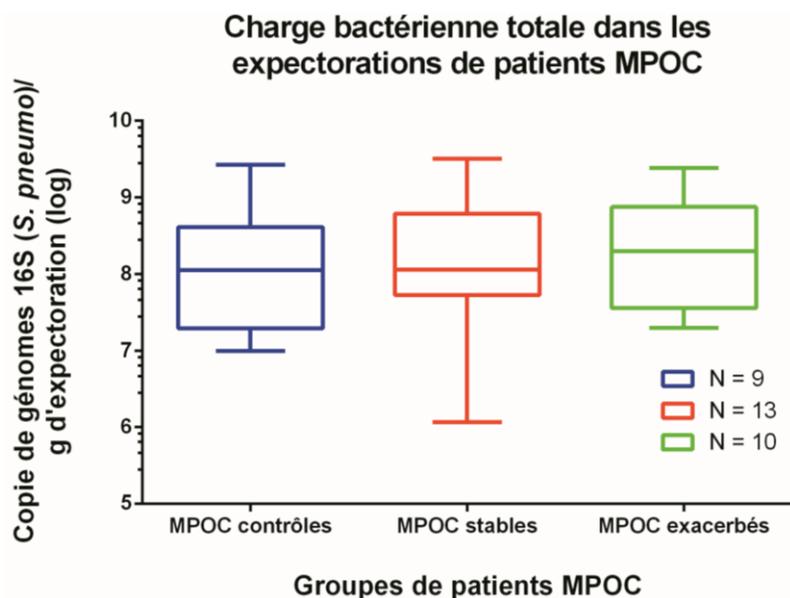


Figure 23 : **Charge bactérienne totale des patients MPOC déterminée par qPCR.** Les échantillons en bleu proviennent de patients contrôles, en rouge de patients stables et en vert de patients exacerbés. À première vue, il n'y a pas de différence sur la quantité de bactéries totales détectée dans les expectorations, et ce, indépendamment du stade de la maladie.

Ces résultats démontrent que l'exacerbation est probablement due à un déséquilibre de proportion d'un certain genre bactérien comparativement à une augmentation de la charge bactérienne. Ces résultats ont permis de répondre à la deuxième partie de l'hypothèse soit qu'une augmentation de la charge bactérienne n'était pas impliquée dans les exacerbations de patients MPOC.

Cinq échantillons d'expectorations (E1, E6, E7, E9 et E16) ont été envoyés au laboratoire de microbiologie de l'hôpital. *M. catarrhalis* et *S. aureus* ont été cultivés dans 60 % (E1, E7 et E16) des échantillons et 10 % (E1) des échantillons respectivement. Un patient (E1) avait donc les deux bactéries dans son expectoration. Les résultats de culture de l'échantillon d'expectoration E9 n'ont pas été concluants. *Alternaria. sp* a été cultivé dans l'échantillon d'un patient (E6). Ce résultat est très intéressant, car l'importance des fongiques dans la MPOC est peu étudiée. Ces résultats démontrent que la culture est toujours utile pour la recherche de microorganisme, malgré le fait qu'il n'est pas toujours possible d'identifier les microorganismes présents dans un échantillon.

Comparaison du microbiome d'expectoration de patients MPOC contrôlé après trois mois d'intervalle.

Une des principales lacunes des études portant sur le microbiome de patients MPOC est le manque d'étude longitudinale afin de bien comprendre l'évolution du microbiome [132, 151]. Il y a seulement une étude récente qui a fait un échantillonnage à différents temps [182]. Dans le cadre de cette étude, un intervalle de trois mois a été utilisé pour étudier l'effet du temps sur le microbiote. Une première comparaison a été effectuée avec les méthodes de profilage. La Figure 24 démontre que la similarité de trois patients (C18, C19 et C21) sur cinq est supérieure à 80 %, cela indique que les profils ont varié d'environ 20 % en trois mois avec ces techniques. Pour ce qui est des deux autres patients, ils ont environ 50 % de similarité dans leur profil à trois mois d'intervalle. Pour ce qui est des méthodes de profilage et dans la majorité des patients (60 %), il semble y avoir une

tendance à conserver leur microbiome au fil du temps. Les résultats sont toutefois différents lorsqu'on regarde les données avec le séquençage de nouvelle génération.

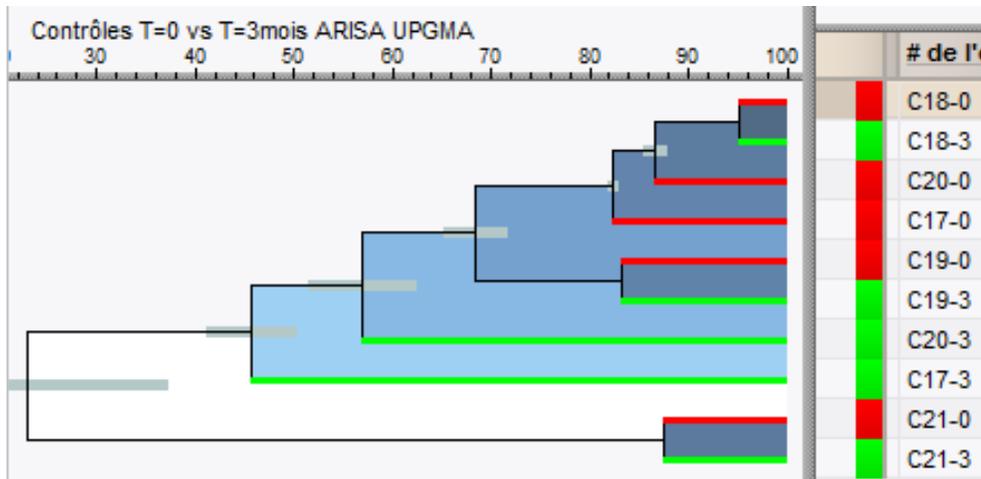


Figure 24 : **Dendrogramme avec une corrélation Pearson-UPGMA de profil bactérien en ARISA des échantillons C18-0 à C21-0 et C18-3 à C21-3.** Les échantillons en rouge proviennent de patients contrôles au temps 0 mois (C18-0 à C21-0), ceux en vert proviennent de patients contrôles au temps 3 mois (C18-3 à C21-3). 60 % des patients recrutés obtiennent des profils avec un pourcentage de similarité élevé après trois mois.

Les échantillons d'un patient (C21-0 et C21-3) ont dû être enlevés de l'analyse car, elles avaient très peu de séquences dans leur échantillon. Chez trois patients sur quatre (C17, C18 et C19), il y a une augmentation de l'abondance des *Proteobacteria* au temps trois mois. Un patient sur quatre (C20) a une augmentation très prononcée de *Bacteroidetes* au temps trois mois (Figure 25). À part pour l'apparition de *Spirochaetes* chez deux patients (C19 et C20) dans une proportion d'environ 3 %, le microbiome de patients contrôles ne change pas en terme de richesse, mais bien en terme d'abondance. Pour la suite, il sera question des différences au genre bactérien de ces patients contrôles MPOC.

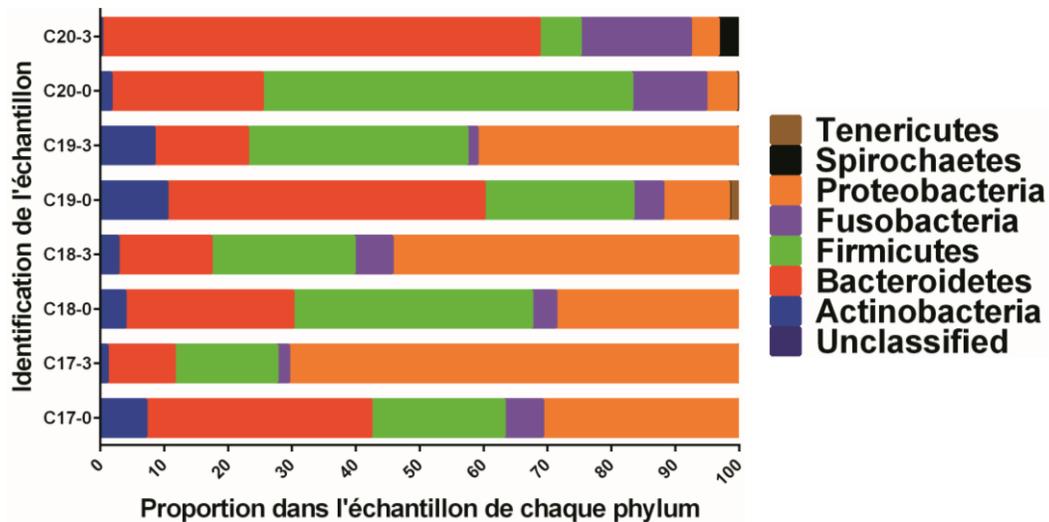


Figure 25 : **Abondance des phyla bactériens dans les échantillons de patients MPOC contrôle à trois mois d'intervalle.** Chaque couleur correspond à un phylum bactérien retrouvé dans la légende. Le microbiome semble évoluer dans le temps chez tous les patients.

Il semble y avoir une perte du genre *Prevotella* après trois mois compensée par une augmentation du genre *Methylobacterium* chez trois patients (C17, C18 et C19) (Figure 26). Le patient C20 a une présence très importante de *Porphyromonas* et de *Fusobacterium* qui sont des genres bactériens la plupart du temps impliqués dans les maladies parodontales [183]. D'après ces résultats le microbiome de patients MPOC contrôle change avec le temps. Cependant, dans cette étude seulement un point a été utilisé pour comparer l'effet du temps. D'autres études longitudinales devront être faites en ajoutant beaucoup plus de points dans le temps, par exemple deux expectorations par semaine pendant quatre semaines afin de bien voir l'évolution dans le temps et écarter l'hypothèse du hasard dans ces échantillons. Ces résultats ne permettent pas de bien confirmer l'hypothèse qui était que le microbiome évolue dans le temps.

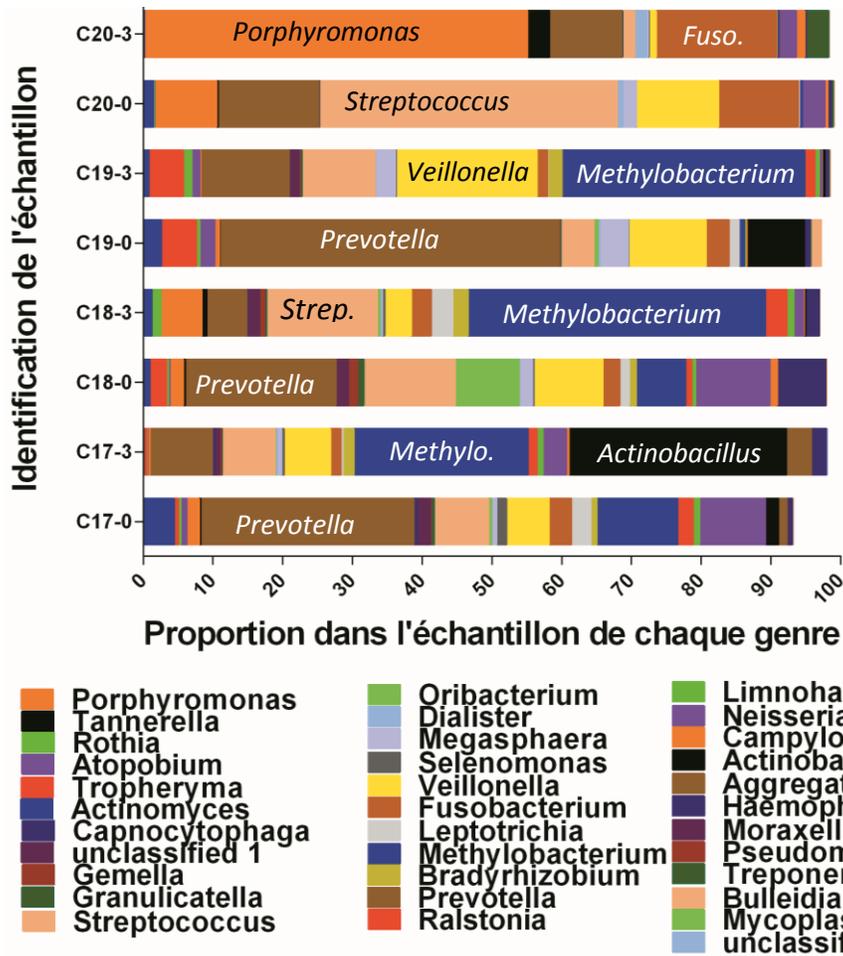


Figure 26 : **Abondance des genres bactériens dans les échantillons de patients MPOC contrôle à trois mois d'intervalle.** Chaque couleur correspond à un genre bactérien et les genres importants ont été identifiés. Il y a une augmentation du genre *Methylobacterium* après trois mois dans la majorité des échantillons.

Conclusion

Cette étude avait pour but de comparer et d'étudier le microbiome de patients atteints de maladies pulmonaires obstructives chroniques lorsque ceux-ci sont en état stable comparativement à une période d'exacerbation. De plus, il a été question de suivre dans le temps l'évolution du microbiome de patients MPOC contrôles après un intervalle de trois mois, afin de mieux comprendre l'évolution du microbiote. Des méthodes de profilages comme la DGGE et l'ARISA ainsi que le séquençage de nouvelle génération ont été sélectionnées pour répondre à ces questions.

Les méthodes de profilage sont bel et bien utilisables dans l'étude de la biodiversité pulmonaire. La méthode de prédilection à utiliser selon cette étude est la méthode ARISA. Cette méthode est beaucoup plus robuste et requière moins de manipulation de données rendant les analyses beaucoup plus objectives.

Le microbiome de patients MPOC en état stable est différent d'un état exacerbé. Chez trois patients sur huit, il y avait un déséquilibre de *Proteobacteria* du genre *Methylobacterium* pour une augmentation de *Firmicutes* du genre *Streptococcus*. L'inverse était aussi remarqué chez trois patients sur huit, soit une présence importante des *Proteobacteria* en exacerbation. Un fait intéressant est que le genre *Methylobacterium* tend à être retrouvé avec une plus grande abondance chez les patients fumeurs. Des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle de ce genre bactérien dans le microbiome pulmonaire de patients MPOC.

Le pyroséquençage a permis de découvrir des genres bactériens comme *Prevotella*, *Methylobacterium* et *Veillonella* dans les échantillons de patients exacerbés. Des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre leurs implications et les liens directs avec les exacerbations. En effet, ils ne sont pas cités dans la littérature comme des agents importants dans les exacerbations.

L'implication des virus respiratoires dans les exacerbations n'a pas pu être bien étudiée. Leur détection a été quasiment nulle en exacerbation dans cette cohorte sauf chez une patiente infectée par Influenza B. L'hypothèse est que ces résultats sont dus à un délai de visite beaucoup trop long avec une moyenne de sept jours avant de se déplacer à l'hôpital lors de l'exacerbation. Un déplacement directement chez le patient lors de symptômes ressentis pourrait être une solution envisageable pour diminuer le délai pour les analyses de virus respiratoire.

De plus, la quantité totale de bactéries retrouvées en exacerbation ne varie pas par rapport à l'état stable ou contrôle. Ces résultats sont en accord avec les autres études. En effet, la diversité semble être beaucoup plus importante que la quantité de bactéries pour causer une exacerbation.

Le microbiome de patients MPOC contrôle évolue dans le temps. La majorité des patients avaient un changement de microbiote avec une augmentation de *Methylobacterium* au temps trois mois. Des études supplémentaires devront être faites avec beaucoup plus d'échantillonnage sur une période de temps plus courte afin d'éliminer l'hypothèse du hasard sur l'évolution du microbiome.

Bibliographie

1. World Health Organization, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>. Page consulté le 20 novembre 2012.
2. World Health Organization, <http://www.who.int/respiratory/copd/burden/en/index.html>. Page consulté le 20 novembre 2012.
3. Statistique Canada. <http://www.statcan.gc.ca/pub/11-402-x/2010000/chap/pop/pop02-fra.htm>. 2010 Page consulté le 5 août 2013].
4. Statistique Canada, <http://www.statcan.gc.ca/pub/82-625-x/2010002/article/11273-fra.htm>. Page consulté le 20 novembre 2012.
5. L'association pulmonaire du Québec, <http://www.pq.poumon.ca/diseases-maladies/copd-mpoc/>. Page consulté le 20 novembre 2012.
6. Bourbeau, J., Tan, W. *L'étude CanCOLD : les défis et implications*. in *Rencontre annuelle du regroupement stratégique MPOC du Réseau en santé respiratoire du FRQS*. 2013. Québec.
7. National Heart Lung and Blood Institute, *Morbidity and mortality chart book on cardiovascular, lung and blood diseases*. 2009.
8. Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease*. 2011.
9. Petty, T.L., *The history of COPD*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2006. **1**(1): p. 3-14.
10. Tudor, R.M., et al., *State of the art. Cellular and molecular mechanisms of alveolar destruction in emphysema: an evolutionary perspective*. Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(6): p. 503-10.
11. Association pulmonaire du Canada. http://www.poumon.ca/diseases-maladies/a-z/emphysema-emphyseme/index_f.php. 2012.
12. Morris, D.G. and D. Sheppard, *Pulmonary emphysema: when more is less*. Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 396-403.
13. Aubier, M., et al., *[COPD and inflammation: statement from a French expert group: inflammation and remodelling mechanisms]*. Rev Mal Respir, 2010. **27**(10): p. 1254-66.
14. Fishman, A.P., *One hundred years of chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **171**(9): p. 941-8.
15. Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease*, 2011.
16. Decramer, M., W. Janssens, and M. Miravittles, *Chronic obstructive pulmonary disease*. The Lancet, 2012. **379**(9823): p. 1341-1351.
17. Talhout, R., et al., *Hazardous compounds in tobacco smoke*. Int J Environ Res Public Health, 2011. **8**(2): p. 613-28.
18. Ko, F.W. and D.S. Hui, *Air pollution and chronic obstructive pulmonary disease*. Respiriology, 2012. **17**(3): p. 395-401.

19. Eisner, M.D., et al., *An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **182**(5): p. 693-718.
20. Wong, C.M., et al., *Part 4. Interaction between air pollution and respiratory viruses: time-series study of daily mortality and hospital admissions in Hong Kong*. Res Rep Health Eff Inst, 2010(154): p. 283-362.
21. Prescott, E., et al., *Gender difference in smoking effects on lung function and risk of hospitalization for COPD: results from a Danish longitudinal population study*. Eur Respir J, 1997. **10**(4): p. 822-7.
22. Bone, C.R., et al., *NHLBI workshop summary. Research needs and opportunities related to respiratory health of women*. Am Rev Respir Dis, 1992. **146**(2): p. 528-35.
23. Schikowski, T., et al., *Long-term air pollution exposure and living close to busy roads are associated with COPD in women*. Respir Res, 2005. **6**: p. 152.
24. Société canadienne du cancer. <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-101/what-is-a-risk-factor/tobacco/second-hand-smoke/?region=on>. 2015.
25. World Resources Institute (WRI), *World resources: A guide to the Global Environment.*, 2007-08: Oxford University Press.
26. Rivera, R.M., et al., *Comparison of lung morphology in COPD secondary to cigarette and biomass smoke*. Int J Tuberc Lung Dis, 2008. **12**(8): p. 972-7.
27. Barros-Tizon, J.C., et al., *Reduction of severe exacerbations and hospitalization-derived costs in alpha-1-antitrypsin-deficient patients treated with alpha-1-antitrypsin augmentation therapy*. Ther Adv Respir Dis, 2012. **6**(2): p. 67-78.
28. Gooptu, B., U.I. Ekeowa, and D.A. Lomas, *Mechanisms of emphysema in alpha1-antitrypsin deficiency: molecular and cellular insights*. Eur Respir J, 2009. **34**(2): p. 475-88.
29. Svanes, C., et al., *Early life origins of chronic obstructive pulmonary disease*. Thorax, 2010. **65**(1): p. 14-20.
30. MacNee, W., *Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease*. Proc Am Thorac Soc, 2005. **2**(4): p. 258-66; discussion 290-1.
31. Sharafkhaneh, A., N.A. Hanania, and V. Kim, *Pathogenesis of emphysema: from the bench to the bedside*. Proc Am Thorac Soc, 2008. **5**(4): p. 475-7.
32. Spurzem, J.R. and S.I. Rennard, *Pathogenesis of COPD*. Semin Respir Crit Care Med, 2005. **26**(02): p. 142-153.
33. Knight, D.A., et al., *Year in review 2011: asthma, chronic obstructive pulmonary disease and airway biology*. Respirology, 2012. **17**(3): p. 563-72.
34. Barnes, P.J., S.D. Shapiro, and R.A. Pauwels, *Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms*. European Respiratory Journal, 2003. **22**(4): p. 672-688.
35. Donnelly, L.E. and P.J. Barnes, *Defective phagocytosis in airways disease*. Chest, 2012. **141**(4): p. 1055-62.
36. Taylor, A.E., et al., *Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD*. Eur Respir J, 2010. **35**(5): p. 1039-47.

37. Hodge, S., et al., *Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells*. *Immunol Cell Biol*, 2003. **81**(4): p. 289-96.
38. Stockley, R.A., *Neutrophils and the pathogenesis of COPD*. *Chest*, 2002. **121**(5 Suppl): p. 151S-155S.
39. Luo, H.R. and F. Loison, *Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation*. *Am J Hematol*, 2008. **83**(4): p. 288-95.
40. Holloway, R.A. and L.E. Donnelly, *Immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease*. *Curr Opin Pulm Med*, 2013. **19**(2): p. 95-102.
41. Kersul, A.L., et al., *Molecular mechanisms of inflammation during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease*. *Arch Bronconeumol*, 2011. **47**(4): p. 176-83.
42. Bafadhel, M., et al., *Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: identification of biologic clusters and their biomarkers*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011. **184**(6): p. 662-71.
43. Rohde, G., et al., *Inflammatory response in acute viral exacerbations of COPD*. *Infection*, 2008. **36**(5): p. 427-33.
44. Marin, A., et al., *Effect of bronchial colonisation on airway and systemic inflammation in stable COPD*. *COPD*, 2012. **9**(2): p. 121-30.
45. Banerjee, D., O.A. Khair, and D. Honeybourne, *Impact of sputum bacteria on airway inflammation and health status in clinical stable COPD*. *European Respiratory Journal*, 2004. **23**(5): p. 685-691.
46. Rodriguez-Roisin, R., *Toward a Consensus Definition for COPD Exacerbations**. *CHEST Journal*, 2000. **117**(5_suppl_2): p. 398S-401S.
47. Sykes, A., P. Mallia, and S.L. Johnston, *Diagnosis of pathogens in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease*. *Proc Am Thorac Soc*, 2007. **4**(8): p. 642-6.
48. Jenkins, C.R., et al., *Seasonality and determinants of moderate and severe COPD exacerbations in the TORCH study*. *Eur Respir J*, 2012. **39**(1): p. 38-45.
49. Sethi, S., et al., *Airway bacterial concentrations and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007. **176**(4): p. 356-61.
50. Haldar, K., Lau, K, Bafadhel, M, et al., *Molecular profiling of the airway microbiome in COPD*. *Thorax*, 2011. **66**: p. A10-A11.
51. Sethi, S., *Molecular diagnosis of respiratory tract infection in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease*. *Clin Infect Dis*, 2011. **52** Suppl 4: p. S290-5.
52. Sethi, S. and T.F. Murphy, *Infection in the Pathogenesis and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. *New England Journal of Medicine*, 2008. **359**(22): p. 2355-2365.
53. Groenewegen, K.H. and E.F.M. Wouters, *Bacterial infections in patients requiring admission for an acute exacerbation of COPD; a 1-year prospective study*. *Respiratory Medicine*, 2003. **97**(7): p. 770-777.
54. Ko, F.W.S., et al., *Sputum bacteriology in patients hospitalized with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease and concomitant pneumonia in Hong Kong*. *Intern Med J*, 2005. **35**(11): p. 661-667.

55. Larsen, J.M., 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**(2): p. e31976.
56. Murphy, T.F., et al., *Moraxella catarrhalis in chronic obstructive pulmonary disease: burden of disease and immune response*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(2): p. 195-9.
57. Parameswaran, G.I., et al., *Moraxella catarrhalis acquisition, airway inflammation and protease-antiprotease balance in chronic obstructive pulmonary disease*. BMC Infect Dis, 2009. **9**: p. 178.
58. Miravittles, M., et al., *Relationship Between Bacterial Flora in Sputum and Functional Impairment in Patients With Acute Exacerbations of COPD**. CHEST Journal, 1999. **116**(1): p. 40-46.
59. Engler, K., et al., *Colonisation with Pseudomonas aeruginosa and antibiotic resistance patterns in COPD patients*. Swiss Med Wkly, 2012. **142**: p. 0.
60. Murphy, T.F., et al., *Pseudomonas aeruginosa in chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **177**(8): p. 853-60.
61. Hoogendoorn, M., et al., *Association between lung function and exacerbation frequency in patients with COPD*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2010. **5**: p. 435-44.
62. Zalacain, R., et al., *Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease*. Eur Respir J, 1999. **13**(2): p. 343-8.
63. Han, M.K., et al., *Significance of the microbiome in obstructive lung disease*. Thorax, 2012. **67**(5): p. 456-63.
64. Erb-Downward, J.R., et al., *Analysis of the Lung Microbiome in the "Healthy" Smoker and in COPD*. PLoS ONE, 2011. **6**(2): p. e16384.
65. Montero, M., et al., *Mortality of COPD patients infected with multi-resistant Pseudomonas aeruginosa: a case and control study*. Infection, 2009. **37**(1): p. 16-9.
66. Hill, A.T., et al., *Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis*. The American Journal of Medicine, 2000. **109**(4): p. 288-295.
67. Rohde, G., et al., *Respiratory viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalisation: a case-control study*. Thorax, 2003. **58**(1): p. 37-42.
68. Mohan, A., et al., *Prevalence of viral infection detected by PCR and RT-PCR in patients with acute exacerbation of COPD: a systematic review*. Respiriology, 2010. **15**(3): p. 536-42.
69. Lieberman, D., et al., *Serological evidence of Legionella species infection in acute exacerbation of COPD*. Eur Respir J, 2002. **19**(3): p. 392-7.
70. Ballester, F., et al., *First human isolate of Mycobacterium poriferae in the sputum of a patient with chronic bronchitis*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(8): p. 3107-8.
71. Karnak, D., et al., *Chlamydia pneumoniae infection and acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD)*. Respiratory Medicine, 2001. **95**(10): p. 811-816.
72. Blasi, F., et al., *Chlamydia pneumoniae and chronic bronchitis: association with severity and bacterial clearance following treatment*. Thorax, 2002. **57**(8): p. 672-6.

73. Keith, E.R., et al., *Characteristics of Streptococcus pseudopneumoniae isolated from purulent sputum samples*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(3): p. 923-7.
74. Morris, A., et al., *Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and Pneumocystis colonization*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **170**(4): p. 408-13.
75. Losada, L., et al., *The Human Lung Microbiome*. 2011: p. 117-143.
76. McManus, T.E., et al., *High levels of Epstein-Barr virus in COPD*. Eur Respir J, 2008. **31**(6): p. 1221-6.
77. Bossink, A.W.J., Deege, M, and Thijsen, S.F.T., *A possible role for Epstein-Barr virus infection in COPD?* European respiratory journal, 2008. **32**(5): p. 1411-1412.
78. Balique, F., P. Colson, and D. Raoult, *Tobacco mosaic virus in cigarettes and saliva of smokers*. J Clin Virol, 2012. **55**(4): p. 374-6.
79. Bezemer, G., et al., *Microbes and microbial products in cigarette smoke. Implications for chronic obstructive pulmonary disease*. Ann Am Thorac Soc, 2014. **11 Suppl 1**: p. S76.
80. Chin, C.L., et al., *Haemophilus influenzae from patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation induce more inflammation than colonizers*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(1): p. 85-91.
81. Sethi, S., et al., *New Strains of Bacteria and Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. New England Journal of Medicine, 2002. **347**(7): p. 465-471.
82. Sethi, S., *Bacteria in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: phenomenon or epiphenomenon?* Proc Am Thorac Soc, 2004. **1**(2): p. 109-14.
83. Sethi, S., et al., *Inflammatory profile of new bacterial strain exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **177**(5): p. 491-7.
84. Beasley, V., et al., *Lung microbiology and exacerbations in COPD*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2012. **7**: p. 555-69.
85. Kherad, O., et al., *Upper-respiratory viral infection, biomarkers, and COPD exacerbations*. Chest, 2010. **138**(4): p. 896-904.
86. Hurst, J.R., et al., *Systemic and upper and lower airway inflammation at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **173**(1): p. 71-8.
87. Avadhanula, V., et al., *Respiratory viruses augment the adhesion of bacterial pathogens to respiratory epithelium in a viral species- and cell type-dependent manner*. J Virol, 2006. **80**(4): p. 1629-36.
88. Sajjan, U., et al., *Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **178**(12): p. 1271-81.
89. Mallia, P., et al., *Experimental rhinovirus infection as a human model of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(6): p. 734-42.
90. Molyneaux, P.L., et al., *Outgrowth of the Bacterial Airway Microbiome following Rhinovirus Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2013.

91. Mallia, P., et al., *Rhinovirus Infection Induces Degradation of Antimicrobial Peptides and Secondary Bacterial Infection in COPD*. Am J Respir Crit Care Med, 2012.
92. Hutchinson, A.F., et al., *A community-based, time-matched, case-control study of respiratory viruses and exacerbations of COPD*. Respir Med, 2007. **101**(12): p. 2472-81.
93. Matsuse, T., et al., *Latent adenoviral infection in the pathogenesis of chronic airways obstruction*. Am Rev Respir Dis, 1992. **146**(1): p. 177-84.
94. McManus, T.E., et al., *Acute and latent adenovirus in COPD*. Respir Med, 2007. **101**(10): p. 2084-90.
95. Falsey, A.R., et al., *Detection of respiratory syncytial virus in adults with chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **173**(6): p. 639-43.
96. Sikkil, M.B., et al., *Respiratory syncytial virus persistence in chronic obstructive pulmonary disease*. Pediatr Infect Dis J, 2008. **27**(10 Suppl): p. S63-70.
97. Lin, C.L., et al., *Mannose-binding lectin gene polymorphism contributes to recurrence of infective exacerbation in patients with COPD*. Chest, 2011. **139**(1): p. 43-51.
98. Connors, A.F., Jr., et al., *Outcomes following acute exacerbation of severe chronic obstructive lung disease. The SUPPORT investigators (Study to Understand Prognoses and Preferences for Outcomes and Risks of Treatments)*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(4 Pt 1): p. 959-67.
99. Bakaletz, L.O., *Developing animal models for polymicrobial diseases*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(7): p. 552-68.
100. Martin, J.R., C.S. Flores, and M. Kraft. *The Lung Microbiome: A New Frontier in Pulmonary Medicine*. in Thomas L. Petty Aspen Lung Conference. 2013. Gant Conference Center, Aspen, Colorado, USA.
101. Cabrera-Rubio, R., et al., *Microbiome diversity in the bronchial tracts of patients with chronic obstructive pulmonary disease*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(11): p. 3562-8.
102. Joyce, S.M., *Sputum analysis and culture*. Annals of Emergency Medicine, 1986. **15**(3): p. 325-328.
103. Surette, M. *Cystic Fibrosis and the Microbiome*. in Thomas L. Petty Aspen Lung Conference. 2013. Gang Conference Center, Aspen, Colorado, USA.
104. Amann, R.L., W. Ludwig, and K.H. Schleifer, *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. Microbiol Rev, 1995. **59**(1): p. 143-69.
105. Hurst, J.R., et al., *Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med, 2010. **363**(12): p. 1128-38.
106. Tunney, M.M., et al., *Lung microbiota and bacterial abundance in patients with bronchiectasis when clinically stable and during exacerbation*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **187**(10): p. 1118-26.
107. Peces-Barba, G., et al., *[Diagnosis and management of chronic obstructive pulmonary disease: joint guidelines of the Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR) and the Latin American Thoracic Society (ALAT)]*. Arch Bronconeumol, 2008. **44**(5): p. 271-81.

108. El Moussaoui, R., et al., *Short-course antibiotic treatment in acute exacerbations of chronic bronchitis and COPD: a meta-analysis of double-blind studies*. Thorax, 2008. **63**(5): p. 415-22.
109. Nseir, S., et al., *Multiple-drug-resistant bacteria in patients with severe acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: Prevalence, risk factors, and outcome **. Crit Care Med, 2006. **34**(12): p. 2959-2966
10.1097/01.CCM.0000245666.28867.C6.
110. Diez, B., et al., *Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(7): p. 2942-51.
111. Ercolini, D., *PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food*. J Microbiol Methods, 2004. **56**(3): p. 297-314.
112. Muyzer, G., E.C. de Waal, and A.G. Uitterlinden, *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA*. Appl Environ Microbiol, 1993. **59**(3): p. 695-700.
113. Borneman, J. and E.W. Triplett, *Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation*. Appl Environ Microbiol, 1997. **63**(7): p. 2647-53.
114. Fisher, M.M. and E.W. Triplett, *Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(10): p. 4630-6.
115. Cardinale, M., et al., *Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(10): p. 6147-56.
116. Purcell, P., J, Nelson, A, Fisher, A, Perry, J, D, De-Soyza, A, Cummings S, P., *MOLECULAR FINGERPRINTING AND METAGENOMIC ANALYSIS REVEALS A POLYMICROBIAL ELEMENT IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE*. Thorax, 2011: p. A10-A11.
117. Torsvik, V., et al., *Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments*. J Biotechnol, 1998. **64**(1): p. 53-62.
118. Rastogi, G. and R.K. Sani, *Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment*. 2011: p. 29-57.
119. Popa, R., et al., *Limitations and benefits of ARISA intra-genomic diversity fingerprinting*. J Microbiol Methods, 2009. **78**(2): p. 111-8.
120. Biswas, K. and S.J. Turner, *Microbial community composition and dynamics of moving bed biofilm reactor systems treating municipal sewage*. Appl Environ Microbiol, 2012. **78**(3): p. 855-64.
121. Schottner, S., et al., *Spatial scales of bacterial diversity in cold-water coral reef ecosystems*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e32093.
122. Shade, A., et al., *Lake microbial communities are resilient after a whole-ecosystem disturbance*. ISME J, 2012.
123. Sze, M.A., et al., *The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. **185**(10): p. 1073-80.

124. Liu, W.T., et al., *Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA*. *Appl Environ Microbiol*, 1997. **63**(11): p. 4516-22.
125. Marsh, T.L., *Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products*. *Current Opinion in Microbiology*, 1999. **2**(3): p. 323-327.
126. Cameron, R.J., et al., *Virus infection in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring ventilation*. *Intensive Care Med*, 2006. **32**(7): p. 1022-9.
127. Metzker, M.L., *Sequencing technologies - the next generation*. *Nat Rev Genet*, 2010. **11**(1): p. 31-46.
128. Kuczynski, J., et al., *Experimental and analytical tools for studying the human microbiome*. *Nat Rev Genet*, 2012. **13**(1): p. 47-58.
129. Schloss, P.D., et al., *Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities*. *Appl Environ Microbiol*, 2009. **75**(23): p. 7537-41.
130. Caporaso, J.G., et al., *QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data*. *Nat Methods*, 2010. **7**(5): p. 335-6.
131. Haas, B.J., et al., *Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons*. *Genome Res*, 2011. **21**(3): p. 494-504.
132. Beck, J.M., *ABCs of the lung microbiome*. *Ann Am Thorac Soc*, 2014. **11 Suppl 1**: p. S3-6.
133. Bray, J.R. and J.T. Curtis, *An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin*. Vol. 27. 1957: Ecological Monographs.
134. Hall, G.B., *Phylogenetic Trees Made Easy - a How-To Manual*. 2nd ed. 2004: Sinauer Associates, Inc. 221.
135. Evans, J., L. Sheneman, and J. Foster, *Relaxed neighbor joining: a fast distance-based phylogenetic tree construction method*. *J Mol Evol*, 2006. **62**(6): p. 785-92.
136. Flanagan, J.L., et al., *Loss of bacterial diversity during antibiotic treatment of intubated patients colonized with Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*, 2007. **45**(6): p. 1954-62.
137. Speert, D.P., *Bacterial infections of the lung in normal and immunodeficient patients*. *Novartis Found Symp*, 2006. **279**: p. 42-51; discussion 51-5, 216-9.
138. Monso, E., et al., *Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995. **152**(4 Pt 1): p. 1316-20.
139. Phillips, H., et al., *A comparison of cefpodoxime proxetil and cefaclor in the treatment of acute exacerbation of COPD in adults*. *Chest*, 1993. **104**(5): p. 1387-92.
140. Basran, G.S., et al., *Treatment of acute exacerbations of chronic obstructive airways disease--a comparison of amoxicillin and ciprofloxacin*. *J Antimicrob Chemother*, 1990. **26 Suppl F**: p. 19-24.
141. Rosen, M.J., *Treatment of exacerbations of COPD*. *Am Fam Physician*, 1992. **45**(2): p. 693-7.

142. Cvejic, L., et al., *Laryngeal penetration and aspiration in individuals with stable COPD*. *Respirology*, 2011. **16**(2): p. 269-75.
143. Gleeson, K., D.F. Egli, and S.L. Maxwell, *Quantitative aspiration during sleep in normal subjects*. *Chest*, 1997. **111**(5): p. 1266-72.
144. Segal, L.N., W.N. Rom, and M.D. Weiden, *Lung Microbiome for Clinicians. New Discoveries about Bugs in Healthy and Diseased Lungs*. *Ann Am Thorac Soc*, 2014. **11**(1): p. 108-16.
145. Lemon, K.P., et al., *Comparative analyses of the bacterial microbiota of the human nostril and oropharynx*. *MBio*, 2010. **1**(3).
146. Nasidze, I., et al., *Global diversity in the human salivary microbiome*. *Genome Res*, 2009. **19**(4): p. 636-43.
147. Dewhirst, F.E., et al., *The human oral microbiome*. *J Bacteriol*, 2010. **192**(19): p. 5002-17.
148. Pragman, A.A., et al., *The lung microbiome in moderate and severe chronic obstructive pulmonary disease*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. 11.
149. Hilty, M., et al., *Disordered microbial communities in asthmatic airways*. *PLoS One*, 2010. **5**(1): p. e8578.
150. Huang, Y.J., et al., *A persistent and diverse airway microbiota present during chronic obstructive pulmonary disease exacerbations*. *Omics*, 2010. **14**(1): p. 9-59.
151. Sze, M.A., J.C. Hogg, and D.D. Sin, *Bacterial microbiome of lungs in COPD*. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2014. **9**: p. 229-38.
152. Morris, A., et al., *Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013. **187**(10): p. 1067-75.
153. Wang, F. and B. He, *The effect of dithiothreitol on chemotactic factors in induced sputum of chronic obstructive pulmonary disease patients*. *Respiration*, 2009. **78**(2): p. 217-22.
154. Pizzichini, M., et al., *The influence of testosterone on purine nucleotide metabolism in rat liver*. *Life Sci*, 1995. **57**(23): p. 2127-35.
155. Zhao, J., et al., *Impact of enhanced Staphylococcus DNA extraction on microbial community measures in cystic fibrosis sputum*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e33127.
156. Centre de référence pour les virus bactérien Félix d'Hérelle. <http://www.phage.ulaval.ca/accueil/>. 2015 Page consulté le 15 avril 2015].
157. American Type Culture Collection. <http://www.atcc.org/>. 2015 Page consulté le 15 avril 2015].
158. Utokaparch, S., et al., *The relationship between respiratory viral loads and diagnosis in children presenting to a pediatric hospital emergency department*. *Pediatr Infect Dis J*, 2011. **30**(2): p. e18-23.
159. Bach, H.J., et al., *Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification*. *J Microbiol Methods*, 2002. **49**(3): p. 235-245.
160. Deschaght, P., et al., *Comparison of the sensitivity of culture, PCR and quantitative real-time PCR for the detection of Pseudomonas aeruginosa in sputum of cystic fibrosis patients*. *BMC Microbiol*, 2009. **9**: p. 244.
161. Abdeldaim, G.M., et al., *Toward a quantitative DNA-based definition of pneumococcal pneumonia: a comparison of Streptococcus pneumoniae target*

- genes, with special reference to the Spn9802 fragment.* Diagn Microbiol Infect Dis, 2008. **60**(2): p. 143-50.
162. Garcha, D.S., et al., *Changes in prevalence and load of airway bacteria using quantitative PCR in stable and exacerbated COPD.* Thorax, 2012.
163. Greiner, O., et al., *Quantitative detection of Moraxella catarrhalis in nasopharyngeal secretions by real-time PCR.* J Clin Microbiol, 2003. **41**(4): p. 1386-90.
164. Selvaraju, S.B. and R. Selvarangan, *Evaluation of three influenza A and B real-time reverse transcription-PCR assays and a new 2009 H1N1 assay for detection of influenza viruses.* J Clin Microbiol, 2010. **48**(11): p. 3870-5.
165. Hu, A., et al., *Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR.* J Clin Microbiol, 2003. **41**(1): p. 149-54.
166. Heim, A., et al., *Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR.* J Med Virol, 2003. **70**(2): p. 228-39.
167. Hayden, F.G., et al., *Efficacy and safety of oral pleconaril for treatment of colds due to picornaviruses in adults: results of 2 double-blind, randomized, placebo-controlled trials.* Clin Infect Dis, 2003. **36**(12): p. 1523-32.
168. Gendron, L., et al., *Evaluation of Filters for the Sampling and Quantification of RNA Phage Aerosols.* Aerosol Science and Technology, 2010. **44**(10): p. 893-901.
169. Comeau, A.M., et al., *Arctic Ocean microbial community structure before and after the 2007 record sea ice minimum.* PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27492.
170. Lidstrom, M.E. and L. Chistoserdova, *Plants in the pink: cytokinin production by methylobacterium.* J Bacteriol, 2002. **184**(7): p. 1818.
171. Anesti, V., et al., *Isolation and molecular detection of methylotrophic bacteria occurring in the human mouth.* Environ Microbiol, 2005. **7**(8): p. 1227-38.
172. Khaira, N., et al., *Production of volatile sulphur compounds in diseased periodontal pockets is significantly increased in smokers.* Oral Dis, 2000. **6**(6): p. 371-5.
173. Brook, I. and E.H. Frazier, *Immune response to Fusobacterium nucleatum and Prevotella intermedia in the sputum of patients with acute exacerbation of chronic bronchitis.* Chest, 2003. **124**(3): p. 832-3.
174. Eldika, N. and S. Sethi, *Role of nontypeable Haemophilus influenzae in exacerbations and progression of chronic obstructive pulmonary disease.* Curr Opin Pulm Med, 2006. **12**(2): p. 118-24.
175. Garcia-Vidal, C., et al., *Pseudomonas aeruginosa in patients hospitalised for COPD exacerbation: a prospective study.* Eur Respir J, 2009. **34**(5): p. 1072-8.
176. Aebi, C., *Moraxella catarrhalis - pathogen or commensal?* Adv Exp Med Biol, 2011. **697**: p. 107-16.
177. Desai, H., et al., *Antibiotic resistance in sputum isolates of Streptococcus pneumoniae in chronic obstructive pulmonary disease is related to antibiotic exposure.* COPD, 2010. **7**(5): p. 337-44.
178. Nishimura, K., T. Nishimura, and T. Oga, *Streptococcus pneumoniae urinary antigen test and acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease.* COPD, 2012. **9**(4): p. 344-51.

179. Millares, L., et al., *Bronchial microbiome of severe COPD patients colonised by Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014.
180. Engler, K., et al., *Colonisation with Pseudomonas aeruginosa and antibiotic resistance patterns in COPD patients*. Swiss Med Wkly, 2012. **142**: p. w13509.
181. George, S.N., et al., *Human rhinovirus infection during naturally occurring COPD exacerbations*. Eur Respir J, 2014.
182. Huang, Y.J., et al., *Airway Microbiome Dynamics in Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. J Clin Microbiol, 2014.
183. Saito, A., S. Inagaki, and K. Ishihara, *Differential ability of periodontopathic bacteria to modulate invasion of human gingival epithelial cells by Porphyromonas gingivalis*. Microb Pathog, 2009. **47**(6): p. 329-33.

Annexe

Tableau 2 : Amorces et sondes utilisées.

Microorganismes	Cible	Amorces et sondes	Séquences
Bactéries			
<i>P. aeruginosa</i>	<i>oprL</i> gene	PAO1 F PAO1 R PAO1 TM	CAG GTC GGA GCT GTC GTA CTC ACC CGA ACG CAG GCT ATG FAM-AGA AGG TGG TGA TCG CAC GCA GA
<i>H. influenzae</i>	<i>P4</i> Lipoprotein gene	Hin-F Hin-R Hin-TM	CCG GGT GCG GTA GAA TTT AAT AA CTG ATT TTT CAG TGC TGT CTT TGC FAM-ACA GCC ACA ACG GTA AAG TGT TCT ACG
<i>M. catarrhalis</i>	<i>CopB</i> gene	Mor-F Mor-R Mor-TM	GTG AGT GCC GCT TTA CAA CC TGT ATC GCC TGC CAA GAC AA FAM-TGC TTT TGC AGC TGT TAG CCA GCC TAA
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Spn9082</i> (gene fragment)	Spn-F Spn-R Spn-TM	AGT CGT TCC AAG GTA ACA AGT CT ACC AAC TCG ACC ACC TCT TT FAM-TAC ATG TAG GAA ACT ATT TTC CTC ACA AA
Virus			
MS2 phage	Assembly/Coat protein	MS2 1 for MS2 1 rev MS2 1 probe	GTC CAT ACC TTA GAT GCG TTA GC CCG TTA GCG AAG TTG CTT GG FAM-ACG TCG CCA GTT CCG CCA TTG TCG
Influenza A	M fragment	InfAfor InfArev InfAprobe	GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA FAM-TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG
Influenza B	xxxxx	InfBfor InfBrev InfBprobe	TCC TCA ACT CAC TCT TCG AGC G CGG TGC TCT TGA CCA AAT TGG FAM-CC AAT TCG A/ZEN/G CAG CTG AAA CTG CGG TG
RSV A	Nucleocapsid	RVSA-F RVSA-R RVSA-TM	GCT CTT AGC AAA GTC AAG TTG AAT GA GCC ACA TAA CTT ATT GAT GTG TTT CTG FAM-ACA CTC AAC AAA GAT CAA CTT CTG TCA TCC AGC
RSV B	Nucleocapsid	RVSB-F RVSB-R RVSB-TM	GAT GGC TCT TAG CAA AGT CAA GTT AA TGT CAA TAT TAT CTC CTG TAC TAC GTT GAA FAM-TGA TAC ATT AAA TAA GGA TCA GCT GCT GTC ATC CA
Rhinovirus	5' untranslated region	HRV-F HRV-R HRV-TM	GTG AAG AGC CSC RTG TGC T GCT SCA GGG TTA AGG TTA GCC FAM-TGA GTC CTC CGG CCC CTG AAT G
Adenovirus	Hexon	ADN-F ADN-R ADN-TM	GCC CCA GTG GTC TTA CAT GCA CAT C GCC ACG GTG GGG TTT CTA AAC TT FAM-TGC ACC AGA CCC GGG CTC AGG TAC TCC GA

La Phylogénie d'un patient MPOC

1) Phylum	2) Classe	3) Ordre	4) Famille	5) Genre et Espèce
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Legionellales</i>	<i>Legionellaceae</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
		<i>Pseudomonadales</i>	1) <i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
			2) <i>Moraxellaceae</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
		<i>Pasteurellales</i>	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
		<i>Xanthomonales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
		<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
		<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Tenericutes</i>	<i>Mollicutes</i>	<i>Mycoplasmatales</i>	<i>Mycoplasmataceae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Chlamydiae</i>	<i>Chlamydiae</i>	<i>Chlamydiales</i>	<i>Chlamydiaceae</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>

Figure 4 : **Phylogénie des principales bactéries impliquées dans la MPOC.** La majorité des bactéries pathogènes impliquées dans la MPOC se retrouve parmi les *Proteobacteria* soit, les Gram négatifs.