

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

*Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de biochimie et microbiologie*



Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Option : Biotechnologie microbienne

Etude des infections respiratoires chez l'adulte asthmatique : Comparaison entre le crachat spontané et induit

Réalisé par : Ouerd Djedjiga
Yezid Dihia

Présenté devant le jury :

Président : Mr Tazdait D.

Maitre de conférences classe A

Examinatrices : M^{me} Abdoune S.

Maitre assistante classe A

M^{elle} Asmani K.

Maitre de conférences classe B

Invité : Mr Djebbara D.

Président de l'association des malades
asthmatiques de Tizi-Ouzou

Promoteur : Mr Bouazza B.

Maitre de conférences classe A

Année universitaire 2018-2019

Remerciements

Pour leur contribution particulière et inestimable lors de la réalisation de ce travail, nous désirons remercier :

- ✓ *Dr B. Bouazza qui a bien voulu nous encadrer malgré son emploi du temps très chargé, ses critiques fondées et constructives ont toujours été bénéfiques, qu'il soit convaincu de notre profonde gratitude et notre meilleure reconnaissance.*
- ✓ *Aux membres du jury d'avoir accepté d'examiner notre travail*
- ✓ *Dr K. Senani qui nous a accueillis dans son cabinet et qui a assuré la surveillance médicale des patients lors la réalisation des prélèvements.*
- ✓ *Mr D. Djebbara président de l'association des Malades et Parents des Malades Asthmatiques de la Wilaya de Tizi-Ouzou qui nous a assuré le recrutement des malades, qu'il trouve ici notre reconnaissance.*
- ✓ *Dr S. Lebsir praticien hospitalier au centre hospitalier George Sand, Centre-Val de Loire, qui a réalisé l'analyse statistique et pour son extraordinaire disponibilité et pour le grand intérêt qu'il a apporté pour notre travail.*
- ✓ *Dr F. Boubrit chef de service du laboratoire de Microbiologie du CHU de Tizi-Ouzou de nous avoir permis de réaliser la partie pratique au sein de son service.*
- ✓ *Mr M. Krireche et Mme D. Koulali pour leurs aides et conseils précieux.*
- ✓ *Le personnel du laboratoire de Microbiologie de Tizi-Ouzou.*
- ✓ *En fin nos remerciements sont adressés à tous les malades asthmatiques ayant participé à notre étude.*

Dédicace

J'ai le plaisir de dédier ce présent travail à

- ✓ *La mémoire de mon défunt père que sa lumière soit éternelle et à ma mère*
- ✓ *Mon mari Karim et mes enfants Mohammed, Meryam, Ania pour leur soutien constant et leurs encouragements*
- ✓ *Mes frères et mes sœurs et leurs familles*
- ✓ *La mémoire de mes beaux parents et à mes belles sœurs et leurs familles*
- ✓ *Tous mes amis (es)*

Djedjiga

Dédicace

J'ai le plaisir de dédier ce présent travail à

- ✓ *Mes très chers Parents, mon père M^r Yezid Ahcene, ma mère Mme Yezid Saïda.*
- ✓ *Mon Fiancé Malek et Mes beaux parents.*
- ✓ *Mes chers et adorables Frères et Sœurs : Kahina, Lila, Ferhat et Toute ma Famille.*
- ✓ *Tous mes amis(es)*
- ✓ *Et à tous ceux que j'aime.*

Dihia

Liste des figures

Figure 1 : Image représentant les voies respiratoire.....	12
Figure 2 : Analyse du microbiote dans des échantillons respiratoires.	17
Figure 3 : Abondance relative de 15 familles bactériennes dans des échantillons de sujets asthmatiques et non asthmatiques.	21
Figure 4 : Le microbiote pulmonaire dans la santé et la maladie.....	22
Figure 5 : Représentation schématique de l'abondance et de la diversité estimée des microbiotes des voies aériennes supérieures et inférieures en situation physiologique et pathologique.....	23
Figure 6 : Facteurs pouvant modifier le microbiote bactérien respiratoire et les nouvelles approches thérapeutiques.	25
Figure 7 : Rôle des microbes dans la régulation de la réponse allergique des voies respiratoires.	27
Figure 8 : Milieux de culture utilisés.....	33
Figure 9 : Différentes étapes d'un antibiogramme.....	40
Figure 10 : Traitement statistique.....	42
Figure 11 : Répartition des espèces pathogènes et pathogénèse opportunistes dans la population étudiée.	43
Figure 12 : Photographie représentant <i>Alternaria spp</i> observé dans le crachat spontané d'un patient asthmatique (N°4).....	54
Figure 13 : Observation des cellules épithéliales et de leucocytes avec la coloration au bleu de méthylène et de May-Grunwald Giemsa présentent dans les crachats des malades asthmatiques.	54
Figure 14 : <i>Candida Albicans</i> dans sa forme invasive chez des patients asthmatiques à l'état frais.	55
Figure 15 : Culture sur la gélose au sang frais de crachat spontané et induit d'un patient asthmatique N°18.	58
Figure 16 : Culture sur la gélose au sang cuit de crachat spontané et induit d'un patient asthmatique N°6.....	58
Figure 17 : Culture sur milieu Hektoen de crachat spontané et induit d'un patient asthmatique N°11 (à gauche) et N°22 (à droite).....	58

Figure 18 : Culture sur milieu Chapman de crachat spontané et induit d'un patient asthmatique N°6.	59
Figure 19 : Culture sur la gélose nutritive de crachat spontané et induit d'un patient asthmatique N°8.....	59
Figure 20 : Culture sur la gélose BEA de crachat spontané et induit d'un patient asthmatique N°22.	59
Figure 21 : Culture sur la gélose chromogène de crachat spontané d'un patient asthmatique.	60
Figure 22 : Culture sur la gélose BCP de crachat spontané et induit d'un patient asthmatique N°6.	60
Figure 23 : Culture sur la gélose au sang frais de crachat spontané et induit d'un patient asthmatique N°22.	60
Figure 24 : Résultat positif d'un teste de filamentation réalisé sur des colonies isolées à partir du milieu Sabouraud d'un crachat induit (patient N° 20).	61
Figure 25 :Image représentative du résultat d'une coloration de Gram pour les colonies apparues sur milieu Chapman (cocci Gram positif).	61
Figure 26 : Image représentative du résultat d'une coloration de Gram pour les colonies apparues sur gélose au sang frais (bacille Gram positif).	61
Figure 27 : Image représentative des colonies hémolytiques à partir d'un crachat induit.	62
Figure 28 : Colonies hémolytique sur gélose au sang frais, réisolement à partir d'une culture de crachat induit d'un patient N°16 ensemencé sur gélose au sang frais.	62
Figure 29 : Image représentative des colonies hémolytiques, réisolement à partire d'une culture sur milieu Chapman.	62
Figure 30 : Image représentative des colonies non hémolytiques, réisolement à partire d'une culture sur milieu Chapman.	62
Figure 31 : Résultat d'un test de sérotypage pour l'identification des streptocoques B hémolytiques (classification de Lancefeild). Dans ce test il s'agit de streptocoque du groupe C.	63
Figure 32 : Résultat d'un test de sérotypage pour l'identification des streptocoques B hémolytiques (classification de Lancefeild). Dans ce test il s'agit de streptocoque du groupe G.	63
Figure 33 : Résultat du test de sérotypage pour l'identification de <i>staphylococcus aureus</i>	63
Figure 34 : Test positif à la recherche de l'oxydase, colonie développées sur milieu Hektoen	64

Figure 35 : Résultat positif de la recherche de la catalase chez les colonies retrouvées sur le milieu Chapman.	64
Figure 36 : Résultat positif de la recherche de la coagulase chez les colonies retrouvées sur le milieu Chapman.	64
Figure 37 : Résultat de l'ensemencement de la galerie Api 20 E d'une souche isolée sur milieu Hektoen d'un crachat induit du malade 11.	65
Figure 38 : Résultat de l'ensemencement de la galerie Api 20 E d'une souche isolée sur milieu Hektoen d'un crachat induit du malade 22.	66
Figure 39 : Résultat de l'ensemencement de la galerie Api 20 NE d'une souche isolée sur milieu Hektoen d'un crachat induit du malade 13.	67
Figure 40 : Résultat de l'ensemencement de la galerie Api 20 NE d'une souche isolée sur milieu Hektoen d'un crachat induit du malade 19.	68
Figure 41 : Résultat de l'ensemencement de la galerie Api NH d'une souche isolée sur milieu Hektoen d'un crachat induit du malade 6.	69
Figure 42 : AntibioGramme réalisé sur la souche de streptocoque B hémolytique isolé à partir du crachat induit d'un patient asthmatique 30.	70
Figure 43 : AntibioGramme réalisé sur la souche de Klebsiella pneumoniae isolée à partir du crachat induit d'un patient asthmatique 11.	71
Figure 44 : AntibioGramme de streptocoque B hémolytique du groupe C isolé à partir du crachat induit d'un patient asthmatique 19.	72
Figure 45 : AntibioGramme réalisé sur l'Entérocooccus isolée à partir du crachat spontané d'un patient asthmatique 24.	73
Figure 46 : AntibioGramme réalisé sur <i>Escherichia coli</i> isolée à partir du crachat spontané d'un patient asthmatique N°22.	74
Figure 47 : AntibioGramme réalisé sur isolée à partir du crachat spontané d'un patient asthmatique T3.	75

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Classification des crises d'asthme (asthme; prévention, causes, symptômes)	3
Tableau 2 : Règles de détermination du « stade clinique »	6
Tableau 3: Phyla, familles, genres ou espèce bactériennes les plus fréquemment décrites dans les voies aériennes supérieures.	19
Tableau 4 : Phyla, genres bactérien les plus fréquemment décrit dans les voies aériennes inférieures.	20
Tableau 5 : Matériel non biologique.	30
Tableau 6: Comparaison des moyennes du nombre d'espèces dans les deux prélèvements.	44
Tableau 7: Comparaison des moyennes du nombre d'espèces pathogènes dans les deux prélèvements.	45
Tableau 8: Comparaison entre la positivité des deux types de prélèvements spontané et induit.	46
Tableau 9 : Contingence.	46
Tableau 10 : Critères macroscopiques des crachats spontanés chez les malades asthmatiques	49
Tableau 11 : Critères macroscopiques des crachats induits chez les malades asthmatiques .	51
Tableau 12 : Les résultats de l'étude cytologique des crachats spontanés des patients asthmatiques et de sujets sains.	52
Tableau 13: Les résultats de l'étude cytologique des crachats induits des patients asthmatiques et de sujets sains.....	53
Tableau 14 : Les résultats des cultures des crachats spontanés et induits des patients asthmatiques sur les différents milieux de culture.	56
Tableau 15 : Les résultats des cultures des crachats spontanés et induits des sujets témoins sains sur les différents milieux de culture.	57
Tableau 16 : Résultat de l'antibiogramme de <i>streptocoque B hémolytique</i> isolé à partir du crachat induit du patient asthmatique N° 3.	70
Tableau 17 : Résultat de l'antibiogramme de <i>klebsiella pneumoniae</i> isolée à partir du crachat induit d'un patient asthmatique.	71
Tableau 18 : Résultat de l'antibiogramme de <i>streptocoque B hémolytique</i> du groupe C isolé à partir du crachat induit d'un patient asthmatique 19.	72
Tableau 19 : Résultat d'antibiogramme de l' <i>Entérocooccus</i> isolé à partir du crachat spontané d'un patient asthmatique N° 24.	73

Tableau 20 : Résultats de l'antibiogramme d' <i>Escherichia coli</i> isolé à partir du crachat spontané d'un patient asthmatique 22.	74
Tableau 21 : Résultats de l'antibiogramme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolé à partir du crachat spontané d'un témoin.....	75

Glossaire

Chronique: Une maladie chronique est une maladie de longue durée" évolutive, souvent associée à une invalidité et à la menace de complications graves.

Cytokine: Les cytokines sont des molécules du système immunitaire qui jouent un rôle de messenger (transmission d'informations) semblable au rôle des hormones. Elles sont produites par les lymphocytes et les macrophages (deux types de cellules du système immunitaire) en réponse à des antigènes (molécules reconnues comme étrangères) pour réguler l'activité d'autres cellules immunitaires.

Eosinophiles: Les polynucléaires éosinophiles sont une variété de globules blancs, qui jouent un rôle dans les maladies allergiques, ils possèdent aussi une action antiparasitaire.

Hyperplasie: Augmentation de la masse d'un organe ou d'une portion d'organe due à un accroissement anormal du nombre des cellules qui le composent. C'est habituellement le reflet d'une hyperactivité fonctionnelle.

Hypertrophie: Augmentation réversible de la taille d'une cellule en rapport avec une augmentation de la taille et du nombre de ses constituants.

Inflammation: L'inflammation est un mécanisme de défense de première ligne face à une agression. Elle a pour objectif de reconnaître, détruire et éliminer toutes les substances qui lui sont étrangères.

Acariens: Les acariens sont de minuscules animaux, visibles au microscope, cousins des insectes et des crustacés (arthropodes). Ceux trouvés dans les poussières de maison sont les plus allergisants. Ils se nourrissent de squames humaines, très répandues dans les matelas, oreillers et moquettes. Leur croissance est maximale en milieu humide et chaud.

Allergènes: C'est la substance, l'agent, la molécule responsable de la réaction allergique chez certains sujets. On donne aussi à tous ces agents le nom d'antigène.

Antibiotiques : Les antibiotiques sont des substances chimiques naturelles ou de synthèses utilisées pour traiter les infections bactériennes.

Bronchodilatateurs : Les bronchodilatateurs sont des médicaments utilisés pour traiter et prévenir la bronchoconstriction, c'est-à-dire la contraction anormale ou pathologique des muscles de la paroi des bronches.

Dyspnée: La dyspnée, sensation de gêne respiratoire, est un symptôme fréquent des maladies respiratoires et cardiaques notamment. Elle nécessite une prise en charge multiple.

Interleukine: Substance (médiateur) sécrétée dans le sang par certaines cellules pour stimuler d'autres cellules intervenant dans les réactions immunitaires (défense naturelle ou acquise de l'organisme face à un élément reconnu comme étranger).

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ARNr : acide ribonucléique ribosomique.

APC : Cellule présentatrice d'antigène.

BAL : Liquide broncho-alvéolaire.

BPCO : Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive.

CD4 : Cluster de différenciation 4.

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité.

CVF : Le volume maximum d'air pouvant être inhalé.

DEP : Le Débit Expiratoire de Point.

ECBC : Examen cyto bactériologique des crachats.

EGEA : Étude épidémiologique des facteurs Génétiques et Environnementaux de l'Asthme.

GBE: Gélose Bille Esculine.

GC: Gélose Chapman.

GH : Gélose Hektoen.

GN: Gélose Nutritive.

GSC: Gélose sans cuit.

GSF : Gélose sang frais.

IgE : Immunoglobulines E.

IL2 : Interleukines 2.

IRA : Infections respiratoires aiguës.

IRAB : Les infections respiratoires aiguës basses.

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique.

LBA : Afin de mesurer le nombre de cellules inflammatoires des voies respiratoires.

MGG: May-Grunwald-Giemsa.

MPOC : Maladie pulmonaire obstructive chronique.

OMS : Organisation mondiale de la Santé.

ORL : Oto-rhino-laryngologie.

PCR: Réaction en chaîne par polymérase.

SPECT : Tomographie axiale transverse par émission de simple photon.

TDA : Test Direct à l'Antiglobuline.

TDM : Tomodensitométrie.

TEP : Tomographie par émission de positon.

TH1 : Lymphocytes T auxiliaires(1).

TH2 : Lymphocytes T auxiliaires(2).

VEMS : Volume expiratoire maximal par seconde.

VP : Voges Proskauer.

Table des matières

Table des matières	1
Introduction	1
I Généralité sur l'asthme	2
I.1 Définition de l'asthme	2
I.2 Epidémiologie de l'asthme	2
I.3 Symptômes de l'asthme	2
I.4 Crise d'asthme	2
I.5 L'exacerbation de l'asthme	3
I.6 Les facteurs de risques de l'asthme	3
I.6.1 Facteurs prédisposant de l'asthme	3
I.6.2 Facteurs environnementaux favorisant le développement de l'asthme	4
I.7 Types d'asthme	5
I.7.1 L'asthme extrinsèque	5
I.7.2 L'asthme intrinsèque (non allergique)	5
I.7.3 Types d'asthme selon la sévérité	6
I.8 Physiopathologie de l'asthme	6
I.8.1 Inflammation	6
I.8.2 Remodelage	7
I.8.3 Hyperréactivité bronchique	7
I.8.4 Obstruction bronchique	7
II Diagnostic et traitement de l'asthme	8
II.1 Diagnostic de l'asthme	8
II.1.1 Interrogatoire	8
II.1.2 L'évaluation de la fonction respiratoire	8
II.1.3 Utilisation de l'imagerie pour l'évaluation de l'asthme	8
II.1.4 Le bilan allergologique	8
II.1.5 L'examen Oto-rhino-laryngologie (ORL)	9
II.1.6 Dosage biologique	9
II.2 Traitement de l'asthme	9
II.2.1 Traitement préventif : Eviction antigénique	9
II.2.2 Traitement de crise : Traitement de la broncho constriction	9
II.2.3 Traitement de fond : Traitement de l'inflammation	10

II.2.4	L'éducation des patients	11
II.2.5	Evaluation du contrôle de la maladie asthmatique.....	11
III	Les infections respiratoires	12
III.1	Les infections respiratoires aiguës	12
III.1.1	Généralités	12
III.1.2	Composition de l'appareil respiratoire.....	12
III.1.3	Facteur favorisant les infections respiratoires	13
III.1.4	Type d'infections respiratoires.....	13
IV	Microbiote respiratoire et asthme	16
IV.1	Microbiote	16
IV.2	Définition du microbiote	16
IV.3	Technique d'étude du microbiote.....	16
IV.4	Le microbiote du poumon sain.....	17
IV.4.1	Origine du microbiote pulmonaire.....	17
IV.4.2	Caractérisation du microbiote respiratoire en bonne santé.....	18
IV.4.3	Microbiote des voies aériennes supérieures	18
IV.4.4	Microbiote des voies aériennes inférieures	19
IV.4.5	Diversité et abondance du microbiote respiratoire	20
IV.5	Microbiote des voies respiratoires et asthme.....	21
IV.5.1	Microbiote respiratoire d'un asthmatique et dysbiose	22
IV.5.2	Caractérisation du microbiote respiratoire chez un asthmatique	22
IV.5.3	Dysbiose des microbiotes et maladies inflammatoires.....	23
IV.6	Rôle des microbiotes dans l'asthme.....	25
IV.6.1	Microbiote intestinal	25
IV.6.2	Microbiote respiratoire	26
IV.7	Microbiote respiratoire et stratégies thérapeutiques	27
IV.7.1	Stratégie thérapeutique en modulant le microbiote intestinal	28
IV.7.2	Stratégie thérapeutique en modulant le microbiote respiratoire	28
V	Etude cytotactériologique	29
V.1	Lieu et période d'étude	29
V.2	Patients ciblés.....	29
V.3	Matériel et méthodes.....	30
V.3.1	Matériel	30
V.3.2	Méthodes	31

VI	Analyse statistique	41
VI.1	Hypothèse de l'étude	41
VI.2	Paramètres d'inclusion	41
VI.3	Objectif de l'étude	41
VI.3.1	Objectif principal	41
VI.3.2	Objectifs secondaires	42
VI.4	Critères de jugement	42
VI.4.1	Principal	42
VI.4.2	Secondaires	42
VI.5	Statistiques	42
VI.6	Résultats	43
VI.6.1	Répartition des espèces pathogènes et pathogenèse opportunistes dans la population étudiée	43
VII	Résultats et discussion	48
VII.1	Résultats	48
VII.1.1	Etude macroscopique	48
VII.1.2	Etude cytologique	1
VII.1.3	Etude microbiologique	5
VII.2	Discussion	25
VII.2.1	Différents germes retrouvés dans les deux types de crachats	26
VII.2.2	Résultat des crachats spontanés et induits chez les sujets témoins sains	30
	CONCLUSION	33
	Bibliographie :	34

Introduction

L'asthme est une pathologie multifactorielle résultant d'interaction entre des facteurs génétiques et environnementaux, défini par une inflammation chronique des voies aériennes entraînant des épisodes récidivants d'essoufflement, d'oppression thoracique et de toux, accompagnés le plus souvent de sifflement particulièrement à l'effort. Ces symptômes sont généralement associés à une obstruction bronchique d'intensité variable, réversible spontanément ou sous l'effet de traitement.

D'après les estimations de « The Global Asthma Report 2018 », il y a 339 millions de malades asthmatiques dans le monde. L'asthme n'est pas un problème de santé publique limité aux pays à haut revenu, il sévit dans tous les pays, quel que soit leur niveau de développement.

Il est bien établi que les infections bronchiques sont l'un des facteurs importants responsables des exacerbations de l'asthme pouvant conduire à des hospitalisations et même en être fatales. Les bactéries responsables de ces infections sont des bactéries pathogènes ou pathogènes opportunistes, d'après des études récentes elles seraient capables d'augmenter l'hyperréactivité bronchique et l'inflammation chez le patient asthmatique.

Il a été récemment démontré que le tractus respiratoire inférieur, longtemps considéré comme stérile chez un sujet sain, contient une vaste communauté bactérienne appelée le microbiote respiratoire, ce dernier a été caractérisé chez des sujets sains et des patients asthmatiques (1). Il en découle que le microbiote respiratoire d'un malade asthmatique diffère quantitativement (richesse) et qualitativement (diversité) par rapport au sujet sain. Cette différence ou perturbation est corrélée aux différentes caractéristiques cliniques de la maladie, à la réponse au traitement et joue très probablement un rôle dans les exacerbations de l'asthme.

Suite aux difficultés rencontrées pour réaliser des prélèvements spontanés chez les patients asthmatiques, aux contaminations des expectorations par les germes de la flore buccale et l'interprétation délicate des résultats de l'étude cytotactériologique des crachats, cet examen est rarement demandé par les médecins dans leur pratique quotidienne. D'autres prélèvements tels que liquide broncho alvéolaire, des biopsies bronchiques, sont des examens invasifs mal tolérés par les patients. L'analyse de l'expectoration induite a été proposée puis adoptée comme méthode directe et peu invasive, largement tolérée par les malades, pour l'étude cyto bactériologique des crachats.

L'objectif de notre étude est d'identifier et de comparer les microorganismes pathogènes, pathogènes opportunistes et commensaux présents dans les crachats spontanés et les crachats induits des malades asthmatiques avec ou sans signes cliniques d'infection respiratoire.

Pour réaliser ce travail, nous avons effectué des prélèvements chez deux catégories de patients, ceux hospitalisés au niveau du service de pneumologie, de l'hôpital Belloua et ceux, sans signes cliniques apparents d'infection, de l'association des malades et parents de malades asthmatiques de la wilaya de Tizi-Ouzou. Les prélèvements sont réalisés dans un cabinet spécialisé de kinésithérapie respiratoire et sont, ensuite, analysés au niveau du laboratoire de bactériologie du centre Hospitalo- Universitaire Mohamed Nedir de Tizi-Ouzou.

I Généralité sur l'asthme

I.1 Définition de l'asthme

L'asthme est une maladie chronique hétérogène non contagieuse définie comme une pathologie inflammatoire des voies aériennes qui se manifeste par une gêne à l'expiration lors de la respiration. Elle est liée à plusieurs facteurs génétiques et environnementaux. C'est l'une des maladies les plus courantes affectant tous les groupes d'âge. (2) Elle se caractérise par des crises récurrentes qui entraînent plusieurs problèmes tels que la fatigue, l'insomnie, la réduction des activités physiques et affecte la qualité de vie du patient(3) (4)

I.2 Epidémiologie de l'asthme

D'après les estimations de « The Global Asthma Report 2018 », il y a 339 millions de malades asthmatiques dans le monde.

C'est la maladie chronique la plus courante chez les enfants. Plus de 80% des décès dus à l'asthme sont enregistrés dans les pays à revenu faible ou intermédiaire (5)

Les causes de l'asthme ne sont pas encore complètement élucidées, cependant les facteurs de risques sont liés à l'association d'une prédisposition génétique et de l'exposition à l'inhalation de substances et de particules dans l'environnement, susceptibles de provoquer des réactions allergiques ou d'irriter les voies respiratoires, comme par exemple (6) :

- Les acariens qu'on retrouve dans la literie, les tapis.
- Pollens et moisissures.
- La fumée du tabac.
- Les produits chimiques irritants.
- La pollution de l'air.

I.3 Symptômes de l'asthme

Les signes cliniques de la maladie de l'asthme peuvent être intermittents ou persistants. Ils peuvent apparaître après un exercice physique ou en présence d'un autre facteur déclencheur. Cette maladie se caractérise par les signes suivants :

- La dyspnée.
- Respiration sifflante.
- Essoufflement.
- Blocage expiratoire.
- Trouble de voix.
- Toux ou oppression thoracique.

Les manifestations de l'asthme peuvent survenir à n'importe quel moment de la journée, avec une intensité qui peut être très variable, allant d'une simple gêne à une véritable sensation d'étouffement (7).

I.4 Crise d'asthme

Une crise d'asthme est définie par un accès paroxystique de durée brève, cette crise est un épisode de dyspnée aigue qui se traduit par une dyspnée oppression thoracique toux qui cède spontanément ou sous l'effet du traitement (8).

La classification des crises d'asthme dépend essentiellement des différents signes cliniques

Tableau 1. Classification des crises d'asthme (7)

Crise d'asthme	Clinique
Crise légère	• Dyspnée mais le malade peut marcher et s'allonger • Le malade parle facilement mais peut être agité • Râles sibilants modérés en fin d'expiration
Crise modérée	• Le malade est dyspnéique en parlant, il est assis ne peut pas s'allonger et parle par phase entre coupées • Les râles sibilants sont intenses diffus aux deux champs pulmonaires
Crise sévère	• Le malade est dyspnéique, assis penché en avant parle en monosyllabes souvent agité • Cyanose peut être retrouvée
Arrêt respiratoire imminent	• Le malade est assis, penché en avant, somnolent, confus • La dyspnée est franche • Absence de râles sibilants, silence respiratoire

I.5 L'exacerbation de l'asthme

Elle est définie par la persistance des symptômes respiratoires au-delà de 24 h, quel que soit le mode du début, progressif ou brutal (8).

I.6 Les facteurs de risques de l'asthme

L'asthme est une affection complexe et hétérogène. Son origine multifactorielle reflète l'interaction de plusieurs régions génétiques et de facteurs d'environnement, déclenchants ou aggravants.

I.6.1 Facteurs prédisposant de l'asthme

I.6.1.1 Atopie

C'est la capacité d'un patient à synthétiser une quantité anormale d'anticorps de type IgE en réponse à un allergène, elle a souvent eu un caractère familial. Elle s'accompagne souvent d'une éosinophilie sanguine. L'atopie peut être responsable d'autres syndromes tels que l'œdème de Quincke, rhinite allergique, eczéma, urticaire (9).

I.6.1.2 Facteurs génétiques

L'asthme est une maladie complexe et hétérogène impliquant de nombreux gènes et facteurs environnementaux. De nombreuses études génétiques ont associé un petit nombre de gènes à l'asthme, l'atopie et l'hyperréactivité des bronches, dont la plupart sont impliqués dans

les réponses immunitaires. Six gènes de susceptibilité à l'asthme et / ou à l'atopie ont été identifiés (10) avec des variants de plus de 60 gènes suggérant que l'asthme est hétérogène du point de vue génétique. Cependant, leurs fonctions précises ne sont pas claires. Une meilleure connaissance de la susceptibilité à l'asthme permettra d'améliorer le diagnostic, la prévention et le traitement de cette maladie qui est de plus en plus fréquente (3).

I.6.2 Facteurs environnementaux favorisant le développement de l'asthme

I.6.2.1 Les allergènes

Les allergènes respiratoires sont des particules microscopiques présentes dans l'air ambiant et qui, même inhalées en quantité minime, peuvent déclencher des symptômes d'asthme. Chez les enfants asthmatiques la prévalence de la sensibilisation allergique est importante (40–77 %), Le risque de développer un asthme est plus élevé en cas de sensibilisation précoce à des allergènes multiples (6).

I.6.2.2 Les acariens

Les acariens (araignées microscopiques) sont essentiellement présents dans la poussière de maison, les tapis, les matelas dans les lieux de stockage alimentaire. Ils ne vivent que six semaines environ mais se reproduisent très rapidement, surtout si le milieu ambiant s'y prête (chaleur et humidité) (11).

I.6.2.3 Le pollen

Le pollen est véhiculé par le vent et peut venir au contact des muqueuses respiratoires. Il contient des substances allergisantes et peut provoquer une rhinite saisonnière allergique, une conjonctivite ou de l'asthme. Les symptômes ne se manifestent qu'en période de pollinisation. Les pollens sont présents en ville comme à la campagne ; leurs effets sont accentués par la pollution et par un temps sec (6).

I.6.2.4 Les moisissures

Les moisissures sont des champignons microscopiques qui ont parfois un fort pouvoir allergisant. À l'intérieur des maisons, les moisissures les plus fréquentes sont *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus* et *Cladosporium*. Elles se développent dans des environnements humides (12).

I.6.2.5 Les animaux domestiques

L'allergie aux animaux domestiques est très fréquente elle est à l'origine de crises d'asthme ou d'aggravation de la maladie, cependant le contact direct avec l'animal n'est pas toujours nécessaire pour déclencher les crises d'asthme, les particules responsables de l'allergie (allergènes) sont présentes au niveau de la salive de l'animal, de ses urines, des débris de peau morte (squames) et des poils qui se déposent partout dans la maison (13).

I.6.2.6 Pollution de l'air

De nombreuses études épidémiologiques ont examiné les effets aigus de la pollution de l'air sur l'asthme en étudiant l'association entre les variations journalières de la qualité de l'air et la fréquence d'évènements caractéristiques d'une exacerbation d'asthme, ainsi que les changements de marqueurs fonctionnels respiratoires. Il est désormais admis que des niveaux

élevés de pollution de l'air sont un facteur de risque d'exacerbation de l'asthme, chez l'enfant comme chez l'adulte (6).

I.6.2.7 Activités sportives

L'activité physique étant un facteur déclenchant des crises d'asthme, il est difficile de conclure sur l'association entre l'activité physique et l'asthme, mais certaines disciplines sportives peuvent être conseillées pour les asthmatiques, car elles permettent le développement de la capacité pulmonaire et de renforcer les muscles respiratoires, comme le diaphragme. Cependant, l'inhalation d'air froid et sec, lors de l'exercice ou à la récupération, peut être à l'origine de crises d'asthme (14).

I.6.2.8 Le tabac

Chez les asthmatiques fumeurs, les médicaments utilisés pour leur traitement ne sont pas efficaces d'où l'aggravation de l'inflammation bronchique (15).

I.6.2.9 L'alimentation

L'allergie alimentaire favorise le développement de l'asthme dans l'enfance, et les aliments les plus incriminés sont : le lait de vache, les œufs, le poisson, l'arachide et le soja (16).

I.6.2.10 L'obésité

L'obésité est souvent un obstacle pour contrôler l'asthme. Elle peut être la cause d'une mauvaise réponse aux corticoïdes inhalés (17)(18).

I.7 Types d'asthme

L'asthme est caractérisé par une hyperréactivité de l'arbre bronchique à divers stimuli, entraînant une inflammation des voies aériennes avec un bronchospasme. L'asthme est classé en deux types :

I.7.1 L'asthme extrinsèque

C'est un asthme allergique qui est déclenché par des allergènes. Il se manifeste généralement tôt dans l'enfance, il s'agit même de la forme d'asthme la plus fréquente chez le jeune.

I.7.2 L'asthme intrinsèque (non allergique)

Définie par la négativité des tests cutanés et d'IgE spécifiques sériques pour des aéro-allergènes. C'est un asthme qui n'est pas d'origine allergique, c'est-à-dire qu'on ne retrouve aucune allergie. Il touche beaucoup plus les adultes de 40 ans ou plus, et d'avantage des femmes (19)

I.7.3 Types d'asthme selon la sévérité

Les recommandations pour la classification de l'asthme selon sa sévérité sont basées sur les symptômes de l'asthme et les valeurs de la fonction pulmonaire, le tableau suivant résume les différents types de l'asthme et les signes cliniques ainsi que leur fonction pulmonaire.

Tableau 2. Règles de détermination du « stade clinique » (Seule la fréquence la plus élevée est prise en compte pour classer l'individu) (20).

Crises d'asthme ou de gêne respiratoire	Manifestations d'asthme nocturne	Stade Clinique associé
En permanence	Presque toutes les nuits	Asthme persistant sévère
1 ou 2 fois par jour	2 à 4 fois par semaine	Asthme persistant modéré
De 1 à 6 fois par semaine	2 à 4 fois par mois	Asthme persistant léger
Moins de 3 fois par mois	Moins de 2 fois par mois	Asthme intermittent

En effet, ces critères nous renseignent surtout sur la qualité du contrôle de la symptomatologie de la maladie mais ne reflètent pas en réalité la gravité de l'inflammation. Comme l'asthme est reconnu comme étant une maladie inflammatoire des voies respiratoires, la classification de cette maladie par gravité devrait également se baser sur une évaluation de l'inflammation, cela en utilisant :

- Les expectorations induites qui permettent de déterminer les cellules inflammatoires des voies respiratoires et des modifications du nombre des éosinophiles.
- Les bronchoscopies utilisées pour le LBA afin de mesurer le nombre de cellules inflammatoires des voies respiratoires et des biopsies des voies respiratoires pour évaluer directement le remodelage de l'inflammation bronchique (21).

I.8 Physiopathologie de l'asthme

L'asthme est une maladie complexe qui se manifeste par une inflammation chronique des voies aériennes, une hyperréactivité bronchique, une obstruction et un remodelage des voies respiratoires (22).

I.8.1 Inflammation

L'inflammation chronique des voies aériennes ainsi que l'hyperréactivité bronchique sont responsables des manifestations de l'asthme, et cela est le résultat de l'interaction entre les facteurs génétiques et environnementaux (23).

Inflammation des voies aériennes observées dans l'asthme reflète un déséquilibre dans l'interaction, entre les cellules inflammatoires, l'épithélium bronchique et la réponse immunitaire de l'hôte (24). Deux types d'inflammation bronchique sont retrouvés chez un asthmatique.

I.8.1.1 Inflammation non allergique

L'inflammation non allergique est caractérisée par la présence des cellules inflammatoires de type éosinophiles et neutrophiles et un nombre élevé de cellules CD₄ de type TH₁. Ces dernières régulent la réponse immunitaire non allergique par la sécrétion des interleukines 2 (IL2), l'interféron gamma et la lymphotoxine alpha (23).

I.8.1.2 Inflammation allergique

L'inflammation des voies aériennes observée dans l'asthme reflète un déséquilibre dans les interactions, via des cibles et des effecteurs multiples, entre les cellules inflammatoires, l'épithélium bronchique et la réponse immunitaire de l'hôte.

L'exposition des récepteurs TLR, CTR, PAR, présents sur les cellules épithéliales bronchiques conduit ces dernières à produire des cytokines pro inflammatoires, notamment TSLP, IL-25, IL-33 capable d'activer les cellules dendritiques, cette activation induit la prolifération et l'activation des cellules Th2 favorisant le développement des réactions allergiques et de l'hyper réactivité bronchique ainsi que le remodelage tissulaire (24).

I.8.2 Remodelage

L'asthme est caractérisé par une inflammation chronique des voies aériennes et des modifications structurales de la paroi bronchique, que l'on désigne sous l'appellation remodelage bronchique. Ce remodelage inclut des altérations de l'épithélium avec une hyperplasie des cellules à mucus et une fragilité des cellules épithéliales.

Ces phénomènes sont peut-être les conséquences d'un processus de réparation mal maîtrisé, en particulier dans l'asthme sévère, en association avec la persistance d'une inflammation chronique(25).

I.8.3 Hyperréactivité bronchique

L'hyperréactivité bronchique (HRB) se définit comme une tendance excessive qu'ont certaines bronches à se contracter (broncho constriction) en réponse à des stimuli qui n'entraînent pas de réaction chez un sujet normal. Elle indique une limitation temporaire du débit d'air lors d'une exposition à un stimulus broncho-constricteur, sa mesure au moyen de tests de provocation peut constituer un outil précieux pour confirmer ou infirmer l'asthme, ainsi que pour évaluer l'efficacité du traitement(26).

L'hyperréactivité bronchique est associée à d'autres maladies, elle est présente chez

- 40% des rhinites allergiques
- 46% des BPCO
- 58% des sujets souffrants de mucoviscidose
- 48% des sujets atteints de dilatation des bronches
- 15% des cas de sarcoïdose.

I.8.4 Obstruction bronchique

L'obstruction des voies aériennes est le résultat d'une contraction du muscle lisse respiratoire qui entoure l'ensemble des voies aériennes (27).

II Diagnostic et traitement de l'asthme

II.1 Diagnostic de l'asthme

Deux situations peuvent se présenter :

- Le patient est symptomatique lors de l'examen ; c'est habituellement le contexte de l'urgence.
- Le patient est asymptomatique lors de l'examen ; c'est habituellement le contexte de la consultation.

Le diagnostic est suspecté à partir des données anamnestiques : caractère variable et réversible des manifestations cliniques et affirmé par les données fonctionnelles respiratoires (28) .

II.1.1 Interrogatoire

L'interrogatoire permet la recherche des antécédents familiaux et personnels d'asthme ou d'autres maladies allergiques, détermine l'âge de survenue, la fréquence, les facteurs déclenchant et aggravants la symptomatologie (29).

II.1.2 L'évaluation de la fonction respiratoire

II.1.2.1 Le Débit Expiratoire de Pointe

Le Débit Expiratoire de Point (DEP) c'est le débit maximal instantané mesuré lors d'une expiration forcée, il est réalisé par un débitmètre et il permet aussi de mesurer le degré d'obstruction des bronches pour évaluer la sévérité de l'asthme.

La mesure du (DEP) par des appareils portables et une des bases de la surveillance de l'asthme et de la prise en charge des crises aiguës (30)(31).

II.1.2.2 La spirométrie

Elle permet de mettre en évidence un syndrome obstructif et de caractériser sa sévérité et sa réversibilité. Il s'agit d'un examen facile à réaliser et il a pour le but de contrôler la fonction respiratoire par la mesure des volumes gazeux pulmonaires, tel que CVF (le volume maximum d'air pouvant être inhalé, ainsi que le VEMS (volume expiratoire maximal par seconde) (28).

Test de provocation à la méthacholine : Test sensible, demandé lorsque la clinique est douteuse et des DEP non concluant (32).

II.1.3 Utilisation de l'imagerie pour l'évaluation de l'asthme

Les techniques d'imagerie les plus utilisées dans l'exploration et l'évaluation des complications de l'asthme sont la Tomodensitométrie (TDM), l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) à l'Hélium, la Tomographie axiale transverse par émission de simple photon (SPECT) et la Tomographie par émission de positon (TEP) (33).

II.1.4 Le bilan allergologique

Le bilan allergologique consiste en :

- Les tests cutanés allergologiques à discuter en fonction des IgE totales et de l'anamnèse, ils ne sont pas de pratique courante chez l'enfant surtout avant 3 ans.
- Dosage des IgE totales.

Actuellement, les tests cutanés les plus utilisés sont le prick-test (introduction dans le derme de l'allergène testé à l'aide d'une petite aiguille très fine). Le prick-test est l'une des méthodes fiables pour diagnostiquer les maladies allergiques par les IgE tel que l'asthme (34).

II.1.5 L'examen Oto-rhino-laryngologie (ORL)

L'association de l'asthme avec les pathologies ORL surtout chronique (rhino-sinusite) aggrave la maladie, il est important d'identifier les types des pathologies ORL chez l'asthmatique et déterminer leurs fréquences (35).

II.1.6 Dosage biologique

- Dosage des IgE : Le dosage des IgE sériques totales est toujours réalisé avant la mise en place d'un traitement anti-IgE, après une suspicion d'une allergie (36).
- FNS : recherche d'une hyperéosinophilie (37).

II.2 Traitement de l'asthme

La prise en charge repose sur l'éducation du patient, le suivi médical régulier et d'autant plus rapproché que la pathologie est sévère, la recherche et l'éradication des facteurs favorisants et aggravants associés, l'information sur les thérapeutiques antiasthmatiques (nature, intérêt, effets secondaires, etc.) et sur la conduite à tenir en cas d'exacerbation (29)

Le traitement de l'asthme est fonction de sa gravité et vise à supprimer les symptômes et restaurer une fonction pulmonaire quasi-normale. Plusieurs traitements existent : le traitement de la crise, le traitement préventif ; de fond, antiallergique. En cas de crise grave, une hospitalisation peut être nécessaire.

Les deux objectifs du traitement sont de contrôler les symptômes et de réduire les risques d'exacerbations, de lésions irréversibles des voies aériennes et d'effets secondaires, des traitements

II.2.1 Traitement préventif : Eviction antigénique

Pour l'asthme d'origine allergique, le tabac actif ou passif est contre indiqué, il est primordial de limiter l'exposition des malades asthmatique aux différents allergènes comme les acariens, le pollen, les animaux domestiques, les cafards, les moisissures et la poussière (38)

II.2.2 Traitement de crise : Traitement de la broncho constriction

Le traitement de référence de la crise d'asthme est la prise de bronchodilatateurs à action rapide ou agonistes-bêta 2 stimulants de courtes durées administrés en inhalation, permettent immédiatement un relâchement de la musculature bronchique aboutissant à une broncho dilatation et un soulagement (39).

Les bronchodilatateurs sont utilisés pour soulager les symptômes de crise, et sont aussi indiqués en cas d'asthme à l'effort avant un exercice physique. En cas de crise grave, les corticoïdes par voie orale ou parentérale sont associés aux bronchodilatateurs.

II.2.3 Traitement de fond : Traitement de l'inflammation

Le traitement pour la réduction de l'inflammation est primordial pour éviter la survenue de crises, cependant il est très souvent négligé par les patients. Les médicaments de traitements de fond ne soulagent pas immédiatement les symptômes, ils agissent lentement et sont efficaces à long terme et réduisent l'inflammation et la fréquence des crises.

II.2.3.1 Corticostéroïdes

Les corticostéroïdes sont des anti-inflammatoires les plus puissants et les plus efficaces parmi tous les traitements de l'asthme, ils diminuent l'inflammation des voies respiratoires. Leur but est de réduire l'inflammation locale et l'hyperréactivité des bronches. Ces produits ne permettent pas de traiter la crise (40)

Généralement, ils sont pris à petites doses en inhalation (spray), de façon quotidienne (Alvesco® et Pulmicort®). Le médecin prescrit la dose efficace la plus faible possible afin d'éviter les effets secondaires (41).

II.2.3.2 Les Bronchodilatateurs à longue durée d'action

Ceux-ci sont prescrits en association lorsque les corticostéroïdes inhalés seuls ne suffisent pas à contrôler les symptômes de l'asthme. Les agonistes-bêta2 à longue durée d'action entraînent une broncho dilatation pendant 12 h. Leur efficacité peut être rapide en 3 à 5 minutes comme le formoterol® (ex Foradil®, Asmelor®) ou plus lente au bout de 15 minutes comme le salmétérol (Serevent®). Ils sont utilisés en association avec un corticostéroïde. Il existe des inhalateurs combinant les deux types de médicaments comme le Seretide® (fluticasone/salmeterol).

Les combinaisons avec du formoterol (Symbicort®, Innovair® et Flutiform®) peuvent être aussi utilisées comme médicament de secours, même si elles agissent également sur l'inflammation à long terme(41).

II.2.3.3 Les Antileucotriènes

Un autre type d'anti-inflammatoires, les Antileucotriènes, sont également disponibles. Les leucotriènes sont substances broncho constrictrices qui favorise l'inflammation et la sécrétion de mucus par les bronches. Les Antileucotriènes, pris oralement, diminuent la réaction inflammatoire bronchique et l'hyper réactivité bronchique. En France, un seul Antileucotriène est disponible : le Montelukast (Singulair®) (42).

II.2.3.4 La Théophylline

C'est le plus ancien des bronchodilatateurs (ex : Theostat®). Il n'est plus utilisé de nos jours, car le dosage efficace sans effet secondaire est difficile à trouver (43).

II.2.3.5 L'Anti-immunoglobuline E

Cette classe de médicaments est destinée à traiter l'asthme allergique sévère chez les personnes dont l'asthme est difficile à contrôler avec les autres traitements. L'omalizumab (Xolair®) est le seul médicament de cette classe disponible en 2015. Il est administré en injections sous-cutanées 1 ou 2 fois par mois (44).

II.2.4 L'éducation des patients

L'éducation des patients pour mieux connaître l'asthme, ses facteurs favorisants et aggravants et pour une meilleure observance du traitement est indispensable. Cette éducation passe par des consultations répétées (45).

II.2.5 Evaluation du contrôle de la maladie asthmatique

Le but est de contrôler si possible tous les symptômes. La complication la plus redoutée d'un asthme mal traité est l'asthme résistant au traitement qui peut être fatal (46).

Tous les 3-6 mois, une évaluation clinique du contrôle de l'asthme est indispensable, permettant d'ajuster le traitement de fond. Le contrôle est jugé sur l'absence de symptômes ou de retentissement sur la qualité de vie et sur la fréquence des rechutes (45).

III Les infections respiratoires

III.1 Les infections respiratoires aiguës

III.1.1 Généralités

Les infections respiratoires sont l'un des facteurs qui joue un rôle important dans l'exacerbation de l'asthme, elles sont définies comme étant des infections touchant une des structures qui compose l'appareil respiratoire, à savoir le nez, les oreilles, la gorge, le larynx, la trachée, les bronches ou les poumons, elles sont transmises par contact direct avec les sécrétions respiratoires d'un individu contaminé via des gouttelettes émises lors d'une toux ou d'un éternuement (47).

III.1.2 Composition de l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est composé des :

- Voies respiratoires, qui permettent les échanges d'air entre l'atmosphère et les poumons. Elles comprennent :
- La cavité nasale (qui filtre, réchauffe et humidifie l'air) et la bouche.
- Le pharynx, qui appartient également à l'appareil digestif.
- Le larynx, qui permet en plus la phonation grâce à la présence de cordes vocales.
- La trachée, qui purifie, réchauffe et humidifie l'air, et sécrète un mucus protecteur.

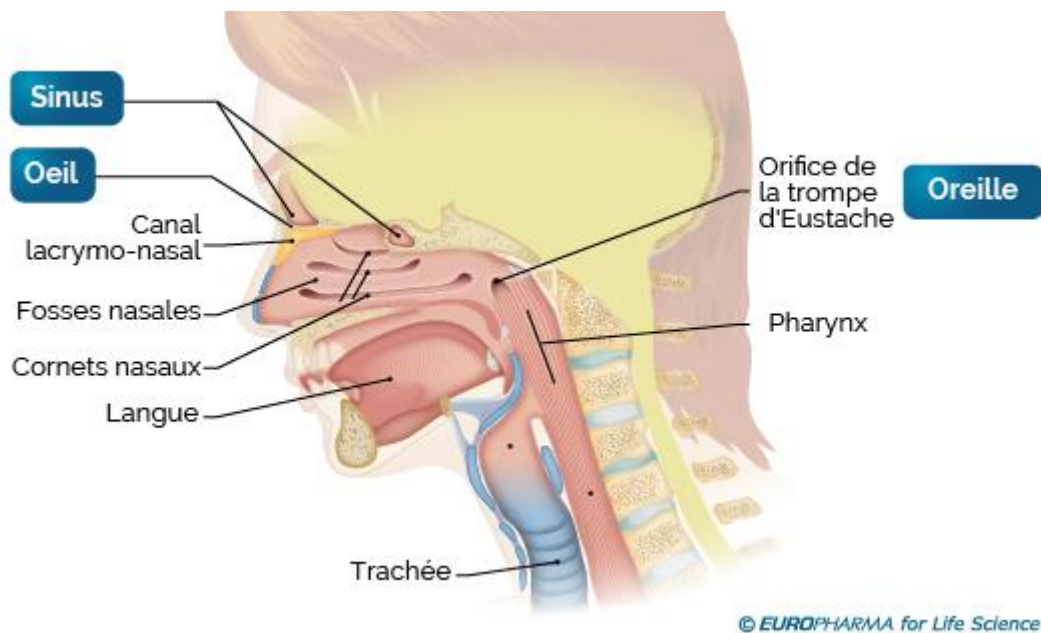


Figure 1 : représentation des voies respiratoires (47)

- Voies intra pulmonaires : qui amènent l'air des voies respiratoires jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Ce sont : les bronches et les bronchioles.

- Poumons : deux organes spongieux et élastiques, qui renferment des alvéoles pulmonaires.
- Plèvre : un double feuillet séreux qui sécrète et contient le liquide pleural, et qui relie les poumons à la cage thoracique tout en les maintenant ouverts (48).

III.1.3 Facteur favorisant les infections respiratoires

De nombreux facteurs peuvent être à l'origine des infections respiratoires aiguës (IRA), comme la mal nutrition, les carences en vitamine A, l'âge avancé, la présence d'une leucopénie, une bactériémie, le tabagisme et la consommation d'alcool. Les mauvaises conditions de vie sont souvent associées de façon significative à la prévalence des IRA (49)

Les facteurs climatiques (température, vent, humidité) et leurs modifications jouent un rôle important dans le déclenchement des infections respiratoires, l'exposition au froid provoque une vasoconstriction des muqueuses nasales et des voies aériennes supérieures, qui diminue les défenses locales et permet aux infections virales latentes de devenir patentes (50).

Les infections respiratoires virales sont des facteurs qui jouent un rôle très importants dans le déclenchement des crises d'asthme (51).

III.1.4 Type d'infections respiratoires

Il existe deux types d'infections respiratoires aiguës ; infections respiratoires basses et infections respiratoires hautes.

III.1.4.1 Infections respiratoires aiguës basses

Les infections respiratoires aiguës basses, représentent l'une des principales causes de mortalité dans le monde incluant principalement : bronchites aiguës, et pneumopathies aiguës, elles peuvent être dues à divers microorganismes tels que les bactéries, virus, champignons, voir même d'origine poly microbienne, mais près de 50 % des IRAB restent sans étiologie microbiologique retrouvée (39).

➤ *Bronchites aiguës*

La bronchite se caractérise par une inflammation des bronches qui rend la respiration plus difficile, car les parois des bronches sont enflées et produisent une quantité importante de mucus, elle s'accompagne d'une toux profonde, des expectorations visqueuses, une douleur à la poitrine et un souffle court (53)

➤ *Pneumopathies aiguës*

Les pneumopathies aiguës présentent les symptômes cliniques suivants (54) :

- Toux sèche ou grasse selon le microorganisme responsable de l'infection.
- Douleurs thoraciques.
- Respiration sifflante.
- Essoufflements.
- Augmentation du rythme cardiaque.
- Nausées.

➤ Vomissements.

Elles représentent un problème majeur de santé publique.

Dans les pneumopathies aiguës bactériennes, *Streptococcus pneumoniae* est l'espèce bactérienne la plus fréquemment impliquée, sa prévalence est largement supérieure à celle des autres bactéries responsables de cette infection, comme *Haemophilus influenzae*, *Legionella* et *Mycoplasma pneumoniae* (22).

Les pneumopathies d'origine virale représentent moins de 25 % des cas des pneumopathies, souvent recensées en période hivernale, au moment du pic grippal, ces infections peuvent conduire à des surinfections(55).

Chez les asthmatiques la pneumonie peut être le résultat d'un effet secondaire des corticostéroïdes inhalés.

III.1.4.2 Les infections respiratoires aiguës hautes

Les infections des voies respiratoires hautes sont des affections aiguës dues à une infection virale ou bactérienne touchant les voies respiratoires supérieures(56).

➤ *Laryngite aiguë*

La laryngite est une inflammation aiguë de la muqueuse du larynx, la dysphonie est le symptôme principal de cette infection, elle peut être d'origine virale ou bactérienne. Les bactéries les plus souvent incriminées dans l'étiologie de cette infection les *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Haemophilus influenza*, *S. pneumocoques*, *Branhamella catarrhalis* (57).

➤ *Otite moyenne aiguë*

Les otites moyennes aiguës sont des infections très fréquentes chez l'enfant de moins de 5 ans. Elles sont définies comme une inflammation de l'oreille moyenne. A la suite d'une infection virale, certaines espèces de la flore commensale du nasopharynx sont capables de coloniser l'oreille moyenne. Les espèces les plus fréquemment rencontrées sont *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Moraxella catarrhalis*. La plupart du temps bénignes, les otites moyennes aiguës peuvent rarement entraîner des complications graves ou des séquelles (surdité) (58).

➤ *Amygdalite aiguë*

L'amygdalite est une inflammation aiguë des amygdales, elle est fréquente chez le jeune adulte en bonne santé. De nombreux microorganismes peuvent causer cette inflammation, les bactéries les plus incriminées sont les Streptocoque pyogènes et autres souches de streptocoques, *Corynebacterium diphtheria*, *Mycoplasma* et *Chlamydia*. Les virus les plus incriminés sont le virus de la grippe, le *parainfluenza virus*, le *Rhinovirus*, l'*adénovirus*.

L'amygdalite aiguë de cause bactérienne est le plus souvent caus e par le streptocoque  -hémolytique du groupe A. Cette bactérie peut entraîner deux complications graves : le rhumatisme articulaire aigu et la glomérulonéphrite post-streptococcique (59).

➤ *Rhinopharyngite aigue*

La rhinopharyngite désigne une inflammation modérée des voies aériennes supérieures d'origine infectieuse. Les signes habituels en sont l'obstruction nasale, la rhinorrhée, l'éternuement, la douleur pharyngée et la toux. Les rhinopharyngites aiguës non compliquées sont d'origine virale (*rhinovirus*, virus de la grippe et les *adénovirus*). Leur évolution spontanée est habituellement rapide et non compliquée. Elles ne nécessitent donc ni prélèvement bactériologique ni antibiothérapie systématique. En première intention, elles relèvent exclusivement d'un traitement antalgique et antipyrétique associé à des lavages des fosses nasales au sérum salé iso- ou hypertonique. Les complications des rhinopharyngites sont des sur-infectieuses bactériennes par streptocoque : Streptocoque bêta hémolytiques du groupe A, *Haemophilus influenza*, essentiellement représentées par les otites et les sinusites (60).

➤ *Rhino-sinusite aigue*

La rhino-sinusite aiguë est une infection des muqueuses du nez et des sinus. Dans la très grande majorité des cas, la rhino-sinusite aiguë est d'origine virale, le plus souvent due à un *rhinovirus*, virus *influenza* ou *parainfluenza*, lorsqu'elle est d'origine bactérienne, elle est causée le plus souvent par *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza* et *Moraxella catarrhalis*. Le diagnostic de la rhino-sinusite aiguë est un diagnostic clinique se basant sur la symptomatologie dont les plus caractéristiques sont: rhinorrhée purulente, congestion ou obstruction nasale, douleur faciale, souvent aggravée par l'inclinaison de la tête en avant (61).

IV Microbiote respiratoire et asthme

IV.1 Microbiote

Jusqu'à il ya une dizaine d'années le poumon sain était considéré exempt de germes, la première publication en faveur de la stérilité des poumons a été publiée en 1888 par Hildedrandt (62) avec les techniques de culture de l'époque, il a identifié une croissance bactérienne minimale à partir de la sonde nasale excisée et de la muqueuse trachéale de lapins, suite à ces observations, l'auteur a déduit la stérilité du poumon humain en bonne santé. Malgré que ces déductions aient été contestées par de nombreux arguments, il s'est passé un siècle à croire et à dire que non seulement les poumons sains sont stériles mais surtout sous constante exposition aux microorganismes de l'air inhalé et ceux des voies respiratoires supérieures (63).

IV.2 Définition du microbiote

Le microbiote est une population de microorganismes (bactéries, champignons, levures, virus) qui vivent sur les muqueuses des cavités corporelles (64).

Le terme «microbiome» a été proposé pour la première fois en 2001 par Joshua Lederberg, qui l'utilisait pour faire référence à "la communauté écologique des micro-organismes commensaux, symbiotiques et pathogènes qui partagent notre espace corporel" (62).

Le microbiome est défini comme le génome collectif des microbes (composé de bactéries, de bactériophages, de champignons, de protozoaires et de virus). Nous avons environ 10 fois plus de cellules microbiennes que de cellules humaines (64) mais le nombre total de gènes (ou microbiome) est 100 fois plus important que celui de notre propre génome.

IV.3 Technique d'étude du microbiote

Historiquement, les poumons humains étaient considérés comme un organe stérile et aseptique, selon des études essentiellement basées sur les méthodes microbiologiques conventionnelles (examen direct et cultures microbiologiques de prélèvements respiratoires). Ce n'est que récemment, grâce au développement des techniques moléculaires de séquençage à haut-débit, qu'il a été démontré la présence d'une flore polymicrobienne appelée microbiote, probablement transitoire dans l'appareil respiratoire de l'homme (65).

L'étude du microbiote bactérien repose sur les techniques d'identification microbiologiques indépendante de la culture, cette technique exploite les variations de l'ADN codant pour l'ARN ribosomal 16S, un locus présent chez toutes les bactéries, ce gène a l'avantage de posséder 9 régions hypervariables permettant une identification du genre et d'espèce entourées de séquences hautement conservées permettant l'amplification par les primers bactériens universels (66).

Les amplicons de gènes d'ARNr générés à partir de l'échantillon biologique contenant des bactéries, donne un grand nombre de courtes séquences avec le séquençage à haut débit, à l'aide de plateforme telle que 454 pyrosequencing et IlluminaMiSeq, qui peuvent être ensuite alignés et triés en fonction de leur niveau d'homologie, et classés selon des critères taxonomiques dans des bases de données disponibles publiquement (66) (63), ces plates-formes permettent aussi l'identification et la quantification simultanée de communautés microbiennes entières dans plusieurs échantillons de tissus (66).

La figure suivante représente les différentes étapes de l'analyse du microbiote des prélèvements respiratoires.

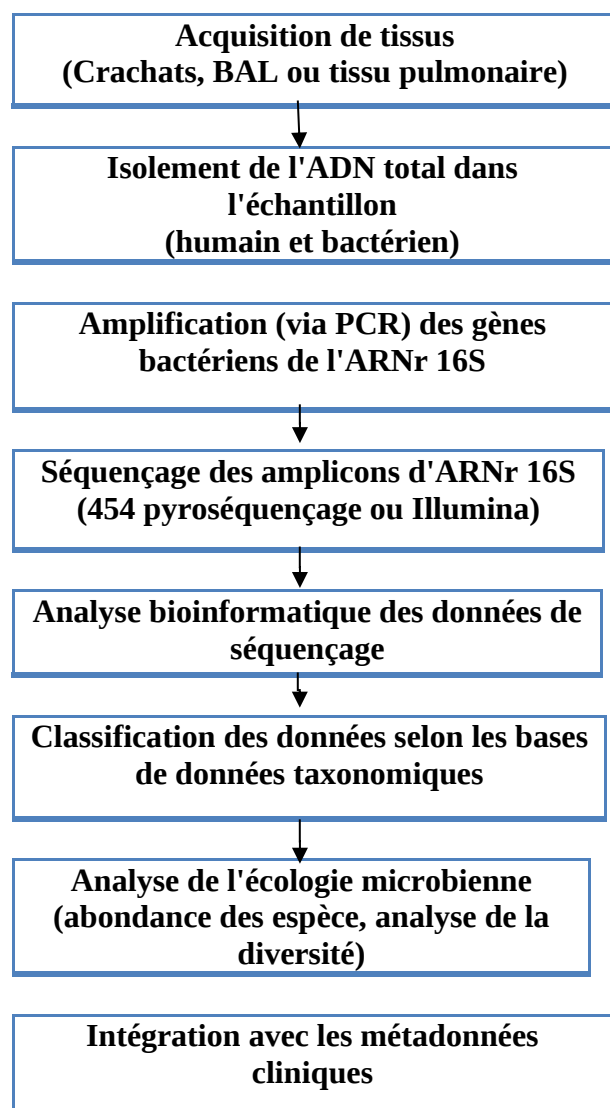


Figure 2 : Analyse du microbiote dans des échantillons respiratoires(adapté de (66)).

IV.4 Le microbiote du poumon sain

IV.4.1 Origine du microbiote pulmonaire

Chaque individu naît axénique mais l'acquisition du microbiote, se fait dès la naissance. Immédiatement après l'accouchement, les surfaces des muqueuses sont rapidement colonisées par des microorganismes provenant de la mère (microbiote vaginal et intestinal en cas d'accouchement par voie basse, de microbiote cutané dans les cas de césarienne) (66). Le microbiote du nouveau-né est initialement identique, quel que soit la cavité naturelle considérée, puis se spécialise par la suite (66).

L'origine du microbiote des voies respiratoires n'a pas encore été étudiée chez les nourrissons en bonne santé, mais une étude longitudinale récente portant sur sept nourrissons

atteints de mucoviscidose montre une similitude entre les communautés microbiennes de l'intestin et celles des voies respiratoires, la présence dans l'intestin de certains genres bactériens précéderait celle au niveau du poumon et ceci peut constituer la preuve de l'origine, en partie digestive, du microbiote respiratoire (64).

IV.4.2 Caractérisation du microbiote respiratoire en bonne santé

Bien que l'étude du microbiote pulmonaire humain normal est encore à ses débuts, l'essentiel des publications démontrent qu'il existe une diversité phylogénique dans la communauté microbiennes pulmonaire (67).

IV.4.3 Microbiote des voies aériennes supérieures

Chez les patients sains, la niche nasopharyngée est colonisée par un microbiote distinct de celui de l'oropharynx. Les phylas prédominants dans le nez sont les *Firmicutes* et les *Actinobacteria*, incluant les familles *Staphylococcaceae*, *Propionibacteriaceae* et *Corynebacteriaceae* (tableau I) (1). Au sein de l'oropharynx, les phylums prédominants sont les *Firmicutes*, *Proteobacteria* et *Bacteroidetes*.

Le microbiote des voies respiratoires supérieures contient de nombreux genres ou espèces dont certains sont des pathogènes opportunistes majeurs : *Staphylococcus aureus* (dont la niche préférentielle est représentée par les fosses nasales), *Streptococcus* (groupables ou non, dont *Streptococcus pneumoniae*), *Haemophilus*, *Neisseria* (éventuellement *Neisseria meningitidis* dont le portage est transitoire), *Moraxella catarrhalis*, ainsi que des *Corynébactéries*, lactobacilles et également de nombreuses bactéries anaérobies. Le tableau suivant résume les différents phylas et genres colonisant les voies aériennes supérieures.

Tableau 3. Phylas, familles, genres ou espèce bactériennes les plus fréquemment décrites dans les voies aériennes supérieures (64)(66).

Phyla	Fosses nasales	Cavité orale
<i>Bacteroidetes</i>	Minoritaire	<i>Bacteroidetes</i> <i>Prevotellaceae</i> <i>Prevotella</i> <i>Capnocytophaga</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i> <i>Staphylococcaceae</i> <i>S. aureus</i> <i>Lachnospiraceae</i>	<i>Firmicutes</i> <i>Streptococcaceae</i> <i>Streptococcus</i> <i>Veillonellaceae</i> <i>Veillonella</i> <i>Acidaminococcaceae</i> <i>Lachnospiraceae</i>
<i>Proteobacteria</i>	Minoritaire	<i>Proteobacteria</i> <i>Neisseriaceae</i> <i>Neisseria</i> <i>Pasteurellaceae</i> <i>Campylobacteraceae</i> <i>Xanthomonadaceae</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i> <i>Propionibacteriaceae</i> <i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Rothia</i> <i>Corynebacterium</i>
<i>Fusobacteria</i>	Minoritaire	<i>Fusobacteria</i> Minoritaire

IV.4.4 Microbiote des voies aériennes inférieures

De nombreuses études publiées ont caractérisé le microbiote pulmonaire des sujets adultes en bonne santé en utilisant des échantillons de LBA. Les résultats de ces études montrent que les phylums les plus fréquemment observés de façon constante étaient *Bacteroides*, *Firmicutes* et *Protéobactéries* (66). Le tableau suivant représente les différents phylas et genres colonisant les voies aériennes inférieures.

Tableau 4. Phylas, genres bactérien les plus fréquemment décrit dans les voies aériennes inférieures (66)

Pylum	Genre
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Prevotella</i> <i>Bacteroides</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Veillonella</i> <i>Streptococcus</i> <i>Staphylococcus</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>Haemophilus</i> <i>Moraxella</i> <i>Neisseria</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Escherichia</i>
<i>Actinobacteria</i>	

IV.4.5 Diversité et abondance du microbiote respiratoire

Comme le microbiote intestinal, le microbiote respiratoire se développe rapidement après la naissance. Sa biomasse est nettement inférieure à celle du microbiote intestinal, qui est de 10^{11} UFC/g du contenu luminal, ou à celle de la bouche (le nombre d'espèces détectées dans chaque échantillon est environ la moitié de celle de la bouche), elle est de l'ordre de 10^3 à 10^5 UFC/g de tissus pulmonaire, elle est plutôt comparable à la biomasse de l'estomac et du duodénum qui est de l'ordre de 10^4 /ml de leurs contenus. L'étude de la charge microbienne est plus complexe avec une composition pouvant varier selon la qualité et le type de prélèvement (expectoration, aspiration, lavage bronchiolo-alvéolaire). La charge et la richesse du microbiote respiratoire sont déterminées par l'équilibre de trois facteurs (64)(63)(66)(68).

➤ *Migration microbienne*

Les principales voies de migration microbienne dans les poumons sont la microaspiration, l'inhalation d'air (l'air atmosphérique contient 10^4 - 10^6 cellule bactérienne par mètre cube), et dispersion directe le long des surfaces muqueuses (64) (63).

➤ *Élimination microbienne*

L'élimination des microbes dans les poumons est un processus actif et continu. Les voies respiratoires utilisent les cellules épithéliales ciliées pour propulser constamment et régulièrement les microorganismes, les sujets sains toussent en propulsant ces microorganismes dans le pharynx où ils sont avalés ou expectorés (64) (69) .

➤ *Persistence des germes résidents (reproduction du microbiote pulmonaire)*

Les facteurs écologiques qui définissent les conditions de croissance et les taux de reproduction du microbiote pulmonaire sont les paramètres physiologiques de l'environnement interne des poumons telle la pression en oxygène, le pH, la ventilation alvéolaire, la température, la concentration et l'activation des cellules inflammatoires de l'hôte. Tous ces facteurs physiologiques ont un effet in vitro et in vivo sur la valeur relative de la croissance bactérienne(64) (62) .

IV.5 Microbiote des voies respiratoires et asthme

La communauté microbienne se renouvelle continuellement, mais la plupart des bactéries impliquées dans ces flux appartiennent à quatre phylums : *Bactéroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacterie*, et *Actinobacteriae*. L'immigration microbienne et son élimination régissent la composition du microbiote pulmonaire sain, à l'inverse, certaines caractéristiques physiologiques des voies respiratoires peuvent favoriser l'installation d'un microbiote dysbiotique, influençant la susceptibilité aux maladies pulmonaires. La figure (3) suivante montre l'abondance relative de 15 familles bactériennes dans des échantillons de sujets asthmatiques et non asthmatiques.

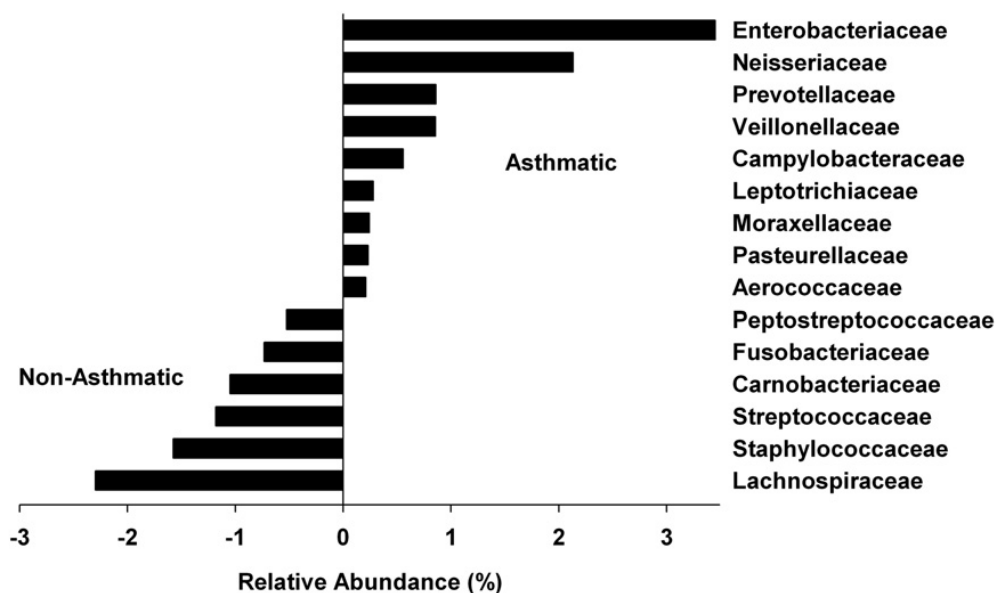


Figure 3 : Abondance relative de 15 familles bactériennes dans des échantillons de sujets asthmatiques et non asthmatiques. (La valeur de zéro indique un pourcentage similaire de contribution de la famille bactérienne à la fois chez les asthmatiques et les individus non asthmatiques. Une valeur positive pour une famille bactérienne indique son pourcentage d'abondance plus élevé chez les asthmatiques et une valeur négative indique l'abondance plus élevée chez les non-asthmatiques. Par exemple, les *Enterobacteriaceae* sont 4% plus abondantes chez les asthmatiques). (68).

IV.5.1 Microbiote respiratoire d'un asthmatique et dysbiose

Plusieurs études ont observé une association entre le début de l'exposition aux antibiotiques chez les enfants et le développement ultérieur de l'asthme et des allergies , (66) ce qui donne à penser que des perturbations du microbiome normal peut être à l'origine de la pathologie d'asthme.

IV.5.2 Caractérisation du microbiote respiratoire chez un asthmatique

Deux observations importantes ont émergé, suite aux nombreuses études sur le microbiote pulmonaire des patients asthmatiques, la première est l'existence d'une corrélation positive entre un microbiote altéré et le développement de l'asthme allergique chez l'enfant, la seconde étant la différence des microbiotes pulmonaires, déterminée par leur diversité et leur abondance, est associée à l'évolution clinique du patient et à sa réaction au traitement, ainsi les différents phénotypes de la maladie pourront être définis (64).

Deux études importantes ont étudié la composition de microbiote pulmonaire chez des patients asthmatiques par rapport aux patients contrôles sains .Hilty et al ont comparé le microbiote des échantillons oraux, nasaux et liquide broncho-alvéolaire (BAL) des patients asthmatiques avec ceux des patients atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) et ceux des contrôles sains (66). Parmi les asthmatiques, les auteurs ont trouvé une abondance relative des Protéobactéries particulièrement *Haemophilus* mais aussi *Moraxella* et *Neisseria* (68), avec une diminution de celle des bactéroïdes par rapport aux témoins(66)(1). La figure suivante représente le microbiote pulmonaire sain et malade.

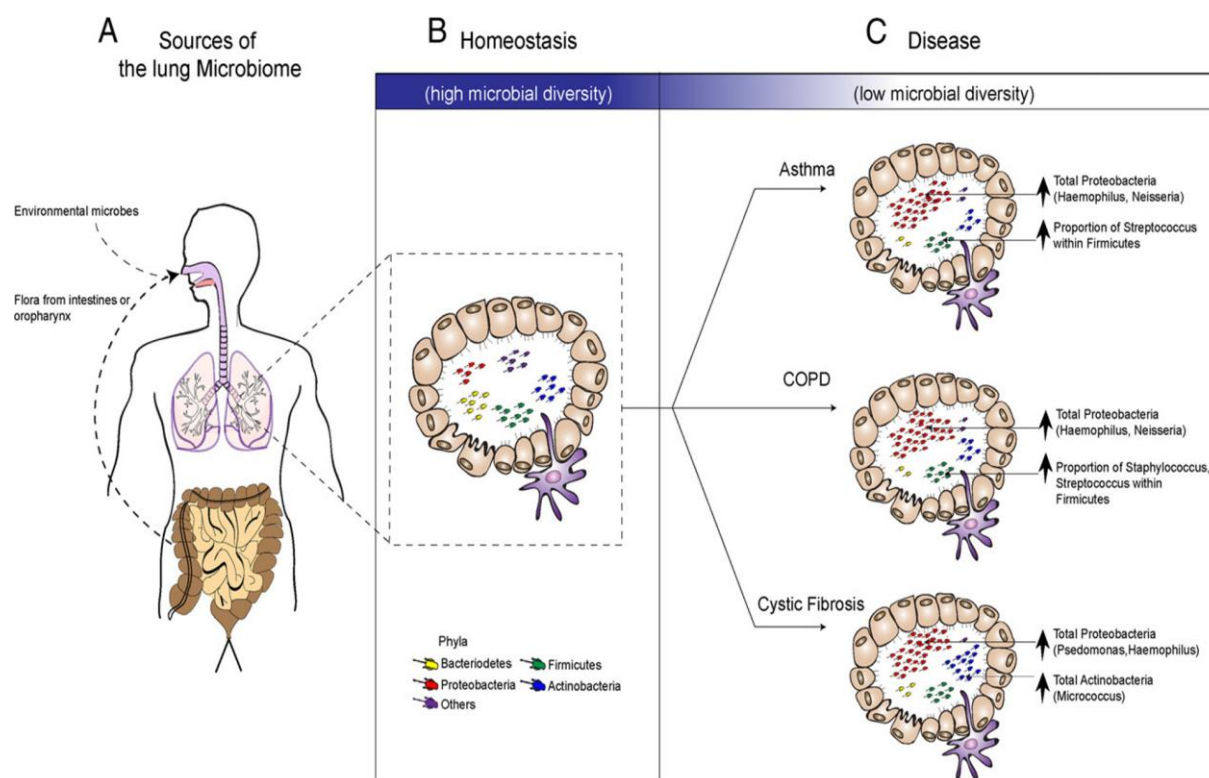


Figure 4. Le microbiote pulmonaire dans la santé et la maladie. A) Bien que les origines du microbiote pulmonaire soient inconnues, l'exposition directe aux microorganismes de l'environnement ainsi qu'à la flore endogène des intestins et de l'oropharynx pourraient servir

d'inoculum initial ou continu. B) Au cours de l'homéostasie, le microbiote pulmonaire présente une diversité dans sa composition. C) En revanche, à l'état malade, cette diversité est réduite, notamment en raison de la prolifération du phylum des Protéobactéries. De plus, l'augmentation de charge de certaines espèces au sein des différents phylums a été rapportée. Par exemple, une augmentation de la proportion de streptocoques dans le phylum des Firmicutes est observée à la fois dans l'asthme et la BPCO (69).

IV.5.3 Dysbiose des microbiotes et maladies inflammatoires

Plusieurs études chez l'adulte ont montré que le microbiote respiratoire de l'asthmatique diffère du sujet sain et la composition du microbiote respiratoire semble être liée à des caractéristiques cliniques et phénotypiques de l'asthme (64). À l'heure actuelle, il est difficile d'affirmer si la dysbiose rencontrée dans la maladie asthmatique est la cause ou la conséquence de la maladie (64). La figure suivante montre la diversité estimée des microbiotes des voies aériennes supérieures et inférieures en situation physiologique et pathologique (dysmicrobisme) (1).

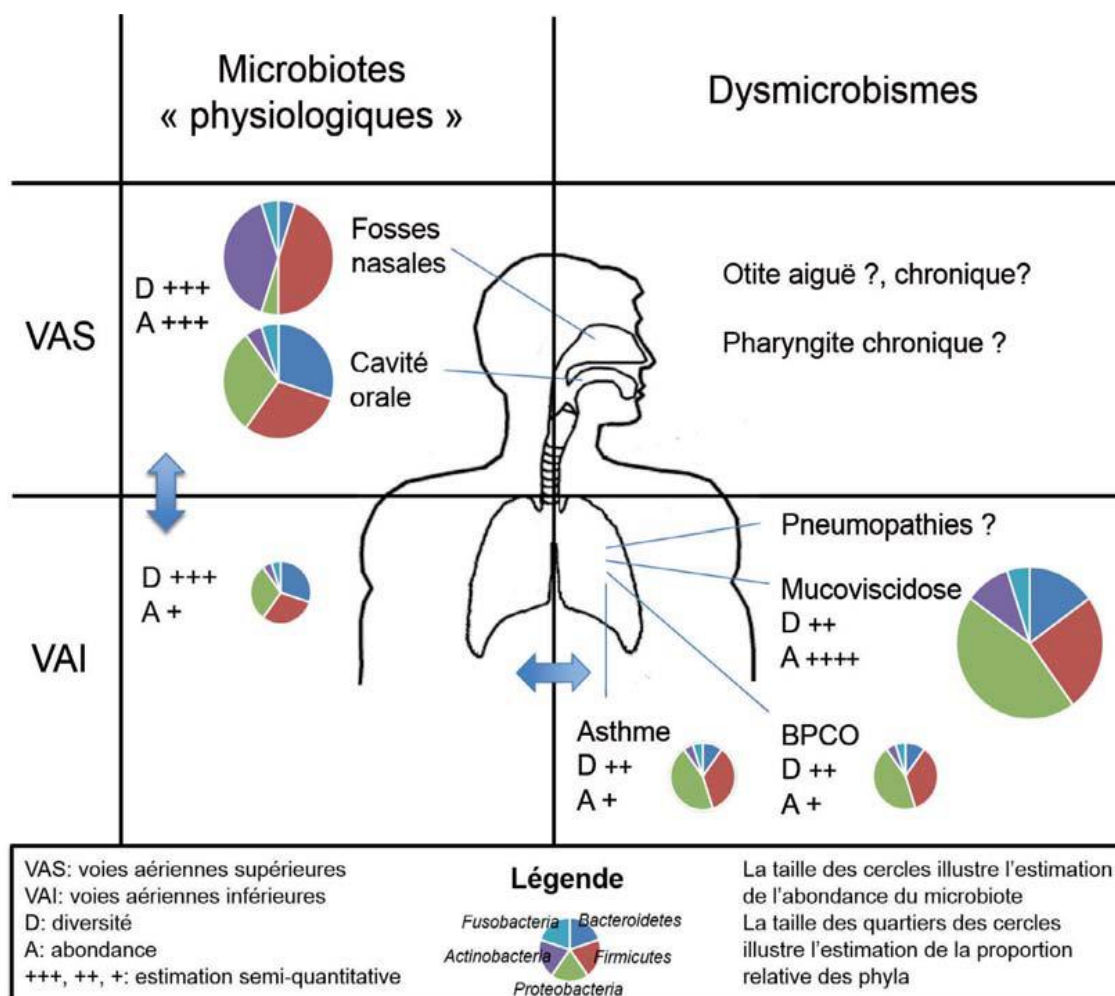


Figure 5. Représentation schématique de l'abondance et de la diversité estimée des microbiotes des voies aériennes supérieures et inférieures en situation physiologique et pathologique (66).

IV.5.3.1 - Facteurs à l'origine de dysmicrobismes respiratoire

Parmi les facteurs les plus connus à l'origine des dysmicrobismes respiratoires, certains peuvent être dus à des modifications liées à l'hôte, d'autres à des facteurs exogènes (64).

➤ Facteurs liés à l'hôte

L'appareil muco-ciliaire constitue un mécanisme de protection permettant d'éviter l'accumulation des microorganismes dans les poumons. Un défaut de clairance muco-ciliaire va entraîner une colonisation massive des voies aériennes inférieures, ainsi le dysfonctionnement de cet appareil muco-ciliaire peut être à la base d'un dysmicrobisme. L'altération du réflexe glottique et du réflexe de toux pourrait également favoriser des dysmicrobismes en permettant le passage du contenu oropharyngé vers les voies aériennes inférieures.

D'autres modifications telles que des modifications abiotiques au sein des poumons qui vont favoriser la colonisation bactérienne. En effet, le déséquilibre hydro-électrolytique, l'acidification, les conditions d'hypoxie hétérogènes ainsi que la modification de viscosité du mucus respiratoire vont favoriser l'adaptation de certaines bactéries qui vont pouvoir coloniser de façon chronique les voies aériennes inférieures de ces patients.(66).

➤ Facteurs exogènes

Des facteurs exogènes pourraient être à l'origine de dysmicrobisme du microbiote bactérien comme :

- ✓ **Les virus.** La composition bactérienne du microbiote respiratoire peut être modifiée suite à une infection virale, Molyneaux *et coll.* ont montré, suite à l'infection par un *Rhinovirus*, une augmentation de la charge bactérienne et notamment d'*Haemophilus influenzae* dans le microbiote de sujets atteints de BPCO. Ces résultats suggèrent que l'infection à *Rhinovirus* modifie le microbiote respiratoire et peut entraîner des infections bactériennes secondaires.
- ✓ **Intubation.** Les sondes endo-trachéales constituent des supports pouvant favoriser l'adhésion de communautés bactériennes et la synthèse de biofilm (66).
- ✓ **Tabac.** Le tabac pourrait également favoriser les dysmicrobismes respiratoires par plusieurs mécanismes incluant l'altération de la clairance muco-ciliaire, l'augmentation de l'attachement des bactéries aux cellules épithéliales et la détérioration des réponses immunitaires de l'hôte (1).
- ✓ **Les traitements antibiotiques** L'utilisation massive d'antibiotiques entraîne une augmentation de la résistance aux antibiotiques dans une population bactérienne, elle peut aussi conduire à une augmentation de la colonisation des voies aériennes par des bactéries naturellement résistantes aux antibiotiques tels que *P. aeruginosa* (66). La figure suivante résume les différents facteurs pouvant modifier le microbiote bactérien respiratoire.

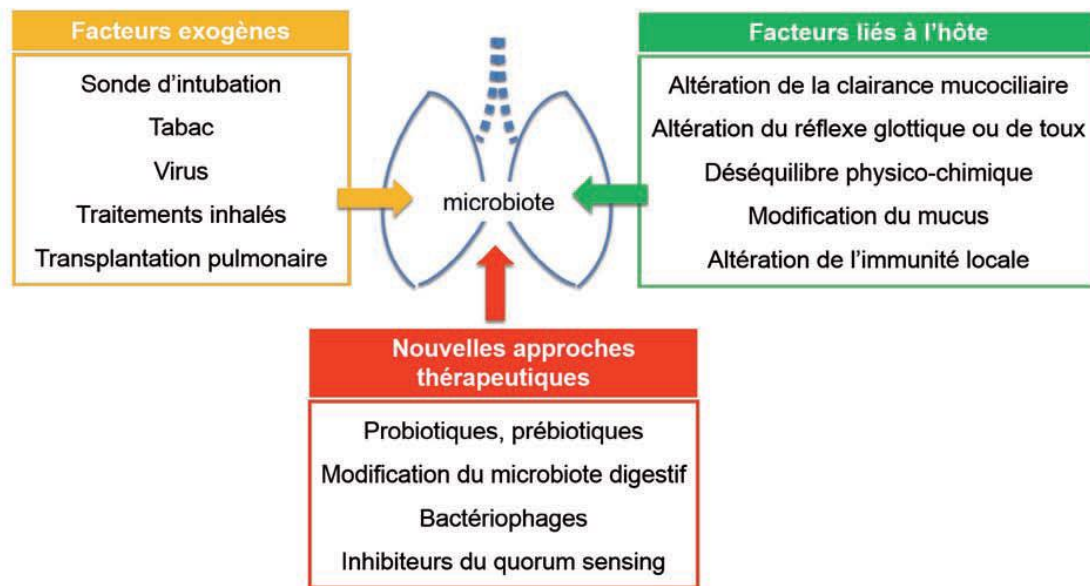


Figure 6. Facteurs pouvant modifier le microbiote bactérien respiratoire et les nouvelles approches thérapeutiques (66).

La dysbiose des bactéries commensales a également été liée à d'autres états pathologiques tel le diabète de type 1, l'obésité, la polyarthrite rhumatoïde et l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale. Ces données indiquent que le changement dans la flore commensale ou dysbiose peut avoir un impact important sur les maladies inflammatoires chroniques.

IV.6 Rôle des microbiotes dans l'asthme

IV.6.1 Microbiote intestinal

De nombreuses études du microbiote commensal du tractus gastro-intestinal ont démontré son importance pour le métabolisme, la maturation du système immunitaire et la protection contre les micro-organismes invasifs (70).

Une association claire et cohérente a été observée entre l'exposition des enfants aux microorganismes (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus* ou *Moraxella catharralis*), l'altération du microbiote gastro-intestinal et pharyngé et le développement de l'asthme. En général une exposition à une charge et une diversité bactérienne importante et protectrice contre le développement de l'asthme, bien que la présence de germes spécifiques potentiellement pathogènes et des substances bactériennes dans le microbiote respiratoire des enfants a été associée positivement à l'asthme (71).

Parmi les premières études qui ont été réalisées sur le microbiote intestinal pour déterminer son rôle dans les pathologies inflammatoires pulmonaires, on cite celles de Nover et al en (2004). Leur modèle utilisait un antibiotique à large spectre pour perturber le microbiote intestinal. Ils ont démontré que la perturbation elle-même ne provoque pas de réponse allergique. L'exposition à l'antigène des voies aériennes ne provoque pas non plus de réponse allergique. Cependant, si le système est perturbé et qu'une exposition à l'antigène se produit, une réponse allergique vigoureuse des voies respiratoires se développe (72).

IV.6.2 Microbiote respiratoire

En dépit d'un nombre croissant de littérature décrivant le microbiote des voies respiratoires dans différentes maladies, son rôle dans la physiologie des maladies inflammatoires chroniques pulmonaires n'est pas encore bien élucidé. Des études utilisant des souris axéniques (sans germes) ont le potentiel de répondre aux questions posées, car ces souris sont complètement stériles.

Une étude menée par Herbst, Sichelstiel, Schaar, et al, 2011, sur la dysrégulation de l'inflammation des voies respiratoires en l'absence de colonisation microbienne a été réalisée en utilisant des souris sans germes (souris dépourvues de toute exposition aux microorganismes pathogènes et non pathogènes), ont démontré que le microbiote commensale a un rôle dans la régulation de l'inflammation des voies respiratoires, particulièrement dans le maintien d'une réponse immunitaire appropriée et surtout éviter des réponses exagérées par le système immunitaire (69).

Dans leurs études, ces auteurs ont démontrés qu'en l'absence du microbiote commensale chez des souris axéniques et leur exposition à un allergène qui est l'ovalbumine, il se produit des réponses immunitaires pulmonaires redirigées vers les cellules T de type 2 (Th₂) induites par l'inflammation, cette réorientation de la différenciation des lymphocytes CD4 en Th1 vers la différenciation en Th2 peut être corrigée par la réimplantation du microbiote commensale chez ces souris (73).

Il a été montré dans une étude menée par Larsen et al sur un modèle de cellules dendritiques que des souches d'*H. influenzae* et de *M. catarrhalis*, espèces impliquées dans des infections respiratoires, pouvaient entraîner une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires à la différence de souches de *Prevotella* du microbiote respiratoire des sujets sains (70).

La figure suivante décrit les différentes réponses immunitaires des voies respiratoires dans trois situations, en présence et en absence de microbes et un microbiote avec supplément de bactéries non pathogènes.

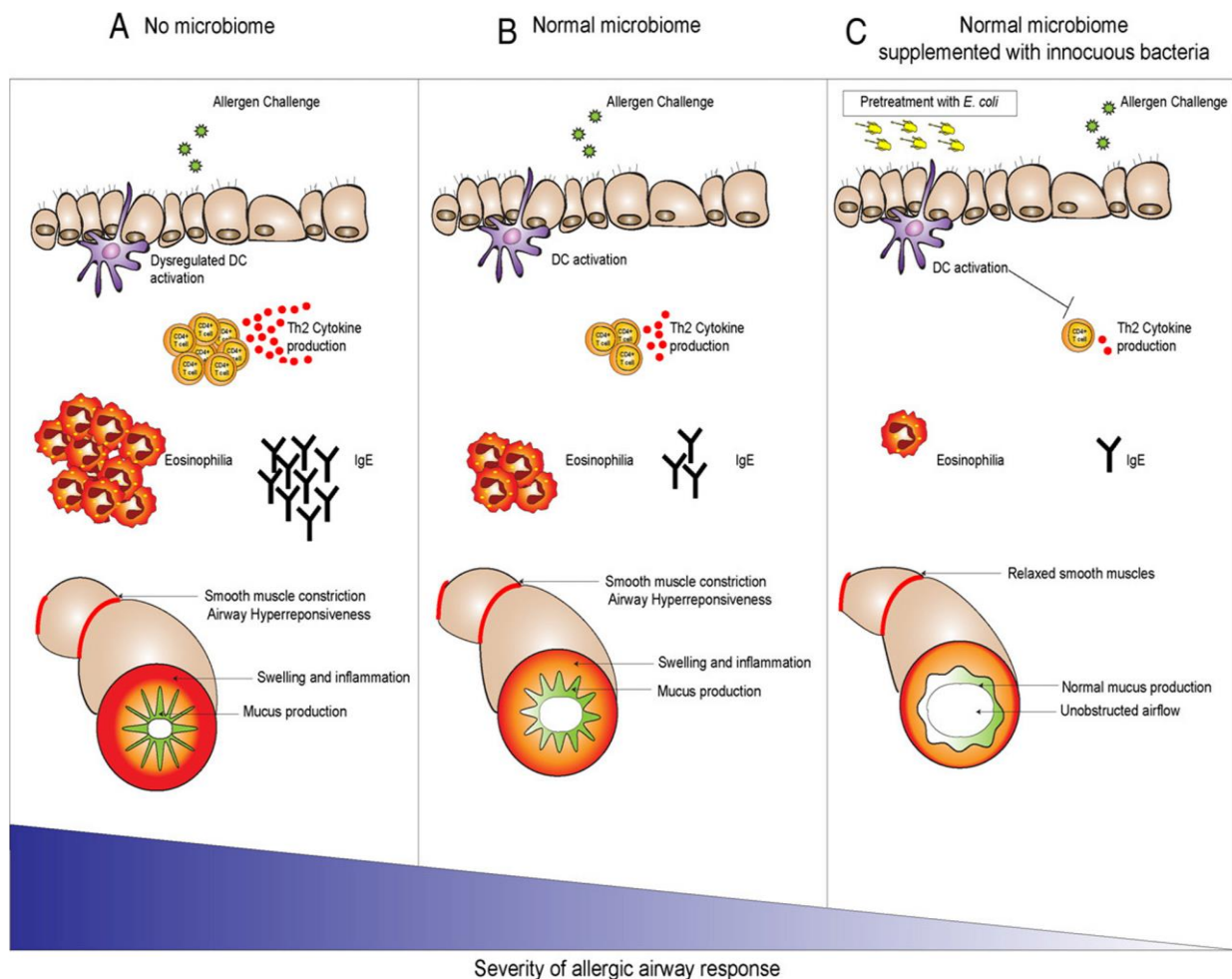


Figure 7. Rôle des microbes dans la régulation de la réponse allergique des voies respiratoires.

A, B, souris exemptes de germes (sans exposition à aucune bactérie, champignon ou virus) (A) présence d'une réponse allergique des voies respiratoires exagérée caractérisée par une augmentation des cytokines de type Th-2, une éosinophilie des voies aériennes, des IgE, une inflammation pulmonaire, et hyperréactivité des voies respiratoires par rapport aux souris (B) hébergeant une microflore normale. C, à l'inverse, une supplémentation du microbiome des voies respiratoires par l'administration directe de bactéries inoffensives par les voies respiratoires peut reprogrammer les cellules immunitaires locales, ce qui induit un effet protecteur contre la réaction allergique des voies respiratoires. Cellule dendritique DC 5; Th2 T helper cells type 2 (69).

IV.7 Microbiote respiratoire et stratégies thérapeutiques

Si un microbiote pulmonaire perturbé s'avère être impliqué dans la pathogénie de la maladie et non une conséquence de la maladie elle-même, il présentera un intérêt certain et une nouvelle cible d'intervention thérapeutique. Le microbiote pulmonaire, comme celui des autres compartiments, peuvent être modulés dans le but de corriger la dysbiose et de rétablir la santé de la communauté microbienne en utilisant des probiotiques et prébiotiques pour concurrencer les bactéries pathogènes et restaurer directement ou indirectement la diversité des communautés microbiennes des voies respiratoires, des antibiotiques et des inhibiteurs du quorum-sensing (66).

IV.7.1 Stratégie thérapeutique en modulant le microbiote intestinal

La prise de conscience croissante du rôle du microbiote intestinal commensale dans le développement et la régulation du système immunitaire, a suscité un vif intérêt pour le potentiel thérapeutique des probiotiques et d'autres stratégies thérapeutiques à base de bactéries pour de nombreux troubles liés au système immunitaire.

Les pré- et probiotiques peuvent en effet interagir avec la flore intestinale et pourraient ainsi réguler la réponse immunitaire dans l'asthme. De nombreuses études ont ainsi montré un effet protecteur par les pré- et probiotiques sur l'asthme allergique expérimental, parmi ces études celle de Bouchaud et *al.*, 2016, une étude qui a démontré un effet protecteur vis-à-vis de la réponse inflammatoire allergique chez la progéniture de mères ayant reçues des prébiotiques pendant la grossesse et la période d'allaitement (74). En effet ce régime alimentaire a modifié le microbiote des mères et de leur progéniture. Cette dernière était protégée contre les allergies alimentaires et présentait des taux plus bas d'IgE et d'histamine, par rapport à celle des mères nourries avec un régime contrôle. De plus, la supplémentation en pré- probiotiques chez la mère a permis une plus grande perméabilité intestinale chez sa progéniture. Une amélioration de la réponse régulatrice à l'inflammation allergique et des modifications de l'équilibre Th2 / Th1 vers une réponse Th2 atténuée ont été observées chez des souris de mères exposées au mélange pré- probiotiques(74).

IV.7.2 Stratégie thérapeutique en modulant le microbiote respiratoire

La restauration d'une composition saine du microbiote respiratoire soit par traitement antibactérien, soit, à l'opposé, par transplantation de germes pourrait peut-être modifier l'évolution de la maladie asthmatique. Des travaux chez l'animal ont montré que l'instillation directe dans les voies respiratoires de certaines souches de bactéries présentes dans la poussière de ferme (*Staphylococcus sciuri* W620 et *Escherichia coli*) protège de la réponse inflammatoire allergique respiratoire. De plus, l'instillation intranasale prénatale chez la mère d'une autre bactérie retrouvée également à la ferme (*Acinetobacter lwoffii*), protège aussi la descendance contre le développement de l'asthme allergique expérimental. (75)

La transplantation du microbiote respiratoire par les probiotiques dans les traitements des pathologies respiratoires, en particulier l'asthme, reste à l'étape de l'expérimentation sur les modèles animaux. La communauté scientifique ne soutient pas l'utilisation de probiotiques pour la prévention primaire des maladies allergiques, mais elle est favorable à la supplémentation en probiotiques chez les femmes enceintes et /ou allaitantes et les nourrissons ayant des antécédents familiaux de maladies allergiques. Il est important de noter qu'il n'existe actuellement aucune recommandation pour une souche de probiotiques spécifique, car la plupart des études montrent une hétérogénéité significative des souches utilisées et ne permettent pas de déterminer quelle souche est la plus efficace (76).

V Etude cytot bacté riologique

La présente étude, consiste à rechercher et à mettre en évidence les germes cultivables présents dans les crachats spontanés et les crachats induits d'une part et d'autre part comparer les germes retrouvés dans les deux types de crachats chez les patients asthmatiques et les sujets sains.

V.1 Lieu et période d'étude

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi-Ouzou durant cinq mois du mois de mars au mois de juillet.

V.2 Patients ciblés

Dans la présente étude, nous avons ciblé deux catégories de malades asthmatiques, la première catégorie qui est majoritaire sont des sujets adultes asthmatiques ne présentant pas de signes cliniques d'infection bronchique, la seconde représente des sujets asthmatiques adultes hospitalisés au niveau de service de pneumo-phtisiologie de l'hôpital Belloua suite à une infection bronchique.

V.3 Matériel et méthodes

V.3.1 Matériel

V.3.1.1 Matériel non biologique

Tableau 5. Matériels utilisés dans ce travail de recherche

Appareillage	Petits matériels	Réactifs et solutions	Milieux de culture
-Autoclave -Aérosol. - Appareils MATEC -Appareils photos. -Balance de précision électronique. -Chambre froide -Etuve réglée a 37°C. -Jarre. -Microscope Optique.	-Anse de platine. -Bavettes. -Bec bunsen. -boites de pétri. -Ecouvillons. -embouts. -Gants à usage unique. -Glacière pour le transport des échantillons. -Lames et lamelles. -Pots stériles. -Para filme. -Pipetes pasteur. -Piores. -Portoirs. - Tubes à vis. -Tubes à hémolyses. -Tubes Eppendoph.	-Antibiotiques. -Api20E. -ApiNH. -Bleu de méthylène. -Disque a oxydase. -Eau distillée. -Eau physiologique stérile. -Fuchsine. -H₂O₂. -Huile de vaseline. -Lugol. -Réactif Nitrite1 (RN1) : acide Sulfanilique. -Réactif Nitrite 2(RN2) : alpha naphthylamine. -Réactif de Kovacs. -Violet de Gentiane. -VP1 : Voges Proskauer 1(KOH) -VP2 : Voges Proskauer 2 (alpha naphthol). -Zym1. -Zym2. -Sérum salé.	- Gélose au sang frais. - Gélose au sang cuit. -Milieu Hektoen. -Milieu Chapman. - Gélose nutritive. - Gélose lactosé au BCP. -Milieu bile-esculine -Plasma humain. -Milieu chromogène. -Milieu sabouraud. -Milieu Muller Hinton

V.3.1.2 Matériel biologique

Des prélèvements de type crachats (expectorations) prélevés à partir des sujets adultes asthmatiques. Les prélèvements ont été réalisés au niveau du cabinet médical de rééducation fonctionnelle et de kinésithérapie respiratoire du Dr SENANI Karim pour les malades de l'association des asthmatiques, par contre pour les malades hospitalisés, les prélèvements ont

été réalisés au niveau du service de pneumo-phthysiologie de l'hôpital Belloua du CHU de Tizi-Ouzou.

Notre étude a portée sur 35 patients asthmatiques d'âge adulte et 6 sujets témoins sains. Nous avons effectué deux types de crachats spontané et induit chez tous patient à l'exception de 4 chez qui seuls des prélèvements induits ont été réalisés pour un total de 78 prélèvements.

V.3.2 Méthodes

V.3.2.1 Les prélèvements

Nous avons réalisé deux types de prélèvements : des crachats spontanés et des crachats induits. Le but étant d'identifier et de comparer les germes présents dans les deux types de crachats. Afin d'éviter le biais de la variabilité individuelle, les deux prélèvements sont effectués chez le même malade. Après une auscultation du patient, nous avons réalisé en premier lieu le prélèvement spontané qui est un acte non invasif puis en second lieu le prélèvement induit, technique peu invasive mais très bien tolérée par le malade Le prélèvement s'effectue en présence d'une assistance médicale.

V.3.2.1.1 Protocol

➤ Prélèvement spontané

Le malade se rince la bouche avec de l'eau minérale, ensuite et à l'aide d'une abaisse langue, nous avons stimulé le réflexe de la toux en appuyant sur la partie postérieure de celle-ci (la langue) pour forcer le patient à tousser. Les crachats sont recueillis dans un récipient stérile.

➤ Prélèvement induit

C'est une technique d'expectoration par toux dirigée. Le malade rince la bouche avec de l'eau minérale, puis il effectue une séance d'aérosol qui consiste en une nébulisation de 3 à 4 ml de sérum physiologique avant de faire 3 cycles d'inspiration - expiration profondes, à la quatrième expiration le malade provoque une quinte de toux qui induit une expectoration. Les crachats sont récupérés dans un récipient stérile.

V.3.2.2 Transport des prélèvements

Afin de préserver les germes sensibles et d'éviter la prolifération de ceux qui sont résistants et fausser ainsi les résultats de la culture, les prélèvements ont été acheminés rapidement dans une glacière au laboratoire.

V.3.2.3 Fiche de renseignement du malade

Chaque prélèvement a été étiqueté en mentionnant sur le récipient : Le nom, prénom, numéro de prélèvement, la date du prélèvement. De plus les renseignements concernant les caractéristiques de la maladie (diagnostic, traitements, antécédents familiaux, etc.) de chaque patient sont recueillis sur des fiches de renseignements (voir annexe1).

V.3.2.4 Etude cytbactériologique des crachats

L'examen cytotabériologique des crachats (ECBC) est un examen qui nous permet d'effectuer :

- Une analyse cytologique (recherche des différents types cellulaires).
- Une analyse bactériologique (recherche des germes présents dans les crachats).
- Mettre en route un traitement antibiotique adapté.

L'ECBC est un examen difficile à interpréter car les expectorations peuvent être contaminées par des germes de la bouche, la salive, le pharynx d'une part et d'autre part les crachats sont des produits biologiques polymicrobiens. Pour éviter ces contraintes inhérentes aux prélèvements, nous avons pris des mesures qui sont :

- Réalisation des prélèvements matinaux
- Rinçage de la bouche plusieurs fois avec de l'eau minérale
- Réalisation d'une séance d'aérosol pendant 15 mn avant le prélèvement induit.
- Récupération des crachats directement dans des étuis stériles
- Transport des expectorations rapidement (dans l'heure qui suit) au laboratoire dans une glacière
- Ensemencement des prélèvements dès leurs arrivés au laboratoire.

Les différentes étapes de l'étude cytotabériologique des crachats sont :

- Etude macroscopique : Les prélèvements sont examinés à l'œil nu, leurs caractéristiques sont décrites :
 - L'aspect : muqueux, mucopurulent, salivaire, fluide, visqueux ou adhérent.
 - La couleur : rouille, verdâtre, jaunâtre, rose ou rouge.
 - L'odeur : parfois désagréable en lien avec la présence de certaine bactérie, il est contre indiqué de sentir les prélèvements car il peut y avoir des germes transmissibles par voie aérienne particulièrement *Mycobacterium tuberculosis*, il est indiqué de porter des masques lors de la manipulation des crachats.
- Etude cytologique : Cette étude nous permet d'observer les types cellulaires présents dans les crachats (cellules immunitaires, bronchiques et épithéliales) et de déterminer la qualité du prélèvement.

L'index de Murray-Washington est utilisé pour sélectionner les prélèvements conformes et de qualités (non salivaires).

En effet, l'index de Murray-Washington stipule que dans les crachats on doit retrouver un nombre de cellules épithéliales inférieur à 10 et un nombre de leucocytes supérieur à 25 par champ microscopique ; pour pouvoir lancer la culture bactérienne.

Comme nos objectifs étaient d'étudier, d'identifier et de comparer les germes présents dans les deux types de crachats avec ou sans infection apparentes, nous avons donc éliminé uniquement les crachats où le nombre de cellules épithéliales était supérieur à 10

V.3.2.4.1 -Observation direct des crachats

- **Protocole**

Déposer à l'aide d'une pipete pasteur une goutte de crachat entre lame et lamelle, apprécier le nombre de cellules épithéliale et celui des cellules immunitaires.

V.3.2.4.2 -Observation après coloration

- **Coloration au bleu de méthylène**

Cette coloration nous permet d'observer les différentes formes des bactéries présentes dans les crachats et leurs agencements.

- **Coloration MGG (May-Grunwald-Giemsa):**

Coloration spécifique des cellules immunitaires, elle nous permet de :

- Observer les différents types de cellules immunitaires
- Rechercher les éosinophiles
- Observer la flore bactérienne.

V.3.2.5 Culture microbiologique

Après l'étude cytologique des expectorations de tous les sujets (malades asthmatiques et témoins non asthmatiques) au nombre de (35 + 6), nous avons éliminé 14 prélèvements (7 spontanés et 7 induits) qui sont non conformes, car le nombre de cellules épithéliales était supérieur à 10.

Pour des raisons techniques, nous n'avons pu réaliser chez 4 patients que des prélèvements induits et ainsi nous avonsensemencés 64 prélèvements.

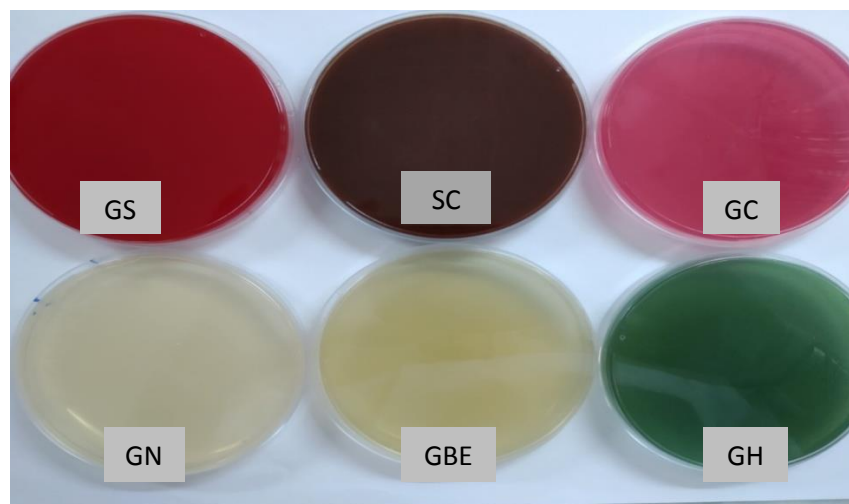


Figure 8. Milieux de culture utilisés.

(GSF : Gélose sang frais, GSC : Gélose sans cuit, GC : Gélose Chapman, GN : Gélose Nutritive, GBE : Gélose Bille Esculine, Gélose Hektoen GH).

V.3.2.5.1 Technique d'ensemencement

Nous avons utilisé la technique de quatre quadrants, pour apprécier l'abondance de chaque bactérie présente dans le milieu de culture et surtout, pouvoir la comparer dans les deux types de prélèvements.

Dans des conditions d'asepsie, nous avons prélevé à l'aide d'une pipette pasteur une goutte de crachat, et nous l'avons ensemencée sur les différents milieux déjà cités.

V.3.2.5.2 Incubation

Les boîtes ensemencées ont été incubées à 37 °C pendant 24 à 48h en aérobiose pour les milieux Chapman, Hektoen, BCP, GN, BE. Tandis que les géloses au sang cuit et au sang frais ont été incubées en atmosphère enrichie en CO₂.

V.3.2.5.3 Gélose Chapman

Le milieu Chapman est un milieu hypersalé, cette forte concentration inhibe la croissance de la plupart des bactéries tout en laissant croître les staphylocoques.

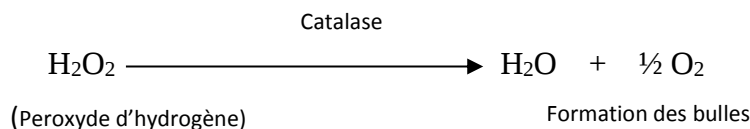
Les staphylocoques pathogènes forment des colonies pigmentées, entourées d'une auréole jaune due à la fermentation de mannitol, Par contre les staphylocoques non pathogènes forment des petites colonies rouges qui ne modifient pas la couleur du milieu ne fermentant pas le mannitol.

❖ Test complémentaire

➤ Recherche de la catalase

• Principe

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène.



Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), ainsi les bactéries qui possède la catalase va dégrader le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation des bulles.

• Protocol

- Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette pasteur.
- Prélever une colonie à l'aide d'une pipette pasteur.
- Dissocier la colonie dans la goutte.

➤ Recherche de la Coagulase

- **Principe**

La Coagulase est une enzyme capable de coaguler le plasma sanguin sa présence est considérée comme étant l'élément principal de détermination du caractère pathogène des staphylocoques.

- **Protocole**

- Pipeter 0.5 ml de plasma dilué dans un tube à hémolyse
- Ajouter 0.5 ml germe à tester prélever d'une culture de 18 à 24 h en bouillon (BHIB).
- Incuber à 37C° pendant 1 à 2 h.
- Faire la lecture, observer la coagulation.

V.3.2.5.4 Gélose Hektoen

- **Principe**

Le milieu Hektoen est un milieu sélectif permettant l'isolement et différenciation des entérobactéries pathogènes à partir des produits biologiques. Il inhibe la croissance de la flore à Gram positif grâce à la présence des sels biliaires.

Ce milieu contient trois sucres saccharose, salicine lactose, ce dernier étant à forte concentration, il favorise la croissance des entérobactéries et éviter le problème de fermentation tardive. Les entérobactéries lac⁺ colonies apparaissent en jaune orangé.

Les bactéries qui produisent le sulfure d'hydrogène (H₂S⁺) sont mises en évidence par l'apparition d'un noircissement au centre des colonies.

➤ Test complémentaire

- **Etat frais**

La réalisation d'un frottis à partir des colonies prélever du milieu Hektoen nous permet d'observer la forme des bactéries (bacilles et coccobacille pour les entérobactéries) elle nous permet aussi d'apprécier la mobilité des bactéries.

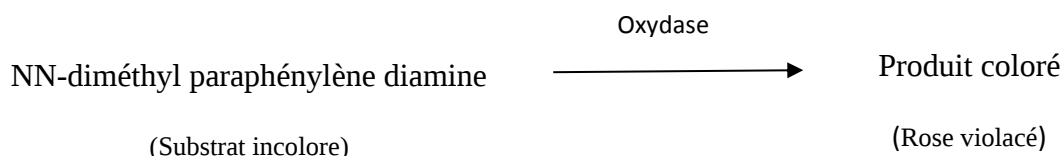
- **Coloration de Gram**

Gram négatif pour les entérobactéries

➤ Test d'oxydase

- **Principe**

Le test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore qui est le NN-diméthyl-paraphénylène diamine en un dérivé rose violacé.



- *Protocole*

- Placer un disque (papier buvard) non imprégné sur une lame à l'aide d'une pince flambée.
- Déposer une goutte de réactif incolore Sur le disque (non imprégné).
- Avec une pipette pasteur prélever une colonie sur le milieu solide et la déposer sur le disque.

➤ *Identification par la galerie Api*

- *Principe*

Le système Api est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries. Lorsqu'une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles qui composent la microgalerie (contenant de substrats déshydratés), les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs.

Dans le cas des bacilles Gram -, on utilise l'Api 20E pour l'identification des Entérobactéries et l'Api NE pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc....)

- *Protocole*

✓ *Préparation de la galerie*

- a) Remplir les alvéoles avec de l'eau stérile pour créer une atmosphère humide.
- b) Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation

✓ *Préparation de l'inoculum*

- a. Ouvrir une ampoule de suspension medium (ou un tube d'eau distillée stérile)
- b. Prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé
- c. Réaliser une suspension bactérienne faible (opacité 0,5 sur l'échelle Mc Farland)

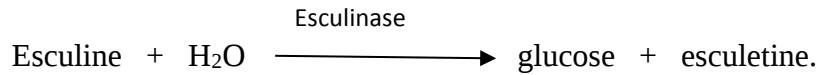
✓ *Résultats*

- a. Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées.
- b. Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : Test VP, TDA, IND, Nitrate réductase...
- c. Identifier l'espèce avec un logiciel d'identification.

V.3.2.5.5 Gélose Bille- Esculine

- **Principe**

L'esculine est un hétéroside qui libère, par hydrolyse du glucose et de l'esculine.



L'esculetine produit lors de l'hydrolyse forme un précipité de Fer III (à ne pas confondre avec les bactéries H_2S^+). Nous avons utilisé le milieu Bille-Esculine pour l'isolement des *Entérocooccus*.

V.3.2.6.6 Gélose lactosé au BCP

La gélose lactosé au pourpre de bromocrésol (BCP) est un milieu non sélectif, utilisé pour la détection et isolement des bactéries bacilles Gram négatif.

- **Principe**

La fermentation du lactose en acide est révélée en présence de pourpre de bromocrésol, par le virage du bleu violacé en jaune. Nous avons utilisé la gélose lactosé au BCP pour l'isolement du *Pseudomonas*.

➤ **Test complémentaire pour l'identification de *Pseudomonas***

- Etat frais : la forme bacillaire.
- Gram : Gram négatif.
- Mobilité : positif.
- Oxydase : positif.
- Api NE : identification biochimique.

V.3.2.6.7 Gélose chromogène

Les milieux chromogènes sont des milieux de culture qui permettent de mettre en évidence une enzyme spécifique d'une espèce bactérienne (ou fongique) ou d'un groupe d'espèces. Il utilise des substances spécifiques de cette enzyme qui après dégradation forment des produits colorés. On identifie donc l'espèce (ou le groupe) par la coloration des colonies. Nous avons utilisé le milieu chromogène pour identifier *l'Entérocooccus*. Les colonies apparaissent en bleues.

V.3.2.6.8 Gélose au sang frais(GSF)

La gélose au sang frais est un milieu non sélectif enrichit, on l'a obtenu en incorporant au milieu Miller-Hinton du sang à raison de 5%, de ce fait tous les germes exigeants ou non exigeants peuvent s'y multiplier.

L'addition de sang au milieu de base peut avoir plusieurs buts :

- Apporter des facteurs de croissance nécessaire au micro-organisme étudié
- Neutraliser certains inhibiteurs contenus dans les peptones des milieux

- Neutraliser, du fait de l'action peroxydasique et catalasique de l'hémoglobine, des ions superoxydes ou des peroxydes toxiques produits par le micro-organisme (intéressant en particulier pour les bactéries catalase négative comme les *Streptococcaceae*).

La culture sur la GSF permet la mise en évidence d'un caractère très important lors de l'identification du germe : l'hémolyse.

Il existe trois types d'hémolyse :

- Hémolyse alpha, qui est une hémolyse incomplète, elle se traduit par une couleur verdâtre
- Hémolyse bêta, c'est une hémolyse totale, elle se traduit par un halo clair
- Absence d'hémolyse

Les bactéries présentant une hémolyse B sont des bactéries groupables (de la classification de Lancefield), elles sont identifiées avec différents sérum c'est le Sérotypage. Les bactéries présentant une hémolyse alpha ou les bactéries ne présentant pas d'hémolyse sont identifiées en utilisant la galerie Api streptocoque (identification biochimique).

V.3.2.6.9 Gélase au sang cuit

La cuisson du sang permet :

- La libération de facteurs de croissance (facteur V=NAD⁺ en particulier) à partir des protéines du sang dénaturées par la chaleur ou à partir des hématies détruites.
- La destruction de certains inhibiteurs.

La gélase au sang cuit est donc un milieu très riche (apporte les facteurs X (hématine) et V(NAD⁺)) qui permettent la culture de bactéries très exigeantes, en particulier les *Haemophilus* et certaines espèces de *Neisseria*

Après 24h en atmosphère enrichie en CO₂, on retrouve les bactéries exigeantes et non exigeantes, pour l'identification ces bactéries observées sur la gélase au sang frais ou cuit on a réalisé des tests complémentaires

- Etude macroscopique des colonies
- Hémolyse
- Etats frais, mobilité
- Coloration de Gram
- Recherche de la catalase
- Recherche de l'oxydase
- Identification biochimique Api.

V.3.2.6.10 Gélase Sabouraud chloramphénicol

La gélase Sabouraud est un milieu qui permet la croissance d'une grande variété de levure et de moisissures. L'addition de chloramphénicol inhibe la croissance des bactéries à Gram positif et Gram négatif.

➤ *Test complémentaire*

- Recherche de filamentation sur sérum à 37°C (mise en évidence de *Candida albicans*) :
 - ✓ Emulsionner dans 1ml une colonie à partir de milieux Sabouraud chloramphénicol.
 - ✓ Incuber 3 h à 37°C.
 - ✓ Au bout de 3 h, observer au microscope une goutte de suspension et noter la filamentation des levures

Filamentation positive donc c'est le *Candida albicans*

Filamentation négative donc c'est autre espèce de *Candida* ou de levure.

V.3.2.6 Antibiogramme

• *Principe*

L'antibiogramme est un examen de laboratoire visant à déterminer la sensibilité d'une bactérie à différents antibiotiques il permet de connaître les antibiotiques efficaces lors d'un traitement pour lutter contre la souche bactérienne responsable de l'infection étudiée.

• *Protocole*

Ensemencer sur un milieu Miller –Hinton la souche pure à tester avec des stries très serrées, attendre quelques minutes, puis déposer des disques d'antibiotiques (habituellement actifs sur la souche en question) sur la gélose de culture bactérienne ensemencée. Incuber à 37° pendant 24h.

• *Lecture*

L'antibiotique migre dans la gélose à partir du disque créant une zone circulaire imbibée d'antibiotique. En fonction de la sensibilité du microorganisme vis-à-vis de l'antibiotique, apparaît autour du disque, une zone d'inhibition plus ou moins grande où la croissance bactérienne est arrêtée.

La figure suivante résume les différentes étapes pour réalisation de l'antibiogramme.

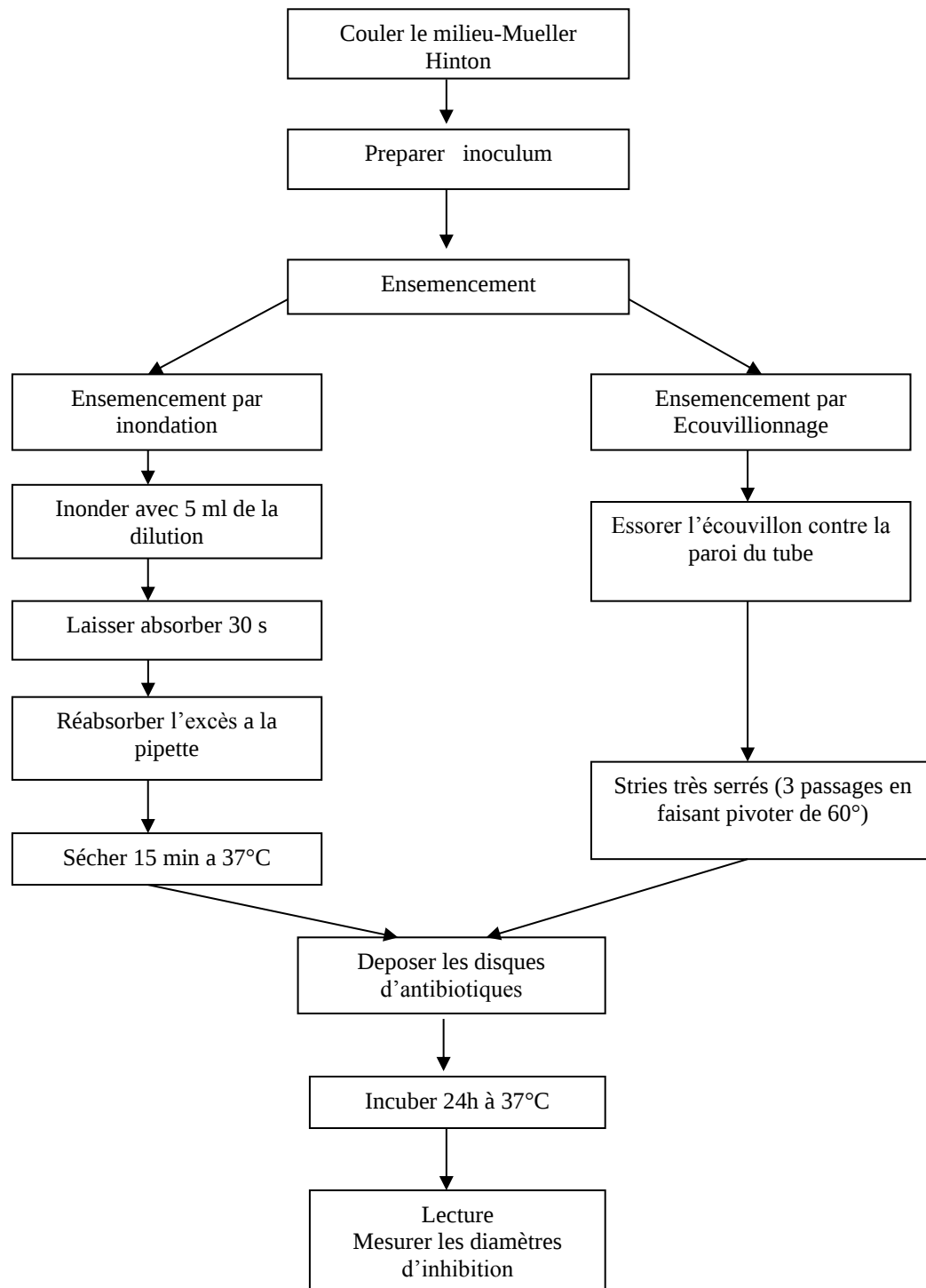


Figure 9. Différentes étapes d'un antibiogramme (7).

VI Analyse statistique

VI.1 Hypothèse de l'étude

Dans ce travail, nous avons jeté l'hypothèse de l'existence d'une différence significative entre les crachats induits et les crachats spontanés en termes de présence de germes en cas d'infection pulmonaire.

Notre travail a consisté à comparer les deux types de prélèvements, en termes de

- Nombre de germes totaux
- Nombre germes pathogènes
- Positivité du prélèvement ou non

VI.2 Paramètres d'inclusion

- Age des sujets : entre 18 à 74 ans.
- Malades asthmatiques.
- Malades de la région de Tizi-Ouzou.

VI.3 Objectif de l'étude

L'infection bronchique est un facteur important dans l'exacerbation de l'asthme. Le choix de l'antibiothérapie lors de l'utilisation d'un traitement probabiliste est hasardeux. Le prélèvement de crachats, présente un grand intérêt, à la condition d'une bonne qualité du prélèvement.

En plus de la qualité du prélèvement il existe une difficulté dans l'interprétation des résultats de culture de ces prélèvements, en raison d'une contamination systématique des résultats par la flore salivaire, la présence en état commensales dans l'oropharynx de certaines bactéries ainsi que la difficulté à cultiver certaines espèces sur les milieux de culture usuels.

Pour toutes ces raisons qu'on recommande d'utiliser des prélèvements de crachats protégés, mais ce type de prélèvements restent invasifs, d'où notre questionnement sur la pertinence d'utilisation d'un prélèvement de crachats induits en remplacement des prélèvements protégés (invasif) et surtout les prélèvements spontanés souvent mal réalisés.

Afin de vérifier la pertinence de ce raisonnement nous avons souhaité comparer les résultats bactériologiques des deux types de prélèvements spontanés et induit par toux dirigée.

VI.3.1 Objectif principal

L'objectif principal de notre étude est de comparer la fiabilité des deux types de crachats, spontané et induit pour mettre en évidence la présence de germes pathogènes en quantité suffisante.

VI.3.2 Objectifs secondaires

- Comparer le nombre d'espèces de germes présents dans les deux types de crachats.
- Comparer le nombre d'espèces de germes pathogènes présents dans les deux types de crachats.

VI.4 Critères de jugement

VI.4.1 Principal

Présence d'une différence statistiquement significative entre les deux types de crachats par rapport aux des prélèvements positifs. Un prélèvement positif est défini par la présence d'un germe pathogène en quantité suffisante.

VI.4.2 Secondaires

- Présence d'une différence statistiquement significative entre les deux moyennes du nombre de germes présents dans les deux types de crachats.
- Présence d'une différence statistiquement significative entre les deux moyennes du nombre de germes pathogènes présents dans les deux types de crachats.

VI.5 Statistiques

L'analyse statistique est effectuée à l'aide des logiciels de statistique R (version 3.6.1) et RStudio (version 1.2.1335).

La normalité de la distribution d ($= x-y$) pour les échantillons appariés, a été vérifiée par un test de Shairo-Wilk.

Dans le cas de non normalité des distributions, un test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney est utilisé pour les échantillons appariés.

Dans le cas de variables qualitatives le test de Khi-deux de Mac Nemar a été utilisé pour vérifier l'indépendance des échantillons de plus de 5 individus (effectif théorique) (figure 10)

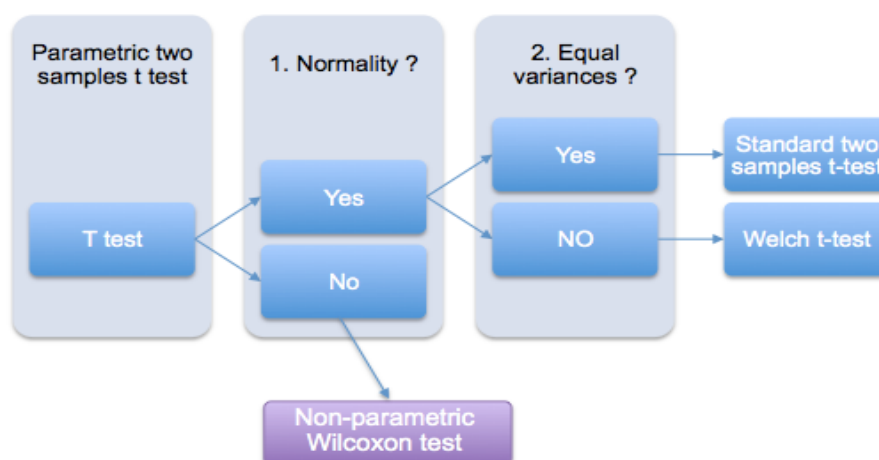


Figure 10. Etapes de l'analyse statistique (STHDA, 2016).

VI.6 Résultats

VI.6.1 Répartition des espèces pathogènes et pathogènes opportunistes dans la population étudiée

L'histogramme suivant montre la comparaison des fréquences (en pourcentage) des différents germes identifiés dans les crachats spontanés et induits

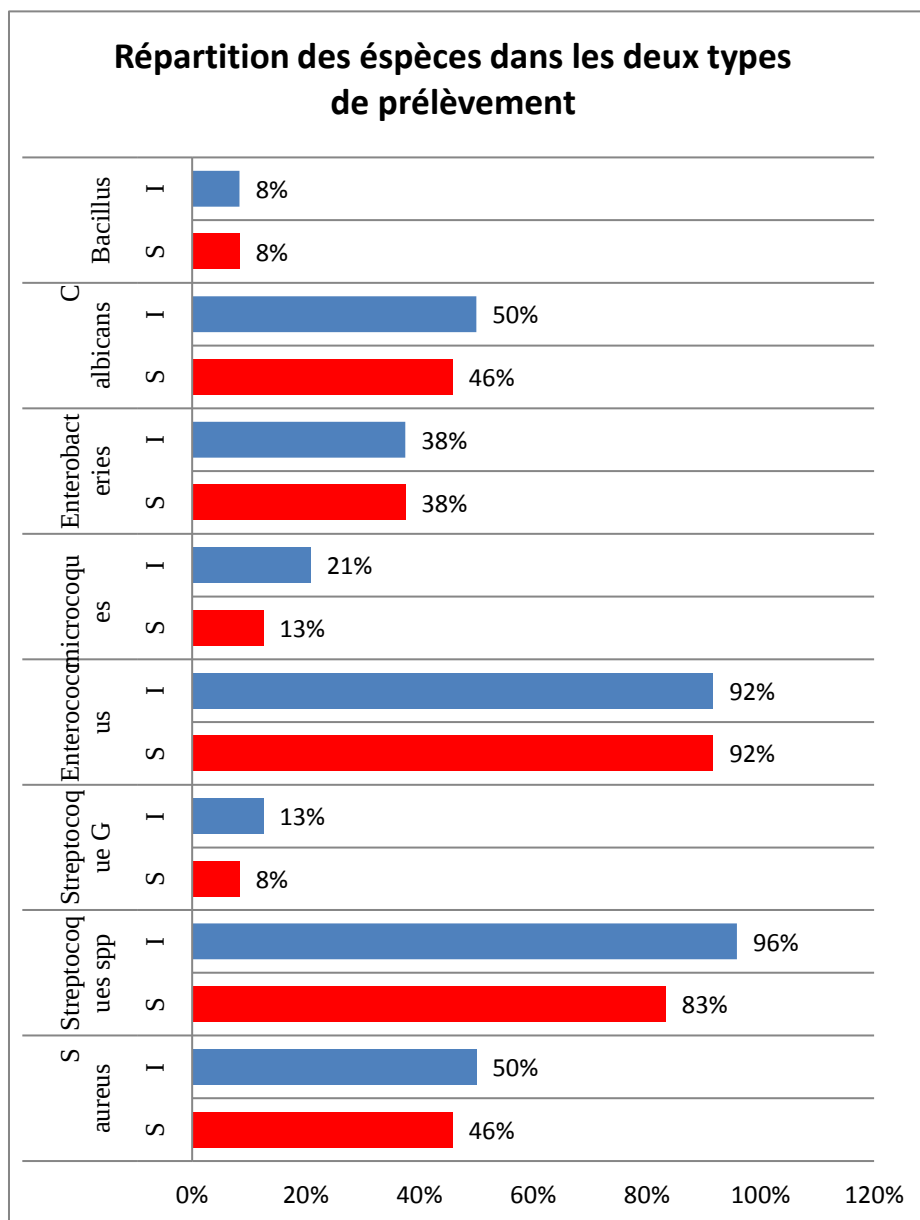


Figure 11. Répartition des espèces pathogènes et pathogènes opportunistes dans la population étudiée.

Tableau 6. Comparaison des moyennes du nombre d'espèces dans les deux prélèvements.

Le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney pour les échantillons appariés a été utilisé pour un risque d'erreur alpha de 0.05

	Nombre d'espèces dans le prélèvement spontané	Nombre d'espèces dans le prélèvement induit
Patient 1	4	3
Patient 2	4	5
Patient 3	3	3
Patient 4	6	5
Patient 5	5	5
Patient 6	4	4
Patient 7	4	4
Patient 8	4	5
Patient 9	5	5
Patient 10	3	3
Patient 11	5	1
Patient 12	4	3
Patient 13	5	5
Patient 14	4	4
Patient 15	4	4
Patient 16	4	4
Patient 17	4	4
Patient 18	4	4
Patient 19	3	4
Patient 20	5	4
Patient 21	3	5
Patient 22	4	5
Patient 23	5	5
Patient 24	4	5
Moyenne	4.16	4.12

En conclusion les prélèvements spontané et induit ne présentent pas de différence significative en termes de nombre d'espèces isolées ($p = 0.887$).

Tableau 7. Comparaison des moyennes du nombre d'espèces pathogènes dans les deux prélèvements

Le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney pour les échantillons appariés a été utilisé pour un risque d'erreur alpha de 0.05.

	Nombre d'espèces pathogènes dans le prélèvement spontané	Nombre d'espèces pathogènes dans le prélèvement induit
Patient 1	1	1
Patient 2	0	3
Patient 3	0	0
Patient 4	1	1
Patient 5	2	2
Patient 6	2	2
Patient 7	1	1
Patient 8	2	2
Patient 9	1	1
Patient 10	1	1
Patient 11	2	1
Patient 12	1	1
Patient 13	1	1
Patient 14	1	0
Patient 15	0	0
Patient 16	0	1
Patient 17	1	1
Patient 18	1	1
Patient 19	2	3
Patient 20	2	1
Patient 21	1	2
Patient 22	1	1
Patient 23	2	2
Patient 24	1	2
Moyenne	1.12	1.29

Nous concluons que les prélèvements spontané et induit ne présentent pas de différence significative en termes de nombre de germes pathogènes isolés ($p = 0.4$).

Tableau 8. Comparaison entre la positivité des deux types de prélèvements spontané et induit

	Prélèvements Spontanés	Prélèvements Induits
Patient 1	non	oui
Patient 2	non	oui
Patient 3	non	non
Patient 4	non	non
Patient 5	oui	oui
Patient 6	non	oui
Patient 7	non	oui
Patient 8	non	non
Patient 9	non	non
Patient 10	non	non
Patient 11	non	oui
Patient 12	non	non
Patient 13	non	non
Patient 14	non	non
Patient 15	non	non
Patient 16	non	oui
Patient 17	non	non
Patient 18	non	oui
Patient 19	non	oui
Patient 20	non	non
Patient 21	non	oui
Patient 22	non	non
Patient 23	non	oui
patient 24	oui	oui

Un test de Khi-deux de MacNemar a été utilisé pour vérifier l'indépendance de deux échantillons avec le tableau de contingence suivant :

Tableau 9 de contingence

	Positif	non positif
Prélèvement spontanés	2	22
Prélèvement induits	12	12

Avec les résultats suivants :

- McNemar's chi-square = 8.1,
- P value = 0.004427

Nous concluons, pour un risque d'erreur à priori alpha à 0.05, qu'il existe une différence significative entre les deux prélèvements (spontané et induit) en termes de culture positive (p=0.004).

Nous avons voulu mettre en évidence la présence des germes pathogènes et pathogènes opportunistes susceptibles de provoquer des crises ou des exacerbations de l'asthme. L'analyse du tableau N° 7 montre que le nombre de cultures positives dans les crachats induits est supérieur à celui des crachats spontanés, cela pourrait s'expliquer par la difficulté, dans le cas du crachat spontané, du patient à cracher spontanément chez certains malades et par le volume réduit de ce dernier par-rapport au crachat induit.

VII Résultats et discussion

VII.1 Résultats

VII.1.1 Etude macroscopique

Une fois les prélèvements arrivés au laboratoire, l'analyse macroscopique des crachats induits et spontanés est réalisée. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 10. Critères macroscopiques des crachats spontanés chez les malades asthmatiques.

	Mu q	MP ur	Sal	Visq	Adh é	Cou l	Hé ma	Liq ui			Mu q	MP ur	Sal	Visq	Adh é	Cou l	Hé ma	Liq ui
1	+	-	-	-	-	J	-	+		22	-	-	-	+	-	T	-	-
2	-	-	-	+	-	T	+	+		23	-	-	-	+	-	T	-	-
3	-	-	-	+	-	T	+	+		24	-	-	-	+	-	T	-	-
4	+	-	-	-	-	J	-	-		25	-	-	+	-	-	T	-	+
5	-	-	-	-	-	T	-	+		26	-	-	+	-	-	T	-	+
6	-	-	-	+	-	T	-	-		27	-	-	+	-	-	T	-	+
7	-	-	-	+	-	T	-	-		28	-	-	+	-	-	T	-	+
8	-	-	-	+	-	T	-	-		29	N	N	N	N	N	N	N	N
9	-	-	-	+	-	T	-	-		30	N	N	N	N	N	N	N	N
10	-	-	-	+	-	B	-	-		31	-	-	+	-	-	T	-	+
11	+	+	-	+	+	J	-	-		32	N	N	N	N	N	N	N	N
12	-	-	-	-	-	T	-	+		33	N	N	N	N	N	N	N	N
13	-	-	-	+	-	T	-	-		34	-	-	+	-	-	T	-	+
14	-	-	-	+	-	T	-	-		35	-	-	+	-	-	T	-	+
15	-	-	-	+	-	T	+	-		T1	-	-	-	+	-	T	-	-
16	+	-	-	+	-	T	-	-		T2	-	-	-	+	-	T	-	-
17	-	-	-	+	-	T	-	-		T3	-	-	-	+	+	B	-	-
18	-	-	-	+	-	T	-	-		T4	-	-	-	+	+	B	-	-
19	-	-	-	+	-	B	-	-		T5	-	-	-	+	-	T	-	-
20	-	-	-	+	-	B	-	-		T6	-	-	-	+	+	B	-	-
21	-	-	-	+	-	T	-	-										

Légende : N : Non fait, T : Transparent, B : Blanchâtre, J : Jaunâtre, Muq : muqueuse, MPur : mucopurulent, Sal: salivaire, Visq : visqueux, Adhé : adhérent, Coul : couleur, Héma : Hématique

L'analyse du tableau révèle que dans notre étude il ya :

- 4 patients (29, 30, 32 et 33) chez qui nous avons réalisé uniquement des prélèvements induits
- Les prélèvements des 7 patients (25, 26, 27, 28, 31, 34 et 35) sont non conformes (nombre de cellules épithéliales est supérieur à 10)
- 3 patients (1, 4 et 16) présentent des prélèvements muqueux et 1 prélèvement (11) mucopurulent

Nous avons observé de petite quantité de sang dans les prélèvements (4 et 5) probablement due à une irritation de la gorge lors du prélèvement.

Tableau 11. Critères macroscopiques des crachats induits chez les malades asthmatiques.

	Muq	MPur	Sal	Visq	Adhé	Coul	Héma	Liqui			Muq	MPur	Sal	Visq	Adhé	Coul	Héma	Liqui
1	+	-	-	-	-	T	-	+		22	-	-	-	+	-	T	-	-
2	-	-	-	+	+	T	+	-		23	-	-	-	+	-	T	-	-
3	-	-	-	+	+	J	+	-		24	-	-	-	+	-	T	-	-
4	+	-	-	-	-	B	-	+		25	-	-	+	-	-	T	-	+
5	-	-	-	-	-	T	-	+		26	-	-	+	-	-	T	-	+
6	-	-	-	+	-	T	-	-		27	-	-	+	-	-	T	-	+
7	-	-	-	+	-	T	-	-		28	-	-	+	-	-	T	-	+
8	-	-	-	+	+	T	-	-		29	-	-	-	-	+	J	-	-
9	-	-	-	+	-	T	-	-		30	-	-	-	-	+	J	-	-
10	-	-	-	+	-	T	-	-		31	-	-	+	-	-	T	-	+
11	-	+	-	+	+	J	-	-		32	-	-	-	-	+	J	-	-
12	-	-	-	-	-	T	-	+		33	-	-	-	-	-	J	-	-
13	-	-	-	+	-	T	-	-		34	-	-	+	-	-	T	-	+
14	-	-	-	+	-	T	-	-		35	-	-	+	-	-	T	-	+
15	-	-	-	+	-	T	+	-		T1	-	-	-	+	-	T	-	-
16	+	-	-	+	-	T	-	-		T2	-	-	-	+	-	T	-	-
17	-	-	-	+	+	T	-	-		T3	-	-	-	+	+	B	-	-
18	-	-	-	+	-	T	-	-		T4	-	-	-	+	+	B	-	-
19	-	-	-	+	+	J	-	-		T5	-	-	-	+	-	T	-	-
20	-	-	-	+	-	B	-	-		T6	-	-	-	+	+	B	-	-
21	-	-	-	+	-	T	-	-										

T : Transparent, B : Blanchâtre, J : Jaunâtre, Muq : muqueuse, MPur : mucopurulent, Sal : salivaire, Visq : visqueux, Adhé : adhérent, Coul ; couleur, Héma : Hématique

L'analyse du tableau a révélé que dans notre étude il ya :

- Les prélèvements des 7 patients non conformes (nombre de cellules épithéliales est supérieur à 10)
- 3 patients (1, 4, 16) présentent des prélèvements muqueux et 1 prélèvement (11) mucopurulent
- Sang en très petite quantité dans les prélèvements (2, 3, 15) probablement due à une irritation de la gorge lors du prélèvement.

VII.1.2 Etude cytologique

Les résultats de l'étude cytologique sont représentés dans les tableaux suivants

Tableau 12. Les résultats de l'étude cytologique des crachats spontanés des patients asthmatiques et des sujets sains.

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CE	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
L	<25	<25	<25	>25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	>25	<25	<25	<25
F	++	+	++	+	+	+	+	++	+	+++	+++	+	+	+
GR	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
CE	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	>10	>10	>10	>10
L	<25	<25	<25	<25	>25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
F	++	+	+	++	++	++	++	+	+	++	+	+	+	+
GR	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N	29	30	31	32	33	34	35	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
CE	N	N	>10	N	N	>10	>10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
L	N	N	<25	N	N	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	
F	N	N	++	N	N	+	+	++	+++	++	+	++	++	
GR	N	N	-	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-	

N : Non fait, CE : cellules épithéliales, L : leucocytes, F : flore, GR : globules rouges

L'étude cytologique des crachats spontanés des patients asthmatiques et sujets sains a permis les observations suivantes

- Les prélèvements (25, 26, 27, 28, 31, 34 et 35) présentent un nombre de cellules épithéliales supérieur à 10
- Les patients N° (4, 11, 19) présentent un nombre de leucocytes supérieur à 25
- La flore bactérienne est présente avec une abondance variable dans les différents prélèvements.

Tableau 13. Les résultats de l'étude cytologique des crachats induits des patients asthmatiques et sujets sains.

N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CE	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	>10	<10	<10
L	<25	<25	<25	>25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	>25	<25	<25	<25
F	++	+	+	++	+	+	+	+	++	+++	+++	+	+	+
GR	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
CE	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	>10	>10	>10	>10
L	<25	<25	<25	<25	>25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
F	++	+	+	+	++	++	+	++	+	++	+	+	+	+
GR	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N	29	30	31	32	33	34	35	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
CE	<10	<10	<10	<10	<10	>10	>10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
L	>25	>25	<25	>25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	
F	++	++	++	+++	++	+	++	++	++	++	+	++	++	
GR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

CE : cellules épithéliales, **L** : leucocytes, **F** : flore, **GR** : globules rouges (Hématies)

L'étude cytologique des crachats induits a permis les observations suivantes

- A éliminé les prélèvements (25, 26, 27, 28, 34 et 35) présentant un nombre de cellules épithéliales supérieur à 10
- Les patients N° (4, 11, 19, 29, 30 et 32) présentent un nombre de leucocytes supérieur à 25
- La flore bactérienne est présente avec une abondance variable dans les différents prélèvements.

Lors de l'observation directe du crachat spontané du malade N°4, nous avons observé une forme de microorganisme eucaryote, il s'agit d'un champignon extérieur pathogène des végétaux (tomate) : *Alternaria spp.*

Alternaria est une moisissure de plus en plus reconnue comme un facteur de risque de développement, de persistance, de gravité de l'asthme et d'exacerbations potentiellement fatales de l'asthme (78).



Figure 12. Photographie représentant *Alternaria spp* observé dans le crachat spontané d'un patient asthmatique (N°4).

Les photographies suivantes représentent l'observation microscopique des cellules épithéliales, des leucocytes et les levures dans les crachats des patients asthmatiques.

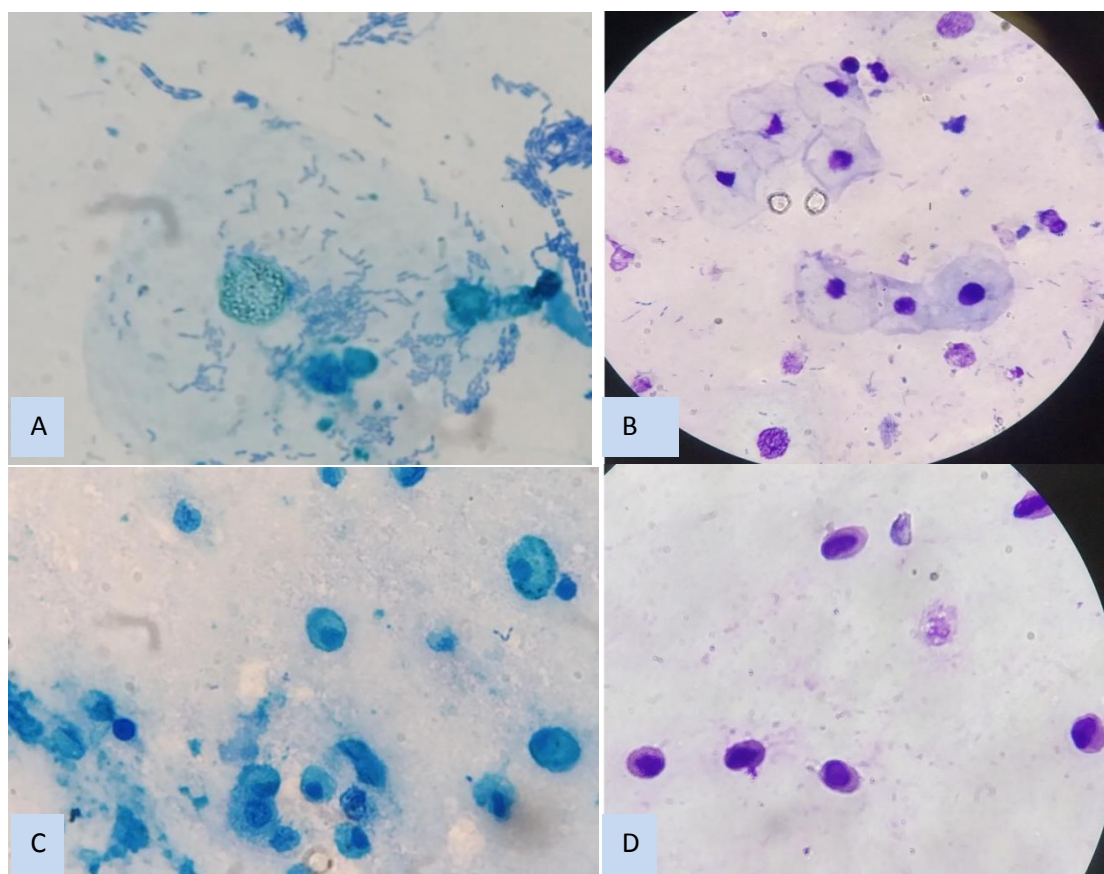


Figure 13. Observation des cellules épithéliales et de leucocytes avec la coloration au bleu de méthylène et de May-Grunwald Giemsa présent dans les crachats des malades asthmatiques **A)** Cellules épithéliales colorées au bleu de méthylène observées sous microscope optique à émergence **B)** image représentative des cellules épithéliales après coloration May-Grunwald Giemsa (G x 400), **C)** Leucocytes colorés au bleu de méthylène observés sous microscope optique (Gx400), **D)** Leucocytes colorés au May-Grunwald Giemsa observés sous microscope optique (Gx400).

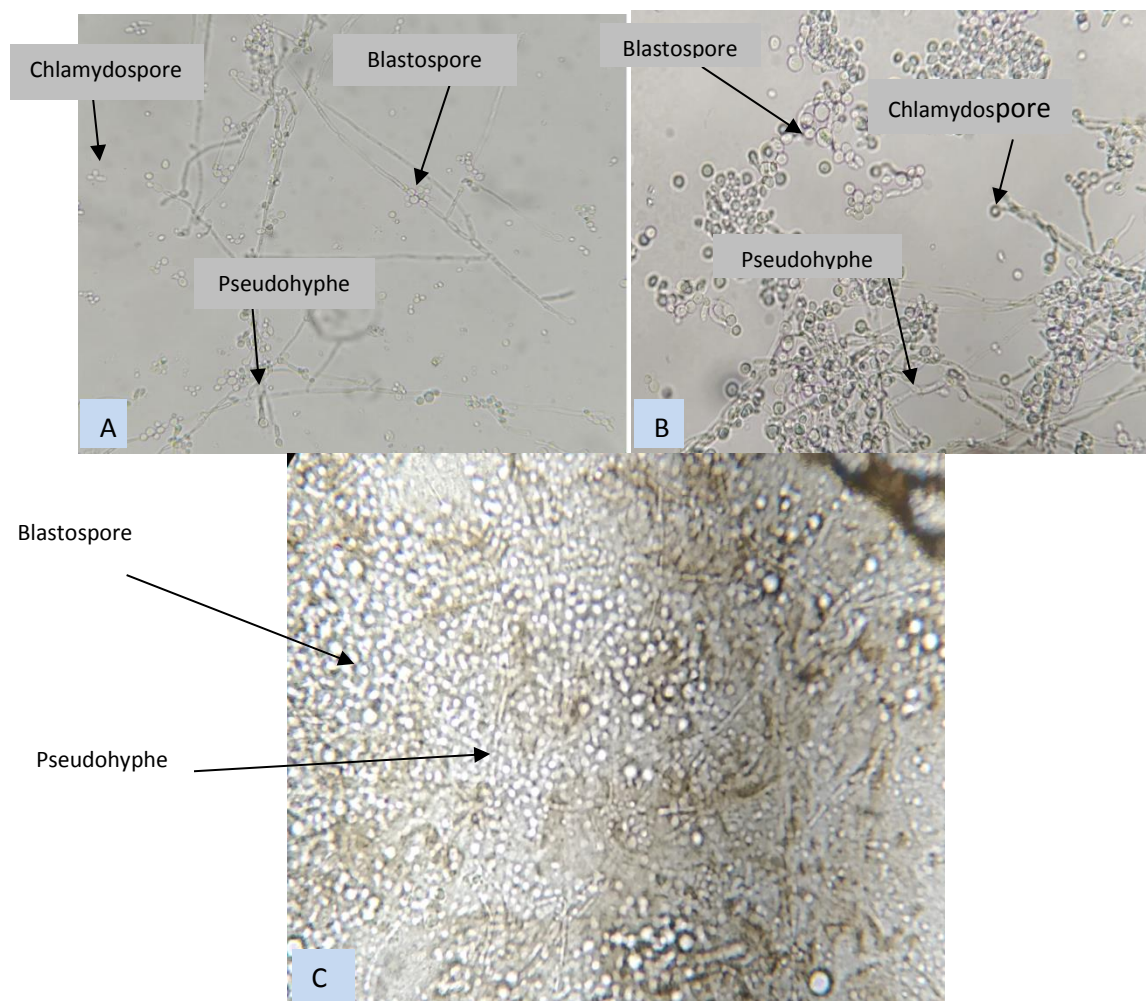


Figure 14. *Candida albicans* dans sa forme invasive chez des patients asthmatiques à l'état frais
A) *C. albicans*, forme bourgeonnante, dans le crachat spontané d'un malade (N° 22), **B** *C. albicans*, forme bourgeonnante, dans le crachat induit d'un malade (N° 21), **C)** *C. albicans*, formation d'un biofilm dans les crachats spontané du malade (N°20). Observation sous microscope (G x400).

VII.1.3 Etude microbiologique

Tableau 14. Les résultats des cultures des crachats spontanés et induits des patients asthmatiques sur les différents milieux de culture.

Germe		Spontané			Induit	
	Total	Pourcentage %	N° de malade	Total	Pourcentage %	N° de malade
<i>S.aureus</i>	11	46	1-2-5-6-7-8-15-18-19-20-23	13	54	1-2-5-6-7-8-12-15-18-19-21-23-24
<i>Streptococcus spp</i>	20	83	1-2-3-4-5-7-8-9-10-11-12-13-14-15-16-17-18-19-23-24	23	96	1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-15-16-17-18-19-21-22-23-24
<i>Streptocoque G</i>	2	8	5-8	3	13	5-8-16
<i>Streptocoque C</i>	1	4	19	1	4	19
<i>Staphylococcus spp</i>	8	33	4-9-11-12-13-14-16-24	7	29	4-9-11-12-13-14-16
<i>S.viridans</i>	0	0	0	1	4	5
<i>Enterococcus</i>	22	92	2-3-4-5-6-7-8-9-11-12-13-14-15-16-17-18-19-20-21-22-23-24	22	92	1-2-3-4-5-6-7-8-9-11-12-13-14-15-16-17-18-19-20-22-23-24
<i>Micrococcus</i>	3	13	1-5-18	5	21	2-5-12-23-24
<i>Enterobacteries</i>	9	38	3-6-7-9-11-17-18-20-22	9	38	3-4-7-9-10-17-18-20-22
<i>E.coli</i>	3	13	6-9-22	3	13	4-9-22
<i>C.albicans</i>	11	46	9-10-13-14-17-18-20-21-22-23-24	12	50	9-10-13-14-15-17-18-20-21-22-23-24
<i>Candidat spp</i>	4	17	2-4-11-15	2	8	2-4
<i>K.pneumoniae</i>	1	4	11	1	4	11
<i>P.aeroginosae</i>	0	0	0	1	4	2
<i>P.putida</i>	0	0	0	1	4	19
<i>Morexella</i>	1	4	6	1	4	6
<i>Bacillus</i>	2	8	21-22	2	8	21-22
<i>Neisseria spp</i>	0	0	0	1	4	8
<i>Alcaligines fecalis</i>	1	4	13	1	4	13
<i>Alternaria spp</i>	1	4	4	0	0	0

Le tableau ci-dessus montre :

- Les germes retrouvés dans les deux types de prélèvements
- Le pourcentage de leurs présences dans les deux types de prélèvements

On note la prédominance des Streptocoques spp (non hémolytique) et les Entérocooccus, on a aussi retrouve *Staphylococcus aureus* et le *Candida albicans* à des taux de 46 % dans les crachats spontanés, 50% dans les crachats induits. Les germes *K. pneumoniae*, *P. aeruginosae*, *P. putida*, *Moraxella*, *Bacillus*, *Neisseria* spp, *Alcaligines fecalis* sont retrouvés à des taux faibles.

Tableau 15. Les résultats des cultures des crachats spontanés et induits des sujets témoins sains sur les différents milieux de culture.

Témoins	Germes retrouvés	
	Spontané	Induit
T1	- <i>Streptococcus non hémolytique</i> . - <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus non hémolytique</i> . - <i>Staphylococcus</i> spp. - <i>Enterococcus</i> .
T2	<i>Streptococcus non hémolytique</i> . - <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus non hémolytique</i> . - <i>Staphylococcus</i> spp. - <i>Enterococcus</i> .
T3	<i>Streptococcus non hémolytique</i> . - <i>Staphylococcus</i> spp. - <i>Enterococcus</i> . - <i>Pseudomonas</i> .	<i>Streptococcus non hémolytique</i> . - <i>Staphylococcus</i> spp. - <i>Enterococcus</i> .
T4	<i>Streptococcus non hémolytique</i> . - <i>Staphylococcus aureus</i> . - <i>Enterococcus</i> .	<i>Streptococcus non hémolytique</i> . - <i>Staphylococcus aureus</i> . - <i>Enterococcus</i> .
T5	<i>Streptococcus non hémolytique</i> . - <i>Staphylococcus</i> spp. - <i>Enterococcus</i> .	<i>Streptococcus non hémolytique</i> . - <i>Staphylococcus</i> spp. - <i>Enterococcus</i> .
T6	- <i>Staphylococcus aureus</i> . - <i>Enterococcus</i> . - <i>Neisseria</i> (probablement).	<i>Streptococcus non hémolytique</i> . - <i>Staphylococcus aureus</i> . - <i>Enterococcus</i> .

Les photographies suivantes représentent les différents germes retrouvés dans chaque milieu de culture

VII.1.3.1 Sur gélose au sang frais

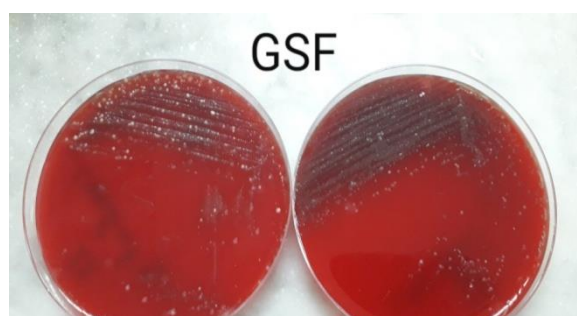


Figure 15. Culture sur la gélose au sang frais de crachat spontané et induit d'un patient asthmatique N°18.

VII.1.3.2 Sur gélose au sang cuit

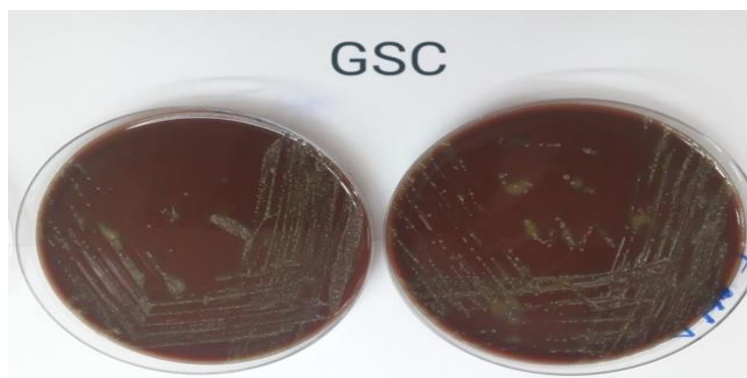


Figure 16. Culture sur la gélose au sang cuit de crachat spontané et induit d'un patient asthmatique N°6.

VII.1.3.3 Sur milieu Hektoen

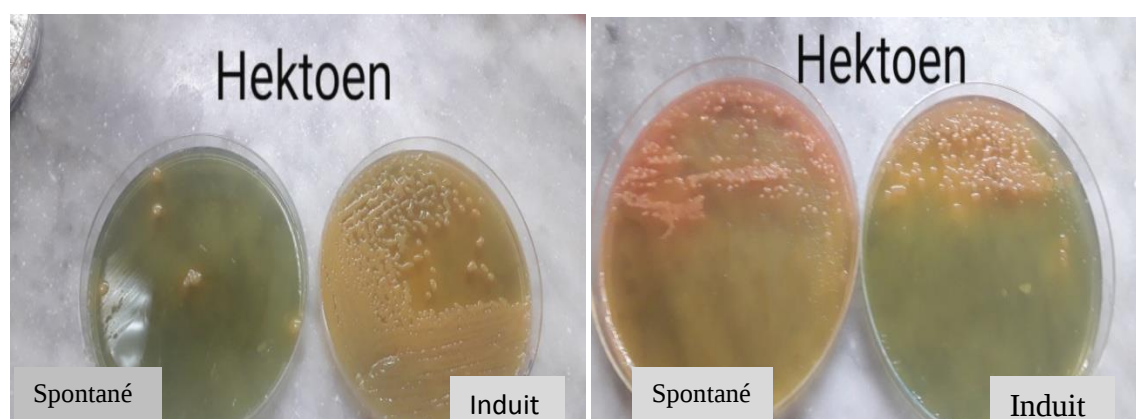


Figure 17. Culture sur milieu Hektoen des crachats spontanés et induits des patients asthmatiques N°11 (à gauche *K pneumoniae*) et N°22 (à droite *E coli*).

VII.1.3.4 Sur milieu Chapman

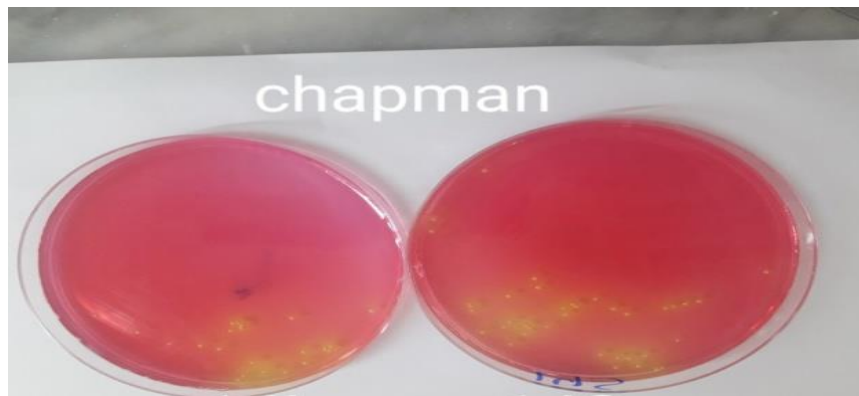


Figure 18. Culture sur milieu Chapman de crachat spontané et induit d'un patient asthmatique N°6.

VII.1.3.5 Sur gélose nutritive

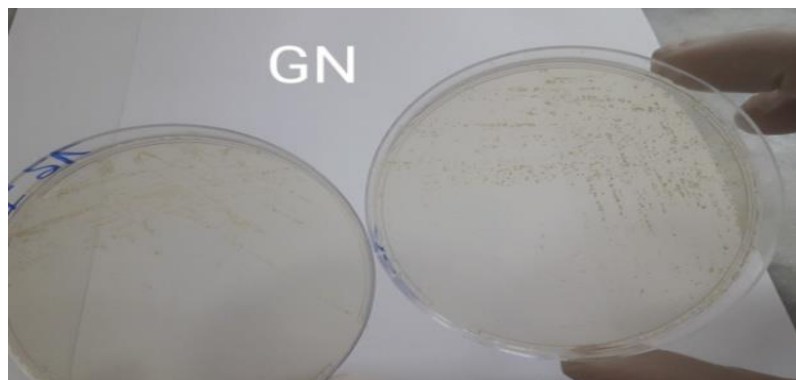


Figure 19. Culture sur la gélose nutritive de crachat spontané et induit du patient asthmatique N°8.

VII.1.3.6 Sur gélose BEA

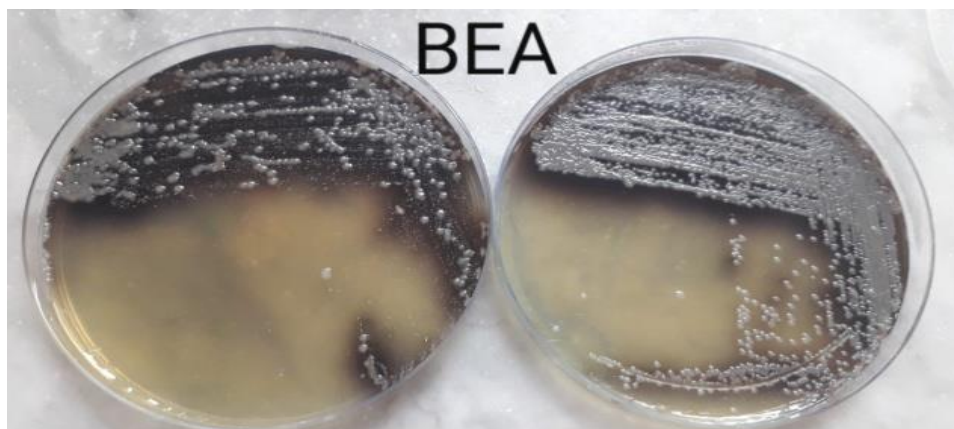


Figure 20. Culture sur la gélose BEA de crachat spontané et induit d'un patient asthmatique N°22.

VII.1.3.7 Sur gélose chromogène

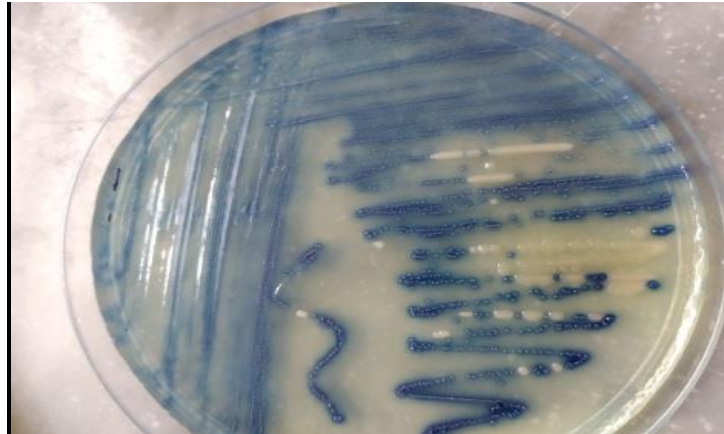


Figure 21. Culture sur la gélose chromogène de crachat spontané d'un patient asthmatique.

VII.1.3.8 Sur milieu BCP

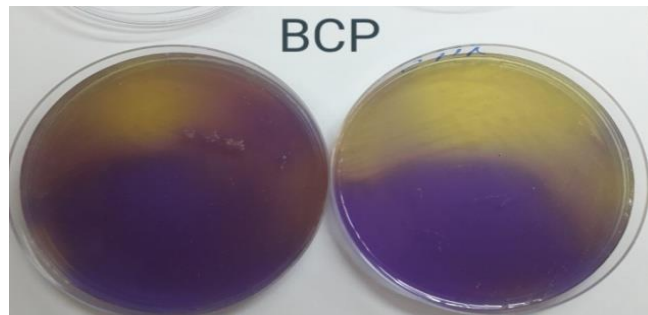


Figure 22. Culture sur la gélose BCP de crachat spontané et induit d'un patient asthmatique N°6.

VII.1.3.9 Sur milieu Sabouraud



Figure 23. Culture sur la gélose Sabouraud de crachat spontané et induit du patient asthmatique N°22.

➤ Teste de filamentation

Sur une gélose Sabouraud positive on réalise le teste de filamentation pour identifier le *Candida albicans*

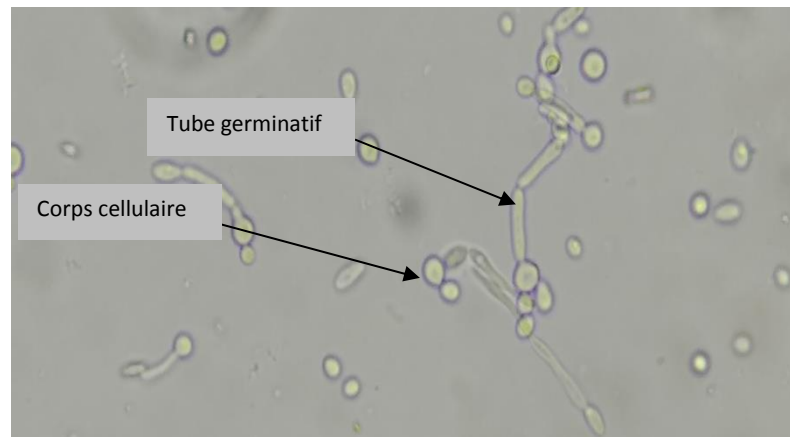


Figure 24. Résultat positif d'un test de filamentation réalisé sur des colonies isolées à partir du milieu Sabouraud d'un crachat induit (patient N° 20).

Sur cette photographie, on observe les corps cellulaires des levures présentant un tube germinatif, par conséquent il s'agit de *Candida albicans*.

VII.1.3.10 Identification des germes retrouvés dans les différents milieux

❖ Etat frais et coloration de Gram

L'observation microscopique des bactéries à l'état frais et à la coloration de Gram, nous oriente vers d'autres tests d'identification

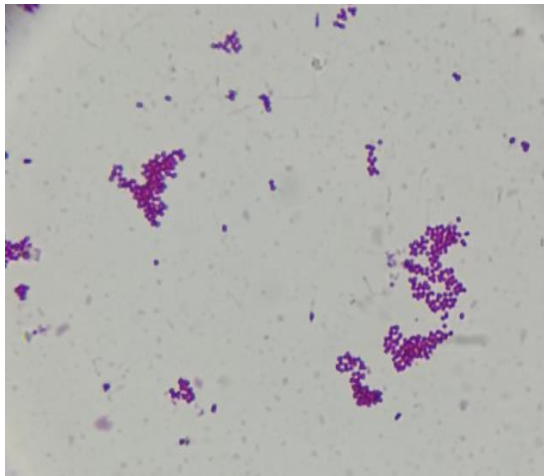


Figure 25. Image représentative du résultat d'une coloration de Gram pour les colonies apparues sur milieu Chapman (cocci Gram positif).

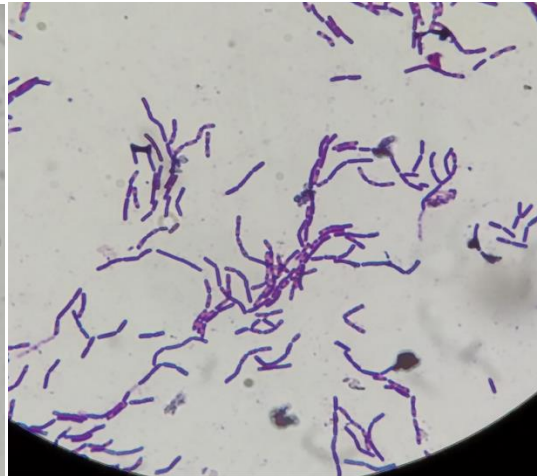


Figure 26. Image représentative du résultat d'une coloration de Gram pour les colonies apparues sur gélose au sang frais (bacille Gram positif).

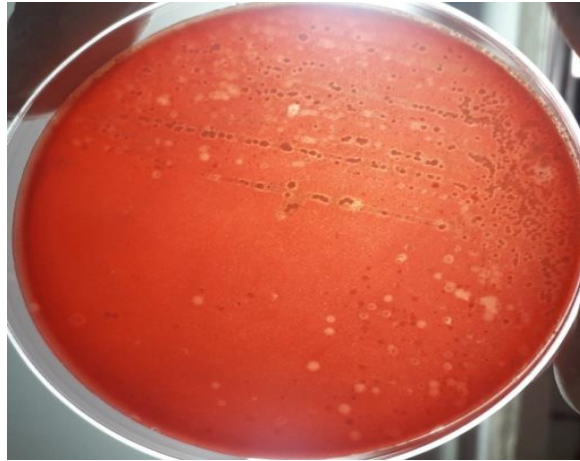


Figure 27. Image représentative des colonies hémolytiques d'une culture positive à partir d'un crachat induit d'un patient asthmatique.



Figure 28. Colonies hémolytiques sur gélose au sang frais, réisolement à partir d'une culture de crachat induit d'un patient N°16 ensemencé sur gélose au sang frais.



Figure 29. Image représentative des colonies hémolytiques, réisolement à partir d'une culture sur milieu Chapman



Figure 30. Image représentative des colonies non hémolytiques, réisolement à partir d'une culture sur milieu Chapman

- **Sérotypage :**

Les colonies B hémolytiques sont réisolées pour avoir une culture pure, les bactéries obtenues sont ensuite observées au microscope optique, avec la coloration de Gram

- Si on observe des cocci Gram+ en chainettes, on réalise le test de Sérotypage pour l'identification du groupe.

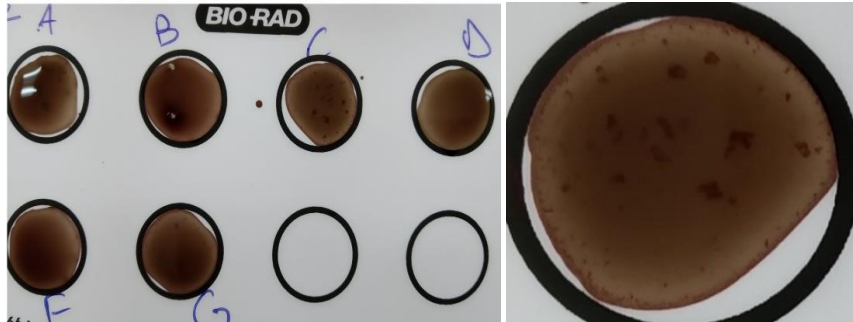


Figure 31. Résultat d'un test de sérotypage pour l'identification des streptocoques B hémolytiques (classification de Lancefeild). Dans ce test il s'agit de *streptococcus* du groupe C.

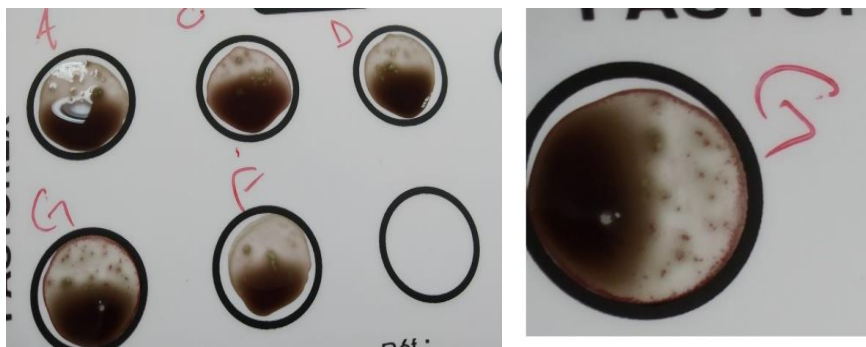


Figure 32. Résultat d'un test de sérotypage pour l'identification des streptocoques B hémolytiques (classification de Lancefeild). Dans ce test il s'agit de *streptococcus* du groupe G.

Si on observe des cocci Gram+ en amas après coloration de gram et un test à la catalase positif on réalise le test de Sérotypage pour l'identification *staphylococcus aureus*.



Figure 33. Résultat du test de sérotypage pour l'identification de *staphylococcus aureus*.

❖ Recherche des enzymes respiratoires

➤ Test à l'oxydase

Le test à l'oxydase nous permet d'orienter l'identification vers un groupe ou une famille bactérienne, ainsi chez les bacilles Gram - avec une oxydase - on utilise l'Api E 20 pour l'identification des Entérobactéries, par contre chez les bacilles Gram- oxydase + on utilise l'Api NE 20

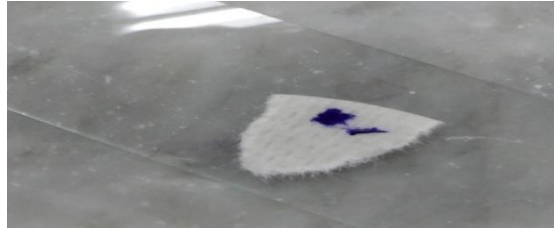


Figure 34. Test positif à la recherche de l'oxydase chez les colonies développées sur milieu Hektoen.

➤ Test à la catalase

Le test à la catalase est surtout utilisé pour différencier entre les streptocoques (catalase) et les staphylocoques (catalase +).



Figure 35. Résultat positif de la recherche de la catalase chez les colonies retrouvées sur le milieu Chapman.

❖ Recherche de la Coagulase

Recherche de la coagulase chez Les colonies retrouvées sur milieu Chapman.

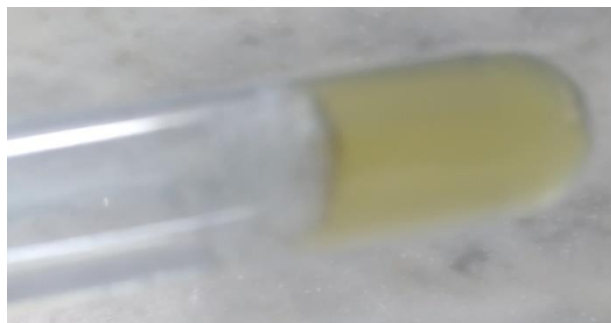
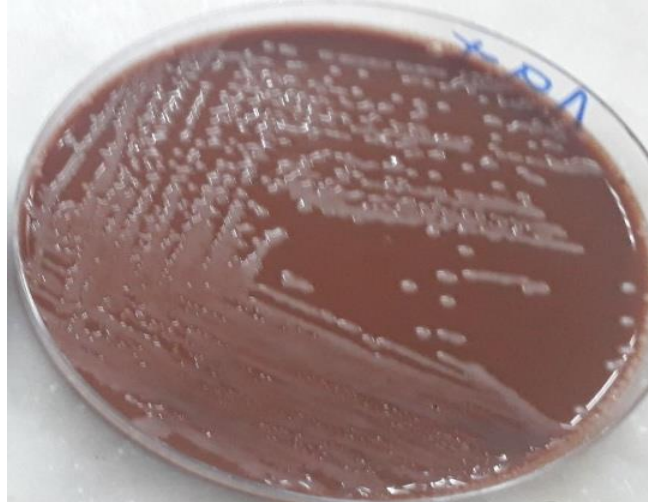


Figure 36. Résultat positif de la recherche de la coagulase chez les colonies retrouvées sur le milieu Chapman.

❖ *Galerie d'identification biochimique*

➤ *Galerie Api 20 E*

- Souche isolée à partir d'un patient N° 11



Après l'observation macroscopique des colonies, nous avons réalisé

- ✓ Observation à l'état frais et à la coloration Gram ont montrés des bacilles Gram négatif
- ✓ Test à l'oxydase négatif

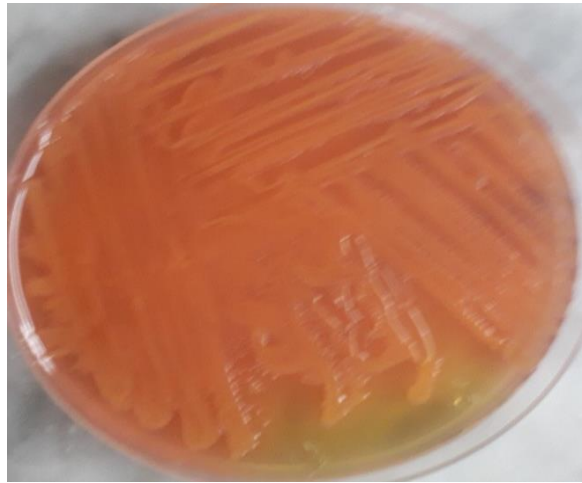
Les résultats de ces tests conduisent à la suspicion d'une entérobactérie et à partir de cette culture nous avons ensemencé la galerie Api 20 E



Figure 37. Résultats de l'ensemencement de la galerie Api 20 E d'une souche isolée sur milieu Hektoen d'un crachat induit du malade N°11.

L'identification de la souche analysée par l'Api 20 E est effectuée par un logiciel d'identification Bio-Mérieux qui a identifié *klebsiella pneumoniae*.

- Souche isolée à partir d'un malade N°22



Après l'observation macroscopique des colonies, nous avons réalisé

- ✓ Observation à l'état frais et à la coloration Gram ont montrés des coccobacilles Gram négatif
- ✓ Test à l'oxydase négatif

Les résultats de ces tests conduisent à la suspicion d'une entérobactérie et à partir de cette culture nous avonsensemencé la galerie Api 20 E

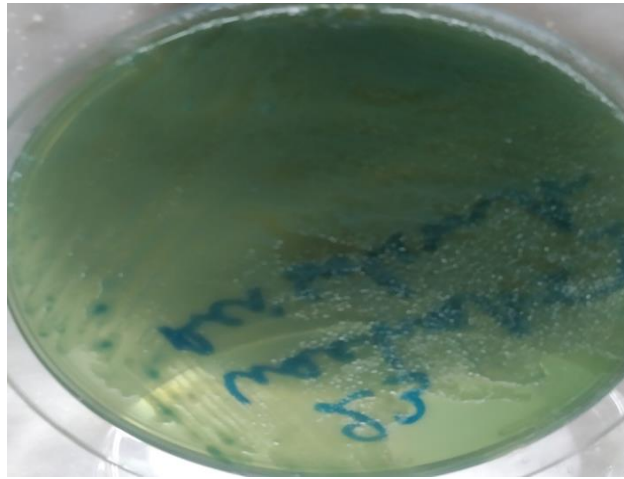


Figure38. Résultats de l'ensemencement de la galerie Api 20 E d'une souche isolée sur milieu Hektoen d'un crachat induit du malade N°22.

L'identification de la souche analysée par l'Api 20 E est effectuée par un logiciel d'identification Bio-Mérieux qui a identifié *Escherichia coli*.

➤ *Galerie Api 20 NE*

-Souche isolée à partir d'un patient N° 13



Après l'observation macroscopique des colonies, nous avons réalisé

- ✓ Observation à l'état frais et à la coloration Gram ont montrés des bacilles Gram négatif
- ✓ Test à l'oxydase positif

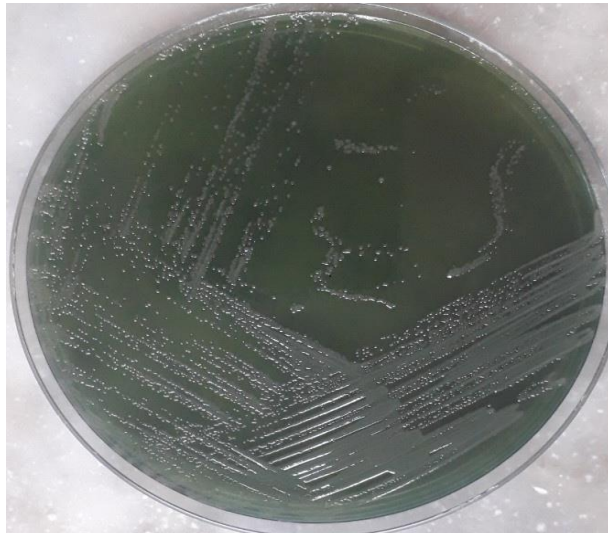
Suite aux résultats de ces tests et à partir de cette culture nous avonsensemencé la galerie Api 20 NE



Figure 39. Résultats de l'ensemencement de la galerie Api 20 NE d'une souche isolée sur milieu Hektoen d'un crachat induit du malade N° 13.

L'identification de la souche analysée par l'Api 20 NE est effectuée par un logiciel d'identification Bio-Mérieux qui a identifié *Alcaligenes faecalis*.

- Souche isolée à partir d'un patient N° 19



Après l'observation macroscopique des colonies, nous avons réalisé

- ✓ Observation à l'état frais et à la coloration Gram ont montrés des bacilles Gram négatif
- ✓ Test à l'oxydase positif

Suite aux résultats de ces tests et à partir de cette culture nous avons ensemencé la galerie Api 20 NE pour l'identification des bacilles gram négatif non entérobactéries.



Figure 40. Résultats de l'ensemencement de la galerie Api 20 NE d'une souche isolée sur milieu Hektoen d'un crachat induit du malade N°19.

L'identification de la souche analysée par l'Api 20 NE est effectuée par un logiciel d'identification Bio-Mérieux qui a identifié *Pseudomonas putida* avec une probabilité de 40 %.

➤ *Galerie Api NH*

-Souche isolée à partir du patient N° 6



Après l'observation macroscopique des colonies, nous avons réalisé

- ✓ Observation à l'état frais et à la coloration Gram ont montrés des cocci Gram négatif
- ✓ Test à la catalase positif
- ✓ Test à l'oxydase positif

Suite aux résultats de ces tests, et à partir de cette culture nous avons ensemencé la galerie Api NH

A partir de cette culture on a ensemencé la galerie Api NH (c'est la galerie utilisée pour l'identification des *Neisseria* et *Haemophilus*)



Figure 41. Caractérisation biochimique par la galerie Api NH d'une souche isolée sur milieu Hektoen à partir d'un crachat induit prélevé du malade N°6.

La souche identifiée par l'API NH est *Moraxella*. L'identification est effectuée par logiciel d'identification du fournisseur Bio-Mérieux.

VII.1.3.11 *Traitement avec les antibiotiques*

➤ Souche isolée à partir de patient N° 30

Tableau 16. Résultat de l'antibiogramme de streptocoque B hémolytique isolé à partir du crachat induit du patient asthmatique (N° 30).

Symbole	Antibiotiques	Résultats	S /R
VA³⁰	Vancomycine	25	S
R	Rifampicine	31	S
C³⁰	Chloranphenicol	32	S
S³⁰	Streptomycine	25	S
RP	Pristamycine	14	R
AMP	Ampicilline	21	S
CIP	Ciprofloxacine	29	S
P¹⁰	Penicilline	20	S
TEC³⁰	Teicoplanine	21	S
CAZ³⁰	Ceftazidime	11	R
E¹⁵	Erythromycine	15	R
TE	Tetracycline	21	S
CD²	Clindamycine	0.6	R

La souche de streptocoque B hémolytique isolée de patient N°30 est résistante aux Pristamycine, Ceftazidime, Erythromycine et Clindamycine.



Figure 42. Antibiogramme réalisé sur la souche de streptocoque B hémolytique isolé à partir du crachat induit du patient asthmatique (N° 30).

➤ **Souche isolée à partir de patient 11**

Le patient N°11 est une femme enceinte à 7 mois de grossesse, hospitalisée pour exacerbation de l'asthme suite à une infection bronchique : Culture positive à *K. pneumoniae*, nombre de leucocyte supérieur à 25. Cet antibiogramme est réalisé à partir d'une culture pure sur milieu Hektoen.

Tableau 17. Résultat de l'antibiogramme de *klebsiella pneumoniae* isolée à partir du crachat induit d'un patient asthmatique 11

Symbole	Antibiotiques	Résultats	S /R
AKN	Amikacine	22	S
CZ ³⁰	Céfazoline	27	S
C ³⁰	Chloramphenicol	15	S
OF	Ofloxacin	27	S
NIF	Norfloxacin	33	S
AMP	Ampicilline	06	R
CTR ³⁰	Ceftriaxone	33	S
CL ²⁵	Colistine	25	S
CX	Céfoxitine	21	S

La souche de *klebsiella pneumoniae* isolée de patient 11 est résistante à l'ampicilline

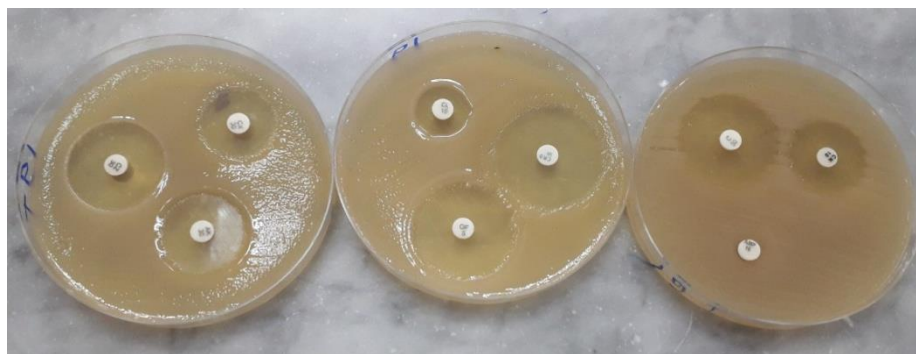


Figure 43. Antibiogramme réalisé sur la souche de *Klebsiella pneumoniae* isolée à partir du crachat induit du patient asthmatique (N°11).

➤ **Souche isolée à partir de patient 19**

Le patient N°19 présente un asthme sévère avec d'autres atteintes, le nombre de leucocyte est supérieur à 25, culture positive de *Streptococcus* du groupe C.

Tableau 18. Résultat d'antibiogramme de streptocoque B hémolytique du groupe C isolé à partir du crachat induit d'un patient asthmatique 19.

Symbole	Antibiotiques	Résultats	S /R
CTR ³⁰	Ceftriaxone	30	S
E ¹⁵	Erythromycine	0.6	R
P ¹⁰	Penicilline G	29	S
VA ³⁰	Vancomycine	27	S
TEI ³⁰	Teicoplanine	20	S
CD ²	Clindamycine	06	R
HLG ¹²⁰	Gentamicine	27	S
TE ³⁰	Tetracycline	31	S
DO ³⁰	Doxycycline	34	S

La souche de streptocoque B hémolytique du groupe C isolée de patient 19 est résistante à Erythromycine et Clindamycine



Figure 44. Antibiotogramme de streptocoque B hémolytique du groupe C isolé à partir du crachat induit du patient asthmatique (N°19).

➤ **Souche isolée à partir de patient N° 24**

Patient N° 24 a été hospitalisé pour exacerbation de l'asthme. L'analyse des crachats du patient a montré un nombre de leucocytes inférieur à 25, un antibiogramme a été réalisé car nous avons observé une culture importante d'*Entérocooccus* sur le milieu Bille Esculine.

Tableau 19. Résultat d'antibiogramme de l'*Entérocooccus* isolé à partir du crachat spontané d'un patient asthmatique N° 24.

Symbole	Antibiotiques	Résultats	S /R
HLG ¹²⁰	Gentamicine	23	S
VA ³⁰	Vancomycine	22	S
CIP ⁵	Ciprofloxacine	22	S
C ³⁰	Chloramphenicol	27	S
CD ²	Clindamycine	06	R
P ¹⁰	Penicilline	29	S
CTX ³⁰	Céfotaxime	30	S
E ¹⁵	Erythromycine	06	R
AMP ¹⁰	Ampicilline	27	S

La souche de l'*Entérocooccus* isolée de patient N° 24 est résistante à la Clindamycine et à l'Erythromycine.



Figure 45. Antibiogramme réalisé sur l'*Entérocooccus* isolée à partir du crachat spontané du patient asthmatique (N° 24)

➤ **Souche isolée à partir de patient 22**

Tableau 20. Résultats de l'antibiogramme d'*Escherichia coli* isolé à partir du crachat spontané d'un patient asthmatique (N°22).

Symbole	Antibiotiques	Résultats	S /R
AKN	Amikacine		S
AMX ²⁵	Amoxicilline /Acide clavulanique		R
CTX ³⁰	Céfotaxime		I
NA ³⁰	Acide nalidixique		R
COT/SXT	Trimethoprim /sulfamethoxazole		R
AMP	Amoxicilline		R
CZ ³⁰	Céfazoline		R
CL ²⁵	Colistine		S
TI ⁷⁵	Ticarcilline		R
CIP	Ciprofloxacine		R

La souche *Escherichia coli* isolée du patient 22 est une souche multirésistante car elle est résistante aux antibiotiques suivants : Amoxicilline, Acide clavulanique, Amoxicilline, Céfazoline, Ticarcilline, Ciprofloxacine, Acide nalidixique, Trimethoprim, sulfamethoxazole.

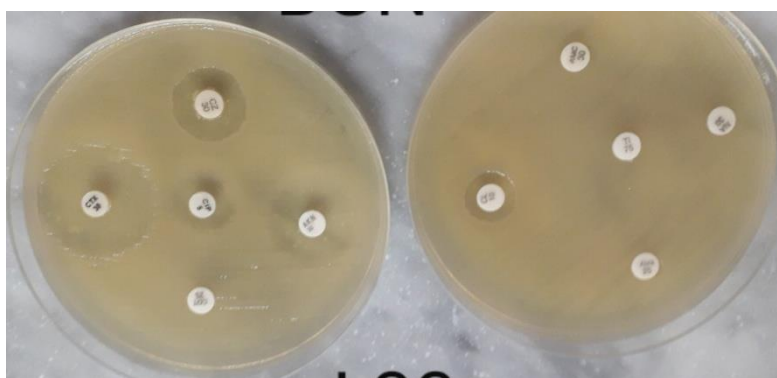


Figure 46. Antibiogramme réalisé sur *Escherichia coli* isolée à partir du crachat spontané d'un patient asthmatique (N°22).

➤ **Souche isolée à partir de témoin T3**

Tableau 21. Résultats de l'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa* isolé à partir du crachat spontané du témoin sain (T3).

Symbole	Antibiotiques	Résultats	S /R
AK ³⁰	Amikacine	21	S
CAZ ³⁰	Ceftazidime	22	S
HLG ¹²⁰	Gentamicine	22	S
TOB ¹⁰	Tobramycine	23	S
DO ³⁰	Doxycycline	0.8	R
CZ ³⁰	Céfazoline	0.6	R
CL ²⁵	Colistine	13	S
PIR	Piperacilline	23	S
TCC ^{75/10}	Ticarcilline /acide clavulanique	23	I

La souche *Pseudomonas aeruginosa* isolée de Témoin est une souche résistante aux Doxycycline, Céfazoline et intermédiaire à Ticarcilline /acide clavulanique.

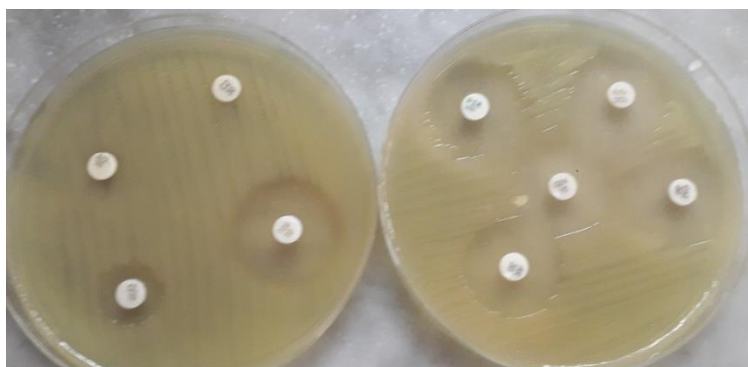


Figure 47. Antibiogramme de la souche *Pseudomonas aeruginosa* isolée à partir du crachat spontané d'un sujet sain (T3).

VII.2 Discussion

Notre étude a porté sur la caractérisation des infections respiratoires de 35 patients asthmatiques d'âge adulte et 6 sujets témoins sains. Nous avons effectué un nombre de 78 prélèvements d'expectorations de deux types, spontané et induit sur chaque participant. Un intervalle de 30 mn est observé entre les deux types de prélèvements.

Suite à l'étude cytologique nous avons éliminé 14 prélèvements (7 spontanés et 7 induits) dont le nombre de cellules épithéliales est supérieur à 10.

Pour réaliser une étude cytot bactériologique des crachats (pour un but de diagnostique ou de recherche) chez un sujet asthmatique, il faut analyser les sécrétions provenant des voies aériennes inférieures de ce fait la question qui se pose : quel est le prélèvement à utiliser pour optimiser cette analyse, le prélèvement spontané ou le prélèvement induit ?

Un prélèvement est dit spontané lorsque le patient peut produire des crachats spontanément provenant des voies aériennes inférieures, cependant ce n'est pas tous les patients qui savent cracher. Parallèlement à cela, le prélèvement induit tel que nous l'avons utilisé dans cette étude, consiste à provoquer les expectorations par l'inhalation de sérum salé et les récupérer avec une toux dirigée le tout sous une supervision médicale. Le prélèvement induit est un acte non invasif et, toléré par les malades.

Actuellement il n'existe pas de méthodes standardisées concernant les expectorations induites, mais des principes généraux existent (79).

Ce qui est très intéressant dans cette étude est que nous avons réalisé les deux types de prélèvements chez le même malade cela nous permettra d'éliminer le facteur de la variabilité individuelle qui peut influencer les résultats de l'étude.

L'analyse des résultats de l'étude macroscopique et cytologique des prélèvements induits et spontanés, a montré une association entre l'aspect macroscopique muqueux et mucopurulent, l'augmentation du nombre de leucocytes et la présence de probable infection respiratoire.

Durant l'analyse cytologique, nous avons pu observer dans le crachat spontané, à l'état frais, du malade N°4, un champignon *Alternaria spp*, plus précisément la spore d'*Alternaria* spp.

Nous nous sommes intéressés à ce patient, mais le deuxième prélèvement n'a pas pu être effectué car il a été hospitalisé une semaine plus tard pour obstruction des voies aériennes. De similaires observations ont été rapportées par Robert et Bush (2004) où ils ont décrit une crise d'asthme aiguë menaçant le pronostic vital d'un patient asthmatique diagnostiqué avec une infection à *Alternaria*.

D'autre part, nous avons également observé le *C. albicans* dans sa forme bourgeonnante, qui peut être associée à une forme invasive et virulente (80), du *C. albicans* dans un prélèvement à l'état frais issu du malade N° 22.

D'une manière intéressante, nous avons observé dans les crachats spontanés du patient N°20 une probable formation d'un biofilm de *Candida albicans* (81).

I Rines en (2011) a décrit le biofilm observé sur un cathéter, il est formé de deux couches : Une couche basale formée de blastospores et une couche supérieure formée de pseudohyphes (forme filamenteuses) (voir la figure N°14 C).

L'analyse cytologique des crachats a permis de montrer que la présence et la multiplication du *Candida albicans* n'est pas corrélée avec une élévation de nombre de leucocytes.

VII.2.1 Différents germes retrouvés dans les deux types de crachats

L'analyse bactériologique des prélèvements spontanés et induits réalisée a mis en évidence divers germes bactériens et fongiques qui sont répertoriés et interprétés comme suit :

VII.2.1.1 *Streptocoque non hémolytique*

Nous avons retrouvé dans notre étude les germes *Streptococcus* et *Entérocooccus* à des fréquences très élevées qui sont de l'ordre de 83% dans les crachats spontanés et 96% dans les crachats induits pour les *Streptococcus* et de l'ordre de 92% pour les *Entérocooccus* dans les deux types de crachats.

Le *Streptococcus spp* et *Entérocooccus* sont des bactéries qui appartiennent au phylum des *Fermicutes*. En effet une étude réalisée sur la composition d'un microbiote respiratoire d'un sujet sain et d'un patient atteint d'asthme, a montré que le phylum des *Fermicutes* est plus abondant dans le microbiote d'asthmatique (69) par-rapport à celui du sujet sain (68).

Une autre étude réalisée par Huang et Boushey en(2015) portée sur les différences de microbiotes des voies aériennes entre patients asthmatiques et sujets sains, a montré que dans le phylum des *Fermicutes* , le genre *Streptococcus* est le plus abondant. Une autre étude suggère que les *Staphylococcus spp* sont présents en excès dans les voies respiratoires des patients asthmatiques (83).

Nous avons retrouvé le *streptococcus* du groupe G chez trois patients (N° 5, 8 et 16). De plus le germe a été isolé dans les deux types de crachats (spontané et induit) chez les patients 5 et 8 et seulement dans le crachat induit chez le patient N° 16. La présence de ce germe ne s'accompagne pas nécessairement par une élévation du nombre de leucocytes, cela peut s'expliquer par le fait que la charge bactérienne n'est pas importante.

Le second groupe que nous avons isolé est le *streptococcus C* dans le crachat spontané et induit du patient N°19, la présence de ce germe est corrélée à une élévation du nombre de leucocytes dans ses crachats. Ce qui témoignerait de la présence d'une infection respiratoire.

Suite à ces observations, nous avons réalisé un antibiogramme pour déterminer le profil de résistance du *streptococcus* du groupe C. Le résultat de l'antibiogramme a montré une résistance à deux antibiotiques uniquement : L'érythromycine et la clindamycine (voir tableau N° 12), une résistance similaire concernant l'érythromycine a été enregistrée par (84).

VII.2.1.2 *Staphylococcus aureus*

Dans notre, étude nous avons retrouvé cette bactérie à une fréquence de 46 % dans les crachats spontanés et à 50 % dans les crachats induits, mais la présence de celle-ci dans les crachats de malades asthmatiques n'est pas accompagnée d'une élévation du nombre de

leucocytes (Tableaux 11et12), cependant la présence de cette bactérie s'explique soit par le fait que cette dernière fait partie du microbiote respiratoire des sujets asthmatiques, ou encore, ces sujets présentent une infection latente, pouvant se réactiver dans certaines conditions.

Staphylococcus aureus est une bactérie gram positif, c'est une espèce pathogène opportuniste. Elle est capable de produire facteurs des virulences tels que les super antigènes qui induisent des résistances aux corticostéroïdes (85). Une étude réalisée par Uonget et al en (2010) sur l'association entre la colonisation par *S. aureus* des voies respiratoires et la spécificité de l'asthme, suggère que la présence de cette souche chez les patients asthmatiques augmente les besoins en corticostéroïdes, ainsi que la sensibilisation aux allergènes, comparé aux asthmatiques non infectés contribuant ainsi à l'aggravation d'asthme.

De même, Bachert et al (2012) ont montré que les IgE dirigés contre l'entérotoxine staphylococcique, retrouvés dans le sérum des patients présentant un asthme sévère, est un des facteurs de risque d'aggravation de l'asthme. Parallèlement, ils concluent que la détection de ces IgE indique une implication des super antigènes staphylococciques dans la physiopathologie des patients asthmatiques sévères.

VII.2.1.3 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae est une entérobactérie pathogène opportuniste. Elle est présente dans le tube digestif de l'homme et des animaux, elle est commensale des voies respiratoires (87). *K. pneumoniae* est un agent responsable d'infections nosocomiales en générale et néonatales particulièrement (88) .

Dans notre étude, nous avons identifié une seule souche de *Klebsiella pneumoniae* dans le crachat spontané et induit d'un patient N°11, des résultats similaires ont été rapportés par Kaci et Ziane en (2018) dans leur étude sur la caractérisation des infections respiratoires chez l'adulte asthmatique. Par ailleurs, nous avons constaté un nombre très élevé de leucocytes dans le crachat de ce patient qui a été déjà hospitalisé pour exacerbation de l'asthme. De même, une étude sur la caractérisation des germes responsables des infections lors de l'exacerbation de l'asthme a rapporté un taux d'infection par *K. pneumoniae* de 10% (89).

L'analyse du microbiote respiratoire dans le lavage broncho alvéolaire et dans les expectorations induites chez les patients asthmatiques a montré une importante différence par rapport aux témoins sains notamment dans l'abondance des proteobactéries en particulier *Haemophilus spp*, *Pseudomonas spp* et *klebsiella spp* (53)(68).

Un profil d'antibiorésistance a été réalisé et nous avons constaté que la souche isolée est sensible à tous les antibiotiques testés sauf à l'ampicilline. Une résistance qui pourrait être due principalement à la production d'enzyme B lactamase (90).

VII.2.1.4 *Moraxella*

Dans la présente étude, nous avons isolé *Moraxella* dans les crachats induit et spontané du malade N°6, la présence de cette bactérie n'est pas corrélée à une élévation du nombre de leucocytes, cela pourrait s'expliquer par une colonisation des voies respiratoires du patient et non une infection.

Une étude réalisée par Huang et al en (2011), a montré que la persistance de la colonisation dans les premiers mois de la vie dans les voies respiratoires, de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis* ou la combinaison de ces organismes était associée de manière significative à l'asthme pendant les 5 premières années de la vie.

Deux études sur l'analyse du microbiote respiratoire (dans le BAL (83) et (dans les expectorations induites (68)) le microbiote identifié est différent de celui de témoin sain, ces études ont montré une augmentation de l'abondance des protéobactéries en particulier de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*. Ainsi la colonisation du microbiote pulmonaire par *Moraxella catarrhalis* et la perturbation de la diversité de ce microbiote dans l'enfance est associée au développement de l'asthme (92).

De plus la présence de ces agents pathogènes pourrait avoir une influence sur l'inflammation chronique des voies respiratoires, même en dessous du seuil de culture de routine.(83)

Par ailleurs, la présence des germes potentiellement pathogènes dans les voies respiratoires peut déclencher une infection bactérienne dans certaines conditions, comme suite à une infection virale(83), de plus *Moraxella catarrhalis* a été isolée au cours des exacerbations de l'asthme à des taux élevés (89).

En plus de *Moraxella*, nous avons pu isoler une bactérie du genre *Neisseria* dans le crachat induit du patient N°8, cette bactérie fait partie du microbiote pulmonaire du sujet sain. Nous avons observé dans notre étude que ce germe, pourtant fréquent dans le microbiote respiratoire du sujet sain, a été isolé avec une fréquence très faible (4%), cela pourrait s'expliquer par le déséquilibre du microbiote respiratoire chez l'asthmatique (64).

VII.2.1.5 *Bacillus*

D'une manière très intéressante, nous avons isolé cette bactérie chez deux patients (N°21 et 22) hospitalisés pour une exacerbation de l'asthme. Ils représentent (8%) de la population étudiée, nous avons également observé chez ces patients une colonisation des voies respiratoires par le *Candida albicans* dans sa forme d'invasive et peut être même avec la formation du biofilm (Figure 14).

Par contre nous n'avons pas pu identifier l'espèce par manque de moyens, mais nous avons réalisé la coloration de Gram et celle au bleu de méthylène pour l'observation (Figure 26) avec l'identification de certains caractères biochimiques insuffisant pour identifier l'espèce, les souches ont été conservées pour une identification moléculaire ultérieure.

Les *Bacillus* sont des bactéries très largement disséminés dans l'environnement, ils peuvent être à l'origine d'une toxi-infection alimentaire (93), leur présence dans les crachats de malades asthmatiques, peut s'expliquer par un passage transitoire à partir du microbiote intestinal. Cependant, très peu de données ont été rapportées sur l'association de *Bacillus* à l'asthme ou aux autres maladies respiratoires et l'impact de ce germe dans la physiopathologie de l'asthme reste à élucider (99).

VII.2.1.6 *Pseudomonas*

C'est une bactérie qui vit normalement à l'état saprophyte dans l'eau et le sol humide ou sur les végétaux. Elle résiste mal à la dessiccation. Cette bactérie peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et de divers animaux.

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste responsable d'infections nosocomiales graves de plus en plus multirésistante (94), d'infections potentiellement mortelles chez les immunodéprimés (5). Mayaud (2007) a rapporté que l'infection par cette bactérie marque un tournant évolutif dans les maladies respiratoires.

Nous avons isolé le *Pseudomonas aeruginosa* dans le crachat induit du patient N°2, avec une charge bactérienne très faible, cela peut être due soit à une contamination extérieure ou bien à un passage transitoire de ce germe dans les voies respiratoires, car le patient n'a pas présenté de symptômes d'infection et le nombre de leucocyte est inférieur à 25, or la seule présence de *Pseudomonas aeruginosa* chez un patient asthmatique peut justifier sa surveillance et des contrôles réguliers.

D'après l'étude de Li et al en (2017), la famille des *Pseudomonadaceae* est présente en abondance significativement plus élevée dans les échantillons prélevés sur des patients asthmatiques sévère par rapport aux groupes sains et aux asthmatiques non sévère.

Ainsi, nous avons pu identifier *Pseudomonas putida* dans le crachat induit d'un patient ayant un asthme sévère (N°19), en plus d'une coïnfection par *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus* de groupe C, avec un nombre de leucocytes supérieur à 25 (tableau13). Cette coïnfection est caractéristique chez les patients avec l'asthme sévère.

VII.2.1.7 *E coli*

E coli est une bactérie appartenant à la famille des *enterobacteriaceae*, elle est commensale du tube digestif. Dans notre étude, nous avons isolé *E coli* dans les crachats spontanés et induits de trois patients (13% tableau 13), la présence de cette bactérie n'est pas accompagnée par une élévation du nombre de leucocytes. Cependant, sa présence en grande quantité dans les crachats de patients asthmatiques est synonyme d'infection bronchique.

Dans une étude réalisée par Li et al en (2017) portée sur l'identification et la détermination de la charge bactérienne des différents phylas qui constituent le microbiote pulmonaire de trois groupe de sujets : Un présentant un asthme sévère, un asthme non sévère et en fin un groupe de témoins sains. Les résultats de cette étude ont montré que les deux familles *Pseudomonadaceae* et *Enterobacteriaceae* étaient présentes en abondance significativement plus élevée dans les échantillons prélevés sur des patients asthmatiques graves par rapport aux groupes sains et asthmatiques non graves.

VII.2.1.8 *Candida albicans*

L'étude des expectorations induites des sujets asthmatiques et des sujet témoins en utilisant les techniques de séquençage à haut débit a identifié 90 espèces de champignons dans les crachats induits des sujets témoins et 46 espèces dans les crachats induits des patients asthmatiques.(Van Woerden et al. 2013).

Dans cette étude, nous avons pu isoler le *C. albicans* à une fréquence de 46% dans les expectorations spontanées et de 50% dans les expectorations induites, nos résultats concordent avec ceux trouvés par Kaci et Ziane en (2018). Dans leur étude sur la caractérisation des infections respiratoires chez l'adulte asthmatique dans les crachats spontanés, elles ont isolé le *C. albicans* à une fréquence de 55,5%.

Dans une étude, Schlecht et al en (2015) ont mis en évidence une interaction entre deux germes ; *S. aureus* et *C. albicans*. De manière intéressante nous avons identifié cette coïnfection chez 5 patients asthmatiques (N°15, 20, 21, 23 et 24, tableau N°13). D'après ces auteurs, cette coïnfection peut entraîner la formation d'un biofilm polymicrobien. Le *C. albicans* par permutation morphologique de la forme arrondie levure vers forme hyphale invasive, peut se fixer sur les cellules épithéliales de la muqueuse orale, ces hyphes serviront de support pour la fixation de *S. aureus* formant ainsi une coïnfection.

Nous avons aussi pu observer le *C. albicans* sous sa forme bourgeonnante dans les crachats de trois patients (N° 20, 21, 22), cette forme correspond à la forme invasive et virulente du *C. albicans* (80).

VII.2.2 Résultat des crachats spontanés et induits chez les sujets témoins sains

Parallèlement à l'étude des crachats de patients asthmatiques, nous avons analysé des crachats issus des sujets sains, les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau 15. La comparaison entre les germes retrouvés chez les patients asthmatiques et chez les sujets témoins sains, montre l'absence de germes pathogènes tels que les streptocoques hémolytiques, *Moraxella* et *Klebsiella* à l'exception d'un *Pseudomonas* isolé dans le crachat spontané du témoin N° 3. Cependant nous avons retrouvé les mêmes germes commensaux dans les deux catégories de prélèvements, tels que le *Staphylococcus spp*, *Entérocooccus*, *Streptococcus* non hémolytiques.

De plus, l'étude cytologique des crachats de sujets sains a montré un taux de leucocytes <25, ainsi que l'absence des levures.

VII.2.2.1 Comparaison entre les crachats spontanés et les crachats induits

Après avoir identifié les germes retrouvés dans la population étudiée, nous avons comparé les crachats spontanés et les crachats induits, du point de vue nombre d'espèces microbiennes pathogènes opportunistes, pathogènes et la positivité de la culture dans chaque type de prélèvement.

De même, nous avons réalisé les deux types d'expectorations spontanée et induite chez les même malades donc statistiquement deux données appariées, un appariement qui permet d'éviter la variabilité individuelle et d'augmenter la fiabilité des résultats.

VII.2.2.2 Comparaison entre les espèces pathogènes opportunistes identifiées dans les crachats spontanés et les crachats induits

Pour comparer entre le nombre d'espèces pathogènes opportunistes dans les deux types de prélèvements, nous avons appliqué le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney pour deux échantillons appariés. Avec un risque d'erreur à priori $\alpha = 0,05$ et avec une P value de 0,887, nous avons déduit qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux types de crachats spontanés et induits.

La comparaison entre les deux types de crachats a montré qu'il n'y a pas de différence significative en termes de nombre de bactéries présentes dans les crachats spontanés et induits, cela ne nous permet pas de statuer sur le choix d'un des deux types de crachats, a moins de choisir le prélèvement le plus facile à réaliser.

Ce résultat nous montre que chez les malades asthmatiques, il existe, à l'état normal, des germes opportunistes dans leurs expectorations et par conséquent chez des asthmatiques à risque de décompensation ou instables, on peut suggérer un traitement préventif de l'infection respiratoire afin d'éviter toutes complications de la maladie.

VII.2.2.3 Comparaison entre les espèces pathogènes identifiées dans les crachats spontanés et les crachats induits

Dans le but de comparer le nombre d'espèces pathogènes identifiées dans les crachats spontanés et les crachats induits, nous avons appliqué le test non paramétrique de Willcoxon - Mann-Whitney pour deux échantillons appariés (risque d'erreur à priori de $\alpha = 0,05$ et $P = 0,40$), nous avons conclu qu'il n'y a pas de différences significatives entre le nombre de germes pathogènes retrouvés dans les crachats induits et ceux retrouvés dans les crachats spontanés.

Les résultats de notre étude concordent avec ceux trouvés par Henig et al en (2001) dans une étude où ils ont fait une comparaison entre trois types de prélèvements, expectoration spontanée, expectoration induite et le lavage broncho alvéolaire réalisés chez des sujets présentant une Fibrose kystique. Les auteurs ont comparé le volume des échantillons, le nombre des cellules, les concentrations de cytokines et les résultats des cultures bactériennes, ainsi les résultats obtenus suggèrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre ces trois types de prélèvements.

Le résultat de ce test montre qu'il existe chez des patients asthmatiques, des germes pathogènes donc infections respiratoires avec ou sans signes cliniques, d'où l'intérêt de traiter ces malades par un traitement antibiotique adapté en s'appuyant sur le résultat de l'antibiogramme. Afin d'éviter des exacerbations de l'asthme, il est nécessaire de réaliser des prélèvements spontanés ou induits afin de mettre en évidence les germes pathogènes responsables des infections respiratoires et pour établir un traitement adapté.

VII.2.2.4 Comparaison entre la positivité de culture dans les crachats spontanés et les crachats induits

Après avoir comparé le nombre d'espèces, pathogène ou pathogène opportuniste, retrouvées dans les deux types de crachat, nous avons comparé, la positivité des cultures à partir des deux types de prélèvement, car la présence d'une bactérie pathogène opportuniste dans les crachats, n'implique pas systématiquement la présence d'infection, cela dit, pour émettre un diagnostic, il faut prendre en considération le statut immunitaire (nombre de leucocytes), la charge bactérienne et la nature du germe.

Pour comparer la positivité des cultures, nous avons d'abord appliqué le test de Khi-deux de Mac Nemar pour vérifier l'indépendance de deux échantillons avec le tableau de contingence (Table 7). Ainsi, nous avons démontré qu'il existe une différence significative entre le prélèvement spontané et induit avec ($p = 0,004$).

A cet effet, nous pouvons constater, déjà l'importance du prélèvement induit par rapport au spontané, dans la mise en évidence des infections respiratoires chez les malades asthmatiques, lesquelles infections peuvent décompenser ou aggraver l'évolution clinique des malades, si elles ne sont pas bien identifiées, puis traitées efficacement selon l'antibiogramme.

Suite aux résultats que nous avons obtenus dans cette étude, nous pouvons répondre à la question suivante : quel est le prélèvement à utiliser pour optimiser cette analyse, le prélèvement spontané ou le prélèvement induit ?

D'après le 1^{er} et 2^{ème} test appliqué il n'y a pas de différence significative entre les germes identifiés dans les deux types de crachats, par contre, le 3^{ème} test montre qu'il y a une différence significative entre la positivité de culture entre les crachats spontanés et les crachats induits. Cela peut s'expliquer par le fait que la présence du germe dans les deux crachats pourrait être due aux germes commensaux mais pourrait aussi affirmer l'existence d'une infection chez le patient.

Nous avons identifié chez le patient N°1, dans les deux types de crachats, *S. aureus*, cependant, après numération des colonies sur le milieu Chapman nous avons obtenu 12 colonies dans la culture à partir des crachats spontanés, contre 27 colonies dans les crachats induits, pour marquer cette différence, nous avons considéré le prélèvement induit positif et le spontané négatif.

Chez le patient N° 11, nous avons également retrouvé une culture de *Klebsiella* (Figure. 17) sur milieu Hektoen abondante dans les crachats induits et quelques colonies dans les crachats spontanés.

Suite aux constatations observées ci-dessus, à savoir, l'abondance des colonies dans les crachats induits par rapport aux crachats spontanés, la difficulté d'expectoration chez certains adultes, ainsi que le volume plus abondant dans les expectorations induites par-rapport aux expectorations spontanées nous préconisons l'utilisation du crachat induit comme prélèvement de choix dans l'étude cyto bactériologique des crachats chez l'asthmatique.

De ce fait, dans le but d'optimiser l'analyse cyto bactériologique des crachats, il serait plus judicieux d'opter pour les expectorations induites.

CONCLUSION

L'asthme représente un problème majeur de santé publique compte tenu de sa prévalence élevée, et des coûts élevés engendrés par la prise en charge des patients atteints par cette maladie.

L'implication du microbiote dans la pathogenèse de l'asthme semble de plus en plus se vérifier. Il semble que des perturbations précoces du microbiote respiratoire et intestinal peuvent altérer la maturation du système immunitaire et leurs réponses et favoriser ainsi l'induction d'une inflammation bronchique (69)(64)(97) .

Cet éclairage récent sur l'interaction entre le microbiote et le système immunitaire offre de nouvelles perspectives thérapeutiques et préventives dans l'asthme. En effet, restaurer ou maintenir un microbiote quantitativement et qualitativement équilibré par transplantation microbienne, par exemple pourrait permettre une régulation du système immunitaire et limiter le développement d'une inflammation bronchique (1)(98) .

Les infections respiratoires constituent un facteur déclenchant des crises d'asthme ou d'exacerbation chez les asthmatiques instables. Il serait nécessaire de généraliser l'usage, chez tous les malades asthmatiques, présentant un des signes cliniques d'infection respiratoire, ou admis en urgence pour exacerbation, de l'analyse cytot bactériologique des crachats. Le résultat de notre travail a révélé la présence de germes qui sont incriminés dans l'exacerbation de l'asthme (*Moraxella* et *Pseudomonas*) sans nécessairement la présence de signes cliniques, c'est pour cela qu'il serait intéressant de faire des contrôles réguliers (ECBC) dans le but d'identifier et de traiter ces infections latentes afin de prévenir des exacerbations.

Nous avons également recherché à caractériser les germes présents dans l'expectoration spontanée et induite chez les patients asthmatiques. Nos résultats démontrent que le prélèvement induit est le mieux indiqué pour le diagnostic cytot bactériologique des infections respiratoires, car il présente :

- ✓ Un volume important et une abondance des éléments cellulaires (bactériens et cellules immunitaires).
- ✓ Un caractère non invasif.
- ✓ Une reproductibilité qui permettra des contrôles réguliers des patients.

En perspectives, il serait intéressant de :

- ✓ Comparer les germes présents dans les deux types de crachats, en utilisant les techniques d'identifications moléculaires.
- ✓ Investiguer l'effet des infections bronchiques sur le profil des cytokines chez des patients asthmatiques.

Bibliographie :

1. Michon A-L, Marchandin H. Diversité physiopathologique du microbiote respiratoire. *Rev Francoph Lab.* 1 févr 2015;2015(469):37-49.
2. Licari A, Brambilla I, Marseglia A, De Filippo M, Paganelli V, Marseglia GL. Difficult vs. Severe Asthma: Definition and Limits of Asthma Control in the Pediatric Population. *Front Pediatr* [Internet]. 19 juin 2018 [cité 1 oct 2019];6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6018103/>
3. Bouzigon E, Nadif R, Le Moual N, Dizier M-H, Aschard H, Boudier A, et al. Facteurs génétiques et environnementaux de l'asthme et de l'allergie : synthèse des résultats de l'étude EGEA. *Rev Mal Respir.* 1 oct 2015;32(8):822-40.
4. Dharmage SC, Perret JL, Custovic A. Epidemiology of Asthma in Children and Adults. *Front Pediatr* [Internet]. 18 juin 2019 [cité 1 oct 2019];7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6591438/>
5. Innes Asher, Cherian Varghese. Global Asthma Report 2018. Auckland, Nouvelle-Zélande; 2018.
6. Leynaert B, Le Moual N, Neukirch C, Siroux V, Varraso R. Facteurs environnementaux favorisant le développement d'un asthme. *Presse Médicale.* 1 mars 2019;48(3, Part 1):262-73.
7. Hassoun D, Moui A, Colas L, Blanc FX, Magnan A. Actualités physiopathologiques et thérapeutiques dans l'asthme sévère. *Rev Médecine Interne.* 1 août 2019;40(8):508-16.
8. Marguet C. Prise en charge de la crise d'asthme de l'enfant (nourrisson inclus): Recommandations pour la pratique clinique. *Rev Mal Respir.* 1 avr 2007;24(4, Part 1):427-39.
9. Ring J. Was ist Atopie? In: Braun-Falco O, Burg G, éditeurs. *Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie.* Springer Berlin Heidelberg; 1983. p. 103-11. (Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie).
10. Dessaint J-P. Génétique de l'asthme et des allergies. *Rev Fr Allergol Immunol Clin.* 1 avr 2005;45(3):200-7.
11. Bessot J-C, Pauli G. Les acariens domestiques et leurs allergènes. Biologie et écologie des acariens. *Rev Mal Respir.* 1 févr 2011;28(2):227-39.
12. Caillaud D. Moisissures intérieures et santé respiratoire : résultats des études épidémiologiques longitudinales récentes. *Rev Fr Allergol.* 1 sept 2018;58(5):389-91.
13. de Blay F, Krieger P. Les allergies aux principaux mammifères domestiques et leur traitement. *Rev Fr Allergol Immunol Clin.* 1 janv 1997;37(1):56-64.

14. [asthmeinduitparlexercice.pdf](http://www.eao.chups.jussieu.fr/polys/dus/dusmedecinedusport/cardiosport/asthmeinduitparlexercice/asthmeinduitparlexercice.pdf) [Internet]. [cité 28 oct 2019]. Disponible sur: <http://www.eao.chups.jussieu.fr/polys/dus/dusmedecinedusport/cardiosport/asthmeinduitparlexercice/asthmeinduitparlexercice.pdf>
15. Underner M, Perriot J, Peiffer G, Meurice J-C. Influence du tabagisme sur le risque de développement de l'asthme. *Rev Mal Respir*. 1 févr 2015;32(2):110-37.
16. Sampson HA. 9. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1 févr 2003;111(2, Supplement 2):S540-7.
17. Boussoffara L, Boudawara N, Touil I, El Fahem N, Sakka M, Knani J. Obésité et sévérité de la crise d'asthme. *Rev Mal Respir*. 1 sept 2014;31(7):616-20.
18. Estirado C, Ceccato A, Guerrero M, Huerta A, Cilloniz C, Vilaró O, et al. Microorganisms resistant to conventional antimicrobials in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 15 juin 2018;19(1):119.
19. L'asthme intrinsèque - Revue Médicale Suisse [Internet]. [cité 28 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.revmed.ch/RMS/2000/RMS-2295/20429>
20. Com-Ruelle L, Crestin B, Dumesnil S. L'asthme en France selon les stades de sévérité. :192.
21. Khajotia R. Classifying Asthma Severity and Treatment Determinants: National Guidelines Revisited. *Malays Fam Physician Off J Acad Fam Physicians Malays*. 31 déc 2008;3(3):131-6.
22. Mouneimné H, Andremont A. Physiopathologie des pneumopathies aiguës communautaires : le modèle des pneumonies à pneumocoque. *Médecine Thérapeutique*. 27 janv 2000;5(10):807-14.
23. King GG, James A, Harkness L, Wark PAB. Pathophysiology of severe asthma: We've only just started. *Respirol Carlton Vic*. 2018;23(3):262-71.
24. S. Létuvé , C. Taillé S. physiopathologie de la réponse inflammatoire dans l'asthme de l'adulte. 2013;10(02).
25. Benayoun L, Pretolani M. Le remodelage bronchique dans l'asthme : mécanismes et enjeux thérapeutiques. *médecine/sciences*. 1 mars 2003;19(3):319-26.
26. Netgen. L'hyperréactivité bronchique et son importance pour le clinicien [Internet]. *Revue Médicale Suisse*. [cité 6 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.revmed.ch/RMS/2014/RMS-N-451/L-hyperreactivite-bronchique-et-son-importance-pour-le-clinicien>
27. Hernandez JM, Janssen LJ. Revisiting the usefulness of thromboxane-A2 modulation in the treatment of bronchoconstriction in asthma. *Can J Physiol Pharmacol*. févr 2015;93(2):111-7.
28. Kaplan AG, Balter MS, Bell AD, Kim H, McIvor RA. Diagnosis of asthma in adults. *CMAJ Can Med Assoc J*. 10 nov 2009;181(10):E210-20.

29. Devouassoux DG. Asthme de l'adulte (226a). :10.
30. Truong M, Iniguez J, Chouhou D, Dessange J, Gendrel D, Chaussain M. Mesure du débit expiratoire de pointe chez les jeunes enfants: comparaison de quatre appareils portables. Arch Pédiatrie. 1 avr 1995;2(4):324-7.
31. asthme_arce.pdf [Internet]. [cité 29 oct 2019]. Disponible sur: https://www.hugge.ch/sites/interhug/files/structures/medecine_de_premier_recours/documents/infos_soignants/asthme_arce.pdf
32. Rudaz A, Emonet S, Gex G. PNEUMONIE ACQUISE EN COMMUNAUTE (PAC). 2013;13.
33. Laurent F, Tunon de Lara M. Apport de l'imagerie dans l'évaluation de l'atteinte des petites voies aériennes dans l'asthme. Rev Mal Respir. 1 avr 2009;26(4):407-11.
34. Heinzerling L, Mari A, Bergmann K-C, Bresciani M, Burbach G, Darsow U, et al. The skin prick test - European standards. Clin Transl Allergy. 1 févr 2013;3(1):3.
35. Soumaré D, Ouattara K, Kanouté T, Toloba Y, Sissoko BF, Sacko HB, et al. Panorama de la pathologie ORL chez l'asthmatique dans les services de pneumologie du CHU point-G. Rev Mal Respir. 1 janv 2015;32:A48-9.
36. Metz-Favre C, Birba E, Metivier A-C, de Blay F, Pauli G. Intérêt du dosage des IgE vis-à-vis de l'allergène recombinant rBet v 1 dans la prise en charge de la pollinose printanière. Rev Fr Allergol Immunol Clin. 1 déc 2005;45(8):584-9.
37. Weyer A, Guilloux L, Motin J, Ville G, Weyer J, David B. Interprétation des dosages biologiques : Critères à définir pour un objectif de recherche ou pour un diagnostic clinique: Applications en allergologie. Rev Fr Allergol Immunol Clin. 1 janv 1997;37(7):819-26.
38. L'asthme de l'adulte | European Lung Foundation - ELF [Internet]. [cité 28 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.europeanlung.org/fr/maladies-pulmonaires-et-information/maladies-pulmonaires/l'asthme-de-l'adulte>
39. Sannier N, Timsit S, Cojocaru B, Leis A, Wille C, Garel D, et al. Traitement aux urgences des crises d'asthme par nébulisations vs chambres d'inhalation. Arch Pédiatrie. 1 mars 2006;13(3):238-44.
40. Représentations des patients et observance des traitements par corticostéroïdes inhalés dans l'asthme. Revue systématique sur la période 1999–2009 - ScienceDirect [Internet]. [cité 28 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0761842511001318>
41. Postma DS, Kerstjens HAM, ten Hacken NHT. RETRACTED ARTICLE: Inhaled corticosteroids and long-acting beta-agonists in adult asthma: a winning combination in all? Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 24 mai 2008;378(2):203.
42. Chauhan BF, Ducharme FM. Anti-leukotriene agents compared to inhaled corticosteroids in the management of recurrent and/or chronic asthma in adults and

- children. Cochrane Database Syst Rev [Internet]. 2012 [cité 1 oct 2019];(5). Disponible sur:
<https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD002314.pub3/abstract>
43. Cosio BG, Soriano JB. Theophylline again? Reasons for believing. Eur Respir J. 1 juill 2009;34(1):5-6.
 44. Heck S, Nguyen J, Le D-D, Bals R, Dinh QT. Pharmacological Therapy of Bronchial Asthma: The Role of Biologicals. Int Arch Allergy Immunol. 2015;168(4):241-52.
 45. Couturaud F, Frachon I, Guillou-Bideau B, Leroyer C. L'éducation de l'adulte asthmatique. :13.
 46. ER'Asthme, contrôle de l'asthme chez 16580 patients suivis en médecine générale - ScienceDirect [Internet]. [cité 28 oct 2019]. Disponible sur:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0755498205841892>
 47. Infections respiratoires aiguës : définition, symptômes et diagnostic [Internet]. Santé sur le net. [cité 20 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.sante-sur-le-net.com/maladies/pneumologie/infections-respiratoires-aigues/>
 48. Bibliothèque virtuelle L'anatomie du système respiratoire [Internet]. [cité 21 oct 2019]. Disponible sur: <http://www.alloprof.qc.ca/BV/pages/s1265.aspx>
 49. S Konrad, A Hossain A Senthilselvan, JA Dosman,. La bronchite chronique chez les Autochtones—prevalence et facteurs associes. sept 2013;33(4).
 50. Tissot-Dupont H. Climat, environnement et infections respiratoires. Médecine Mal Infect. 1 mars 2009;39(3):200-2.
 51. Réfabert L, De Blic J, Scheinmann P. Infections respiratoires aiguës virales et asthme de l'enfant: Aspects épidémiologiques, immunopathologiques et thérapeutiques. Rev Fr Allergol Immunol Clin. 1 nov 1996;36(7):775-81.
 52. Philippart F. Prise en charge des infections des voies respiratoires basses de l'immunocompétent. Partie concernant les définitions, l'épidémiologie et les éléments du diagnostic. Médecine Mal Infect. 1 nov 2006;36(11):784-802.
 53. An association between acute bronchitis and asthma. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 28 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3794612>
 54. Pneumopathie - Causes, symptômes, traitements [Internet]. <https://www.passeportsante.net/>. 2017 [cité 21 oct 2019]. Disponible sur:
https://www.passeportsante.net/fr/Maux/Problemes/Fiche.aspx?doc=pneumopathie_pm
 55. Pneumopathie aiguë sévère : Maladie des Légionnaires ? - ScienceDirect [Internet]. [cité 28 oct 2019]. Disponible sur:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0399077X79800670>
 56. Memoire Online - Prévalence des infections des voies respiratoires superieures chez les enfants de 0 à 15 ans - Bienvenu Kongolo [Internet]. [cité 28 oct 2019]. Disponible sur:

https://www.memoireonline.com/09/15/9276/m_Prevalence-des-infections-des-voies-respiratoires-superieures-chez-les-enfants-de-0--15-ans16.html

57. Buiret G, Tringali S, Céruse P. Laryngites aiguës de l'adulte. EMC - Oto-Rhino-Laryngol. janv 2009;4(2):1-7.
58. Sarkis G, El Hachem N. L'otite moyenne aiguë, séreuse ou récidivante : l'avis du pédiatre. Kinésithérapie Rev. 1 déc 2012;12(132):12-7.
59. Bollag U. Pharyngo-amygdalite - diagnostic et traitement - antibiotiques? Forum Méd Suisse – Swiss Med Forum [Internet]. 4 juin 2003 [cité 28 oct 2019]; Disponible sur: <https://doi.emh.ch/fms.2003.04890>
60. Couloigner V, Van Den Abbeele T. Rhinopharyngites de l'enfant. EMC - Oto-Rhino-Laryngol. 1 mai 2004;1(2):93-112.
61. Rhinosinusite chronique et polypose nasale. 1re partie. Definition, epidemiologie, etiologies et comorbidites multifactorielles, mecanismes inflammatoires. :5.
62. Dickson RP, Erb-Downward JR, Martinez FJ, Huffnagle GB. The Microbiome and the Respiratory Tract. Annu Rev Physiol. 2016;78:481-504.
63. Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. Homeostasis and its disruption in the lung microbiome. Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol. 2 oct 2015;309(10):L1047-55.
64. Barnig C, Martin C. Asthme et microbiome. Rev Mal Respir. 1 févr 2018;35(2):103-15.
65. La Scola B. Nouvelle technique d'étude du microbiote : la culturomique. Rev Francoph Lab. 1 févr 2015;2015(469):83-7.
66. Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. The role of the bacterial microbiome in lung disease. Expert Rev Respir Med. juin 2013;7(3):245-57.
67. Beck JM, Young VB, Huffnagle GB. The microbiome of the lung. Transl Res J Lab Clin Med. oct 2012;160(4):258-66.
68. Marri PR, Stern DA, Wright AL, Billheimer D, Martinez FD. Asthma-associated differences in microbial composition of induced sputum. J Allergy Clin Immunol. 1 févr 2013;131(2):346-352.e3.
69. Marsland BJ, Yadava K, Nicod LP. The airway microbiome and disease. Chest. août 2013;144(2):632-7.
70. Larsen JM, Steen-Jensen DB, Laursen JM, Søndergaard JN, Musavian HS, Butt TM, et al. Divergent Pro-Inflammatory Profile of Human Dendritic Cells in Response to Commensal and Pathogenic Bacteria Associated with the Airway Microbiota. PLOS ONE. 21 févr 2012;7(2):e31976.
71. Ploton M-C, Abakka S, Amouyal E, Besnard C, Dufour L, El Harrif S, et al. Le microbiote pulmonaire. Arch Pédiatrie. 1 juill 2017;24(7):667-74.

72. Noverr MC, Noggle RM, Toews GB, Huffnagle GB. Role of Antibiotics and Fungal Microbiota in Driving Pulmonary Allergic Responses. *Infect Immun*. 1 sept 2004;72(9):4996-5003.
73. Herbst T, Sichelstiel A, Schär C, Yadava K, Bürki K, Cahenzli J, et al. Dysregulation of Allergic Airway Inflammation in the Absence of Microbial Colonization. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 juill 2011;184(2):198-205.
74. Bouchaud G, Castan L, Chesné J, Braza F, Aubert P, Neunlist M, et al. Maternal exposure to GOS/inulin mixture prevents food allergies and promotes tolerance in offspring in mice. *Allergy*. janv 2016;71(1):68-76.
75. Forsythe P. Probiotics and lung diseases. *Chest*. avr 2011;139(4):901-8.
76. Wang HT, Anvari S, Anagnostou K. The Role of Probiotics in Preventing Allergic Disease. *Children* [Internet]. 5 févr 2019 [cité 30 sept 2019];6(2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6406271/>
77. Quels prélèvements utiliser pour optimiser l'analyse des sécrétions bronchiques dans la mucoviscidose ? - EM|consulte [Internet]. [cité 6 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/rmr/article/143517>
78. Bush RK, Prochnau JJ. *Alternaria*-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1 févr 2004;113(2):227-34.
79. Boniface S, Donati Y, Romanet-Manent S, Lorec A-M, Dupuy P, Mamessier E, et al. L'analyse de l'expectoration induite dans l'asthme permet une nouvelle approche de l'inflammation. */data/revues/07618425/00190006/747/* [Internet]. 24 avr 2008 [cité 6 oct 2019]; Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/en/article/151545>
80. Desai JV. *Candida albicans* Hyphae: From Growth Initiation to Invasion. *J Fungi Basel Switz*. 11 janv 2018;4(1).
81. Schlecht LM, Peters BM, Krom BP, Freiberg JA, Hänsch GM, Filler SG, et al. Systemic *Staphylococcus aureus* infection mediated by *Candida albicans* hyphal invasion of mucosal tissue. *Microbiology*. janv 2015;161(Pt 1):168-81.
82. Huang YJ, Boushey HA. The microbiome in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1 janv 2015;135(1):25-30.
83. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, et al. Disordered Microbial Communities in Asthmatic Airways. *PLOS ONE*. 5 janv 2010;5(1):e8578.
84. Bouvet A. Endocardite infectieuse: Enquête en France 1990–1991: Sensibilité aux antibiotiques des Streptocoques et Entérocoques. *Médecine Mal Infect*. 1 déc 1992;22:987-92.
85. Leung DYM. The role of *Staphylococcus aureus* in atopic eczema [Internet]. 2008 [cité 17 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.ingentaconnect.com/content/mjl/adv/2008/00000088/a216s216/art00005>

86. Bachert C, van Steen K, Zhang N, Holtappels G, Cattaert T, Maus B, et al. Specific IgE against *Staphylococcus aureus* enterotoxins: An independent risk factor for asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1 août 2012;130(2):376-381.e8.
87. Samiya H. Etude de la résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques au niveau du CHU de Tlemcen. :83.
88. Boukadida J, Salem N, Hannachi N, Monastiri K, Snoussi N. Exploration génotypique d'une bouffée épidémique nosocomiale néonatale à *Klebsiella pneumoniae* productrice de bêtalactamase à spectre étendu. *Arch Pédiatrie*. 1 mai 2002;9(5):463-8.
89. Ahmed. Burden of bacterial exacerbation in bronchial asthma in Assiut University Hospitals, Egypt [Internet]. [cité 8 oct 2019]. Disponible sur: <http://esim.eg.net/article.asp?issn=1110-7782;year=2017;volume=29;issue=2;spage=71;epage=76;aulast=Ahmed>
90. Ktari S, Arlet G, Mnif B, Gautier V, Mahjoubi F, Jmeaa MB, et al. Emergence of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates Producing VIM-4 Metallo- β -Lactamase, CTX-M-15 Extended-Spectrum β -Lactamase, and CMY-4 AmpC β -Lactamase in a Tunisian University Hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 déc 2006;50(12):4198-201.
91. Huang YJ, Lynch SV. The emerging relationship between the airway microbiota and chronic respiratory disease: clinical implications. *Expert Rev Respir Med*. 1 déc 2011;5(6):809-21.
92. Ege MJ. The Hygiene Hypothesis in the Age of the Microbiome. *Ann Am Thorac Soc*. nov 2017;14(Supplement_5):S348-53.
93. Laouami S. Métabolisme et toxinogénèse de *Bacillus cereus* : rôles de l'enzyme fermentaire LdhA et du régulateur rédox Rex. 20 déc 2012 [cité 9 oct 2019]; Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00921771>
94. Curran CS, Bolig T, Torabi-Parizi P. Mechanisms and Targeted Therapies for *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 2018;197(6):708-27.
95. Li N, Qiu R, Yang Z, Li J, Chung KF, Zhong N, et al. Sputum microbiota in severe asthma patients: Relationship to eosinophilic inflammation. *Respir Med*. 1 oct 2017;131:192-8.
96. van Woerden HC, Gregory C, Brown R, Marchesi JR, Hoogendoorn B, Matthews IP. Differences in fungi present in induced sputum samples from asthma patients and non-atopic controls: a community based case control study. *BMC Infect Dis*. 5 févr 2013;13(1):69.
97. Kraft M. The role of bacterial infections in asthma. *Clin Chest Med*. juin 2000;21(2):301-13.

98. Herbst T, Sichelstiel A, Schär C, Yadava K, Bürki K, Cahenzli J, et al. Dysregulation of Allergic Airway Inflammation in the Absence of Microbial Colonization. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 juill 2011;184(2):198-205.
99. Le Lourd R , Domec L , Le Lourd F *Sem Hop*. 1967 Oct 26;43(44):2730-1.
[Purulent *Bacillus cereus* pleurisy in an asthmatic patient treated for a long time with corticoids].

.

Annexe

Annexe 1.

Fiche de recueil de données

Renseignements personnel

Nom :

Numéro du dossier :

Prénom :

Sexe :

Age : Profession :

Renseignements médicaux :

Ancienneté de la maladie :

Maladies associées :

Fréquences des crises :

Traitement médicaux :

Traitement antibiotique :

Infections respiratoires :

Résultats de l'étude bactériologique :

Prélèvements :

Type :

Crachats spontanés :

Crachats induits :

Lieu :

Hôpital :

Temps recueil

Externe :

Aspect macroscopique :

Couleur:

Consistance:

Quantité :

Etude cytologique :

Type de cellules retrouvées :

Leucocytes :

Cellules épithéliales :

Cellules respiratoires basses :

Etude bactériologique :

Microorganismes retrouvés :

Numération :

Annexe 2. Taxonomie de *Staphylococcus aureus*

Règne	Bacteria
Division	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Bacillales
Famille	Staphylococcaceae
Genre	Staphylococcus
Espace	<i>Staphylococcus aureu</i>

Annexe 3. Taxonomie d'*Enterococcus*

Règne	Bacteria
Division	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Lactobacillales
Famille	Enterococcaceae
Genre	<i>Enterococcus</i>

Annexe 4. Taxonomie d'*Escherichia coli*

Règne	Bacteria
Embranchement	Proteobacteria
Classe	GammaProteobacteria
Ordre	Enterobacteriales
Famille	Enterobacteriaceae
Genre	Escherichia
Espace	<i>Escherichia coli</i>

Annexe 5. Taxonomie de *Klebsiellapneumoniae*

Règne	Bacteria
Embranchement	Proteobacteria
Classe	GammaProteobacteria
Ordre	Enterobacteriales
Famille	Enterobacteriaceae
Genre	Klebsiella
Espace	<i>Klebsiellapneumoniae</i>

Annexe 6. Taxonomie d'*Alcaligenesfaecalis*

Royaume	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Classe	BetaProteobacteria
Ordre	Burkholderiales
Famille	Alcaligenaceae
Genre	Alcaligenes
Espace	<i>Alcaligenesfaecalis</i>

Annexe 7. Taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa*

Règne	Bacteria
Embranchement	Proteobacteria
Classe	GammaProteobacteria
Ordre	Pseudomonadales
Famille	Pseudomonadaceae
Genre	Pseudomonas
Espace	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Annexe 8. Taxonomie de *Pseudomonas putida*

Domaine	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Classe	Gamma Proteobacteria
Ordre	Pseudomonadales
Famille	Pseudomonadaceae
Genre	Pseudomonas
Espace	<i>Pseudomonas putida</i>

Annexe 9. Taxonomie de *Streptococcus*

Règne	Bacteria
Division	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Lactobacillales
Famille	Streptococcaceae
Genre	<i>Streptococcus</i>

Annexe 10. Taxonomie de *streptocoques viridans*

Royaume	Bacteria
Phylum	Firmicutes
Classe	Cocci
Ordre	Lactobacillales
Famille	Streptococcaceae
Genre	Streptococcus
Espace	<i>streptocoques viridans</i>

Annexe 11. Taxonomie de *Micrococcus*

Règne	Bacteria
Embranchement	Actinobacteria
Classe	Actinobacteria
Sous-classe	Actinobacteridae
Ordre	Actinomycetales
Sous-ordre	Microccineae
Famille	Micrococcaceae
Genre	<i>Micrococcus</i>

Annexe 12. Taxonomie d' Entérobactéries

Règne	Bacteria
Embranchement	Proteobacteria
Classe	Gamma Proteobacteria
Ordre	Enterobacteriales
Famille	Enterobacteriaceae

Annexe 13. Taxonomie de *Candida albicans*

Règne	Fungi
Division	Ascomycota
Classe	Saccharomycetes
Ordre	Saccharomycetales
Famille	Saccharomycetaceae
Genre	Candida
Espec	<i>Candida albicans</i>

Annexe 14. Taxonomie de *Moraxella*

Domaine	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Classe	Gamma Proteobacteria
Ordre	Pseudomonadales
Famille	Moraxellaceae
Genre	<i>Moraxella</i>

Annexe 15. Taxonomie de *Bacillus*

Règne	Bacteria
Division	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Bacillales
Famille	Bacillaceae
Genre	<i>Bacillus</i>

Annexe 16. Taxonomie de *Neisseriaspp*

Règne	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Classe	Beta Proteobacteria
Ordre	Neisseriales
Famille	Neisseriaceae
Genre	<i>Neisseria</i>

Annexe 17.Taxonomie d'*Alternariaspp*

Règne	Fungi
Division	Ascomycota
Sous-division	Pezizomycotina
Classe	Dothideomyceteae
Sous-classe	Pleosporomycetidae
Ordre	Pleosporales
Famille	Pleosporaceae
Genre	<i>Alternaria</i>
Especie	<i>Alternariaspp</i>

Annexe 18. Coloration au Bleu de méthylène

1. Techniques
1. Réaliser un frottis et le fixer
2. Le recouvrir de bleu de méthylène n et laisser agir 3 min
3. Rincer à l'eau distillée
4. Sécher entre 2 feuilles de papier essuie-tout.
5. Observationsà immersion

Annexe 19. Coloration May-Grunwald-Giemsa

1. Méthode
1. 3 minutes dans le colorant de May-Grunwald pur.
2. 5 minutes dans le colorant de May-Grunwald pur dilué à 25 % dans un tampon à pH 6,9.
3. 15 minutes dans un Giemsa dilué à 5 %.
4. 5 minutes de rinçage.
5. Séchage devant le ventilateur d'au moins 5 minutes.
6. Observations au microscope (X400).

Annexe 20. Api 20E

Galerie de 20 microtubes prêts à l'emploi permettant de réaliser 23 tests biochimiques afin d'identifier des bacilles Gram – appartenant à la famille des Enterobacteriaceae.

Annexe 21. Api 20 NE

Api 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non Enterobactéries tels que *Pseudomonas*, *Vibrio*, etc.).

Annexe 22.Api NH

Api NH est un système standardisé pour l'identification des *Neisseria*, *Haemophilus* et *Moraxella catarrhalis* (*Branhamella catarrhalis*).

Abstract

Background. Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways. Respiratory infections (RI) can trigger asthma attacks and lead to exacerbations. It is important to detect and characterize RI in order to establish an effective treatment and prevent asthma exacerbation.

Objectives. The objective of our study is to identify and compare pathogenic microorganisms, opportunistic and commensal pathogens present in spontaneous and induced sputum of adult asthmatic outpatients with or without clinical signs of respiratory infection or admitted in emergency for exacerbation.

Methods. A cyto bacteriological study was carried out on spontaneous and induced sputum samples of the same individual. 78 sputum samples obtained from 35 adult asthmatics including 4 patients with only induced sputum samples, and 6 healthy subjects were examined. Sputum macroscopic analysis, cytology, sputum culture, biochemical identification and antibiogram test were performed for each sample. Induced sputum samples were collected by the directed cough sputum technique. After rinsing their mouth, the patients inhale a saline solution (10 to 15 minutes), cough and allow expectorations. The sputum samples are collected in a sterile container.

Results. A variety of germs was identified with different frequency in spontaneous versus induced sputum: *Streptococcus spp* (83% vs96%), *Enterococcus* (92% for both), *S aureus* and *C albicans* (46% vs54%), *Staphylococcus spp* (33% vs29%), *Klebsiella pneumoniae*, *Morexella*, *Alcaligenes fecalis* and group C *streptococcus* (4% for both), *Bacillus* and *Streptococcus* group G (8% for both), *micrococci* (13% vs21%) and *E coli* (13% for both). Moreover, we found the spore of *Alternaria spp* (4%) in a single spontaneous sputum from severe asthmatic patient. Interestingly, (50%) induced sputum samples showed a positive culture than spontaneous sputum (8.3%) (McNemar test, $P = 0.004427$). However, the number of opportunistic pathogenic microbial species and the number of pathogenic microbial species in both types of sputum were not significantly different (Wilcoxon-Mann-Whitney test, $P = 0.887$ and Willcoxon test -Mann-Whitney, $P = 0.40$, respectively).

Conclusion. Our results demonstrate that induced sputum is more effective than spontaneous sputum to investigate RI in adult asthmatics. Cyto bacteriological analysis of induced sputum may help to prevent and reduce asthma exacerbation, in adult asthmatics with or without signs of infection..

Résumé

Introduction. L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes inférieures. Les infections respiratoires aiguës peuvent déclencher les crises d'asthme, ou même entraîner des exacerbations.

Il est important de détecter et de caractériser ces infections pour établir un traitement efficace contre le germe en cause et prévenir les exacerbations chez les asthmatiques.

Objectifs. L'objectif de notre étude est d'identifier et de comparer les microorganismes pathogènes, pathogènes opportunistes et commensaux présents dans les crachats spontanés et induits des malades asthmatiques avec ou sans signes cliniques d'infection respiratoire ou admis en urgence pour exacerbation.

Matériel et Méthodes. A cet effet nous avons réalisé une étude cyto bactériologique des crachats spontanés et induits d'un même malade pour un échantillon de 35 patients asthmatiques adultes dont 4 patients, chez qui seuls des prélèvements induits ont été réalisés, ainsi que 6 sujets sains pour un total de 78 prélèvements. L'étude cyto bactériologique des crachats consistée en l'étude macroscopique, l'étude cytologique, la mise en culture, l'identification biochimique et enfin l'étude de la sensibilité des germes pathogènes aux différents antibiotiques. Les prélèvements induits ont été réalisés par la technique d'expectoration par toux dirigée. Le malade rince la bouche, il effectue une séance d'aérosol de 10 à 15 minutes (inhalation de sérum physiologique), puis provoquer une quinte de toux qui induit une expectoration. Les crachats sont récupérés dans un récipient stérile.

Résultats. Cette étude a permis d'identifier une variété de germes avec des fréquences différentes selon le type de crachat (spontané vs l'induit) : le *Streptococcus* spp (83% vs 96%), *Entérocooccus* (92% dans les deux types de crachats), *S aureus* et *C albicans* (46% vs 54%), *staphylococcus* spp (33% vs 29%), *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella*, *Alcaligenes fecalis* et le *streptococcus* du groupe C (4% dans les deux types de crachats), *Bacillus* et *Streptococcus* du groupe G (8% dans les deux types de crachats), les *micrococcus* (13% vs 21%) et *E coli* (13% dans les deux types de crachats). De plus, nous avons également retrouvé la spore d'*Alternaria* spp (4%) dans le crachat spontané. D'une manière intéressante, nous avons observé une différence significative entre le prélèvement spontané et le prélèvement induit en termes de culture positive (Test McNemar, $P = 0.004$). Cependant, nous n'avons pas noté de différence significative entre le nombre d'espèces pathogènes opportunistes entre les deux types de crachats (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney, $P = 0,887$). Nombre d'espèces microbiennes pathogènes. Pas de différences significatives entre les deux types de crachats spontanés et induits. (Test de Wilcoxon -Mann-Whitney, $P = 0,40$).

Conclusion. Nos résultats, démontrent que le prélèvement induit est le mieux indiqué pour optimiser l'analyse cyto bactériologique des crachats chez l'adulte asthmatique. L'analyse cyto bactériologique de crachat induit devient nécessaire chez les patients avec exacerbation de l'asthme, avec ou sans signes d'infection.