



**HAL**  
open science

# Définition des endotypes de l'asthme sévère chez l'enfant au travers d'une approche intégrée

Mélanie Briard

► **To cite this version:**

Mélanie Briard. Définition des endotypes de l'asthme sévère chez l'enfant au travers d'une approche intégrée. Immunologie. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP5063 . tel-04286952

**HAL Id: tel-04286952**

**<https://hal.inrae.fr/tel-04286952v1>**

Submitted on 19 Jul 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Cité

**Ecole doctorale ED 563 Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries  
Unité MTS 0496/Laboratoire d'Immuno-Allergie Alimentaire (LIAA) et  
Unité MICrobiologie de l'ALimentation au service de la Santé (MICALIS)**

Définition des endotypes de l'asthme sévère chez l'enfant au  
travers d'une approche intégrée

Par Mélanie BRIARD

Thèse de doctorat en immunologie

Dirigée par Karine ADEL-PATIENT

Présentée et soutenue publiquement le 22 juin 2023

Devant un jury composé de :

Pr. Geneviève HERY-ARNAUD Professeure HDR, Faculté de Médecine de Brest	Rapporteur
Pr. Alain PARIS Professeur HDR, UMR MCAM, CNRS et Muséum national d'Histoire naturelle, Paris	Président
Dr. Stéphanie LEJEUNE Médecin Pédiatre, Hôpital Jeanne-de-Flandre, CHRU, Lille	Examineur
Dr. Aude REMOT Chercheure, UMR ISP, INRAE Val de Loire, Nouzilly	Examineur
Dr. German CANO-SANCHO Chercheur, UMR ONIRIS, INRAE	Examineur
Dr. Guillaume LEZMI MCU-PH HDR, Hôpital Necker-Enfants Malades, Université Paris Cité	Invité
Dr. Vinciane SAINT-CRIQ Chercheure, UMR INRAE AgroParisTech Université Paris-Saclay, INRAE Jouy-en-Josas Antony	Invitée
Dr. Karine ADEL-PATIENT Directrice de recherche INRAE, HDR, UMR Université Paris-Saclay,CEA, INRAE MTS, CEA de Saclay	Directrice de thèse



# Résumé

**Titre :** Définition des endotypes de l'asthme sévère chez l'enfant au travers d'une approche intégrée

L'asthme est une pathologie inflammatoire chronique qui résulte d'une réponse immunitaire inflammatoire excessive au niveau de la muqueuse respiratoire, associée à un remodelage des voies respiratoires. L'asthme sévère (AS) est caractérisé par la survenue d'exacerbations malgré un traitement de fond. Il touche 5% des enfants asthmatiques, et reste une maladie hétérogène dont la sévérité, la fréquence des symptômes et les facteurs déclenchants sont très variables en fonction des individus. Il est donc nécessaire de développer une prise en charge adaptée à chaque patient, ce qui nécessite la définition précise de chaque phénotype clinique et la compréhension des endotypes associés. Dans cette thèse, nous avons donc cherché à définir la signature locale de l'AS sévère chez l'enfant et d'en comprendre les mécanismes physiopathologiques, ainsi que les défauts de barrière associés, en combinant différentes approches.

Dans un premier temps, nous avons analysé puis comparé la composition du microbiote (séquençage de l'ARNr 16S) et du métabolome global (LC-HRMS) dans les lavages bronchoalvéolaires (LBA) collectés chez des enfants souffrant d'AS (n=20) et des enfants non-asthmatiques (NA, n=10) (cohorte CLASSE). Nous avons ensuite utilisé des approches permettant d'intégrer nos blocs de données, en incluant également des données de cytokines préalablement obtenues sur ces mêmes échantillons. Nous avons observé une augmentation de la diversité du microbiote chez les enfants souffrant d'AS par rapport aux NA, avec des abondances relatives significativement plus élevées de 5 genres bactériens dans les LBA des enfants AS. En parallèle, l'analyse d'enrichissement des voies métaboliques a mis en évidence l'importance de la voie des polyamines dans l'AS. L'intégration non-supervisée de données multi-blocs a permis d'identifier une signature de la pathologie, principalement composée de métabolites et de cytokines.

Dans un second temps, nous avons cherché à comprendre les mécanismes contribuant à la perte de fonction de la barrière épithéliale des voies respiratoires dans l'AS. Pour cela, grâce à des échantillons de patients AS et NA collectés au sein d'une nouvelle cohorte (SevAsthma-Children, en cours de constitution, ANR-18-CE14-0011), nous avons constitué des banques : i) de cellules épithéliales nasales et bronchiques, et ii) de bactéries isolées de LBA et caractérisées par la production d'acides gras à chaîne courte et la résistance aux antibiotiques. Un modèle cellulaire d'inflammation de type T2 utilisant nos cellules épithéliales d'enfant AS ou NA en présence de l'IL-4 a été mis en place, permettant d'analyser différentes fonctions de défense de l'épithélium en réponse à cette inflammation, comme le transport ionique et l'expression des mucines et des alarmines. De plus, dans l'optique de proposer de nouvelles approches thérapeutiques, nous avons étudié l'impact, dans ce modèle d'inflammation, d'une bactérie lactique déjà décrite comme ayant un potentiel immunomodulateur dans les maladies pulmonaires. Les résultats préliminaires indiquent que l'IL-4 diminue l'activité du canal épithélial sodique et augmente l'activité du canal chlorure CFTR. De manière intéressante, la bactérie semble rétablir l'activité contrôlée de ce canal.

Mes travaux contribuent à une meilleure caractérisation locale de l'asthme sévère chez l'enfant. En effet, notre analyse multi-omique a mis en évidence une relation étroite entre les signatures métabolomique et immunitaire, tout en identifiant des métabolites et des genres bactériens différemment régulés dans les poumons des enfants souffrant d'AS. Ces résultats originaux seront confirmés sur la cohorte SevAsthma, plus importante, actuellement en cours d'inclusion. Notre modèle épithélial in vitro d'inflammation de type T2 a aussi établi les bases de tests fonctionnels qui permettront l'évaluation de bactéries à potentiel probiotique dans la pathologie de l'asthme.

**Mots-clés :** Asthme sévère, enfant, lavage bronchoalvéolaire, métabolome, microbiote, immunologie, signature multi-omique, épithélium pulmonaire



# Summary

**Title:** Definition of severe asthma endotypes in children through an integrated approach

Asthma is a chronic inflammatory disease that results from an excessive immune response in the respiratory mucosa associated with a remodelling of the respiratory tract. Severe asthma (SA) is characterised by the occurrence of exacerbations despite medications. SA affects 5% of asthmatic children, and remains a heterogeneous disease whose severity, frequency of symptoms and triggering factors show high inter-individual heterogeneity. It is therefore necessary to develop personalized medicine, which requires the precise definition of each clinical phenotype and the understanding of the associated endotypes. Therefore, we aimed to define the local signature of SA in children and to understand the pathophysiological mechanisms involved, as well as the associated barrier defects, by combining different approaches.

First, we analysed and then compared the composition of the microbiota (16S rRNA sequencing) and the global metabolome (LC-HRMS) in bronchoalveolar lavages (BALs) collected from children suffering from SA (n = 20) and non-asthmatic children (NA, n=10) (CLASSE cohort). We then used approaches to integrate our data blocks, with cytokine data obtained previously on the same samples. We observed an increase in microbiota diversity in children with SA compared to NA, with significantly higher relative abundances of 5 bacterial genera in the BALs of SA children. In parallel, the enrichment analysis of metabolic pathways highlighted the importance of the polyamine biosynthesis pathway in SA. Unsupervised integration of multi-block data allowed the identification of a signature of the SA, composed primarily of metabolites and cytokines.

Secondly, we aimed to understand the mechanisms mediated by the loss of function of the airway epithelial barrier in SA. Thanks to samples from SA and NA patients collected within a new cohort (SevAsthma-Children, cohort under construction, ANR-18-CE14-0011), we have set up banks of: i) of nasal and bronchial epithelial cells, and ii) bacteria isolated from BALs and characterised by the production of short chain fatty acids and resistance to antibiotics. A cellular model of type T2 inflammation using our SA or NA epithelial cells in the presence of IL-4 has been set up, to analyse different defence functions of the epithelium in response to this inflammation, such as ion transport, and expression of mucins and alarmins. In the context of development of new therapeutic approaches, we examined the impact of a *Lactobacillus* strain in this model of inflammation, a strain already described as having an immunomodulatory potential in lung diseases. Preliminary results suggest that IL-4 decreased epithelial sodium channel activity and increased CFTR chloride channel activity. Interestingly, the bacterium seemed to restore the control activity of the latter.

My work contributes to the better characterisation of a local signature of severe asthma in children. Specifically, our multi-omics analysis highlighted a close relationship between metabolomic and immune signatures, while identifying differentially regulated metabolites and bacterial genera in the lungs of children with SA. These original results will be confirmed on the larger SevAsthma cohort, ongoing in both inclusion and follow-up. Our *in vitro* epithelial model of T2 inflammation has also established the basis for functional tests that will allow the evaluation of the probiotic potential of bacterial strains in the pathology of asthma.

**Key words:** Severe asthma, children, bronchoalveolar lavage, metabolome, microbiota, immunology, multi-omics signature, pulmonary epithelium

# Remerciements

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Je voudrais tout d'abord remercier grandement ma directrice de thèse, Karine Adel-Patient de m'avoir accordé sa confiance depuis le début de mon stage de M2. Je remercie aussi ma co-encadrante, Vinciane Saint-Criq, pour toute son aide durant ce projet. Merci pour vos relectures et corrections, pour votre réactivité tard le soir et les week-ends. Cette thèse n'aurait jamais pu se réaliser sans le soutien de chacune d'entre vous.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de Guillaume Lezmi, Maria Leite de Moraes et Muriel Thomas, qui ont été porteurs du projet déposé à l'ANR sans lequel ma thèse n'aurait pu avoir lieu.

Je remercie grandement la Pr. Geneviève Héry-Arnaud et le Pr. Alain Paris qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse. Je tiens aussi à remercier Dr. Stéphanie Lejeune, Dr. Aude Remot, Dr. German Cano-Sancho et Dr. Guillaume Lezmi pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je remercie toutes les personnes de l'hôpital Necker pour leur implication dans le projet et notamment Morgane Christ pour tout le mal qu'elle s'est donnée pour augmenter le nombre et la qualité des inclusions.

Je ne remercierai jamais assez Marta Grauso-Culetto de s'être si bien occupée de la préparation des échantillons biologiques mais aussi pour ses compétences en cytométrie en flux (même si nous ne sommes jamais assez sévères en plaçant les gates !).

Je tiens à remercier particulièrement Eric Venot et Blanche Guillon pour toutes nos discussions respectives autour des biostatistiques et de la métabolomique et de leurs conseils qui m'ont accompagné tout au long de la thèse.

Je remercie aussi Christelle Hennequet-Antier pour l'aide fournie pour l'intégration des données mais aussi Etienne Thevenot et Sylvain Dechaumet qui m'ont aussi épaulé dans l'utilisation des outils statistiques.

Je remercie les responsables des plateformes lipidomique et métabolomique, en l'occurrence Florence Castelli et Benoit Colsch. Je remercie aussi François Fenaille pour nos points réguliers lors de la mise au point de préparation des échantillons.

Je remercie aussi les collègues de Micalis : Frédéric Pepke pour l'analyse des AGCC, mais aussi pour nos discussions diverses ; Aurélia Bruneau pour son aide sur les échantillons de la cohorte CLASSE. Je remercie Elsa pour nos trajets en RER mais aussi en vélo.

Je remercie également tous les autres membres des deux laboratoires, du SPI et de Micalis, que j'ai fréquenté durant ces trois ans, notamment ceux avec qui j'ai eu l'occasion de travailler et les autres simplement pour les bons moments partagés.

Je remercie Hervé Bernard avec qui j'ai eu la chance de pouvoir travailler avant la thèse. Son enthousiasme, sa passion et ses très nombreuses connaissances m'ont permis de progresser.

Merci à Stéphane Nano pour ses blagues, pas toujours très compréhensibles, et ses soutiens informatiques.

Merci encore à Guillaume Lezmi et à Marie de Lamballerie pour leur participation à mon comité de suivi de thèse.

Mes derniers remerciements vont à ma famille et aussi à mon conjoint Guillaume qui ont tout fait pour m'aider, qui m'ont soutenu et surtout supporté dans tout ce que j'ai entrepris.

# Abréviations

ACN	Acétonitrile
ACP	Analyse en composantes principales
ACT	Test de contrôle de l'asthme (Asthma control test)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Acide gras
AGE	Produits avancés de glycation (« Advanced glycation end products »)
AGCC	Acides gras à chaîne courte
APC	Cellule présentatrice d'antigène
ARA	Acide arachidonique
ARLT	Antagoniste aux récepteurs des leucotriènes
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
AS	Asthme Sévère
ASL	Liquide de surface des voies aériennes (airway surface liquid)
BACA	$\beta_2$ -agoniste à courte durée d'action
BALA	$\beta_2$ -agoniste à longue durée d'action
BCA	Acide bicinchoninique (« Bicinchoninic acid »)
BEA	« Bile esculin agar »
BHIs	Bouillon « Brain heart infusion » contenant un extrait de levure
BSA	Albumine de sérum bovin (« bovine serum albumin »)
CaCC	Canal chlorure dépendant du calcium (« Calcium-dependent chloride channel »)
CFTR	« Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator »
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CNCM	Collection nationale des cultures de microorganismes
CPP	Comités de protection des personnes
CSI	Corticostéroïdes inhalés
CSO	Corticostéroïdes oraux
Ct	Cycle seuil
CV	Coefficient de variation
CVF	Capacité vitale forcée
DC	Cellule dendritique (« Dendritic cell »)
DG	Diglycéride
DIABLO	« Data integration analysis for biomarker discovery using latent variable approaches for omics studies »
DMTS	Département Médicaments et Technologies pour la Santé
DO	Densité optique
EDTA	Acide ethylenediaminetetraacétique (« Ethylenediaminetetraacetic acid »)
EFR	Épreuves fonctionnelles respiratoires
ENaC	Canal épithélial sodique (« Epithelial Na <sup>+</sup> channel »)
ESI	Ionisation par électronébuliseur
fE	Exacerbateur fréquent
FeNO	Fraction expirée du monoxyde d'azote
FoxP3	Forkhead transcription factor 3
GC	Chromatographie en phase gazeuse
GINA	« Global Initiative for Asthma »
gyhBHI	Gélose brain heart infusion + hémine, extrait de levure + agar
HILIC	Chromatographie liquide à interaction hydrophile
HMO	Oligosaccharides du lait maternel (« Human milk oligosaccharides »)
HRMS	Spectrométrie de masse à haute résolution (« High resolution mass spectrometry »)

IDO	Indoleamine 2,3-dioxygénase-1
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
ILC	Cellule lymphoïdes innées (« Innate lymphoid cell »)
IMC	Indice de masse corporelle
INEM	Institut Necker Enfants Malades
I <sub>sc</sub>	Courant de court-circuit (« short-circuit current »)
KEGG	« Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes »
LA	Acide linoléique
LAMA	Antagoniste muscarinique à action prolongée (« Long-acting muscarinic antagonist »)
LBA	Lavage bronchoalvéolaire
LC	Chromatographie en phase liquide (« Liquid chromatography »)
LC-HRMS	Spectrométrie de masse à haute résolution par chromatographie en phase liquide (« Liquid chromatography–high resolution mass spectrometry »)
LSE	Liquide de surface épithéliale
MAIT	« Mucosal-associated invariant T cells
MBP	« Major basic protein »
MBPA	Mycoses broncho-pulmonaires allergiques
MH	Mueller-Hinton
MOFA	Multi-omic factor analysis
MREA	Maladie respiratoire exacerbée par l'aspirine
MRS	« De Man, Rogosa and Sharpe agar”
MSA	« Mannitol salt agar »
MSEA	Analyse d'enrichissement des voies métaboliques « Metabolite set enrichment analysis »
m/z	Rapport masse sur charge
NA	Non-asthmatique
nfE	Exacerbateur non fréquent
NK	Cellules tueuses naturelles (« Natural killer »)
pb	Paire de base
PBMC	Cellules mononuclées du sang périphérique (« Peripheral blood mononuclear cell »)
PBS	« Phosphate Buffered Saline »
PC	Glycérophosphocholines (LPC : lyso-glycérophosphocholines)
PCL	Couche périciliaire (« periciliary liquid layer »)
PCR	Réaction en chaîne par polymérase (« Polymerase chain reaction »)
PE	Glycérophosphoéthanolamine (LPE : lyso-glycérophosphoéthanolamine)
PFA	Paraformaldehyde
PG	Glycérophosphoglycérol (LPG : lyso-glycérophosphoglycérol)
PhBec	Cellule épithéliale bronchique humaine primaire (« Primary human bronchial epithelial cell »)
PhNec	Cellule épithéliale nasale humaine primaire (« Primary human nasal epithelial cell »)
PI	Glycérophosphoinositol (LPI : lyso-glycérophosphoinositol)
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PRR	Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires (« Pattern recognition receptor »)
PS	Glycérophosphosérine (LPS : lyso-glycérophosphosérine)
QC	Contrôle qualité (« Quality control »)
qPCR	PCR quantitative
reg	Régulateur
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROR	Récepteur nucléaire orphelin (« RAR-related orphan receptors »)

rt	Temps de rétention
RT-PCR	« Reverse transcription polymerase chain reaction »
SA-PE	Streptavidine-phycoérythrine
sPLS	Régression des moindres carrés partiels parcimonieuses (« Sparse partial least squares »)
SEA	Entérotoxine staphylococcique A
TA	Température ambiante
TCR	Récepteur des cellules T (« T-cell receptor »)
TEER	Résistance transépithéliale électrique (« Transepithelial electrical resistance »)
TG	Triglycéride
TGF	Facteur de croissance transformant (« Transforming growth factor »)
Th	Lymphocyte T auxiliaire (« T-helper »)
TLR	Récepteur de type Toll (« Toll-like receptor »)
TNF	Facteur de nécrose tumorale (« Tumor necrosis factor »)
Treg	Lymphocytes T régulateurs
TSLP	Lymphopoïétine stromale thymique (« Thymic stromal lymphopoietin »)
VDR	Récepteur de la vitamine D
VEMS	Volume expiratoire maximal par seconde
VRS	Virus respiratoire syncytial
W4M	Workflow4Metabolomics
WGCNA	Weighted Gene Co-expression Network Analysis

## Liste des figures

Figure 1 : Prévalence de l'asthme dans différents pays. En bleu, les pays ayant une prévalence entre 0 et 2.5 %, en vert ceux entre 2.5 et 5 %, en jaune entre 5 et 7.5 %, en orange entre 7.5 % et 10 % et en rouge ceux ayant une prévalence supérieure à 10 %.	28
Figure 2 : Taux de mortalité liée à l'asthme, entre 2001 et 2005 (en bleu foncé) et entre 2011 et 2015 (en bleu clair) par pays, classés par taux de mortalité, et normalisés selon l'âge, <b>A.</b> dans les pays à revenus faibles et moyens et <b>B.</b> dans les pays à revenus élevés.	29
Figure 3 : Coûts socio-économiques liés à l'asthme de l'enfant, constitués des coûts directs, indirects et intangibles.	30
Figure 4 : Le cycle de gestion de l'asthme est constitué de trois étapes : l'évaluation, l'ajustement du traitement et l'analyse de la réponse au traitement.	34
Figure 5 : Les deux possibilités de traitements de l'asthme catégorisés par paliers pour les personnes de plus de 12 ans.	35
Figure 6 : Facteurs de risque favorisant l'initiation de l'asthme et induisant les exacerbations.	38
Figure 7 : Lien entre phénotypes et endotypes dans l'asthme sévère.	43
Figure 8 : La structure de l'épithélium des voies respiratoires inférieures humaines.	45
Figure 9 : Mécanisme immunitaire impliquant la voie T2.	49
Figure 10 : Mécanisme immunitaire impliquant les voies Th1 et Th17.	51
Figure 11 : La cascade des sciences « omiques ».	56
Figure 12 : Le métabolome comprend à la fois des métabolites endogène et exogènes.	57
Figure 13 : Différentes étapes de la métabolomique impliquant trois principaux domaines scientifiques que sont la biologie, la chimie analytique et la biologie.	58
Figure 14 : Déroulement d'une analyse métabolomique globale par LC/HRMS.	59
Figure 15 : Récapitulatif des huit catégories de lipides, avec pour chacune des exemples de lipides et leurs structures.	62
Figure 16 : Facteurs environnementaux qui influencent le microbiote respiratoire.	64
Figure 17 : Composition du microbiote respiratoire chez <b>A.</b> le sujet sain et <b>B.</b> chez l'asthmatique.	66
Figure 18 : Traitement de brossage nasal pour l'analyse du microbiote et pour la culture cellulaire.	78
Figure 19 : Traitement des biopsies pour analyse du microbiote et pour la culture cellulaire.	79
Figure 20 : Traitement des lavages bronchoalvéolaires (LBA) pour analyse métabolomique, du système immunitaire et du microbiote.	79

Figure 21 : Processus de mise au point de la préparation des lavages bronchoalvéolaires (LBA) par séchage sous-vide ou lyophilisation en amont de leur passage en LC-MS.....	86
Figure 22 : Protocole de traitement d'un pool de lavage bronchoalvéolaire (LBA) pour le choix d'un traitement permettant d'améliorer le signal obtenu en LC-MS en condition analytique HILIC-ESI <sup>-</sup> . .....	87
Figure 23 : Intensités de l'uracile ( <b>A</b> ) et de l'acide méthyl-imidazole acétique ( <b>B</b> ) obtenues lors de l'analyse de 500 µL d'un pool de LBA séché sous-vide ou lyophilisé, en condition C18-ESI <sup>+</sup> . Intensités du nicotinamide ( <b>C</b> ) et de l'acide tiglique ( <b>D</b> ) mesurées sur ces mêmes échantillons en condition HILIC-ESI <sup>-</sup> . .....	90
Figure 24 : Chromatogrammes pour les analyses en conditions <b>A.</b> HILIC-ESI <sup>-</sup> et <b>B.</b> C18-ESI <sup>+</sup> pour les trois volumes de pool de LBA de patients (100, 500 et 1 000 µL) concentrés par séchage sous-vide. ....	91
Figure 25 : Chromatogrammes obtenus <b>A.</b> en condition HILIC-ESI <sup>-</sup> et <b>B.</b> en condition C18-ESI <sup>+</sup> en pour visualiser l'effet des différents traitements (cut-off à 3 kDa, filtre à 0,22 µm et ajout de β-octyl-glucoside) pris de manière individuelle (temps en minutes). ....	93
Figure 26 : Diagrammes de Venn du nombre de variables extraites ( <b>A</b> ) et de métabolites annotés ( <b>B</b> ) en condition C18-ESI <sup>+</sup> , pour les différents volumes séchés sous vide (250, 500 et 1000 µL) ainsi que le nombre de variables extraites ( <b>C</b> ) et métabolites annotés ( <b>D</b> ) en condition d'analyse HILIC-ESI <sup>-</sup> . .....	95
Figure 27 : <b>A.</b> Concentrations en protéines totales (mg/mL) dans les plasmas et dans les lavages bronchoalvéolaires (LBA) des 30 enfants inclus dans la cohorte CLASSE. <b>B.</b> Corrélation entre la concentration en protéines totales entre le plasma et les LBA.....	100
Figure 28 : <b>A.</b> Concentrations en azote uréique (mg/dL) dans les plasmas et dans les lavages bronchoalvéolaires (LBA) des 30 enfants inclus dans la cohorte CLASSE. <b>B.</b> Corrélation de la concentration en azote uréique entre le plasma et les LBA. ....	100
Figure 29 : Concentrations en urée (mg/dL) et en protéines totales (mg/mL) <b>A.</b> dans le plasma et <b>B.</b> dans les lavage bronchoalvéolaires (LBA) des patients non-asthmatiques (NA, en vert) et asthmatiques sévères (SA, en bleu). ....	101
Figure 30 : Test de corrélation de Pearson entre la concentration en protéines totales et la concentration en urée dans les lavages bronchoalvéolaires. ....	101
Figure 31 : <b>A.</b> Graphique des individus sur les deux premières dimensions de l'ACP construite avec l'ensemble des métabolites, représentant 41% de la variance totale. Les ellipses de confiance à 95 % basées sur la distance de Mahalanobis sont représentées en bleu pour les données relatives aux asthmatiques sévères et en vert pour les données relatives aux non-asthmatiques. Le cercle noir correspond au cercle de corrélation. <b>B.</b> Analyse différentielle sur l'ensemble des métabolites, présentée sous forme de volcano plot pour la comparaison entre AS et NA. Le graphique représente la valeur P x fold_change. Les valeurs P n'ont pas été	



corrigées et sont considérées comme significatives pour  $p < 0,05$ . Les points bleus correspondent aux métabolites significativement plus abondants dans les LBA des patients atteints d'AS que dans ceux des NA, et les points verts aux métabolites significativement plus abondants dans les LBA des NA que dans ceux des AS..... 148

Figure 32 : **A.** Découverte d'une signature à partir des données de métabolomiques. Le niveau S correspond à la signature finale, c'est-à-dire aux métabolites qui ont passé toutes les itérations de sélection déterminant si les variables candidates améliorent significativement la prédiction du modèle. En revanche, les métabolites des autres niveaux ont été écartés pendant toutes les itérations sauf la dernière (A) ou les précédentes (B à E). PLS-DA : Analyse discriminante par la méthode des moindres carrés partiels, SVM : Support Vector Machines. **B.** Boxplot de l'intensité du métabolite M872T345\_2 chez les patients non-asthmatiques et chez les patients asthmatiques sévères. .... 149

Figure 34 : Association entre les niveaux de cytokines (et immunoglobulines), de métabolites et de genre bactériens en relation avec l'asthme sévère. .... 151

Figure 34 : Structures chimique de **A.** la glycérophosphocholines et **B.** de la sphingomyéline. .... 158

Figure 35 : Spectre MS/MS pour le rapport m/z 816,7071, permettant de vérifier l'annotation du triglycéride 48:4. .... 159

Figure 36 : Temps de rétention (min) en fonction **A.** du nombre d'insaturations (exemples des triglycérides contenant 44 carbones) ou **B.** du nombre de carbones dans la chaîne carbonée (exemple des triglycérides contenant 8 insaturations). .... 159

Figure 37 : Nombre de variables obtenues après les différentes étapes de traitement (extraction via W4M, application des trois filtres, suppression des isotopes et nettoyage des annotations). .... 160

Figure 38 : Corrélations entre les métabolites plasmatiques et les métabolites des lavages bronchoalvéolaires des 30 patients issus de la cohorte CLASSE. .... 162

Figure 39 : Graphiques des valeurs propres des analyses en composantes principales (ACP) réalisées sur l'ensembles des variables extraites **A.** en condition C18-ESI<sup>+</sup> et **B.** en condition HILIC-ESI<sup>-</sup>. Graphiques des individus issus de ces mêmes ACP, **C.** en condition C18-ESI<sup>+</sup> et **D.** en condition HILIC-ESI<sup>-</sup>. .... 163

Figure 40 : **A.** Graphique des valeurs propres et **B.** graphique des individus issus de l'analyse en composantes principales sur les 214 variables annotées. .... 164

Figure 41 : Volcano plot sur l'ensemble des métabolites, obtenus après tris, **A.** en condition HILIC-ESI<sup>-</sup> et **B.** en condition C18-ESI<sup>+</sup>. .... 164

Figure 42 : Volcano plot représentant toutes les variables annotées et vérifiées par MS/MS (**A**). En vert, sont représentées les variables moins intenses chez les asthmatiques sévères que chez les contrôles et en bleu, est représenté le phénomène inverse. En noir sont présentés

les métabolites non significativement différents entre les deux groupes. Box plot des intensités des métabolites significativement diminués ( <b>B</b> ) ou augmentés ( <b>C</b> ) chez les enfants asthmatiques sévères (en gris) par rapport aux non-asthmatiques (en blanc). .....	165
Figure 44 : <b>A.</b> Résultats de l'analyse d'enrichissement de l'ensemble de métabolites (top 25) à partir de l'analyse des métabolites, cartographiés dans les voies métaboliques humaines (KEGG) et significativement altérées par l'asthme sévère. La taille des cercles représente le taux d'enrichissement de la voie métabolique et la couleur représente la valeur p. <b>B.</b> Résultats de l'analyse d'enrichissement pour les 10 voies les plus impactées. ....	166
Figure 44 : <b>A.</b> Analyse des corrélations entre les métabolites annotés et les caractéristiques démographiques et infectieuses. <b>B.</b> Analyse des corrélations entre les métabolites annotés et les données cliniques associées à l'asthme. Les coefficients ont été calculés avec la méthode de Spearman.....	167
Figure 45 : Lipides identifiés dans le plasma par l'analyse lipidomique. <b>A.</b> Composition lipidique total des échantillons plasmatiques (%). <b>B.</b> Composition en glycérophospholipides de ces mêmes échantillons (%). ....	168
Figure 46 : <b>A.</b> Volcano plot des lipides identifiés et annotés par LC-MS. En vert, sont représentés les lipides dont les intensités sont plus faibles chez les asthmatiques sévères que chez les contrôles et en bleu, sont représentés les lipides dont les intensités sont plus élevées chez les asthmatiques sévères que chez les contrôles. En noir, sont représentés les métabolites non significativement différents entre les deux groupes. <b>B.</b> Boxplot des intensités des lipides significativement différents entre les asthmatiques sévères (en gris) et les non-asthmatiques (en blanc). ....	169
Figure 47 : Description des facteurs obtenus par l'analyse MOFA. <b>A.</b> Corrélation entre les facteurs. <b>B.</b> Variance expliquée de chaque facteur en fonction des jeux de données. <b>C.</b> Variance expliquée globale. ....	170
Figure 48 : <b>A.</b> Association entre les facteurs issus de l'analyse MOFA et les données démographiques et infectieuses. Le log <sub>10</sub> de la valeur p ajustée est représenté. BMI : Indice de Masse Corporelle. <b>B.</b> Associations des 8 facteurs avec la pathologie de l'asthme. Les points verts représentent les non-asthmatiques et les points bleus les asthmatiques sévères.....	171
Figure 49 : Stratégie d'identification des différentes populations d'ILC et d'ILC activées.....	179
Figure 50 : Stratégie d'identification des différentes populations de cellules T auxiliaires (ou T helper, Th).....	180
Figure 51 : Stratégie d'identification des lymphocytes T régulateurs.....	180
Figure 52 : Graphique des individus sur les deux premières dimensions de l'ACP construite avec l'ensemble des populations cellulaires, représentant 39.83 % de la variance totale. Les ellipses de confiance à 95 % sont représentées en violet pour les données relatives aux asthmatiques sévères et en vert pour les données relatives aux non-asthmatiques. ....	181

Figure 53 : Graphique des individus sur les deux premiers axes de l'analyse PLS-DA. Les patients atteints d'asthme sévère sont indiqués en violet et les patients non asthmatiques en vert. ....	182
Figure 54 : Graphique des valeurs des variables importantes dans la projection (VIP) issues de la PLS-DA x p_value issues du test de Mann-Whitney entre les groupes de patients pour toutes les populations cellulaires. ....	183
Figure 55 : Expansion des cellules épithéliales bronchiques et nasales isolées d'un patient non-asthmatique.....	185
Figure 56 : Protocole de caractérisation des souches isolées des lavages bronchoalvéolaires. ....	187
Figure 57 : Courbes de croissance de trois souches différentes, exemple des souches nommées <b>A.</b> MB0296 (provenant d'un patient asthmatique sévère, isolée en MRS en condition aérobie), <b>B.</b> MB0258 (provenant d'un patient non-asthmatique, isolée en MSA en condition anaérobie) et en <b>C.</b> MB0251 (provenant d'un patient non-asthmatique, isolée en gyhBHI en condition aérobie).....	190
Figure 58 : Heatmap représentant les diamètres d'inhibition des souches par rapport à 5 antibiotiques (C : chloramphénicol ; Va : vancomycine ; K : kanamycine ; Gm : gentamycine ; S : streptomycine). ....	191
Figure 59 : Heatmap représentant la concentration en acétate, propionate et butyrate pour les 28 souches produisant plus de 3 µg/mL d'acétate. ....	192
Figure 60 : Photographie du gel d'agarose 1%, permettant la vérification du poids moléculaire correct du fragment d'ADN amplifié par PCR. ....	193
Figure 61 : Les différentes étapes de culture cellulaires avant d'obtenir un épithélium différencié.....	197
Figure 62 : Effet de l'ajout d'IL-4 (en bleu) sur la résistance électrique transépithéliale (TEER), exprimée en pourcentage de la condition contrôle (en noire), mesurée sur des cellules nasales de patients asthmatiques sévères (AS) et sur des cellules de patients non-asthmatiques (NA). ....	202
Figure 63 : <b>A.</b> Mesures du courant de court-circuit ( $I_{sc}$ ) lors d'ajouts séquentiels d'amiloride (10 µM, apical), de forskoline (10 µM, bilatéral), d'inhibiteur $I_{172}$ (20 µM, apical) et d'UTP (100 µM, apical) dans les trois conditions de culture des cellules épithéliales nasales humaines primaires (exemple du patient n°8, asthmatique sévère). Graphiques représentant le changement d' $I_{sc}$ , pour chaque condition de cultures (CTL : contrôle, ajout d'IL-4, ajout d'IL-4 puis de la bactérie CNCM I-5314), soit la variation du courant de court-circuit par rapport à la ligne de base après l'ajout <b>B.</b> d'amiloride (inhibition d'ENaC), <b>C.</b> de forskoline (activation de CFTR), <b>D.</b> d'inhibiteur $I_{172}$ (inhibition de CFTR) et <b>E.</b> d'UTP (activation des CaCC). Les points	

rouges correspondent aux patients asthmatiques sévères et les points verts aux patients non-asthmatiques.....	203
Figure 64 : Concentrations en <b>A.</b> IFN- $\gamma$ , <b>B.</b> IL-6 et <b>C.</b> TNF- $\alpha$ dans les lavages apicaux des cellules épithéliales nasales humaines primaires (PhNec) contrôles (CTL), des cellules ayant reçu de l'IL-4 et des cellules ayant reçu de l'IL-4 et la bactérie CNCM I-5314. ....	204
Figure 65 : Expressions relatives des ARN messagers (mRNA) de <b>A.</b> MUC5AC, <b>B.</b> MUC5B, <b>C.</b> MUC4, <b>D.</b> l'IL-25, <b>E.</b> TSLP et <b>F.</b> l'IL-33 dans les cellules épithéliales nasales humaines primaires issues de patients non-asthmatiques (NA) et asthmatiques sévères (AS) et mises en culture en présence de PBS/BSA 5% (en bleu, contrôle), d'IL-4 (en rose) ou d'IL-4 et de la bactérie CNCM I-5314 (vert).....	205
Figure 66 : Caractérisations locale est systémique de l'asthme sévère pédiatrique. ....	213
Figure 67 : Mise en place d'un modèle in vitro d'épithélium pour tester des candidats probiotiques.....	215

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification de la sévérité de l'asthme selon les caractéristiques cliniques avant le traitement. ....	32
Tableau 2 : Récapitulatif des études métabolomiques dans l'asthme. AS : Asthme Sévère, LBA : lavage bronchoalvéolaire. ....	61
Tableau 3 : Récapitulatifs des études sur le microbiote dans l'asthme. AS : asthme sévère, LBA : lavage bronchoalvéolaire .....	68
Tableau 4 : Caractéristiques démographiques et cliniques des enfants de la cohorte CLASSE. ....	73
Tableau 5 : Analyses réalisées sur les différents échantillons issus d'enfants asthmatiques sévères ou d'enfants contrôles. ....	76
Tableau 6 : Valeurs minimale, maximale, moyenne et écart-type de l'ensemble des métabolites annotés communs aux deux types de concentration. ....	89
Tableau 7 : Nombres de variables totales et après le tri et nombre de métabolites annotés <b>A.</b> en condition C18-ESI <sup>+</sup> et <b>B.</b> en condition HILIC-ESI <sup>-</sup> . ....	94
Tableau 8 : Références des standards utilisés comme étalons internes. ....	157
Tableau 9 : Résultats des analyses univariées réalisées sur les lipides regroupés par sous-classes. Les p value sont données avec et sans correction pour les tests multiples. ....	169
Tableau 10 : Matrice de confusion résumant l'information concernant la prédiction de classification des observations. Le pourcentage correct correspond au rapport du nombre d'observations bien classées, sur le nombre total d'observations. ....	182
Tableau 11 : Composition du milieu Brain Heart Infusion .....	186

Tableau 12 : Composition du milieu de De Man, Rogosa et Sharpe (MRS).....	186
Tableau 13 : Composition de la gélose au sel de mannitol (MSA) .....	186
Tableau 14 : Composition de la gélose à la bile, à l'esculine et à l'azide de sodium (BEA).186	
Tableau 15 : Disques d'antibiotique utilisés pour analyser la résistance aux antibiotiques des souches isolées des lavages bronchoalvéolaires. Les disques proviennent tous de chez BD Biosciences. ....	187
Tableau 16 : Composition du milieu Mueller-Hinton (MH).....	188
Tableau 17 : Nombres de souches isolées, des lavages bronchoalvéolaires de deux patients asthmatiques sévères et deux non-asthmatiques, sur 4 milieux en aérobie ou anaérobie non-strictes. ....	190
Tableau 18 : Tableau récapitulatif reprenant l'identification des souches, et le diamètre des zones d'inhibition (en mm).....	194
Tableau 19 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour le marquage de chaque moitié des inserts contenant les cellules. ....	200
Tableau 20 : Séquences des amorces directes et inverse pour l'étude de différents gènes par qPCR. Les amorces ont toutes été fournies par Eurofins .....	201

# Table des matières

Résumé.....	3
Summary.....	4
Remerciements .....	5
Abréviations .....	7
Liste des figures .....	10
Liste des tableaux .....	15
Introduction générale.....	23
Etude bibliographique.....	27
Pourquoi s'intéresser à l'asthme sévère.....	28
Prévalence de l'asthme et conséquences en termes de Santé Publique .....	28
Physiopathologie et symptomatologie clinique de l'asthme.....	31
Diagnostic et prise en charge de l'asthme .....	33
Diagnostic de l'asthme.....	33
Diagnostic chez les jeunes enfants .....	34
Traitement de l'asthme .....	34
Emergence de l'utilisation des probiotiques dans l'asthme.....	37
Facteurs impliqués dans le développement de la maladie .....	38
L'asthme sévère .....	41
Phénotypes et endotypes de l'asthme sévère.....	42
Phénotypes ou caractéristiques observables .....	42
Les endotypes ou mécanismes pathogéniques sous-jacents de l'asthme.....	43
Rôle de l'épithélium pulmonaire .....	44
Le système immunitaire acteur dans l'asthme .....	46
Immunité des cellules épithéliales.....	48
Les réponses de type T2 dans l'asthme.....	49
Les réponses de type Th1 dans l'asthme.....	50
Les réponses de type Th17 dans l'asthme.....	51
Les lymphocytes T régulateurs (Treg) dans l'asthme .....	52

Les lymphocytes B dans l'asthme .....	53
Intérêt de l'utilisation de biomarqueurs.....	53
Etat des lieux des analyses « omiques » dans l'asthme sévère .....	55
La métabolomique pour la recherche de biomarqueurs dans l'asthme sévère .....	57
Principe de la métabolomique .....	57
Comment fait-on une analyse métabolomique ? .....	58
La métabolomique pour la recherche de signature de l'asthme sévère .....	60
La métagénomique pour l'analyse du microbiote dans l'asthme sévère .....	63
Principe de la métagénomique.....	63
Comment fait-on une analyse métagénomique .....	63
Rôle du microbiote .....	64
Microbiote de patient sain <i>versus</i> microbiote de patients asthmatiques sévères .....	66
Analyse multi-omique dans l'asthme.....	69
Objectifs de la thèse .....	69
Méthodologie générale .....	71
Présentations des cohortes utilisées.....	72
La cohorte CLASSE, une première cohorte permettant la preuve de concept.....	72
Cohorte SevAsthma, cohorte en cours d'inclusion .....	73
Traitement des échantillons de la cohorte SevAsthma.....	76
Traitement des prélèvements sanguins .....	77
Traitement des brossages nasaux .....	77
Traitement des biopsies.....	78
Traitement des lavages bronchoalvéolaires .....	79
Partie 1 : Etude multi-omique sur les échantillons de la cohorte CLASSE .....	81
Chapitre 1 : Mise en place d'une méthodologie pour l'analyse métabolomique des lavages bronchoalvéolaires.....	82
Mise au point du protocole de préparation des LBA.....	82
Contexte .....	82
Matériels et méthodes.....	82

a)	Protocole de préparation des échantillons sans optimisation préalable.....	82
b)	Choix de la méthode de concentration des LBA .....	85
c)	Sélection du volume initial d'échantillon à concentrer .....	86
d)	Etude de différents traitements pour améliorer le signal en ionisation négative 86	
	Résultats.....	88
a)	Nombre et intensités des variables obtenues en LC-MS sur les LBA non traités 88	
b)	Test de concentration des LBA par évaporation ou lyophilisation en amont de la LC-MS.....	88
a)	Optimisation du volume de LBA à concentrer .....	90
b)	Etude de traitement supplémentaire .....	91
c)	Volume final de LBA à concentrer.....	94
	Conclusion.....	96
	Normalisation des LBA pour l'analyse métabolomique .....	97
	Contexte .....	97
	Matériels et méthodes.....	98
	Résultats.....	100
	Conclusion.....	102
	Conclusion générale du chapitre 1.....	102
	Chapitre 2 : L'analyse intégrée de données multi-omiques permet de distinguer les enfants asthmatiques sévères des contrôles .....	104
	Introduction.....	104
	Résultats.....	148
	Conclusion.....	151
	Chapitre 3 : Métabolome et lipidome plasmatique.....	154
	Contexte .....	154
	Matériels et méthodes.....	155
a)	Analyse métabolomique sur le plasma.....	155
b)	Analyse lipidomique des plasmas .....	156



c) Analyses statistiques .....	160
Résultats.....	161
a) Analyses des corrélations entre les métabolites plasmatiques et les métabolites des lavages bronchoalvéolaires .....	161
b) Analyses non supervisées de l'ensemble des métabolites plasmatiques ...	162
c) Douze métabolites sont altérés en fonction du statut asthmatique .....	164
d) Quelques lipides sont significativement différents entre les groupes de patients 167	
e) Analyse multi-omique au niveau plasmatique .....	170
Conclusion et discussion .....	171
Conclusion générale de la partie 1 .....	174
Partie 2 : Etude du système immunitaire sur la cohorte SevAsthma et caractérisation des interactions microbiote/cellules épithéliales pulmonaires dans un contexte d'inflammation T2 .....	175
Chapitre 1 : Analyse des cellules immunitaires et des cytokines aux niveaux local et plasmatique .....	176
Contexte .....	176
Matériels et méthodes.....	176
a) Population d'étude.....	176
b) Préparation des cellules pour le marquage en cytométrie en flux .....	176
c) Protocole et panel d'anticorps pour le marquage cellulaire sur cellules « fraîches » .....	177
d) Protocole et panel d'anticorps pour le marquage cellulaire sur cellules réactivées ex vivo .....	178
e) Acquisition des données de cytométrie.....	178
f) Stratégie d'analyse des populations cellulaires .....	178
g) Analyses des données.....	181
Résultats sur les PBMC .....	181
Conclusion.....	183
Chapitre 2 : Caractérisation des interactions microbiote/cellules épithéliales pulmonaires dans un contexte d'inflammation « T2 ».....	184

Contexte .....	184
Banque de cellules épithéliales et de bactéries pulmonaires .....	184
Matériels et méthodes.....	184
Résultats.....	189
a) Banques de cellules et banques de bactéries .....	189
b) Caractérisation et identification de bactéries issues des LBA .....	190
Conclusion.....	195
Caractérisation des interactions microbiote/cellules dans un modèle d'inflammation T2 .....	197
Matériels et méthodes.....	197
Résultats.....	201
a) Une inflammation de type T2 induite par l'IL-4 semble avoir un effet sur le canal CFTR dans un modèle cellulaire .....	201
b) La concentration cytokinique dans les lavages apicaux ne semble pas être modifiée dans un modèle cellulaire d'inflammation T2 .....	203
c) Les expressions relatives des mucines MUC5AC et MUC5B semblent être altérées dans un modèle cellulaire d'inflammation T2 .....	204
Conclusion.....	205
Conclusion du chapitre 2 .....	208
Conclusion générale et perspectives .....	209
Bibliographie .....	216
Table des annexes .....	227
Annexes .....	228
Liste des communications .....	241
Liste des formations .....	242
Publications.....	243



## Introduction générale

L'asthme est une maladie hétérogène pouvant être associée à plusieurs phénotypes cliniques, chacun pouvant faire intervenir des mécanismes physiopathologiques différents (endotypes). L'asthme est caractérisé par une inflammation et une obstruction partielle et réversible des bronches. Les voies aériennes hypersensibles se retrouvent contractées et obstruées par d'épaisses sécrétions, ce qui rend la respiration difficile. Certains asthmatiques sont la plupart du temps asymptomatiques, avec seulement des épisodes d'essoufflement de courte durée. D'autres présentent une toux et des sifflements presque permanents et peuvent avoir des crises sévères provoquées par de nombreux facteurs comme des infections virales, l'exposition à des aéroallergènes ou l'activité physique. Les crises d'asthme, ou exacerbations, sont variables par leur fréquence et leur sévérité.

Le diagnostic d'asthme ainsi que le niveau de sévérité de la maladie sont actuellement basés sur les recommandations internationales, à partir des symptômes et des données de spirométrie permettant d'évaluer le contrôle de la pathologie. L'asthme sévère (AS) se définit comme un asthme non contrôlé (c'est-à-dire avec survenue d'exacerbations) malgré la prise effective de corticostéroïdes inhalés à dose élevée associée à un deuxième médicament de contrôle. L'AS ne touche qu'environ 5% des asthmatiques, mais réduit considérablement leur qualité de vie et engendre des coûts de santé très élevés. La quantité de médicaments utilisés, les consultations fréquentes chez le médecin et les visites aux urgences, qui se terminent souvent par une hospitalisation, expliquent ces coûts.

Il est aujourd'hui, difficile de prévoir la réponse des patients asthmatiques sévères (AS) aux médicaments et l'évolution de la maladie. L'implémentation de la médecine personnalisée ou de précision dans la gestion de l'AS nécessite l'identification de biomarqueurs. C'est pourquoi, pour améliorer le traitement de l'AS, il est important d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes physiopathologiques de cette maladie. Dans ce contexte, mon travail a consisté à essayer de caractériser finement l'asthme sévère dans une population pédiatrique à l'aide d'une approche intégrée (comprenant les signatures immunologiques, métaboliques et du microbiote) menée sur des lavages bronchoalvéolaires.

Les résultats seront confirmés ultérieurement sur une seconde cohorte indépendante, pour laquelle les inclusions ont malheureusement été retardées notamment du fait de la COVID-19. Cependant, cette nouvelle cohorte a permis de réaliser des expériences complémentaires, avec production de banques de cellules épithéliales primaires nasales et bronchiques et de souches bactériennes pulmonaires. Pour finir, cette cohorte a permis de caractériser les interactions microbiote/cellules épithéliales dans le cadre d'une inflammation T2.

Le projet de thèse a été soutenu grâce à un financement ANR (à l'appel à projets générique correspondant à la composante « Recherche et Innovation » du Plan d'Action de l'ANR). Le projet

est développé grâce à l'interaction entre trois partenaires : l'Institut Necker Enfants Malades (INEM), le Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), Université Paris-Saclay, CEA et INRAE ainsi que l'institut Micalis, INRAE. J'ai réalisé mes travaux de thèse dans ces deux derniers laboratoires.



## Etude bibliographique



## Pourquoi s'intéresser à l'asthme sévère

### Prévalence de l'asthme et conséquences en termes de Santé Publique

L'asthme est la maladie respiratoire chronique la plus répandue dans le monde, touchant plus de 300 millions de personnes dont 4 millions en France<sup>1</sup>. La fréquence de l'asthme varie en fonction de l'âge : les enquêtes nationales de santé en milieu scolaire indiquent une prévalence de la maladie allant de 10 à 16% selon les classes en France, tandis qu'elle diminue à 5 à 7 % chez l'adulte<sup>2</sup>.

La prévalence de l'asthme dépend aussi du pays, en lien avec son développement économique. Comme le montre la Figure 1, les pays avec la prévalence la plus élevée sont la France, l'Angleterre ainsi que les pays du Nord de l'Europe, le Brésil et l'Australie. Inversement, des pays d'Asie comme le Vietnam ou d'Amérique centrale comme le Mexique semblent moins touchés<sup>3</sup>.

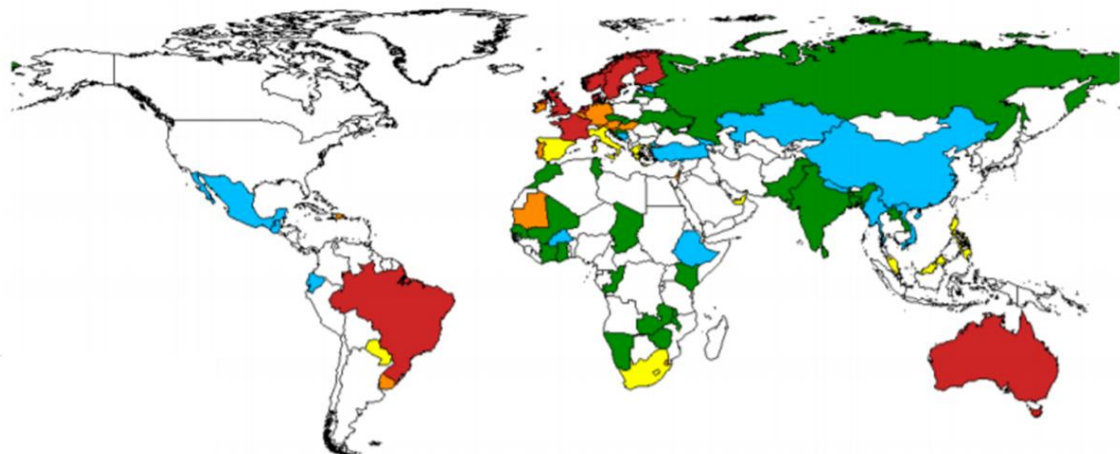


Figure 1 : Prévalence de l'asthme dans différents pays. En bleu, les pays ayant une prévalence entre 0 et 2.5 %, en vert ceux entre 2.5 et 5 %, en jaune entre 5 et 7.5 %, en orange entre 7.5 % et 10 % et en rouge ceux ayant une prévalence supérieure à 10 %.

(En blanc, sont représentés les pays où il n'y a pas de données standardisées disponibles).

Adapté de To et al., 2012<sup>3</sup>

La mortalité liée à l'asthme est faible à tous les âges. En Europe, l'asthme est responsable de 0,4 % des décès, avec de grandes différences entre les pays<sup>4</sup>. La mortalité est plus élevée dans les pays plus pauvres en ressources (Figure 2), où les médicaments contre l'asthme ne sont pas disponibles et les patients peuvent rencontrer des difficultés à accéder aux soins de santé.

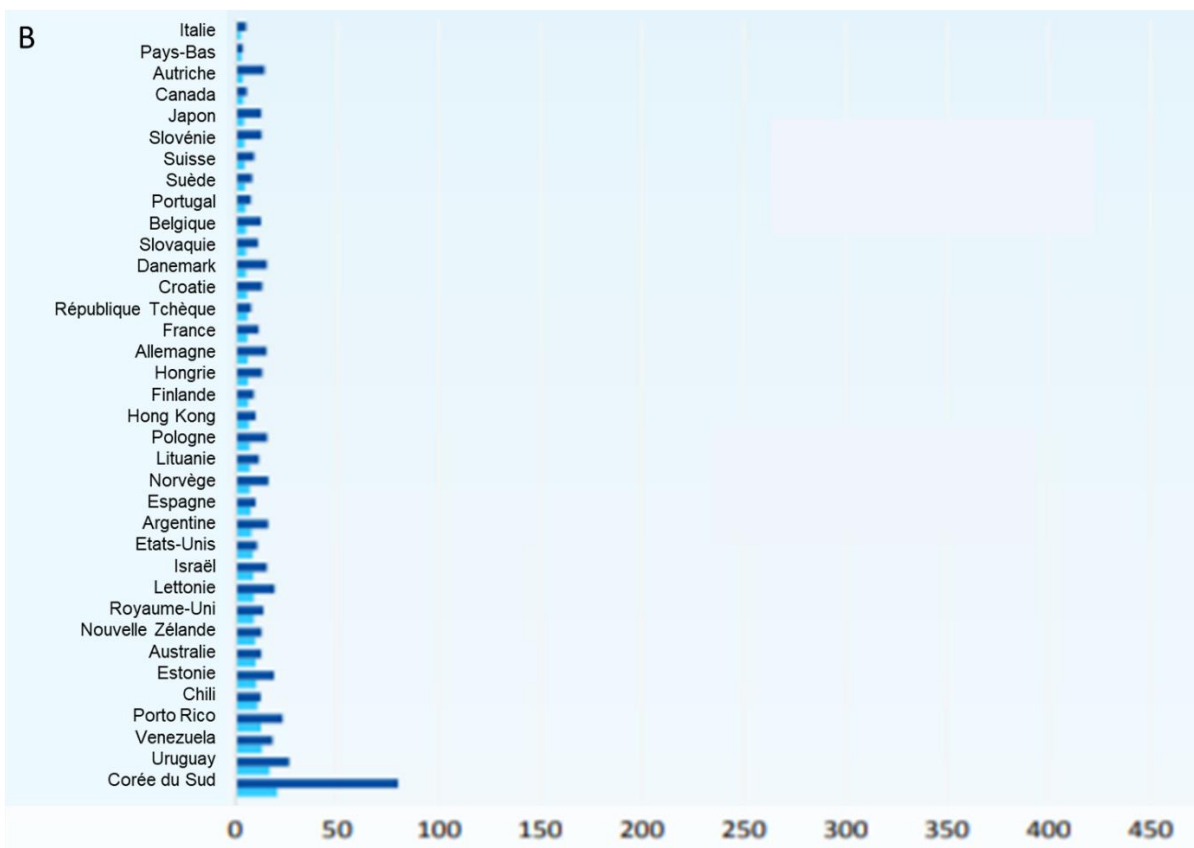
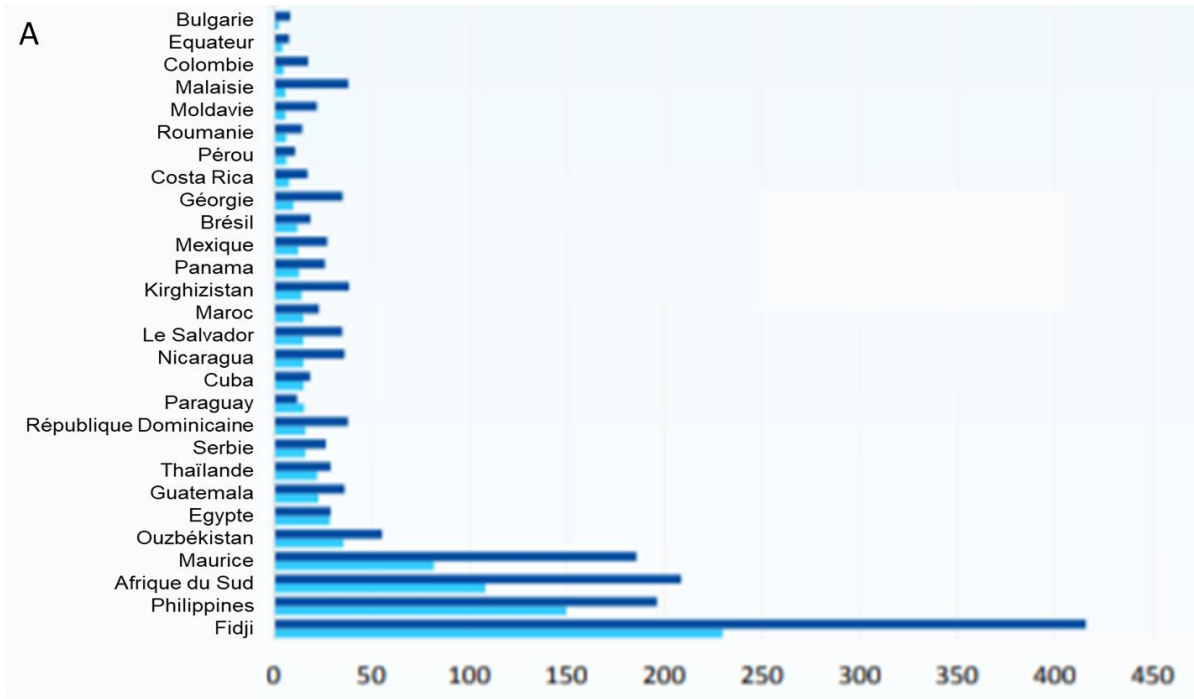


Figure 2 : Taux de mortalité liée à l'asthme, entre 2001 et 2005 (en bleu foncé) et entre 2011 et 2015 (en bleu clair) par pays, classés par taux de mortalité, et normalisés selon l'âge, **A.** dans les pays à revenus faibles et moyens et **B.** dans les pays à revenus élevés. Adapté de Global Asthma Network, 2018<sup>5</sup>

L'asthme est donc un problème de santé publique non seulement pour les pays développés mais également pour les pays en développement.

Les coûts socio-économiques de cette maladie sont considérables du fait de la composante médicale directe (séjours hospitaliers et médicaments) et de la composante médicale indirecte (absences au travail et décès prématuré), comme montré Figure 3 pour l'asthme chez l'enfant qui impactera l'enfant lui-même, mais aussi ses parents.

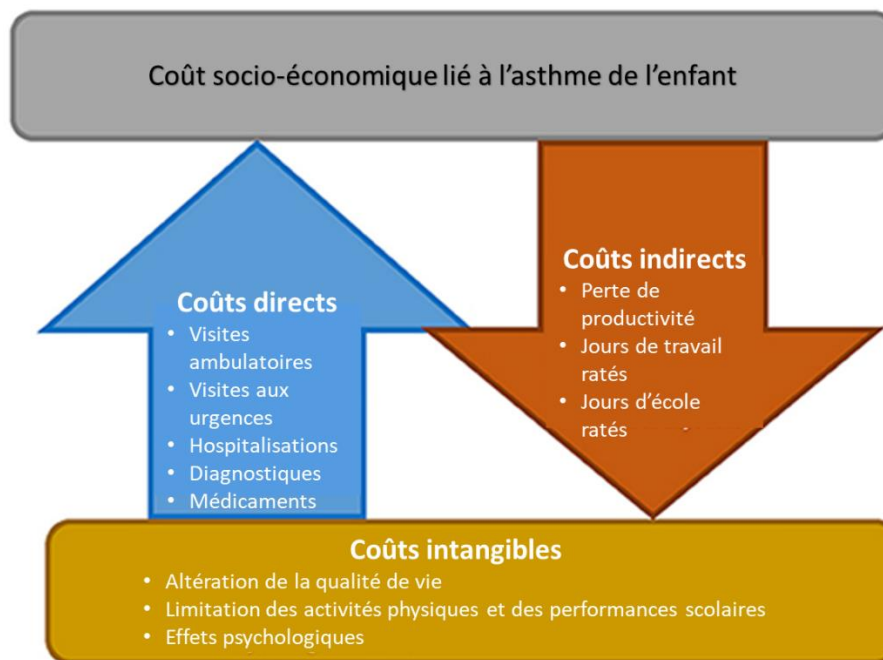


Figure 3 : Coûts socio-économiques liés à l'asthme de l'enfant, constitués des coûts directs, indirects et intangibles.

Adapté de Ferrante et al., 2018<sup>4</sup>

Dans l'ensemble, les coûts mondiaux liés à l'asthme sont élevés et varient considérablement d'un pays à l'autre, en fonction de facteurs tels que le type de système de santé et les ressources financières en santé publique<sup>4</sup>. Les coûts directs de l'asthme représentent environ 1 à 3% des dépenses médicales totales dans la plupart des pays. Aux USA, les dépenses de santé liées à l'asthme étaient d'environ 56 milliards de dollars en 2011. En Europe, ils étaient de 19.3 milliards d'euros pour les personnes de 15 à 64 ans entre 1999 et 2002<sup>5</sup>. Les patients souffrant d'asthme difficile à traiter, bien que représentant un faible pourcentage des asthmatiques, consomment une part très importante de ces ressources de soins.

De plus, l'asthme peut être associé à des limitations sur les aspects physiques et sociaux de la vie quotidienne des patients, en particulier lorsque les symptômes ne sont pas contrôlés<sup>4</sup>. Ainsi, au-delà des aspects financiers présentés, l'asthme infantile a des effets négatifs importants sur les activités quotidiennes de l'enfant, sa scolarité et sa vie familiale<sup>6</sup>. Dans l'asthme de l'enfant, les coûts indirects sont généralement plus élevés que chez les patients

plus âgés. En effet, un enfant souffrant d'une exacerbation perd en moyenne 3 à 5 jours d'école par an et au moins un de ses parents perd le même temps de travail<sup>4</sup>.

### Physiopathologie et symptomatologie clinique de l'asthme

La maladie asthmatique est l'une des affections chroniques les plus fréquentes en France et touche à la fois les enfants et les adultes. Comme précisé par le programme « Global Initiative for Asthma » (GINA)<sup>7</sup>, l'asthme est une maladie hétérogène, caractérisée par une inflammation chronique des voies respiratoires entraînant une hyperréactivité à certaines agressions biologiques, chimiques ou physiques. Suite à cette inflammation, et en réponse à ces stimuli, la paroi bronchique se contracte et un mucus épais est sécrété. Ces phénomènes induisent un moindre passage de l'air vers les poumons, ce qui entraîne généralement la crise d'asthme ou exacerbation. Les symptômes de cette crise sont caractérisés le plus souvent par une respiration sifflante (dyspnée), une gêne respiratoire, une toux sèche ou encore une sensation d'oppression thoracique. La crise peut durer plusieurs minutes et jusqu'à quelques heures. Entre deux crises, la respiration redevient normale. Cependant, ces différents symptômes peuvent se manifester plusieurs fois par jour ou par semaine et s'aggravent chez certains sujets lors d'un effort physique ou pendant la nuit.

L'asthme est une maladie hétérogène notamment du fait de la différence des symptômes cliniques observés, et de leur sévérité, et des facteurs déclenchant les crises. La maladie peut donc prendre des formes très diverses : il n'y a donc pas un asthme mais bien plusieurs types d'asthme. Jusqu'en 2006, les groupes d'expert classaient la maladie en fonction de sa gravité<sup>8</sup>. Comme l'ont ensuite précisé Bateman et al.<sup>9</sup>, la gravité de l'asthme dépend du niveau des symptômes, de la limitation du débit d'air mais aussi de la variabilité de la fonction pulmonaire. Ainsi quatre catégories d'asthme avaient été définies, présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Classification de la sévérité de l'asthme selon les caractéristiques cliniques avant le traitement.

VEMS : volume expiratoire maximal par seconde, CVF : Capacité Vitale Forcée.

Adapté de Bateman et al., 2018<sup>9</sup>

Catégorie	Caractéristiques
Intermittent	Symptômes moins d'une fois par semaine Brèves exacerbations Symptômes nocturnes pas plus de deux fois par mois VEMS ou CVF $\geq$ 80% prévu Variabilité CVF ou VEMS $<$ 20%
Léger	Symptômes plus d'une fois par semaine mais moins d'une fois par jour Exacerbations qui peuvent affecter l'activité et le sommeil Symptômes nocturnes plus de deux fois par mois VEMS ou CVF $\geq$ 80% prévu Variabilité CVF ou VEMS $<$ 20–30%
Modéré	Symptômes quotidiens Exacerbations qui peuvent affecter l'activité et le sommeil Symptômes nocturnes plus d'une fois par semaine VEMS ou CVF 60-80% prévu Variabilité CVF ou VEMS $>$ 30%
Sévère	Symptômes quotidiens Exacerbations fréquentes Symptômes d'asthme nocturnes fréquents Limitation des activités physiques VEMS ou CVF $\leq$ 60% prévu Variabilité CVF ou VEMS $>$ 30%

La première catégorie d'asthme est l'asthme intermittent. Les patients ont des symptômes d'asthme qui surviennent généralement après des infections respiratoires virales, un effort intense, ou des expositions environnementales. Ces épisodes sont suivis de périodes prolongées sans symptôme. L'asthme peut aussi être léger, les symptômes ou la prise de bronchodilatateur ont lieu 1 à 2 fois par semaine et les réveils liés à l'asthme nocturne sont présents au moins deux fois par mois. D'autres présentent un asthme modéré, avec des symptômes quotidiens ou très fréquents. Contrairement à l'asthme intermittent, ces patients n'ont pas de périodes prolongées sans oppression thoracique, respiration difficile, intolérance à l'effort ou toux. Ils sont sujets à des exacerbations aiguës à la suite d'infections respiratoires virales ou à des expositions environnementales. Enfin, l'asthme sévère est un asthme avec des symptômes quotidiens, des crises fréquentes et une altération importante de la fonction pulmonaire. L'impact sur l'activité physique est important. Plus tard, les experts ont considéré que l'évaluation des symptômes était peu objective car elle est fortement dépendante de la perception de chaque patient et, d'autre part, les symptômes peuvent évoluer au cours du temps. La maladie a donc été classée en fonction du degré de contrôle des symptômes permis par un traitement de fond<sup>9</sup>. Ainsi actuellement, on distingue trois niveaux de contrôle (ou trois catégories) : l'asthme bien contrôlé, l'asthme partiellement contrôlé, et l'asthme non contrôlé. La connaissance du niveau de contrôle de l'asthme repose sur plusieurs questionnaires et tests. Ensemble, le questionnaire d'évaluation du traitement de l'asthme ainsi que le test de

contrôle de l'asthme (ACT) fournissent des « scores » qui peuvent être utilisés pour classer l'asthme dans une des trois catégories<sup>8,10</sup>. Le contrôle de l'asthme est la mesure permettant d'apprécier si les manifestations de l'asthme ont été réduites ou éliminées par le traitement. Ces catégories intègrent donc à la fois la fréquence et la sévérité des symptômes, associées à l'adhérence et à la prise correcte du traitement de fond de l'asthme, ainsi que la suppression des facteurs environnementaux modifiables (i.e. tabagisme). Dans cette classification, l'asthme est défini comme « contrôlé » si le patient traité signale des symptômes et utilise des médicaments de secours moins de deux fois par semaine, et qu'il ne présente aucun symptôme nocturne, aucune limitation d'activité et aucun facteur de risque important<sup>11</sup>. L'asthme est défini comme « partiellement contrôlé » lorsque les symptômes et l'utilisation de médicaments de secours sont présents plus de deux fois par semaine et/ou que le patient présente des symptômes nocturnes et des limitations d'activité<sup>11</sup>. Un asthme non contrôlé est défini par au moins l'un des critères suivants : un score inférieur à 20 au test de contrôle de l'asthme ; au moins 2 exacerbations sévères avec prise de corticostéroïdes oraux pendant au moins 3 jours dans les 12 mois précédents ; des exacerbations sérieuses, nécessitant une hospitalisation et/ou une ventilation mécanique dans les 12 mois précédents ; la diminution irréversible de la capacité pulmonaire.<sup>12</sup> Par la suite, nous allons nous intéresser à cette dernière forme d'asthme, c'est-à-dire à un asthme non contrôlé – également appelé asthme sévère (AS).

## Diagnostic et prise en charge de l'asthme

### Diagnostic de l'asthme

La suspicion d'asthme se base sur la présence des différents symptômes (toux, respiration sifflante, essoufflement, oppression thoracique). Les cliniciens questionnent sur les symptômes respiratoires ressentis : type de symptôme, fréquence et moment d'apparition (la nuit, après un effort...)<sup>7</sup>. Le diagnostic est ensuite confirmé par une analyse de l'obstruction des voies respiratoires (présence et degré), au cours d'épreuves fonctionnelles respiratoires (EFR)<sup>7,13</sup>. Les EFR mesurent, la capacité pulmonaire en termes de ventilation, grâce à un spiromètre, et le taux d'oxygène et de gaz carbonique dans le sang. La méthode la plus fiable pour évaluer la capacité pulmonaire est la mesure du volume expiratoire maximal par seconde (VEMS), qui correspond au volume de gaz expiré pendant la première seconde d'une expiration forcée maximale réalisée après une inspiration complète. Cependant, la mesure de la Capacité Vitale Forcée (CVF), correspondant au volume total de gaz exhalé au cours d'une expiration forcée réalisée après une inspiration complète, est également couramment utilisée. Il est important d'utiliser toujours la même méthode lors des divers contrôles de suivi de l'asthme pour un même patient.

## Diagnostic chez les jeunes enfants

La littérature distingue l'asthme préscolaire, chez les enfants âgés de moins de 6 ans et caractérisé par une respiration sifflante récurrente (« wheezing »), de l'asthme des enfants d'âge scolaire (âgés de 6 à 11 ans) et l'asthme chez les adolescents (chez les 12-17 ans)<sup>14</sup>.

Comme vu précédemment, les mesures de la fonction pulmonaire sont essentielles au diagnostic de l'asthme. Cependant, ces dernières ne sont pas fiables chez les jeunes enfants : une diminution du débit d'air ou une inflammation des voies respiratoires, sont en effet difficiles à évaluer dans cette population<sup>15,16</sup>. Par conséquent, le diagnostic chez l'enfant préscolaire repose en grande partie sur les symptômes. Or, de nombreux symptômes qui appuient un diagnostic d'asthme chez les jeunes enfants ne sont pas nécessairement spécifiques à l'asthme. Par exemple, la toux et la respiration sifflante peuvent être observées suite à une infection, notamment virale (bronchiolite par exemple).

Ainsi, de nombreux enfants peuvent recevoir un sur-traitement des sifflements transitoires, ou à l'inverse être diagnostiqués comme asthmatiques bien après leurs premiers symptômes, ce qui entraîne un retard de leur prise en charge.

## Traitement de l'asthme

Le traitement pharmacologique et non pharmacologique de l'asthme est ajusté selon un cycle continu (Figure 4) qui implique une évaluation (diagnostic), l'ajustement du traitement et un examen de la réponse (symptômes).

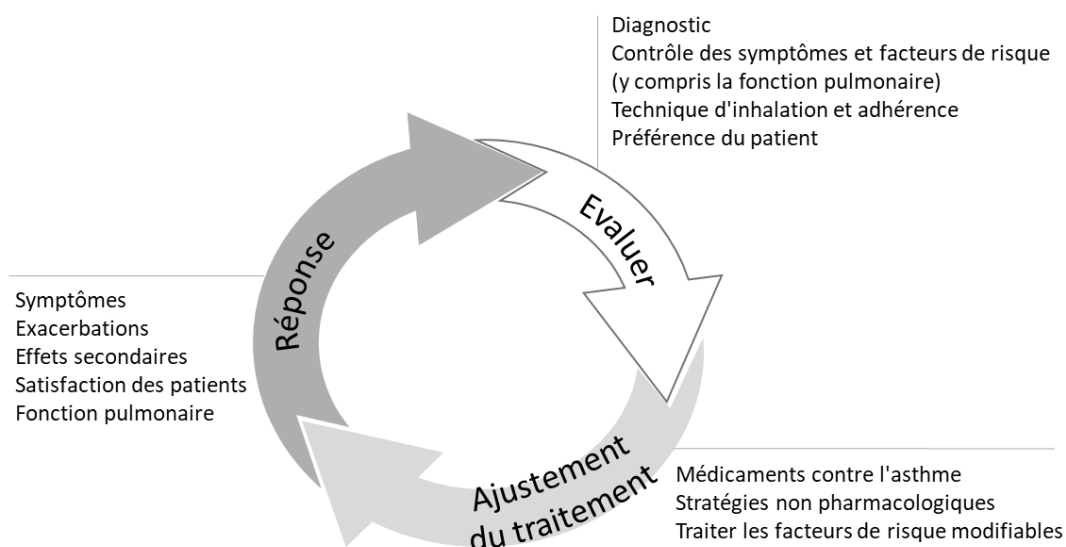


Figure 4 : Le cycle de gestion de l'asthme est constitué de trois étapes : l'évaluation, l'ajustement du traitement et l'analyse de la réponse au traitement.  
Adapté de GINA, 2022<sup>7</sup>



L'asthme persiste toute la vie même si des phases de rémission peuvent durer plusieurs années, faisant parfois oublier la maladie<sup>17</sup>. Les objectifs à long terme du traitement ne sont donc pas de supprimer l'asthme, mais de diminuer les risques et de contrôler les symptômes.

La prise en charge de l'asthme repose tout d'abord sur un traitement spécifique mais aussi sur une éviction des facteurs environnementaux déclenchants « modifiables », tels que le tabagisme actif et passif et les expositions aux aéroallergènes (acariens, moisissures, animaux...).

Les traitements sont divisés en deux catégories : les médicaments qui soulagent la crise et les médicaments liés au traitement de fond. Pour soulager les crises, les bronchodilatateurs d'action rapide agissent en relâchant les muscles qui entourent les bronches, contrecarrant la bronchoconstriction et facilitant le passage de l'air. La respiration est rapidement soulagée mais leur action est limitée dans le temps. Le traitement de fond de l'asthme est déterminé par la sévérité de la maladie, évaluée sur des critères cliniques et fonctionnels respiratoires. Les traitements sont catégorisés en différents paliers allant de 1 à 5, avec deux possibilités de traitement (Figure 5)<sup>7</sup>.

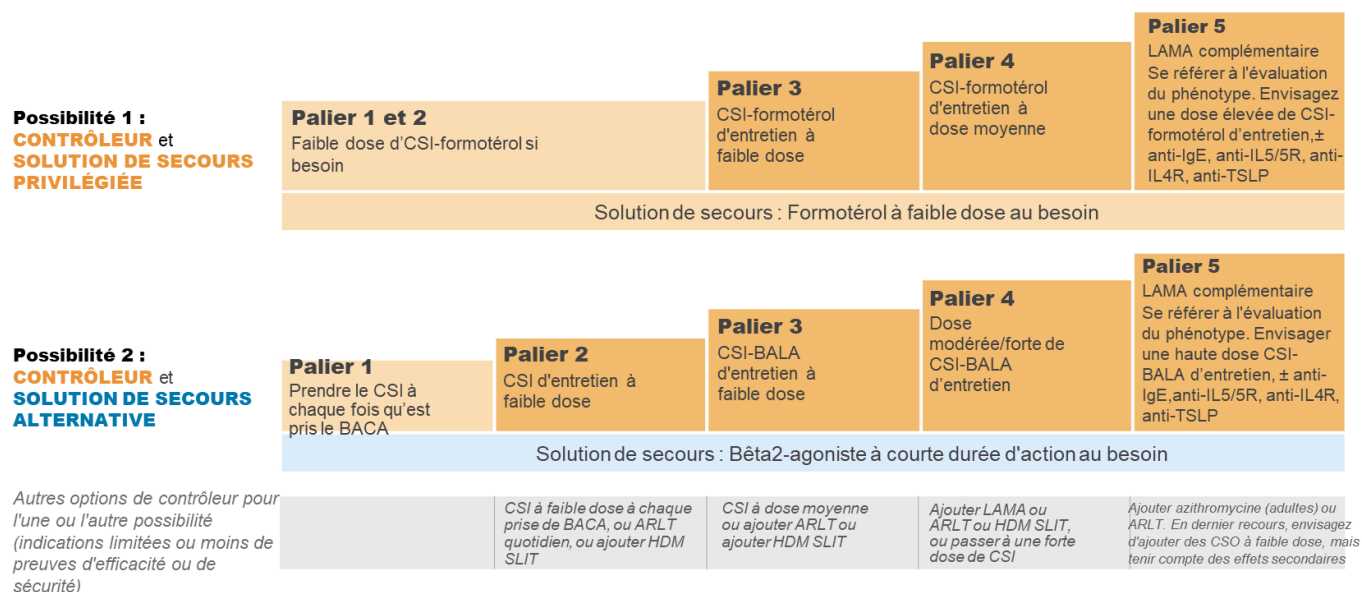


Figure 5 : Les deux possibilités de traitements de l'asthme catégorisés par paliers pour les personnes de plus de 12 ans.

ARLT : antagonistes aux récepteurs des leucotriènes ; BALA :  $\beta_2$ -agonistes à longue durée d'action, BACA :  $\beta_2$ -agonistes à courte durée d'action ; CSI : corticostéroïdes inhalés ; CSO : corticostéroïdes oraux ; HDM SLIT : immunothérapie sublinguale aux acariens ; LAMA : antagoniste muscarinique à action prolongée.

Source : GINA, 2022<sup>7</sup>

La possibilité de traitement 1 est caractérisée par des doses croissantes de CSI-formotérol pour les paliers 1 à 4 (Figure 5). La solution de secours envisageable dans ce cas est, au besoin, la prise de formotérol. Pour la possibilité de traitement 2, nous retrouvons ce même



phénomène de dose croissante en CSI pour les paliers 1 et 2 puis pour les paliers suivant en fonction de la dose de CSI avec l'ajout de  $\beta_2$ -agonistes à longue durée d'action (BALA). La solution de secours envisageable dans ce cas est, au besoin, le BACA. Pour ces deux possibilités de traitement, d'autres contrôleurs sont possibles comme les BACA, les antagonistes aux récepteurs des leucotriènes (ARLT) ou l'immunothérapie sublinguale aux acariens. La possibilité 1 est la possibilité préférée, recommandée par le GINA<sup>7</sup>, car l'utilisation de CSI-formotérol à faible dose comme analgésique réduit le risque d'exacerbations sévères par rapport aux traitements avec BACA, avec un contrôle similaire des symptômes. La possibilité 2 est proposée comme approche alternative si la possibilité 1 n'est pas possible, ou si l'asthme d'un patient est stable avec une bonne observance et aucune exacerbation de son traitement actuel.

Les patients de tout âge, qui ont des symptômes persistants et des exacerbations malgré une technique d'inhalation correcte et une bonne observance du traitement de l'étape 4 et chez qui d'autres options de contrôle ont été envisagées, doivent être référés à un spécialiste ayant une expertise dans l'investigation et la prise en charge de l'asthme sévère. Des biothérapies peuvent ainsi être prescrites en fonction du profil phénotypique du patient (palier 5) en plus de la prise d'antagonistes muscariniques à action prolongée (LAMA) et de forte dose de CSI. Les biothérapies sont basées sur des anticorps qui ciblent des molécules impliquées dans les mécanismes de l'asthme et ont pour objectif principal de réduire le risque de survenue des exacerbations et objectif secondaire de réduire l'utilisation de corticoïdes<sup>18</sup>. Par exemple, les patients de plus de 6 ans, avec un asthme allergique sévère ou modéré non contrôlé avec les traitements des paliers 4 et 5 peuvent prendre des anti-immunoglobulines E (IgE) comme l'omalizumab. L'anti-interleukine (IL)-5/5R est utilisé dans des cas d'asthme sévère à éosinophiles et l'anti-lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) est utilisé chez les personnes de plus de 12 ans atteintes d'asthme sévère<sup>7</sup>. Les biothérapies actuellement disponibles dans le traitement de l'asthme sévère en France sont l'omalizumab, le mepolizumab, le reslizumab, le benralizumab et le dupilumab. Cet arsenal thérapeutique s'enrichira courant de l'année 2023, avec l'arrivée du tezepelumab. Dans le cadre de l'asthme sévère pédiatrique, trois anticorps monoclonaux sont disponibles aujourd'hui en France : l'omalizumab, le mépoluzumab, et le dupilumab<sup>18</sup>. Toutes ces biothérapies concernent les asthmes sévères dont la composante inflammatoire est dite de type T2 et ne peuvent donc pas être prescrites à tous les patients atteints d'AS<sup>18</sup>.

## Emergence de l'utilisation des probiotiques dans l'asthme

Les traitements de l'asthme existants ne sont pas toujours efficaces. Environ 10 % des personnes qui suivent le traitement de fond prescrit ne parviennent pas à contrôler leurs symptômes d'asthme<sup>19</sup>. Ces dernières années, ont vu l'émergence des biothérapies ainsi que l'utilisation de probiotiques pour le traitement de l'asthme.

L'Organisation mondiale de la santé<sup>20</sup> précise que les probiotiques sont définis comme «des micro-organismes vivants qui confèrent des bénéfices santé lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante ». Les membres des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont les bactéries probiotiques les plus couramment utilisées, et peuvent aider à prévenir ou à améliorer les allergies et les maladies respiratoires<sup>21</sup>. En effet, elles peuvent coloniser de manière stable le tractus intestinal, moduler la composition microbienne de l'intestin, améliorer les niveaux de métabolites microbiens, principalement les acides gras à chaîne courte (AGCC) et moduler l'immunité de l'hôte<sup>21</sup>. Les acides gras à chaîne courte, y compris le butyrate, le propionate et l'acétate, sont produits par une grande variété de bactéries intestinales par fermentation de fibres alimentaires, ce qui pourrait aider à inhiber les réponses pro-inflammatoires dans les poumons<sup>21</sup>. En effet, les AGCC gagnent la circulation périphérique et les sites corporels distaux, tels que les poumons, où ils moduleraient l'activité des lymphocytes T régulateurs et de diverses cytokines régulatrices<sup>21</sup>. Des études d'observation chez l'homme ont rapporté que des réductions d'AGCC fécaux pendant la petite enfance étaient associées au développement de l'asthme plus tard dans la vie<sup>22,23</sup>.

Plusieurs études ont évalué l'effet de probiotiques administrés oralement dans la prévention des maladies allergiques et des infections. Une étude chez la souris a montré que l'administration orale d'un mélange de probiotiques (contenant *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus* et *Bifidobacterium animalis*) atténuait le recrutement d'éosinophiles activés dans les poumons, leur infiltration dans les LBA et leur activation (mesure de l'activité de la peroxydase des éosinophiles dans le liquide des LBA)<sup>24</sup>. De plus, il a été montré, toujours dans un modèle murin, qu'une supplémentation orale néonatale en probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus* et *Bifidobacterium lactis*) pouvait inhiber le développement de la sensibilisation allergique et des maladies des voies respiratoires en induisant des cellules Treg et la production de TGF- $\beta$ <sup>25</sup>. Il a aussi été démontré que l'administration orale de *L.rhamnosus* offrait des avantages dans le contexte de la prévention et du traitement des maladies allergiques dans des essais cliniques humains<sup>26,27</sup>.

Bien que les probiotiques aient été initialement administrées par voie orale, l'application de probiotiques par voie non orale commence à être décrite. Par exemple, l'étude de Spacova et al.,<sup>28</sup> sur un modèle souris, a démontré que l'administration intranasale répétée de bactéries

probiotiques vivantes (*L.rhamnosus*) peut diminuer l'inflammation allergique des voies respiratoires et la production de cytokines pulmonaires T2, et est capable de prévenir l'hyperréactivité des voies respiratoires. Une autre étude, renforçant l'idée le début de la vie tant que période de sensibilité élevée, a montré que l'administration précoce de souches pro-type 1 (*Enterococcus sp.*) ou pro-type 2 (*Staphylococcus genus*) permet de moduler la réactivité aux aéroallergènes avec notamment une réduction de la réponse immunitaire de type 2<sup>29</sup>.

### Facteurs impliqués dans le développement de la maladie

L'asthme résulte de l'interaction entre une prédisposition génétique et des facteurs environnementaux favorisant son initiation, puis le déclenchement des exacerbations (Figure 6).

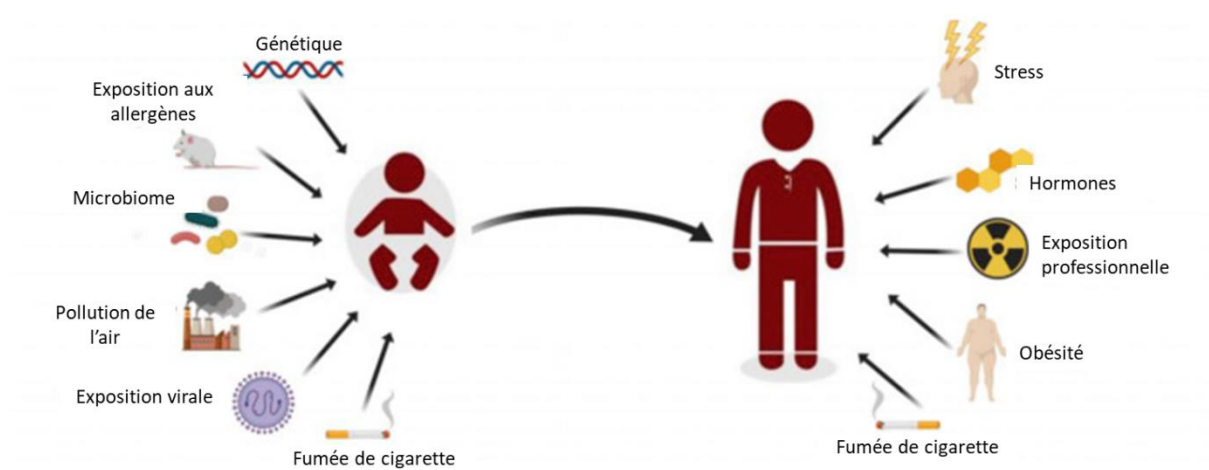


Figure 6 : Facteurs de risque favorisant l'initiation de l'asthme et induisant les exacerbations. Adapté de Kuruvilla et al., 2019<sup>30</sup>

### Facteurs prédisposant à l'asthme

L'hypothèse hygiéniste suggère que la période post-natale, critique dans la mise en place de la réponse immunitaire, est impactée négativement par une hygiène trop poussée, notamment les environnements domestiques extrêmement propres et par l'utilisation des antibiotiques<sup>31</sup>. Il existe ainsi une relation inverse entre la diversité microbologique très tôt dans la vie et les maladies atopiques<sup>31</sup>. L'hypothèse de l'hygiène a été récemment renommée comme "l'hypothèse des vieux amis", afin d'incorporer l'importance de l'exposition à des micro-organismes commensaux et symbiotiques<sup>30</sup>. Dès la naissance, le microbiome colonise en grande majorité la lumière intestinale, où il subit une série de changements tout au long des 2 à 3 premières années de vie. Cet établissement du microbiome est déterminé par des facteurs nutritionnels (lait, teneur en fibres des aliments, utilisation d'antibiotiques) et

environnementaux<sup>32</sup>. Bien qu'il existe une très grande variation interindividuelle dans la composition du microbiome intestinal, de nombreux groupes bactériens sont partagés entre des individus en bonne santé. Les pertes de taxons clés et/ou de diversité microbienne peuvent conduire à un état de déséquilibre écologique connu sous le nom de dysbiose, qui pourrait conduire à une augmentation des agents pathogènes opportunistes<sup>32</sup>. La dysbiose du microbiome a également été associée à des maladies immunitaires et métaboliques, telles que les maladies inflammatoires de l'intestin, les allergies, l'obésité, les cardiopathies et l'asthme<sup>32</sup>.

La voie d'accouchement et le mode d'alimentation du nourrisson peuvent avoir un impact sur le développement de l'asthme. En effet, l'accouchement par césarienne ainsi qu'un accouchement prématuré seraient des facteurs possibles favorisant le développement de l'asthme<sup>33</sup>. L'allaitement maternel présente aussi de nombreux avantages pour la santé de l'enfant et serait également protecteur face au développement de l'asthme<sup>34</sup>. En effet, le lait maternel contient des facteurs immunitaires protégeant contre de nombreux problèmes de santé pendant la petite enfance, tels que les infections et les maladies allergiques<sup>34</sup>, mais aussi différents composés, tels que les HMO (Human milk oligosaccharides, oligosaccharides du lait maternel) qui vont aider à l'implantation d'un microbiote plus protecteur.

A l'inverse, il a été également montré que les infections virales dans la petite enfance sont associées à un risque beaucoup plus élevé d'apparition d'un asthme ou d'une respiration sifflante plus tard dans l'enfance<sup>35</sup>. Par ailleurs, l'exposition passive de femmes enceintes non fumeuses à la fumée de tabac ambiante peut être associée au développement de symptômes allergiques et asthmatiques chez leurs enfants<sup>36</sup>. Le tabagisme pendant la grossesse de la grand-mère augmenterait même le risque d'asthme chez le petit-enfant indépendamment du statut tabagique de la mère, impliquant des modifications épigénétiques transmises à la descendance<sup>37</sup>.

### **Facteurs environnementaux induisant les crises d'asthme**

D'après Santé publique France<sup>17</sup>, de nombreux facteurs peuvent être à l'origine d'une crise d'asthme chez les personnes sujettes à cette maladie, que ce soit lors de l'enfance ou à l'âge adulte.

Les infections respiratoires virales et bactériennes, comme la grippe, la pneumonie ou l'infection au virus respiratoire syncytial (VRS), sont souvent responsables de l'apparition de crises d'asthme<sup>17</sup>. De plus, les patients asthmatiques peuvent être plus sensibles aux infections virales et bactériennes en raison d'une altération des défenses immunitaires muco-sale et systémique et de l'atopie<sup>31</sup>. Les exacerbations peuvent également être provoquées chez les personnes allergiques via des mécanismes IgE-médiés, suite à une

réexposition aux allergènes sensibilisants venant au contact des muqueuses respiratoires sensibilisées, notamment les pneumallergènes tels que les acariens, moisissures et pollens, ou des allergènes liés à l'activité professionnelle (asthme du boulanger induit par les protéines du blé par exemple). Ces crises peuvent aussi être provoquées par les allergènes aéroportés issus d'animaux domestiques (phanères de chat, chien, rongeurs...)<sup>17</sup>. L'exposition aux allergènes est un déclencheur important des symptômes de l'asthme et peut entraîner une morbidité accrue. A noter que l'asthme peut aussi être un symptôme d'allergies non respiratoires (i.e. allergie alimentaire). C'est alors un facteur de risque associé à des réactions sévères à la suite de l'ingestion de l'aliment incriminé.

On estime qu'environ 10 à 25 % des cas d'asthme de l'adulte résultent d'expositions liées au travail.<sup>30</sup> L'asthme professionnel peut également être causé par des produits chimiques de bas poids moléculaire, qui provoquent l'asthme via des mécanismes non IgE-médiés. D'autres irritants respiratoires comme la fumée de tabac, la pollution de l'air, ainsi que certains médicaments (anti-inflammatoires) peuvent être des facteurs exogènes déclenchants<sup>38</sup>. Il a été montré qu'il est plus difficile de maintenir le contrôle de l'asthme chez les fumeurs que chez les non-fumeurs<sup>30,31,38</sup>. Le temps froid et sec ainsi que l'exercice physique (asthme d'effort) peuvent aussi être à l'origine d'exacerbations. Différents facteurs de risque d'exacerbations ont été identifiés. L'obésité à elle seule a un impact significatif sur le risque d'asthme, son phénotype et son pronostic. Des études épidémiologiques ont clairement démontré que l'asthme est plus susceptible de survenir chez les patients obèses et que l'état de santé est altéré chez les personnes obèses souffrant d'asthme. Ces asthmatiques présentent davantage de symptômes, une moins bonne qualité de vie, un recours accru aux soins de santé et une sévérité accrue de l'asthme<sup>31</sup>. De plus, il existe une nette disparité entre les sexes dans l'asthme. Bien que la prépondérance de l'asthme soit plus élevée chez les garçons de moins de 13 ans, les taux sont plus élevés chez les femmes adultes que chez les hommes<sup>39</sup>. Ce changement dans la prévalence de l'asthme au fil du temps selon le sexe suggère (entre autres) un rôle des hormones sexuelles. En effet, des études ont montré que 20 à 40 % des femmes asthmatiques présentaient une augmentation des symptômes pendant la période prémenstruelle et périmenstruelle<sup>39</sup>. Les effets de la ménopause sur la prévalence et le contrôle de l'asthme ont aussi été étudiés et certaines études montrent une diminution de la fonction pulmonaire et une augmentation des symptômes d'asthme durant la période de ménopause<sup>39</sup>. Chez les garçons, il a été montré, grâce à la cohorte SARP (« Severe Asthma Research Program »), que des niveaux accrus de déhydroépiandrostérone étaient associés à une diminution du risque d'asthme chez les adolescents<sup>39</sup>.

D'autres facteurs moins courants ont été étudiés. Certaines études ont suggéré que la déficience en vitamine D pouvait jouer un rôle dans la sévérité des symptômes et sur le nombre

d'exacerbations<sup>38,40</sup>. L'activation du récepteur de la vitamine D (VDR) a des effets immuno-régulateur et anti-inflammatoires<sup>38</sup>. D'autres études sont nécessaires pour clarifier le rôle de la vitamine D dans le développement et le traitement de l'asthme.

### L'asthme sévère

L'asthme sévère est défini comme un asthme qui n'est pas contrôlé malgré l'observance d'un traitement optimisé à haute dose de CSI-BALA et la prise en charge des facteurs contributifs, ou qui s'aggrave lorsque le traitement à haute dose est diminué<sup>7</sup>. Cette définition a été donnée pour les personnes âgées de plus de 6 ans. La prévalence de l'asthme sévère est généralement estimée à moins de 4% de la population totale des patients asthmatiques<sup>7</sup>.

Au-delà des symptômes physiques, l'impact psychologique de l'asthme sévère est important. L'asthme sévère interfère souvent avec la vie familiale, sociale et professionnelle, limite les choix de carrière et les options de vacances, et affecte la santé émotionnelle et mentale.

La compréhension de l'asthme sévère reste limitée du fait de l'hétérogénéité de la maladie et de la difficulté d'observer le phénomène au niveau des poumons. Plusieurs mécanismes physiopathologiques expliquant l'asthme sévère sont envisagés. L'AS pourrait être due à une inflammation continue malgré un traitement approprié, à une pathologie sous-jacente indépendante mais aussi à des altérations de la structure pulmonaire (remodelage)<sup>41</sup> . . Aucun biomarqueur n'est disponible pour identifier l'asthme sévère.

## Phénotypes et endotypes de l'asthme sévère

L'asthme sévère est une maladie hétérogène caractérisée par une inflammation chronique des voies aériennes, mais dont la sévérité et la fréquence des symptômes, persistants malgré les traitements, et dont les facteurs déclenchants sont très variables en fonction des individus. Il est donc nécessaire de développer une prise en charge adaptée à chaque patient. Ces prises en charges ne peuvent être possibles qu'avec la définition précise de chaque phénotype clinique et la compréhension des endotypes associés.

### Phénotypes ou caractéristiques observables

D'après Agache,<sup>42</sup> un phénotype est défini comme l'ensemble des traits visibles d'un individu résultant de l'interaction de son génotype avec l'environnement. Ces phénotypes sont utilisés pour la gestion actuelle de l'AS. On a longtemps pensé que l'asthme se manifestait sous la forme de deux phénotypes majeurs, l'asthme non atopique ou « intrinsèque » et l'asthme atopique ou « extrinsèque »<sup>43</sup>. L'asthme allergique ou atopique est le phénotype d'asthme le plus facilement reconnu. Celui-ci commence souvent dans l'enfance et/ ou est associé à des antécédents familiaux ou personnels de maladies allergiques (eczéma, rhinite allergique, allergie alimentaire ou médicamenteuse). L'examen des expectorations induites de ces patients avant le traitement révèle souvent une inflammation à éosinophiles des voies respiratoires. Les patients atteints de ce phénotype d'asthme répondent généralement bien au traitement par corticostéroïdes inhalés. L'asthme non atopique apparaît en général chez des adultes ne souffrant pas d'allergie. Le profil cellulaire des expectorations de ces patients peut être neutrophilique, éosinophilique ou contenir seulement quelques cellules inflammatoires. Ces derniers répondent souvent moins bien aux corticostéroïdes inhalés<sup>44</sup>.

Plus récemment, une approche multidimensionnelle sur trois cohortes (n = 114, 187 et 68), basée sur des méthodes statistiques de « clustering » selon les symptômes et différents marqueurs de l'inflammation, a permis de définir différemment les phénotypes d'asthme<sup>45</sup>. L'asthme a été catégorisé en cinq phénotypes : asthme obèse non éosinophilique ; asthme atopique d'apparition précoce ; asthme bénin ; asthme prédominant à symptômes précoces et asthme à prédominance inflammatoire.

Il existe ainsi de nombreux phénotypes montrant la complexité de la maladie. Cependant, les phénotypes ne se rapportent pas nécessairement aux mécanismes pathogéniques sous-jacents qui sont décrits comme les endotypes de la maladie<sup>42</sup>.

## Les endotypes ou mécanismes pathogéniques sous-jacents de l'asthme

Le terme endotype, introduit en 2008 par Anderson,<sup>46</sup> correspond à la contraction de endophénotypage. Il désigne les différents sous-types du même phénotype clinique d'une maladie, définis par des mécanismes fonctionnels ou physiopathologiques distincts. Pour caractériser un endotype de l'asthme sévère, il est nécessaire de prendre en compte un grand nombre de facteurs : le génome du patient, son exposition à certains facteurs comme des pathogènes respiratoires ou des polluants ou à certains facteurs psychosociaux, la réponse immunitaire innée et adaptative, le microbiome, ainsi que le métabolisme<sup>47</sup>. La définition d'un endotype est encore controversée, de plus en plus de personnes s'accordent sur le fait qu'un endotype est un sous-type d'un état de santé défini par un mécanisme fonctionnel ou pathobiologique distinct<sup>48</sup>. Cette nécessité d'un mécanisme confirmé différencie l'endotype du phénotype.

Le phénotype, la pathobiologie et ses biomarqueurs associés, mais également de nombreux éléments cliniques, physiologiques et génétiques, permettent de définir entièrement un endotype (Figure 7)<sup>49</sup>.

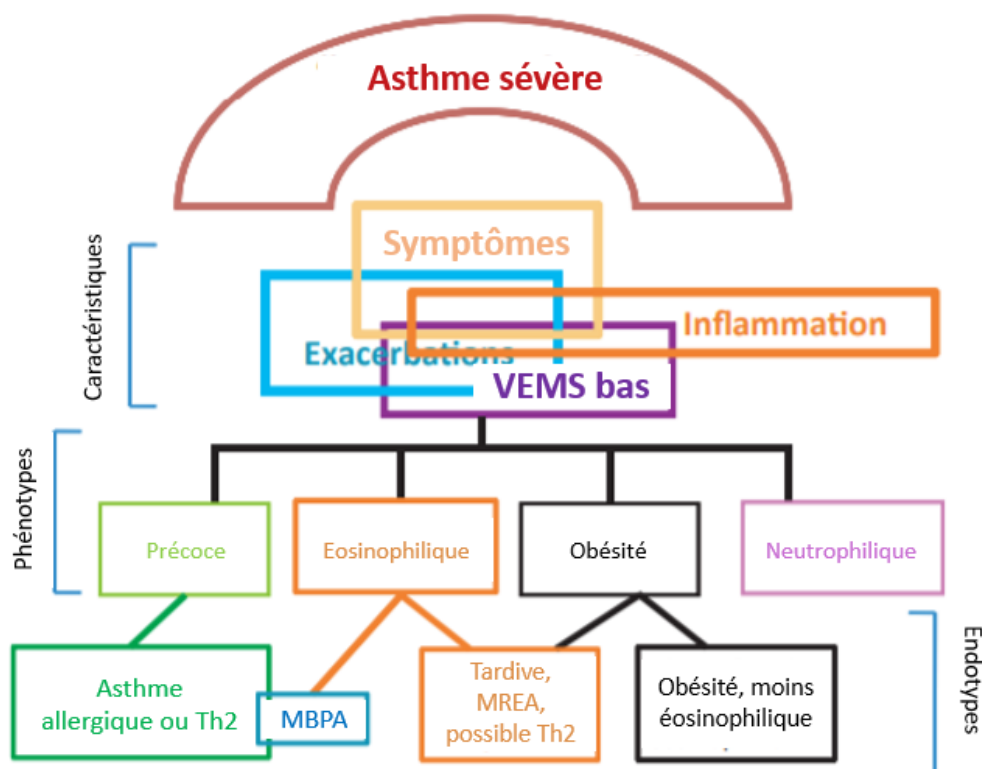


Figure 7 : Lien entre phénotypes et endotypes dans l'asthme sévère.

VEMS : volume expiratoire forcé en une seconde, MBPA : mycoses broncho-pulmonaires allergiques, MREA : maladie respiratoire exacerbée par l'aspirine.

Adapté de Wenzel, 2012<sup>49</sup>



Les endotypes de l'asthme (sévère) n'ont pas été complètement identifiés et caractérisés. Cependant, on peut distinguer deux groupes d'asthme : associé à une réponse T2 (Lymphocyte T auxiliaire de type 2) (asthme de type T2, ou T2-high) ou non-associé à une réponse T2 (asthme non-T2, ou T2-low). Les patients, ayant un profil inflammatoire T2 se caractérisent par un infiltrat d'éosinophiles dans les voies respiratoires et une surexpression des cytokines T2-dépendantes<sup>50</sup>. Il comprend l'asthme allergique à début précoce et l'asthme à éosinophiles persistant à début tardif. L'asthme non-T2 est encore peu étudié : il serait lié à l'activation des cellules Th1 et/ou Th17, et caractérisé par une inflammation neutrophilique ou pauci-granulocytaire (peu d'éosinophiles ou de neutrophiles)<sup>50</sup> et un manque de réponse à la corticothérapie. Il est associé à l'asthme dû à l'obésité, au tabagisme et à l'asthme d'apparition très tardive<sup>43</sup>.

### Rôle de l'épithélium pulmonaire

L'épithélium pulmonaire est pseudostratifié avec une orientation apicale-basolatérale claire. Il se compose de cellules ciliées, de cellules caliciformes ou de cellules Club (cellules non ciliées sécrétrices, respectivement au niveau des bronches et des bronchioles), et de cellules basales sous-jacentes (Figure 8). Les cellules ciliées, les cellules caliciformes et les cellules Club permettent d'assurer une clairance mucociliaire efficace du côté apical au niveau duquel les particules inhalées sont piégées par le mucus sécrété, qui est constamment transporté vers la gorge par les cils battants, où il sera ensuite avalé ou expectoré. Les cellules basales comprennent les cellules souches des voies respiratoires ayant la capacité de se différencier dans les différents types cellulaires mentionnés ci-dessus<sup>51</sup>. De chaque côté des cellules épithéliales, et entre elles, se trouvent des cellules immunitaires innées (macrophages, cellules dendritiques, mastocytes, éosinophiles, ILC) et adaptatives (lymphocytes T). Les facteurs sécrétés par ces cellules, tels que les cytokines, affectent l'épithélium des voies respiratoires qui à son tour libère des alarmines et des chimiokines qui affectent les cellules immunitaires, créant un pont entre l'immunité innée et adaptative<sup>51</sup>. Les alarmines peuvent aussi être sécrétées en réponse à différents stress (allergènes, microbes et polluants) en amont de la sécrétion des cytokines par les cellules immunitaires<sup>52</sup>.

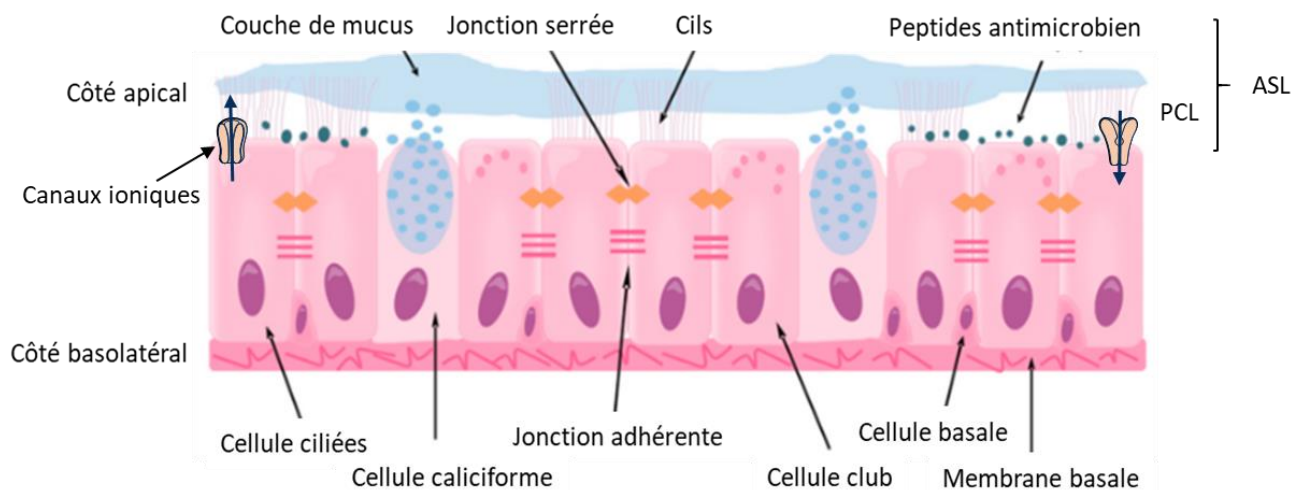


Figure 8 : La structure de l'épithélium des voies respiratoires inférieures humaines.

ASL : liquide de surface des voies aériennes ou « airway surface liquid ». PCL : couche périliciliaire ou « periciliary liquid layer ».

Adapté de Calven et al., 2020<sup>51</sup>

Dans des conditions normales, la clairance mucociliaire assure l'homéostasie en empêchant d'éventuels irritants ou agents pathogènes d'accéder aux cellules épithéliales. De plus, les cellules épithéliales des voies respiratoires sécrètent divers peptides antimicrobiens qui empêchent les bactéries de coloniser les voies respiratoires. Dans l'asthme, ces deux protections basées sur les sécrétions sont généralement altérées, soit en raison de variations génétiques endogènes, soit sous l'effet d'une inflammation en cours.<sup>51</sup>

Le liquide de surface des voies respiratoires (ou ASL pour « Airway Surface Liquid ») est composé de la couche périliciliaire (PCL) et de la couche de mucus (Figure 8). Dans des conditions normales, la couche périliciliaire a une épaisseur d'environ 7  $\mu\text{m}$  ; cette couche est essentielle pour le transport du mucus vers le larynx<sup>53</sup>. Les canaux épithéliaux sodiques (ENaC), les canaux régulateurs de la conductance transmembranaire de la mucoviscidose (CFTR) et les canaux  $\text{Cl}^-$  activés par le  $\text{Ca}^{2+}$  (CaCC), stimulés entre autres par des nucléotides extracellulaires (l'UTP ou l'ATP), agissent ensemble pour réguler la hauteur, la viscosité et le pH de cette couche. Ces canaux sont donc des acteurs essentiels de la clairance mucociliaire. Quant au mucus des voies respiratoires, en plus de sa participation évoquée précédemment dans la clairance mucociliaire, il possède d'autres propriétés clés, importantes dans l'asthme. Le mucus contient à la fois des constituants aqueux et non aqueux. Les mucines (MUC) sont les produits des cellules caliciformes et des cellules Club, et les principaux composants macromoléculaires du mucus<sup>54</sup>. Les mucines sont de grandes protéines très glycosylées, formant des complexes et réseaux macromoléculaires très ordonnés. Les glycoprotéines prédominantes dans les voies respiratoires humaines sont MUC5AC et MUC5B<sup>55</sup>.

Les propriétés viscoélastiques du mucus des voies respiratoires dépendent de MUC5AC et MUC5B<sup>56</sup>. Des changements dans la proportion relative de MUC5AC et MUC5B sont observés dans l'asthme. En effet, les asthmatiques ont des niveaux plus élevés de MUC5AC, ainsi que des niveaux de mucus totaux accrus au niveau des bronches et/ou bronchioles<sup>55</sup>. Il semble que MUC5AC soit la mucine responsable de la formation du mucus mucilagineux qui est difficile à éliminer en raison de l'attachement direct de MUC5AC aux cellules productrices de mucus dans l'épithélium<sup>54</sup>. De plus, des observations *in situ* de l'épithélium des voies respiratoires ont révélé des changements structurels chez les asthmatiques,<sup>51</sup> caractérisés par une augmentation de la proportion des cellules caliciformes épithéliales, une augmentation de la masse des muscles lisses bronchiques<sup>57</sup> et une néovascularisation<sup>58</sup>. D'autres modifications ont aussi été mises en évidence, comme une expression réduite de la cadhérine E ainsi que d'autres molécules constituant les jonctions serrées, conduisant à une augmentation de la perméabilité et un détachement des cellules ciliées<sup>51</sup>. En accord avec ces observations, des études fonctionnelles sur des cellules épithéliales des voies respiratoires cultivées à l'interface air-liquide indiquent une perméabilité et une sensibilité accrues aux agressions environnementales (comme les moisissures) dans les cellules d'individus asthmatiques par rapport à des cellules issues de témoins sains<sup>59</sup>.

Le rôle de l'épithélium est de plus en plus reconnu puisque ce sont les lésions de la barrière endothéliale qui vont permettre la pénétration des allergènes et ainsi entraîner les cascades inflammatoires.

### Le système immunitaire acteur dans l'asthme

Le système immunitaire correspond à l'ensemble des mécanismes de défense de l'organisme. Le système immunitaire doit s'activer et induire une réponse défensive face à une agression de l'organisme par un agent du non-soi (bactéries pathogénique, virus, toxines...), tandis qu'il devra réprimer toute réponse contre des agents du soi ou des agents du non-soi inoffensifs (pollen, acarien, aliments, phanère d'animaux...). Le système immunitaire est classifié en système immunitaire inné ou adaptatif.

Dans ce cadre, l'asthme peut être considéré comme une réponse immunitaire inflammatoire excessive, mal contrôlée, au niveau de la muqueuse respiratoire. En effet, l'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires dans laquelle de nombreuses cellules et éléments immunitaires jouent un rôle. Des acteurs de l'immunité innée et adaptative sont recrutés dans l'asthme, avec un rôle notamment des cellules épithéliales, des mastocytes muqueux, des éosinophiles, des macrophages et des neutrophiles, ainsi que des lymphocytes T. L'immunité innée, constitue la première ligne de défense face à une infection. Elle est constituée des macrophages, granulocytes, cellules dendritiques, cellules tueuses naturelles

(cellules NK) et elle est caractérisée par sa rapidité, sa non-spécificité et l'absence de mémoire immunitaire. La réponse adaptative se met en place quelques jours après le contact avec l'agent infectieux et fait intervenir des cellules spécialisées appelées lymphocytes (B et T), qui vont être spécifiquement induits par et contre des parties de l'agents infectieux (protéines de la paroi, de l'enveloppe virale...), appelés antigènes. Les lymphocytes B vont produire des anticorps spécifiques de ces antigènes. La réponse adaptative est caractérisée par sa spécificité vis-à-vis de l'agent agresseur, et sa mémoire immunologique permettant une réponse rapide en cas de deuxième infection avec le même agent.

Ainsi, à la suite d'un contact avec un agent ou une substance pathogène, une réponse immunitaire adaptative spécifique va être induite. La première étape dans l'induction de cette réponse va être la prise en charge de l'agent infectieux par les cellules présentatrices de l'antigène, notamment les cellules dendritiques (DC). Cette prise en charge, ainsi que des signaux présents dans le microenvironnement au lieu de l'agression (dérivant directement de l'agent pathogène ou libérés par les cellules épithéliales « agressées »), vont induire l'activation des DC et leur migration vers les ganglions lymphatiques drainants. A ce niveau, les DC vont présenter aux lymphocytes T CD4+ des fragments de l'antigène exogène, i.e. des peptides issus de sa dégradation intracellulaire par la DC (épitope T), via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II). Les lymphocytes présentant un récepteur T (TCR) spécifique des peptides présentés vont être activés, sous condition d'autres signaux fournis par la DC : molécules de co-stimulation membranaires, cytokines sécrétées. En fonction du type de cytokines sécrétées par la DC, qui dépendront des signaux perçus au moment de la prise en charge de l'antigène, les lymphocytes T CD4 vont se différencier en lymphocytes T auxiliaires (ou T helper, Th) qui se subdivisent principalement en lymphocytes T auxiliaires Th1, Th2, Th17, ou en lymphocytes T régulateur (Treg). Les cellules Th1 vont sécréter des cytokines telles l'interféron (IFN)- $\gamma$ , le facteur de nécrose tumorale (TNF)- $\alpha$  et l'interleukine (IL)-2. La sécrétion des cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 est caractéristique d'une réponse immunitaire de type T2, tandis que la sécrétion des IL-17A, IL-17F et IL-22 va correspondre à une réponse Th17. Les lymphocytes B possédant des immunoglobulines de surface spécifiques de l'antigène seront également activés, conduisant à la production d'anticorps spécifiques dont l'isotype dépendra des signaux reçus par le lymphocyte B au moment de son activation (IgG1 à 4, IgA, IgE).

Les cellules Th1 produisent de grandes quantités d'IFN- $\gamma$  et sont principalement impliquées dans la clairance des pathogènes intracellulaires par l'activation des macrophages. Des réponses de type Th1 excessives ont été impliquées dans le développement de maladies auto-immunes<sup>60</sup>. Les cellules Th2 sont caractérisées par la production d'IL-4, IL-5 et IL-13 et participent à l'élimination des pathogènes extracellulaires et des parasites par l'induction d'un

changement de classe des immunoglobulines vers les IgG1 et les IgE<sup>60</sup>. Une sur-activation des réponses de type T2 pourra conduire aux maladies allergiques. Les cytokines Th17 telles que l'IL-17A et IL-17F ont des propriétés pro-inflammatoires et agissent sur un large éventail de types cellulaires pour induire des cytokines (IL-6, IL-8) et des chimiokines (CXCL1, CXCL10)<sup>60</sup>. L'IL-17A et l'IL-17F sont également des cytokines clés pour le recrutement, l'activation et la migration des neutrophiles. Il a été reconnu que les concentrations d'IL-17 étaient augmentées dans les maladies auto-immunes humaines telles que la sclérose en plaques, la polyarthrite rhumatoïde et le psoriasis, ainsi que dans les modèles animaux d'auto-immunité<sup>60</sup>.

La fonction barrière dans les voies respiratoires est assurée par des jonctions serrées et adhérentes entre les cellules épithéliales, mais aussi par la présence de mucus, de liquide de surface et d'un microbiote<sup>61</sup>. Les cellules épithéliales jouent également un rôle dans les réponses immunitaires innées en facilitant la clairance mucociliaire, en produisant des peptides anti-microbiens, des cytokines et des chimiokines, créant ainsi une barrière physique, chimique et immunologique. Un certain nombre d'allergènes, d'agents pathogènes et de toxines environnementales peuvent endommager la barrière épithéliale. Les cellules immunitaires comme les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules lymphoïdes innées (ILC) et les cellules T et leurs cytokines, sont essentielles dans la régénération des cellules souches et de la barrière épithéliale en cas d'agressions.

### Immunité des cellules épithéliales

L'épithélium des voies respiratoires est un élément important du système immunitaire inné. L'épithélium des voies respiratoires détecte l'exposition bactérienne et réagit en conséquence en augmentant ses défenses. Cette réponse consiste en une augmentation de la libération, de peptides antimicrobiens dans la lumière des voies aériennes, et en la libération de chimiokines et de cytokines qui déclenchent une réaction inflammatoire<sup>62,63</sup>.

Les cellules épithéliales jouent un rôle important dans l'initiation des réponses immunitaires adaptatives dans les voies respiratoires. Les cellules épithéliales peuvent déclencher et modifier l'activation et la différenciation des DC, des cellules B et des cellules T<sup>64</sup>. Les cellules épithéliales sont équipées de récepteurs de reconnaissance des formes, tels que les récepteurs de type Toll, qui détectent et déclenchent rapidement une réponse immunitaire aux menaces microbiennes, et de récepteurs de cytokines, dont le TNFR1, qui leur permettent de répondre aux signaux produits par les cellules immunitaires telles que les macrophages<sup>65</sup>.

Les cellules épithéliales jouent un rôle dans le recrutement et la survie locale des DC, car elles produisent respectivement la chimiokine CCL20 et la cytokine GM-CSF, qui favorisent ces

processus. Dans les voies respiratoires, la production épithéliale de CCL28 permet d'attirer les éosinophiles et les cellules Th2 par l'intermédiaire des CCR3 et CCR10<sup>64</sup>.

### Les réponses de type T2 dans l'asthme

Quatre-vingt pour cent des enfants et 60 % des adultes asthmatiques souffrent d'asthme de type 2, qui résulte de la production d'IgE et de cytokines T2 (IL-5, IL-13 et IL-4) suite à une exposition à des allergènes (Figure 9)<sup>66</sup>.

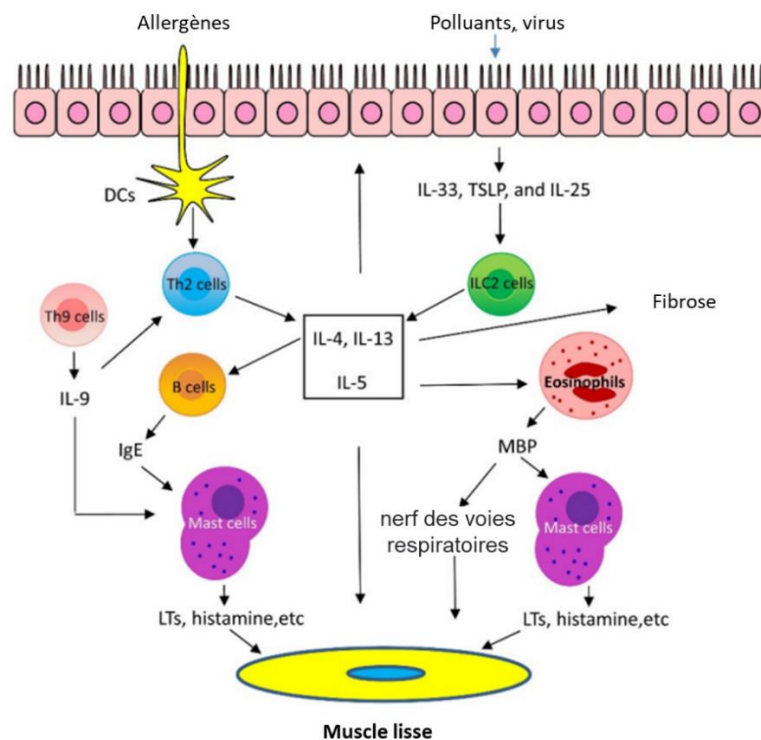


Figure 9 : Mécanisme immunitaire impliquant la voie T2.

DC : cellules dendritiques, TSLP : lymphopoïétine stromale thymique, LT : leucotriènes, MBP : protéine de base majeure.

Adapté de Habib et al., 2022<sup>67</sup>

Lorsque les allergènes pénètrent dans les voies respiratoires basses, et en présence de différentes alarmines pro-T2 produites par les cellules épithéliales altérées (agressions physique ou chimique, infection ; voir plus bas), les DC induisent l'activation et la différenciation des cellules Th2 spécifiques des allergènes. Ces dernières vont sécréter des cytokines, notamment l'IL-5, IL-4 et IL-13. L'IL-4 et l'IL-13 activent les cellules B entraînant la production des immunoglobulines de type E (IgE) spécifiques des allergènes. Les IgE se lient ensuite à la surface des mastocytes présents dans la muqueuse, via un récepteur de haute affinité (FcεR1). Lorsque les mêmes allergènes pénètrent dans les voies respiratoires, ils sont reconnus par ces IgE spécifiques, ce qui active les mastocytes et conduit à la libération de médiateurs de la réaction allergique, tels que les leucotriènes et l'histamine<sup>67</sup>. On parle de

dégranulation des mastocytes. Les cellules Th9 sécrètent de l'IL-9, qui active les cellules Th2 et favorise l'accumulation de mastocytes.

L'IL-13, l'IL-5 et l'IL-4 sont impliquées dans l'asthme, notamment dans l'attraction des éosinophiles dans les tissus (activité chimiotactique), la maturation des cellules caliciformes, la sécrétion de mucus, l'hyperréactivité bronchique et le remodelage tissulaire<sup>68</sup>. L'IL-5 est responsable de la maturation des éosinophiles dans la moelle osseuse et de leur libération dans le sang. La production d'IL-5 dans les voies respiratoires favorise la production, l'accumulation et l'activation des éosinophiles dans les poumons et, à terme, la libération d'un grand nombre de médiateurs capables d'induire une hyperréactivité bronchique, une hypersécrétion de mucus via une différenciation accrue des cellules caliciformes et le remodelage des voies respiratoires<sup>68</sup>.

Des études ont démontré que l'épithélium des voies respiratoires produit des cytokines en réponse à des agressions physiques ou chimiques (exposition à des irritants, des polluants) ou à des infections. Ces cytokines dérivées de l'épithélium, ou alarmines, comprennent la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP), l'IL-25 et l'IL-33. Ces dernières activent les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2), qui sécrètent alors des cytokines T2, telles que l'IL-5 et l'IL-13 et induisent une inflammation pulmonaire T2<sup>67</sup>. Les ILC de type 2 sont impliquées dans les maladies allergiques et sont augmentées dans les expectorations et le LBA des adultes et des enfants souffrant d'asthme sévère<sup>69,70</sup>. L'asthme chez les enfants a ainsi longtemps été considéré comme un trouble de T2, car il implique des cellules T2, des éosinophiles<sup>71</sup> et d'autres cellules immunitaires innées, telles que les mastocytes<sup>72</sup>. Cependant, des études ont montré que le LBA d'enfants atteints d'AS peut présenter des réponses mixtes, voire une signature Th1 dominante<sup>73</sup>.

### Les réponses de type Th1 dans l'asthme

L'infection et les lésions épithéliales favorisent la maturation des cellules Th1 et la sécrétion de cytokines Th1, notamment le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ . Le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  agissent en synergie avec l'IL-17 pour favoriser le recrutement des neutrophiles<sup>67</sup>. De plus, le TNF- $\alpha$  augmente la contraction des muscles lisses des voies respiratoires, induisant leur hyperréactivité (Figure 10). Niessen et al.,<sup>74</sup> ont montré que le TNF- $\alpha$  des expectorations est élevé dans l'asthme neutrophillique et dans l'asthme sévère.



## Les réponses de type Th17 dans l'asthme

Plus récemment, un rôle potentiel pour d'autres voies impliquant les cellules Th17 a émergé. Les lymphocytes Th17 produisent de l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-22, l'IL-21 et le TNF- $\alpha$  (Figure 10).

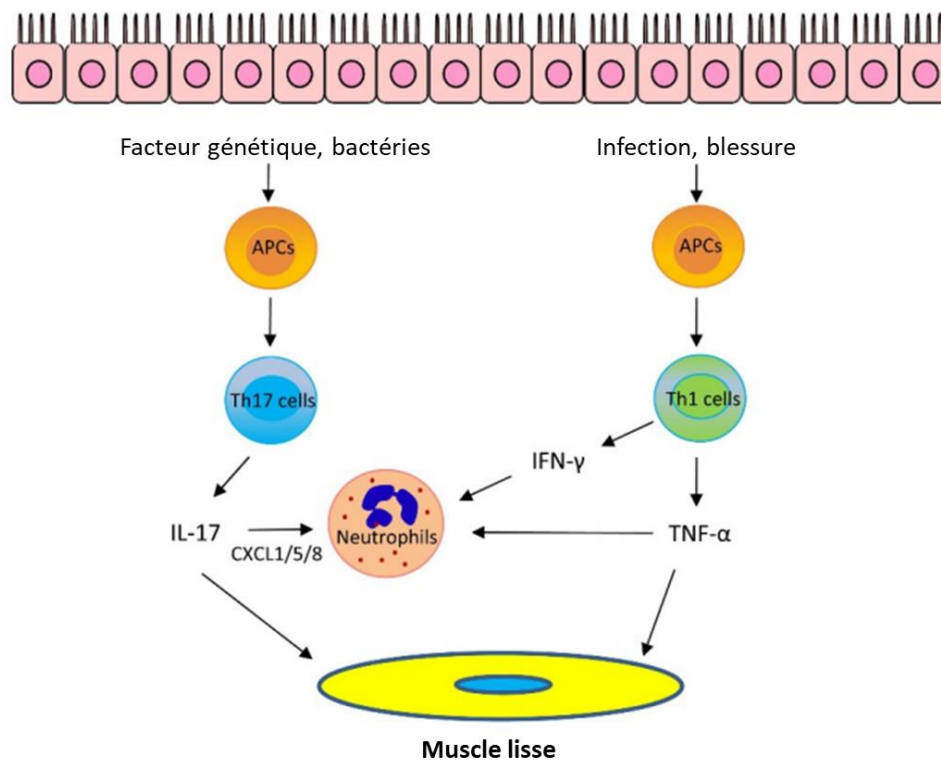


Figure 10 : Mécanisme immunitaire impliquant les voies Th1 et Th17.  
APC : Cellules présentatrices d'antigène.  
Adapté de Habib et al., 2022<sup>67</sup>

Certaines bactéries favorisent la différenciation des cellules Th17 via les cellules présentatrices d'antigène (APC). L'IL-17 peut stimuler les cellules épithéliales et les fibroblastes pour libérer les chimiokines CXCL1/5/8, qui recrutent les neutrophiles dans les poumons<sup>67</sup>.

L'IL-17 est associée à la présence de neutrophiles dans les voies respiratoires et corrélée à l'intensité de l'hyperréactivité bronchique<sup>75</sup>. Des études ont montré que, chez les enfants et les adultes, l'expression de l'IL-17A dans la circulation et les voies respiratoires augmentait avec la sévérité de l'asthme<sup>76,77</sup> et était plus élevée dans les voies respiratoires des exacerbateurs que chez les non-exacerbateurs<sup>77</sup>. De plus, il a été montré que la fréquence des cellules T invariantes associées aux muqueuses produisant de l'IL-17 (MAIT-17) et des cellules Th17 était plus élevée dans le sang chez les enfants asthmatiques sévères ayant subi plusieurs exacerbations sévères au cours des 12 derniers mois que chez ceux qui n'en avaient pas subi<sup>78</sup>.



Nous avons également mis en évidence que les enfants atteints d'AS présentent un profil mixte Th1/Th2 dans le LBA<sup>79</sup>. De façon intéressante, les enfants avec AS et des exacerbations fréquentes présentaient un phénotype Th2 dans les LBA, associé à une augmentation de la fréquence de cellules Th17 activées en périphérie, tandis que les enfants souffrant d'AS mais ayant des exacerbations moins fréquentes étaient caractérisés par un phénotype T1 dans les LBA<sup>80</sup>.

### Les lymphocytes T régulateurs (Treg) dans l'asthme

Les lymphocytes Treg appartiennent à une sous population naturelle de lymphocytes T CD4+ capables d'induire les mécanismes de tolérance et de réguler les réponses immunitaires induites contre les agents pathogènes, mais aussi contre les antigènes du soi. L'identification des cellules Treg repose sur l'expression d'antigènes de surface (CD4, CD25), sur leur production d'IL-10 et/ou de facteur de croissance transformant (TGF)- $\beta$ , et sur l'expression nucléaire du facteur de transcription « Forkhead Box P3 » (FoxP3). Il existe deux types de Tregs, les Tregs dites naturels (nTreg) et les Tregs induits (iTreg). Les nTregs constituent 5 à 10 % des lymphocytes T CD4+ périphériques et assurent le contrôle de la tolérance du soi. Ils sont sélectionnés au niveau du thymus. Ces cellules expriment des marqueurs de surface tels que GITR, CTLA-4, CD152. Cependant, la molécule qui définit le mieux le phénotype et la fonction des nTregs reste FoxP3<sup>81,82</sup>. Les cellules iTreg sont induits dans les tissus périphériques, à la suite de la rencontre avec des agents exogènes. Deux sous-ensembles de cellules iTreg sont définis en fonction de l'expression des cytokines : (i) les cellules Tr1 libèrent de l'IL-10 et (ii) les cellules TH3 libèrent le TGF- $\beta$ <sup>81,82</sup>. D'autres cellules régulatrices induites, exprimant les facteurs de transcription Foxp3 et ROR $\gamma$ t ont également été mises en évidence au niveau du colon, et seraient induites spécifiquement par le microbiote.

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) jouent un rôle important dans le contrôle de la réaction inflammatoire asthmatique. Hartl et al.,<sup>83</sup> ont montré pour la première fois, dans une cohorte d'enfants souffrant d'asthme, que les lymphocytes Treg sont enrichis dans l'espace bronchoalvéolaire par rapport au sang périphérique et sont parfaitement capables de réguler les réponses des cellules T. Plusieurs recherches ont ensuite mis en évidence une dérégulation des Treg dans les maladies pulmonaires comme l'asthme. Provost et al.,<sup>84</sup> ont ainsi rapporté que l'expression du facteur de transcription FoxP3 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> était significativement plus faible chez les patients asthmatiques stables adultes par rapport aux sujets témoins adultes sans asthme. Pour finir, l'étude de Yüksek et al.,<sup>82</sup> a démontré que les cellules nTreg jouent un rôle important dans la pathogenèse et les réponses au traitement de l'asthme.

## Les lymphocytes B dans l'asthme

De nombreuses études ont démontré un rôle crucial des lymphocytes T et des cytokines qu'ils produisent dans le développement de l'asthme. Le rôle des lymphocytes B dans le développement de l'asthme a été moins étudié, à l'exception de la capacité des lymphocytes B à produire des IgE spécifiques d'un antigène. Une des sous-populations de cellules B sont les cellules B régulatrices (Breg) productrices d'IL-10, qui ont la capacité de réduire l'activation des lymphocytes T et de bloquer la production de cytokines pro-inflammatoires.<sup>85</sup> Il a été montré, dans un modèle murin d'asthme, le rôle central des cellules Breg dans la modulation de la fonction pulmonaire et le remodelage des voies respiratoires, ainsi que l'induction de cellules Treg<sup>86</sup>.

Au vu de ces données de la littérature, il apparaît que l'asthme est une pathologie complexe, faisant intervenir un nombre important de cellules immunitaires. Cependant, une approche globale permettrait de mieux comprendre les acteurs ainsi que les mécanismes impliqués au niveau local dans l'asthme sévère chez l'enfant. De telles analyses permettraient également d'identifier des biomarqueurs qui permettraient d'aider au diagnostic, à la prise en charge et au suivi de ces patients. Au-delà d'approches visant à analyser de façon globale la composante immunitaire, tel que nous avons pu le faire<sup>79,80</sup>, l'utilisation d'approches « omiques », permettant l'analyse simultanée d'un très grand nombre de composants présents localement, comme les protéines, les gènes ou les métabolites, semble intéressante.

## Intérêt de l'utilisation de biomarqueurs

Les biomarqueurs, ou marqueurs biologiques, sont des indicateurs internes mesurables, utilisés pour examiner tous les aspects de la santé ou des maladies comme les altérations moléculaires et/ou cellulaires qui peuvent apparaître dans un organisme au cours de, ou après, la progression d'une maladie ou d'une exposition à un agent toxique<sup>87</sup>.

En médecine, les biomarqueurs sont couramment utilisés pour le diagnostic d'un état physiopathologique mais aussi pour le suivi thérapeutique des patients. Il s'agit le plus souvent de métabolites ou de protéines, dont la présence à plus forte/faible concentration est corrélée avec la pathologie. Le biomarqueur idéal devrait fournir des informations sur la physiopathologie d'une maladie sous-jacente, l'évolution d'une maladie et / ou la réponse au traitement. Il doit également être reproductible sur différentes populations et permettre d'expliquer des pronostics différents entre les individus. Son dosage doit être facilement réalisable en pratique clinique<sup>47</sup>.

Pour les maladies respiratoires, comme l'asthme sévère, les biomarqueurs peuvent être obtenus en utilisant différents types d'échantillons cliniques comme les échantillons

bronchoscopiques (biopsies, lavages bronchoalvéolaires – LBA), les expectorations induites ou le sang.

Les marqueurs associés à l'asthme de type T2, sévère ou non sont les biomarqueurs de l'asthme les plus connus. Les marqueurs sanguins en sont, entre autres, le nombre d'éosinophiles et la concentration en IgE, tandis que la fraction expirée du monoxyde d'azote (FeNO) en est un marqueur respiratoire<sup>67,88</sup>. Les concentrations de certaines cytokines comme l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 dans les expectorations et les LBA et la TSLP, l'IL-33 et l'IL-25 dans l'épithélium sont d'autres marqueurs de l'asthme T2<sup>67</sup>.

Les biomarqueurs associés à un asthme non-T2 sont les neutrophiles et la concentration d'IL-17 dans les expectorations. Les concentrations de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  dans le sang périphérique contribuent aussi au diagnostic différentiel de l'asthme non T2<sup>67</sup>.

Le concept d'un endotype T2 a été validé du fait de l'efficacité des anticorps monoclonaux contre le récepteur alpha de l'IL-4 (IL4Ra) ou contre l'IL-5 et son récepteur (IL5RA) chez les patients présentant des augmentations des biomarqueurs T2 précédemment évoqués<sup>48</sup>. Cependant, une vaste gamme de réponses à ces thérapies allant d'un véritable changement de vie à une amélioration minime, en passant par une aggravation réelle de la maladie (ou des effets secondaires concomitants), a été recensée<sup>48</sup>. Il semble probable qu'en plus du profil des cytokines T2, d'autres facteurs, notamment les caractéristiques cliniques, métaboliques et immunitaires, puissent collectivement déterminer l'efficacité du traitement<sup>48</sup>. Cela implique le besoin de biomarqueurs plus sélectifs (ou de panels de biomarqueurs) permettant d'identifier la bonne thérapie biologique pour chaque patient, dans une approche médicale plus personnalisée et précise du traitement de la maladie<sup>89</sup>. Des recherches supplémentaires de biomarqueurs sont nécessaires pour définir le phénotype moléculaire de l'asthme, et afin de prédire la réponse à des thérapies ciblées<sup>89</sup>. L'utilisation de données « omiques » apparaît comme un outil prometteur pour définir les mécanismes physiopathologiques sous-jacents de l'asthme sévère<sup>48,89</sup>.

## Etat des lieux des analyses « omiques » dans l'asthme sévère

La complexité et l'hétérogénéité de l'asthme sévère font qu'il est très peu probable qu'un seul biomarqueur suffise à en définir/caractériser les endotypes. Ces dernières années ont vu l'émergence des sciences « omiques », qui mesurent simultanément des milliers de molécules dans un échantillon biologique complexe et qui représentent le cœur de la biologie des systèmes. La génomique et la transcriptomique ont fait leur apparition dans les années 1980, la protéomique dans les années 1990. La métabolomique émerge quelques années plus tard et est en constante évolution depuis<sup>90-92</sup>. Ces technologies complémentaires (Figure 11) ont eu un impact significatif sur la découverte de biomarqueurs et de nouvelles cibles thérapeutiques à l'ère de la médecine de précision. La génomique est la science qui étudie le génome : elle permet d'expliquer un certain nombre de prédispositions génétiques<sup>93</sup>. La transcriptomique est la science qui étudie la manière dont varie l'expression globale des gènes<sup>93</sup>. La protéomique s'intéresse à l'étude du protéome, c'est-à-dire à l'ensemble des protéines constituant un organisme vivant<sup>93</sup>. La métabolomique est le reflet le plus proche du phénotype, c'est-à-dire de la réponse de l'organisme à une pathologie. Elle correspond ainsi à la dernière étape de la cascade des sciences « omiques » (Figure 11). Un individu présentant à la surface de ses muqueuses/barrières des microbiotes spécifiques, et le déséquilibre (ou dysbiose) de ces microbiotes pouvant être la cause ou la conséquence de certaines pathologies, leur analyse est complémentaire aux études précédentes. Ainsi, à l'inverse de la génomique qui consiste à séquencer un unique génome, la métagénomique séquence les génomes de plusieurs espèces différentes dans un milieu donné : la métagénomique est la méthode d'étude du microbiote.

Un certain nombre de criblages du génome entier en lien avec les phénotypes de l'asthme et de l'atopie ont maintenant été publiés. A titre d'exemple, une étude génomique<sup>94</sup> suggère que le récepteur soluble pour les produits finaux de glycation avancée (AGE) peut jouer un rôle causal, biologiquement important et protecteur dans l'asthme et peut servir à identifier des thérapies prometteuses dans sa prévention et son traitement.

L'analyse par transcriptomique permet d'évaluer l'impact de l'expression des gènes (par une régulation à la hausse ou à la baisse) sur un système cellulaire, et est essentiel pour comprendre les rôles des gènes de prédisposition à l'asthme. Une analyse du transcriptome<sup>95</sup> sur des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) issues de patients asthmatiques, a mis en évidence trois groupes distincts grâce à un regroupement hiérarchique : un groupe était représentatif de l'asthme T2 non sévère, un groupe était composé d'asthmatiques non T2 sévères, et un dernier groupe présentait des caractéristiques cliniques intermédiaires avec des concentrations d'IgE plasmatiques les plus élevées. Ainsi, l'analyse par transcriptomique

sur des PBMC peut refléter les caractéristiques immunophénotypiques des patients atteints d'asthme.

L'analyse par protéomique des LBA a également été largement utilisée pour identifier des marqueurs spécifiques de différentes maladies respiratoires, y compris les lésions pulmonaires aiguës, les maladies pulmonaires interstitielles et les maladies pulmonaires professionnelles<sup>96</sup>. L'analyse protéomique des LBA<sup>96</sup>, de patients asthmatiques, a montré que les niveaux de lipocaline-1, de cystatine S et de phospholipase A2, qui sont liés aux voies de stimulation des voies respiratoires supérieures, étaient significativement augmentés par rapport aux contrôles. Une analyse protéomique des surnageants de crachats<sup>97</sup> produits par des patients atteints d'asthme classique et de formes atypiques d'asthme telles que l'asthme variant de la toux ou l'asthme variant de l'oppression thoracique, a montré que les différents variants de l'asthme présentait un mécanisme pathogénique similaire (Th2 associé à l'éosinophilie). Une stratégie thérapeutique commune pourrait ainsi être proposée pour ces différents types d'asthme.

Par la suite, nous nous intéresserons surtout à la métabolomique et à la métagénomique.

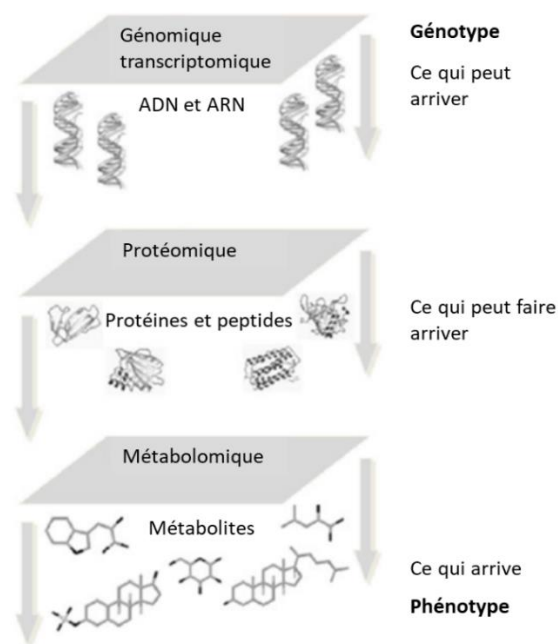


Figure 11 : La cascade des sciences « omiques ». Adapté de Courant et al., 2014<sup>90</sup>

## La métabolomique pour la recherche de biomarqueurs dans l'asthme sévère

### Principe de la métabolomique

La métabolomique est l'étude globale des métabolites (le métabolome) présents dans une cellule, un tissu, un organe ou un organisme, à l'aide de techniques à haut débit<sup>98</sup>. Elle mesure l'ensemble des molécules de faible poids moléculaire (< 1000 Da) dans des échantillons biologiques complexes, fournissant un aperçu des processus biologiques et reflétant un état physiologique ou physiopathologique à un moment donné. Le métabolome humain inclut les substances endogènes, qui sont naturellement produites par le métabolisme interne, incluant les lipides, les nucléotides, les aminoacides, etc<sup>93</sup>. Il contient également les métabolites produits par les microbiotes et des substances exogènes à l'organisme apportées par l'environnement : l'alimentation, les médicaments, les polluants et les contaminants (Figure 12).

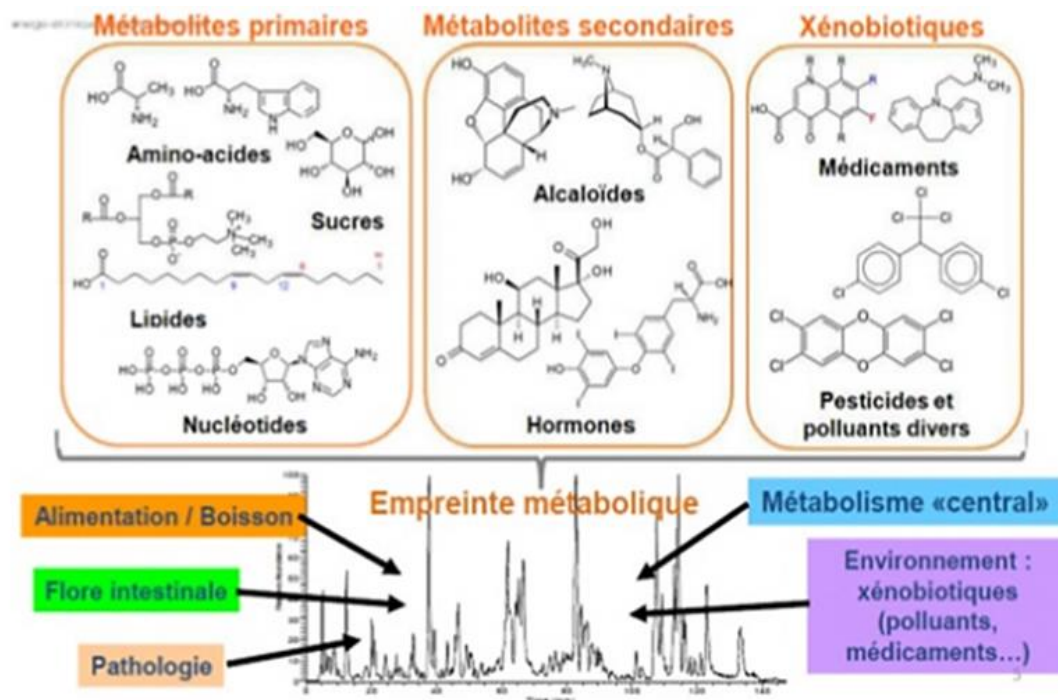


Figure 12 : Le métabolome comprend à la fois des métabolites endogène et exogènes.  
Source : Heintz, 2013<sup>99</sup>

La métabolomique globale, ou non ciblée, est une analyse sans a priori (métabolites non identifiés avant l'analyse). Elle a pour but d'identifier la signature d'une pathologie ou d'un contexte particulier, puis d'en identifier des biomarqueurs d'exposition ou d'effet. L'identification de ces biomarqueurs est complexe, et nécessitera des annotations à l'aide de bases de données (chimiothèque interne ou externe) et/ou d'analyses plus poussées (MS/MS, analyse spectrale) afin de pouvoir réaliser l'interprétation biologique de la signature identifiée.

## Comment fait-on une analyse métabolomique ?

La métabolomique connaît une grande expansion depuis une dizaine d'années suite à l'évolution des techniques analytiques à haut débit mais également au développement d'outils informatiques performants<sup>100</sup>. La métabolomique est une approche interdisciplinaire qui englobe (i) la biologie, plus précisément la physiologie, (ii) la chimie analytique et (iii) la bioinformatique (Figure 13)<sup>101</sup>. L'analyse métabolomique s'appuie tout d'abord sur un questionnement biologique. Les échantillons sont prélevés et soumis à une procédure de préparation. L'acquisition de données est ensuite effectuée à l'aide d'instruments analytiques à haut débit, suivie d'une analyse de données à l'aide d'outils statistiques et chimiométriques pour détecter des variables discriminantes. Enfin, l'attribution de l'identité de ces variables est effectuée à l'aide d'instruments analytiques afin de proposer une interprétation biologique.

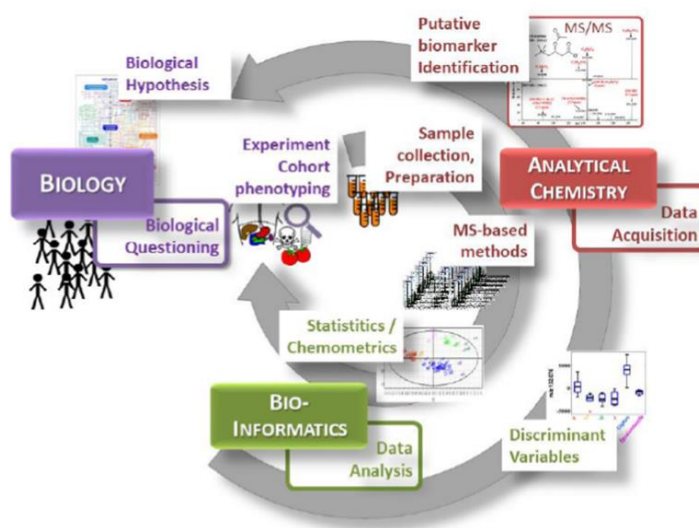


Figure 13 : Différentes étapes de la métabolomique impliquant trois principaux domaines scientifiques que sont la biologie, la chimie analytique et la bioinformatique.  
Source : Alves et al., 2020<sup>101</sup>

Les deux principales techniques analytiques fournissant l'information structurale des métabolites sont la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la chromatographie liquide (LC) ou gazeuse (GC) couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS)<sup>102</sup>. La RMN est l'une des premières technologies utilisées pour le profilage métabolomique<sup>103</sup>. C'est une technique spectroscopique basée sur le principe de l'absorption d'énergie et de la réémission des noyaux d'atomes, en raison des variations d'un champ magnétique externe. Elle produit des données spectrales qui permettent de quantifier la concentration et de caractériser la structure chimique des métabolites. La spectrométrie de masse acquiert des données spectrales sous la forme d'un rapport masse sur charge ( $m/z$ ) et d'une intensité relative du composé ionisé. Elle se base sur la mesure du ratio masse/charge des ions moléculaires et de leurs fragments permettant de déterminer leur identité. La métabolomique basée sur cette



approche est généralement précédée d'une étape de séparation, ce qui réduit la complexité de l'échantillon et permet l'analyse de différents ensembles de molécules à différents moments. Les techniques de séparation les plus courantes sont les colonnes de chromatographie en phase liquide (LC)<sup>104</sup> et de chromatographie en phase gazeuse (GC)<sup>105</sup>, appelées LC-MS ou GC-MS<sup>98</sup>. Le couplage entre la spectrométrie de masse et la chromatographie est devenue majoritaire dans les études métabolomiques ces dernières années, notamment par sa plus grande sensibilité.

La métabolomique globale ou non ciblée, par LC/GC-MS ne permet pas de quantifier les métabolites de manière absolue mais uniquement de façon relative. L'approche ciblée des métabolites a pour but de mesurer spécifiquement un ou plusieurs métabolites ou une famille de métabolites prédéfinis, identifiées en amont par des approches non ciblées. L'analyse métabolomique repose sur une succession d'étapes appelées workflow allant de la préparation des échantillons à leur interprétation biologique au sein du système étudié. Le déroulement de l'analyse LC-HRMS (Spectrométrie de Masse à Haute Résolution ou LC-MS) non ciblée, telle que réalisée au laboratoire est décrite Figure 14 et sera présentée plus en détail dans la partie Méthodes (Partie 1 – Chapitre 1) de ce manuscrit.

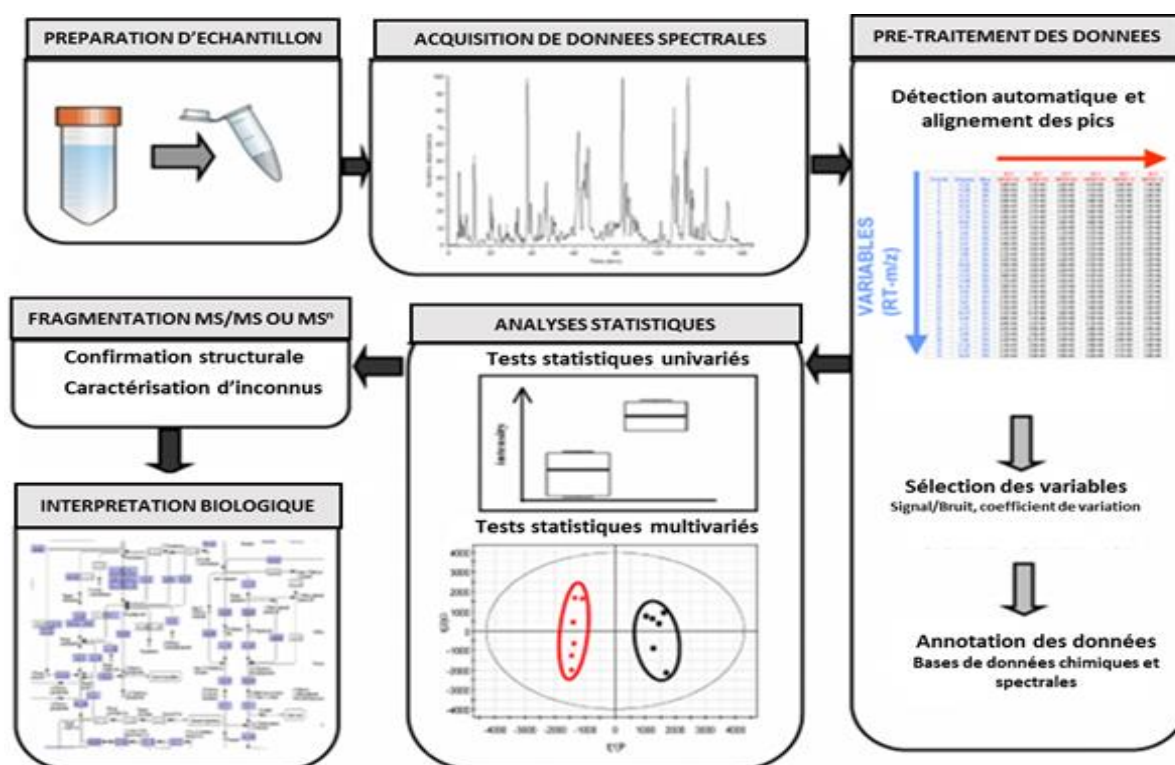


Figure 14 : Déroulement d'une analyse métabolomique globale par LC/HRMS.  
Adapté de Junot et al., 2014<sup>106</sup>



## La métabolomique pour la recherche de signature de l'asthme sévère

L'étude métabolomique du plasma de 22 personnes en bonne santé et 54 asthmatiques (12 légers, 20 modérés, 22 sévères) par LC-MS de Reinke et al.,<sup>107</sup> a identifié des profils métaboliques de l'asthme chez l'adulte qui différencient les phénotypes d'asthme léger, modéré et sévère. Sur les 66 métabolites identifiés, 15 étaient significativement différents entre les groupes. Cette étude a montré que les niveaux de taurine, phénylalanine, xanthine, methylthioadenosine et arginine étaient augmentés chez les AS, alors que celui du cortisol était diminué. Comhair et al.,<sup>108</sup> ont également trouvé, par des analyses LC-MS et GC-MS, une diminution des stéroïdes plasmatiques chez les adultes souffrant d'asthme sévère par rapport aux contrôles.

La première étude métabolomique sur des échantillons de sang d'enfants asthmatiques, réalisée par Checkley et al.,<sup>109</sup> avait pour but de trouver des biomarqueurs non invasifs pour aider à normaliser le diagnostic de l'asthme. Grâce à la spectrométrie de masse ciblée, des différences importantes dans les concentrations de plusieurs métabolites ont permis de discriminer clairement les enfants asthmatiques (n = 50) des contrôles (n = 49). Plus particulièrement, les concentrations sériques d'acide 2-isopropylmalique, d'acide ascorbique, de 6-phospho-D-gluconate et de shikimate-3-phosphate étaient diminués chez les enfants asthmatiques par rapport aux témoins. En revanche, la concentration de glutathion réduit était plus élevée chez les asthmatiques que chez les témoins.

D'autres études métabolomiques ont été réalisées dans le contexte de l'asthme sur le sang ou les urines,<sup>110-112</sup> majoritairement chez l'adulte et pas forcément dans un contexte d'asthme sévère. Dans ce cadre, les études visent à identifier des biomarqueurs d'aide au diagnostic ou au suivi du patient. Quelques études ont également réalisé des analyses du métabolome local, en lien direct avec la pathologie, i.e. sur des condensats de l'air expiré<sup>113</sup> ou des LBA. De telles approches peuvent permettre de mieux comprendre les voies métaboliques impactées par la maladie, pour aller vers la compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents et une meilleure prise en charge. Une étude ciblée sur les niveaux d'acides aminés dans les LBA de patients asthmatiques adultes a montré une augmentation des niveaux d'asparagine, de phosphoéthanolamine et de taurine<sup>114</sup>. Une étude récente a mis en évidence 13 métabolites significativement augmentés dans les LBA d'enfants avec une respiration sifflante persistante par rapport au groupe témoin, notamment la choline, l'oléamide, le népéto lactame, la butyrylcarnitine, la l-palmitoylcarnitine, le palmitoyléthanolamide et diverses phosphatidylcholines<sup>115</sup>. Ces études ont montré des résultats différents, de par leur approche, ciblée et non ciblée, mais aussi par les populations étudiées.

Tableau 2 : Récapitulatif des études métabolomiques dans l'asthme. AS : Asthme Sévère, LBA : lavage bronchoalvéolaire.

Références	Populations étudiées	Echantillons	Résultats
Reinke et al. <sup>107</sup>	Adultes atteints d'AS	Sérum et expectorations	Niveaux de taurine, phénylalanine, xanthine, methylthioadenosine et arginine augmentés chez les AS, alors que celui du cortisol était diminué
Comhair et al. <sup>108</sup>	Adultes atteints d'AS	Plasma	Diminution des stéroïdes chez les AS
Checkley et al. <sup>109</sup>	Enfants asthmatiques	Sérum	Diminution des concentrations relatives d'acide ascorbique, d'acide 2-isopropylmalique, de shikimate-3-phosphate, de 6-phospho-d-gluconate et de glutathion chez les enfants asthmatiques
Loureiro et al. <sup>106</sup>	Adultes asthmatiques	Urine	Les métabolites liés à la peroxydation lipidique pourraient prédire les paramètres cliniques y compris la gravité de la maladie, la fonction pulmonaire, la FeNO et les éosinophiles sanguins chez les patients non obèses
Mattarucchi et al. <sup>108</sup>	Enfants asthmatiques	Urine	Les PLS-DA distinguent les patients dont les symptômes sont bien contrôlés de ceux dont les symptômes sont mal contrôlés
Carraro et al. <sup>109</sup>	Enfants atteints d'AS et non sévère	Condensat de l'air expiré	Les profils métaboliques ont permis de discriminer complètement le phénotype de l'asthme sévère
Hofford et al. <sup>110</sup>	Adultes	LBA	L'asparagine, la phosphoéthanolamine et la taurine sont augmenté de manière significative chez les patients asthmatiques.

## Cas particulier des lipides

Les lipides étaient auparavant considérés comme de simples éléments structurels, notamment des membranes cellulaires, et comme de « simples » réserves d'énergie. Les lipides sont aujourd'hui décrits comme des molécules clés dans la signalisation cellulaire, le maintien de l'homéostasie et les réponses inflammatoires et immunitaires<sup>116</sup>. Les lipides sont largement distribués dans l'organisme et représentent la majorité des métabolites dans le sang<sup>117</sup>. Les lipides peuvent être classés en huit catégories, à savoir les acides gras libres, les glycérolipides, les glycérophospholipides, les sphingolipides, les stérols, les prénols, les saccharolipides et les polycétides (Figure 15)<sup>118-121</sup>.

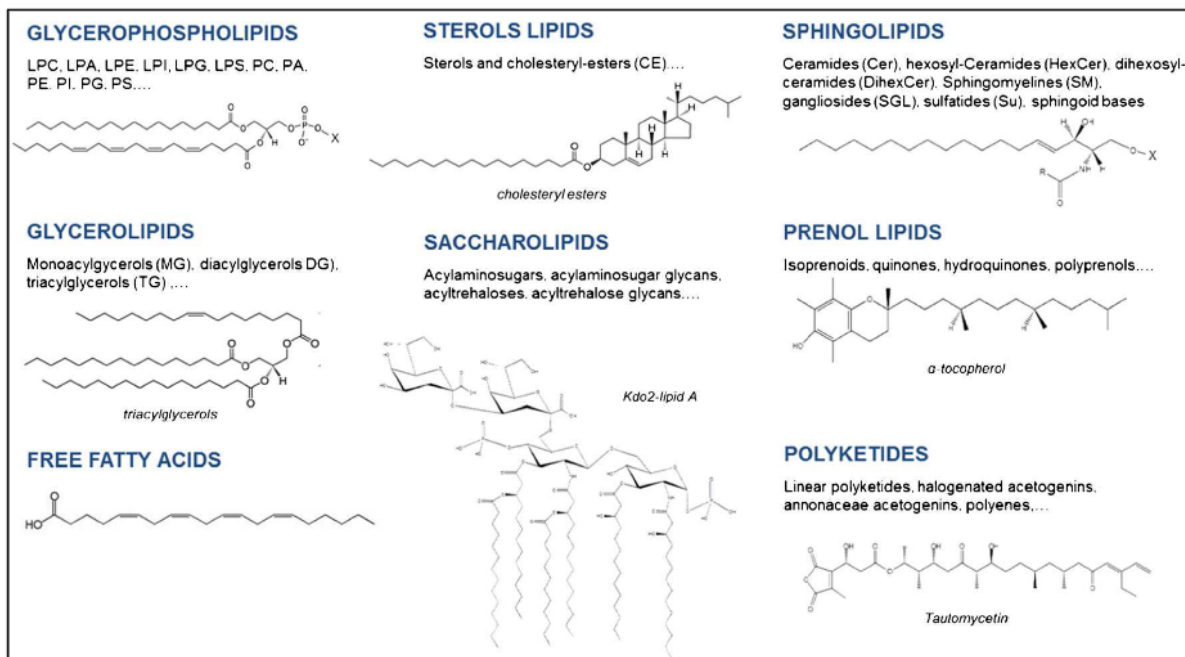


Figure 15 : Récapitulatif des huit catégories de lipides, avec pour chacune des exemples de lipides et leurs structures.

PC : Glycérophosphocholines ; PE : Glycérophosphoéthanolamine ; PI : Glycérophosphoinositol ; PS : Glycérophosphosérine ; PG : Glycérophosphoglycérol ; L : Lyso.

Source : Colsch, 2015<sup>121</sup>

Il a été notamment montré que les lipides jouent un rôle important dans l'inflammation des voies respiratoires et l'asthme. Une étude chez des enfants asthmatiques allemands a montré que des niveaux croissants d'acides gras polyinsaturés de type  $\omega$ -6 (acide linoléique (LA) et acide arachidonique (ARA)) dans le sérum étaient associés à une diminution de la fonction pulmonaire mesurée par le VEMS<sup>122</sup>. Ces deux acides gras sont des précurseurs de la biosynthèse des eicosanoïdes et contribuent à l'inflammation des voies respiratoires<sup>123</sup>. Les acides gras polyinsaturés sont des précurseurs de multiples molécules pro- et anti-inflammatoires comme les prostanoïdes, qui jouent un rôle important dans l'exacerbation de l'asthme<sup>124</sup>.

## La métagénomique pour l'analyse du microbiote dans l'asthme sévère

### Principe de la métagénomique

Le séquençage de l'ADN a été utilisé pour caractériser les communautés microbiennes associées aux hôtes humains et animaux<sup>125</sup>. Le coût du séquençage a rapidement diminué, ce qui a conduit à l'utilisation de technologies de séquençage dans un large éventail d'applications biologiques. Le nombre d'études portant sur le microbiome, qui se compose de diverses bactéries, archées, champignons, protozoaires et virus, a explosé depuis les avancées technologiques dans le séquençage à haut débit qui facilitent l'analyse de ces organismes indépendamment de la culture et du clonage. L'utilisation du séquençage à haut débit dans l'analyse des communautés microbiennes a conduit à la création d'un nouveau domaine scientifique - la métagénomique, c'est-à-dire l'analyse des génomes d'organismes coexistant dans une communauté.

### Comment fait-on une analyse métagénomique

Comme pour la métabolomique, il existe deux types de métagénomique : le séquençage du génome entier et la métagénomique ciblée.

Le principe de la métagénomique sur génome entier est d'extraire l'ADN d'une communauté microbienne complexe, puis de séquencer et d'interpréter les données comme un génome unique. L'ADN est extrait de toutes les cellules d'une communauté, puis l'ADN est découpé en tout petits fragments qui sont séquencés indépendamment. Il en résulte des séquences d'ADN qui s'alignent sur divers emplacements génomiques présents dans l'échantillon. Certaines de ces lectures seront échantillonnées à partir de locus génomiques taxonomiquement informatifs et d'autres seront échantillonnées à partir de séquences codantes qui donnent un aperçu des fonctions biologiques codées dans le génome<sup>126</sup>.

La métagénomique ciblée consiste à choisir une région spécifique à séquencer et amplifier. Le séquençage des amplicons, par exemple, est la méthode la plus utilisée pour caractériser la diversité du microbiote<sup>126</sup>. Comme pour le séquençage du génome complet, l'ADN est extrait de toutes les cellules de l'échantillon. Un marqueur génomique commun à pratiquement tous les organismes d'intérêt est ensuite ciblé et amplifié par réaction en chaîne par polymérase (Polymerase chain reaction ou PCR). Les amplicons résultants sont séquencés et caractérisés de manière bioinformatique pour déterminer quels microorganismes sont présents dans l'échantillon et à quelle abondance relative. Dans le cas des bactéries et des archées, les études de séquençage des amplicons ciblent généralement le locus de la petite sous-unité de l'ARN ribosomal (16S), qui est un marqueur taxonomique et phylogénétiquement informatif.

L'utilisation du séquençage du gène de l'ARNr 16S, a permis de mettre en évidence la présence de bactéries dans différents organes considérés auparavant comme stériles, tels que les poumons<sup>127</sup>. Ces découvertes ont donné naissance à la notion de microbiome pulmonaire et amorcé des efforts de recherche pour sa caractérisation.

### Rôle du microbiote

Les microbiotes associés à l'homme s'établissent après la naissance et se stabilisent après les 2 à 3 premières années de vie<sup>128</sup>. Au début de la vie, les communautés microbiennes des voies respiratoires sont très dynamiques et dépendent de multiples facteurs, notamment le mode de naissance, le type d'alimentation et les traitements antibiotiques (Figure 16). Ensemble, ces facteurs peuvent modifier la composition du microbiote vers une communauté stable, à l'équilibre qui résiste à la prolifération d'agents pathogènes, ou, à l'inverse, vers une communauté instable, qui prédispose à l'infection et à l'inflammation<sup>129</sup>. Ainsi, dès les premiers mois de vie, la colonisation précoce du nouveau-né par des bactéries commensales joue un rôle critique dans la stimulation et la maturation du système immunitaire<sup>130</sup>.

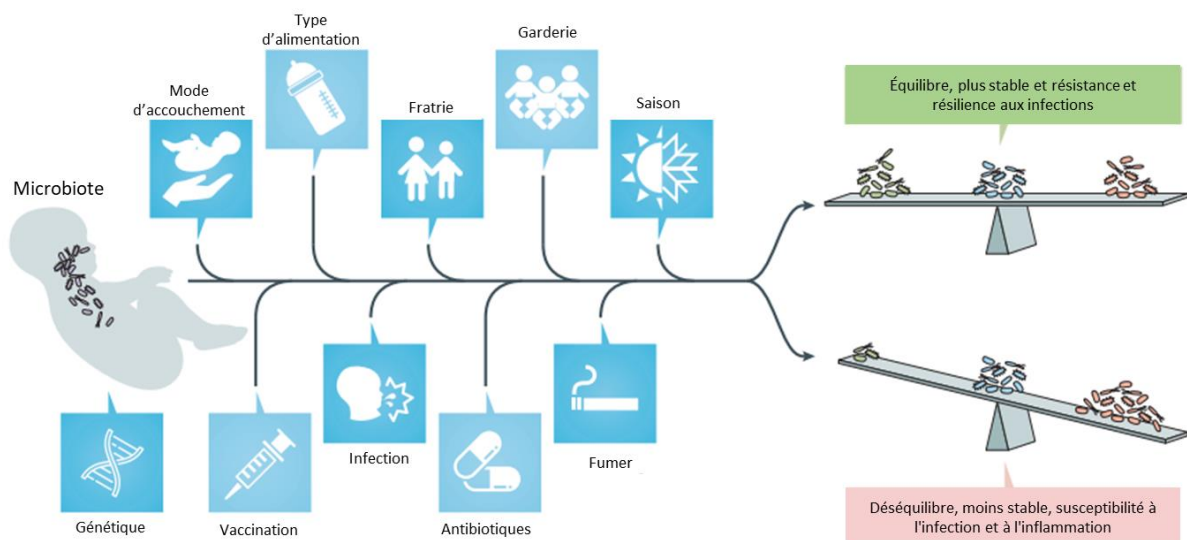


Figure 16 : Facteurs environnementaux qui influencent le microbiote respiratoire.  
Adapté de Man et al., 2017<sup>129</sup>

Les voies respiratoires humaines sont la principale porte d'entrée pour l'immigration continue et l'élimination de micro-organismes et de particules en suspension dans l'air, notamment des virus, des bactéries et des champignons<sup>131</sup>. Les poumons sont continuellement exposés à une multitude de micro-organismes, dont certains sont capables de persister et de coloniser les voies respiratoires. La surface des poumons présente une couche continue de cellules épithéliales qui constituent une barrière physique et biologique à ces substances. L'épithélium respiratoire est nécessaire au maintien de l'homéostasie immunitaire, et le dysfonctionnement épithélial est impliqué dans le développement de nombreux troubles inflammatoires des voies

respiratoires et des poumons. Les voies respiratoires sont divisées en voies respiratoires supérieures (cavité nasale, pharynx, larynx) et en voies respiratoires inférieures (trachée, bronches, bronchioles et les alvéoles) : les densités bactériennes les plus élevées sont observées dans les voies respiratoires supérieures.

Le rôle du microbiote intestinal dans l'atopie a fait l'objet d'une grande attention au cours des dernières décennies dans le cadre de l'hypothèse de l'hygiène, selon laquelle un manque d'exposition aux composants microbiens au début de la vie entrave la maturation du système immunitaire humain et augmente la susceptibilité aux maladies atopiques<sup>132</sup>. De nombreuses études ont fourni des preuves de la communication entre le microbiote intestinal et les poumons, appelée « axe intestin-poumon ». Pendant la période périnatale, le microbiote intestinal joue un rôle clé dans la détermination de la tolérance future, la maturation de l'immunité et le risque d'asthme<sup>133</sup>. En effet, une diversité réduite du microbiote intestinal ainsi qu'un traitement antibiotique au cours de la première année de vie peut être associés à un risque accru d'asthme<sup>132</sup>. De plus, il a été montré que les enfants présentant une abondance réduite des genres bactériens *Lachnospira*, *Veillonella*, *Faecalibacterium* et *Rothia* avaient un risque accru de développer de l'asthme et l'ajout de ces bactéries dans un modèle de souris humanisée réduisait l'inflammation des voies respiratoires<sup>134</sup>. Dans l'intestin les *Bacteroidetes*, les *Firmicutes* et les *Proteobacteria*<sup>131</sup> sont connus comme étant des bactéries productrices d'acides gras à chaîne courte via la fermentation bactérienne de glucides non digestibles par le métabolisme humain. Le microbiote des voies respiratoires dans un poumon sain est dominé par ces bactéries<sup>131</sup>. L'acétate, le propionate et le butyrate sont les AGCC les plus abondants dans le tractus intestinal humain<sup>131</sup>. Il a été démontré que les AGCC réduisaient l'inflammation dans les modèles d'inflammation des voies respiratoires induite par l'OVA<sup>135</sup> et les acariens<sup>136</sup>.

Le microbiote respiratoire a une biomasse nettement inférieure à celui du tractus intestinal et son étude est plus complexe avec une composition pouvant varier selon la qualité et le type de prélèvement (expectoration, aspiration, LBA, explant pulmonaire). Les déterminants écologiques du microbiome pulmonaire - immigration microbienne, élimination microbienne et taux de reproduction relatifs des communautés bactériennes - changent au cours d'une maladie pulmonaire aiguë et chronique<sup>137</sup>. Par conséquent, l'appartenance à la communauté du microbiome pulmonaire est altérée dans certains états pathologiques. Dans l'asthme, la dysbiose microbienne dans les poumons ou l'intestin, peut être causée par de nombreux facteurs liés au mode de vie et aux expositions environnementales. Le déséquilibre entre les souches bactériennes symbiotiques et pathogènes dans l'intestin et les poumons peut entraîner une altération du développement immunitaire et des réponses inflammatoires inappropriées<sup>138</sup>. L'interaction entre des agents infectieux et les cellules épithéliales induit la stimulation des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) qui entraîne la

sécrétion de molécules effectrices antimicrobiennes, d'enzymes ainsi que des chimiokines et de facteurs de croissance<sup>131</sup>. Ces molécules facilitent le recrutement et la communication entre les cellules immunitaires et contribuent à l'initiation des réponses immunitaires innées puis adaptatives qui sont essentielles au contrôle précoce d'une infection. Chez les individus en bonne santé, cette réponse entraîne rapidement l'élimination des agents pathogènes, tandis que la réponse immunitaire est régulée négativement pour empêcher toute inflammation excessive. En revanche, chez les patients atteints de maladies respiratoires chroniques, ces défenses peuvent être altérées, ce qui entraîne une sensibilité accrue aux infections et entraînent des réponses inflammatoires qui exacerbent la maladie sous-jacente<sup>131</sup>.

La dérégulation de la réponse immunitaire épithéliale et de la fonction de barrière ainsi que la dysbiose microbienne peuvent contribuer aux maladies pulmonaires inflammatoires chroniques telles que l'asthme<sup>131</sup>.

### Microbiote de patient sain *versus* microbiote de patients asthmatiques sévères

Les principaux phyla et genres décrits dans le microbiome pulmonaire « sain » sont les *Bacteroidetes*, désormais appelés *Bacteroidota* (*Prevotella*, *Bacteroides*), et les *Firmicutes* ou *Bacillota* (*Veillonella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*). Sont retrouvés également à une moindre abondance les *Proteobacteria* ou *Pseudomonadota* (*Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Acinetobacter* et *Escherichia coli*) et les *Actinobacteria* ou *Actinomycetota* (Figure 17)<sup>127,130,139</sup>.

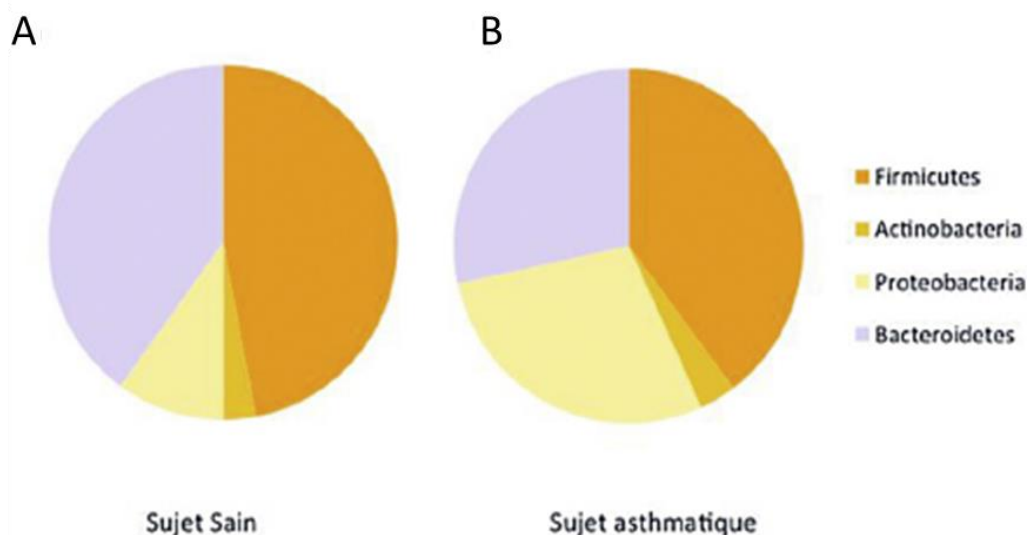


Figure 17 : Composition du microbiote respiratoire chez **A.** le sujet sain et **B.** chez l'asthmatique.  
Source : Barnig et al., 2018<sup>139</sup>

Il a été montré, grâce au séquençage 16S, que les LBA des enfants asthmatiques présentaient un microbiote différent de celui des sujets non-asthmatiques, avec notamment une

augmentation de l'abondance relative des phyla Proteobacteria (*Pseudomonadota*), tels que *Haemophilus*, *Moraxella* et *Neisseria* spp, et Firmicutes (*Bacillota*), comme *Staphylococcus* ou *Streptococcus*, et associé à une diminution des Bacteroidetes (tels que *Prevotella*)<sup>127</sup>. L'étude de Zhang et al.,<sup>140</sup> a confirmé que les *Bacteroidetes* (*Bacteroidota*) étaient moins abondants dans les expectorations induites des patients adultes asthmatiques non sévères et sévères par rapport aux groupes sains, tandis que les *Firmicutes* (*Bacillota*) étaient nettement augmentés chez les asthmatiques sévères uniquement. Dans l'étude de Marri et al.,<sup>141</sup> qui a également utilisé des échantillons d'expectorations induites, une plus grande abondance de *Proteobacteria* (*Pseudomonadota*), en particulier *Haemophilus*, et une plus faible abondance de *Firmicutes* (*Bacillota*) ont été trouvées chez les patients asthmatiques adultes.

En parallèle, Huang et al.<sup>142</sup> ont montré que la diversité du microbiote, était augmentée dans des échantillons épithéliaux bronchiques d'adultes asthmatiques par rapport à ceux d'adultes non-asthmatiques. Dans une étude ultérieure,<sup>143</sup> ils ont montré que ces échantillons, provenant de patients asthmatiques sévères, étaient enrichis en *Actinobacteria* (ou *Actinomycetota*), en comparaison aux échantillons de sujets sains ou de patients asthmatiques légers à modérés.

Dans les LBA d'enfants asthmatiques (13 versus 7 contrôles), il a été montré que les phylums *Proteobacteria* (*Haemophilus*) et *Firmicutes* (*Staphylococcus*) étaient significativement plus élevés par rapport aux témoins sains<sup>127</sup>. Goldman et al.<sup>144</sup>, ont montré une augmentation de *Bacteroides* et *Pneumocystis* dans les LBA d'enfants asthmatiques sévères par rapport aux témoins sains (15 versus 11 contrôles). Pour finir, chez les enfants asthmatiques sévères, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* et *Moraxella* étaient les plus répandus dans les voies respiratoires nasales alors que *Veillonella*, *Prevotella* et *Streptococcus* étaient les plus répandus dans les voies respiratoires bronchiques<sup>145</sup>.



Tableau 3 : Récapitulatifs des études sur le microbiote dans l'asthme. AS : asthme sévère, LBA : lavage bronchoalvéolaire

Références	Populations étudiées	Echantillons	Résultats
Hilty et al. <sup>127</sup>	Enfants asthmatiques	LBA	<i>Proteobacteria</i> ( <i>Haemophilus</i> ) et <i>Firmicutes</i> ( <i>Staphylococcus</i> ) étaient significativement plus élevés par rapport aux témoins sains
Zhang et al. <sup>140</sup>	Adultes asthmatiques non sévères et sévères	Expectorations induites	<i>Bacteroidetes</i> ( <i>Bacteroidota</i> ) moins abondants chez les patients adultes asthmatiques non sévères et sévères par rapport aux groupes sains. <i>Firmicutes</i> ( <i>Bacillota</i> ) augmentés chez les AS uniquement
Marri et al. <sup>141</sup>	Adultes asthmatiques	Expectorations induites	Plus grande abondance de <i>Proteobacteria</i> ( <i>Pseudomonadota</i> ), en particulier <i>Haemophilus</i> , et plus faible abondance de <i>Firmicutes</i> ( <i>Bacillota</i> ) trouvées chez les patients asthmatiques
Huang et al. <sup>142</sup>	Adultes asthmatiques	Echantillons épithéliaux bronchiques	Diversité du microbiote augmentée chez les adultes asthmatiques par rapport à ceux d'adultes non-asthmatiques
Huang et al. <sup>143</sup>	Adultes atteints d'AS	Brossages bronchiques	Enrichissement en 53 taxons, la majorité étant des actinobactéries et les 5 taxons restants se classant dans la catégorie des gamma-protéobactéries.
Chun et al. <sup>145</sup>	Enfants atteints d'AS persistant	Ecouvillons nasaux et LBA	<i>Corynebacterium</i> , <i>Staphylococcus</i> et <i>Moraxella</i> étaient les plus répandus dans les voies respiratoires nasales alors que <i>Veillonella</i> , <i>Prevotella</i> et <i>Streptococcus</i> étaient les plus répandus dans les voies respiratoires bronchiques

## Analyse multi-omique dans l'asthme

La recherche basée sur les omiques est de plus en plus utilisée pour différencier les sous-types d'asthme, identifier les biomarqueurs ou prédire la réactivité des patients à des thérapies spécifiques<sup>146</sup>. L'intégration des données multi-omiques permet de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de la maladie grâce à l'identification des interactions moléculaires et des phénotypes<sup>146</sup>. L'application des approches « omiques », y compris la transcriptomique, l'épigénomique, la microbiomique, la métabolomique et la protéomique, a été appliquée à l'endotypage de l'asthme<sup>147</sup>. L'analyse intégrée d'approches « omiques » a permis d'identifier des endotypes, de bronchiolite à rhinovirus chez les nourrissons, corrélés avec un risque plus élevé de développer une respiration sifflante récurrente et de l'asthme<sup>148</sup>. Une autre analyse intégrée, sur des données génomiques et métabolomique dans les cas de bronchiolite sévère<sup>149</sup>, a montré que les sphingomyélines, les gènes du chromosome 19p13 (par exemple, MUC16) et le 1,2-dioleoyl-GPG ont été associés à un risque accru de développement de l'asthme.

## Objectifs de la thèse

L'asthme sévère est une pathologie hétérogène aux phénotypes cliniques multiples. De plus, chaque phénotype peut résulter de différents endotypes, c'est-à-dire de mécanismes physiopathologiques distincts aux niveaux cellulaires et moléculaires.

Afin d'améliorer le suivi personnalisé et la prise en charge thérapeutique, il reste nécessaire de comprendre en profondeur les mécanismes physiopathologiques et d'identifier des biomarqueurs locaux de l'asthme sévère.

Les objectifs du projet, en réponse à cette problématique sont de caractériser au niveau local le métabolome et le microbiote d'enfants atteints d'asthme sévère, par rapport à des enfants non-asthmatiques. Ces données pourront être intégrées avec des données immunologique préalablement obtenues, pour tenter de différencier des enfants AS et les contrôles. Au niveau plasmatique, l'objectif est d'identifier des biomarqueurs de l'asthme sévère. Pour creuser les mécanismes physiopathologiques et tester de nouvelles approches thérapeutiques sur des modèles *in vitro*, en s'affranchissant de nouveaux prélèvements, l'objectif était de réaliser des biobanques de cellules épithéliales primaires humaine nasale et bronchique et de bactéries issues des lavages bronchoalvéolaires.



## Méthodologie générale

## Présentations des cohortes utilisées

### La cohorte CLASSE, une première cohorte permettant la preuve de concept

Une première cohorte a permis de réaliser la preuve de concept de nos approches et hypothèses, mais aussi en amont de tester la faisabilité et la mise en place de la logistique nécessaire à ces études entre l'hôpital (Paris) et les laboratoires de recherche (Saclay/Jouy-en-Josas). Cette cohorte, nommée CLASSE est composée de vingt enfants asthmatiques sévères (AS) et de dix enfants du même âge et atteints de troubles respiratoires chroniques sévères autres que l'asthme, qui ont été recrutés comme sujets contrôle de la maladie (ci-après appelés non asthmatiques, NA). Le choix des patients témoins, non sains, s'explique par une justification éthique. Les enfants souffrant d'AS étaient suivis régulièrement dans le service de pneumologie et allergie pédiatrique dirigé par le Dr G Lezmi à l'hôpital Necker (Paris).

Les caractéristiques démographiques et cliniques des enfants sont résumées dans le Tableau 4. L'âge, l'indice de masse corporelle (IMC), le sexe et l'histoire familiale d'atopie étaient équivalents entre les deux groupes. Les enfants souffrant d'AS utilisaient des doses plus élevées de corticostéroïde inhalés (CSI), et présentaient un ratio volume expiratoire maximal par seconde sur capacité vitale forcée (VEMS/CVF) post-bronchodilatateur plus élevés que les sujets témoins, ainsi qu'une éosinophilie sanguine. Les sujets témoins (NA) présentaient des troubles respiratoires chroniques sévères, notamment une dyskinésie ciliaire (n = 2), des séquelles pulmonaires virales (n = 3) ou une bronchectasie (dilatation des bronches) non liée à la mucoviscidose (n = 5). Bien que certains sujets témoins étaient traités par CSI au moment de l'inclusion, le diagnostic d'asthme a été exclu sur la base des antécédents, de la réponse aux bronchodilatateurs, de la spirométrie et du dosage nasal du monoxyde d'azote ou de la tomographie à densité de matière. Les enfants NA avaient un nombre plus élevé de neutrophiles dans leur LBA que les enfants AS. La virologie et l'analyse bactérienne au niveau local ne différaient pas entre les enfants AS et NA. Cependant, parmi les patients AS, les cultures bactériennes étaient positives pour cinq enfants sur vingt (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* et *Staphylococcus aureus*) et des virus ont été trouvés chez quatre enfants (rhinovirus, adénovirus et virus de la grippe aviaire, virus respiratoire syncytial). Chez les contrôles NA, les cultures bactériennes étaient positives pour cinq enfants sur dix (*Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, et *Staphylococcus aureus*) et des virus ont été trouvés chez un enfant (coronavirus non SARS-CoV2).

Tableau 4 : Caractéristiques démographiques et cliniques des enfants de la cohorte CLASSE.  
Adapté de : Adel-Patient et al., 2021<sup>79</sup>

	Asthme sévère (AS) 20	Non-asthmatique (NA) 10	p value NA vs AS
Age (années)	10,5 [7,7-12,4]	10,7 [7,7-12]	0,82
Sexe (Femme:Homme)	7:15	4:6	1*
Indice de masse corporelle (kg/m <sup>2</sup> )	17,6 [15,5-23,1]	17,7 [16,2-19,8]	0,98
Histoire atopique (n)	17/20	6/10	0,18*
Post-BD FEV1, %	109 [97-116]	92 [86-102 ; n=9]	0,14
Post-BD FEV1/FVC, %	87,5 [81,2-90,5]	76 [73-86 ; n=9]	<b>0,057</b>
score ACT	17,5 [13-21,2]	19 [15-21 ; n=5]	0,78
Nombre de crises	5 [2-9]	1 [0-2 ; n=5]	0,15
Dose de CSI (µg/jours, eq, Fluticasone)	500 [500-562,5]	300 [250-500]	<b>0,007</b>
IgE totaux circulants (UI/mL)	218 [136,8-671]	43,57 [36,9-281,9]	0,15
Leucocytes sanguins (x10 <sup>3</sup> /µL)	6,7 [5,1-7,4]	7,05 [6,3-10,2]	0,24
Eosinophiles sanguins (x10 <sup>3</sup> /µL)	0,5 [0,3-0,9]	0,2 [0,17-0,32]	<b>0,008</b>
Neutrophiles sanguins (x10 <sup>3</sup> /µL)	2,7 [1,9-3,4]	3,8 [2-6,8]	0,21
Lymphocytes sanguins (x10 <sup>3</sup> /µL)	2,5 [1,9-2,9]	2,65 [2,5-2,8]	0,65
Eosinophiles dans les LBA (%)	0 [0-0]	0 [0-0]	0,35
Neutrophiles dans les LBA (%)	2 [1-4]	38 [15-84]	<b>0,001</b>
Lymphocytes dans les LBA (%)	6 [5-8]	4 [3-5]	<b>0,059</b>
Bactériologie positive dans les LBA (n)	5/20	5/10	0,23*
Virologie positive dans les LBA (n)	4/20	1/10	0,64*

Sur cette cohorte, déjà constituée au début de ma thèse, avaient été prélevés des échantillons de LBA et de sang. Le traitement des échantillons avait été réalisé comme décrit par Adel-Patient et al.<sup>79,80</sup> : le plasma et les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) avaient été obtenus après centrifugation sur gradient Ficoll, et les lavages bronchoalvéolaires (LBA) avaient subi différentes étapes de centrifugation. Les analyses des facteurs immunitaires dans le sang et les LBA étaient en cours (facteurs immunitaires solubles) ou finalisés (facteurs immunitaires cellulaires) à mon arrivée au laboratoire. Des aliquots supplémentaires de LBA et de plasmas avaient été conservés à -80°C, permettant l'analyse ultérieure du microbiote et du métabolome.

### Cohorte SevAsthma, cohorte en cours d'inclusion

La cohorte SevAsthma (CPP n° 20.02.28.66146) doit inclure 50 enfants asthmatiques sévères de moins de 6 ans, 50 enfants asthmatiques sévères âgés de 6 à 12 ans et 50 patients non-asthmatiques du même âge. Cette cohorte est au cœur de l'ANR SevAsthma-Children (n° ANR-18-CE14-0011). Cette étude a pour titre : « Définition de l'endotype de l'asthme pédiatrique sévère : une approche intégrée combinant des analyses phénotypiques liées aux caractéristiques immunitaires, métabolomiques et microbiennes ». L'objectif premier du projet est de caractériser en profondeur les endotypes d'AS chez des enfants d'âge préscolaire (0 à 6 ans) et d'âge scolaire (6 à 12 ans) en utilisant une approche intégrée, combinant une

description de leur phénotype (symptômes d'asthme, atopie et fonction pulmonaire) associée à des analyses histologiques (inflammation et remodelage des voies respiratoires), immunitaires (immunité innée et adaptative), métabolomique et du microbiote. Les objectifs secondaires sont de : (1) regrouper toutes les données obtenues pour définir de nouveaux groupes de patients et développer des biomarqueurs qui caractérisent les différents groupes ; (2) déterminer le profil immunitaire, métabolomique et du microbiote de ces enfants pour faciliter la recherche fondamentale future qui se concentrera sur de nouveaux mécanismes impliqués dans l'asthme pédiatrique ; (3) déterminer si les enfants d'âge préscolaire et d'âge scolaire avec AS partagent des caractéristiques endotypiques communes ; et (4) établir la base du suivi prospectif des patients afin d'identifier les endotypes qui prédisent la persistance de l'asthme tout au long de l'enfance, la gravité et la réponse au traitement.

Au 29 mars 2023, la cohorte incluait 33 enfants pris en charge au service de pneumologie et allergie pédiatrique à l'hôpital Necker (Paris) : 21 enfants avec un asthme sévère (AS, 20 dans la tranche d'âge 0 à 6 ans et 1 dans la tranche d'âge 6-12 ans) et 12 sujets témoins sans asthme du même âge. Les sujets témoins n'avaient pas d'antécédent d'asthme mais nécessitaient une endoscopie avec biopsie pour l'évaluation de leur maladie des voies respiratoires (principalement la dyskinésie ciliaire primitive ou des séquelles pulmonaires virales).

Les critères d'exclusion sont la prématurité (<37 semaines de gestation), la dysplasie broncho-pulmonaire, la bronchite asthmatique non sévère, le dysfonctionnement des cordes vocales, les déficiences immunitaires, la mucoviscidose, le reflux gastro-œsophagien et les troubles de la déglutition, ainsi que la prise de biothérapies.

Pour définir le phénotype de l'enfant asthmatique, une série de données est recueillie incluant :

- La description de la situation familiale en matière d'atopie :
  - Atopie chez 1 ou 2 parents
  - Asthme parental
  - Dermatite atopique parentale
  - Allergie alimentaire parentale
  - Rhinite allergique parentale
  - Les mêmes questions sont posées sur les frères et sœurs
- La description de l'environnement :
  - Résidence en zone urbaine ou non urbaine
  - Moisissure/humidité au domicile
  - Exposition à la fumée de cigarette
  - Présence d'animaux domestiques à la maison

- La description des antécédents d'asthme au cours de l'année écoulée :
  - Nombre d'exacerbations sévères
  - Nombre de jours cumulés de prise de stéroïdes oraux
  - Nombre de visites aux urgences pour asthme aigu
  - Score au test de contrôle de l'asthme
- La description de la fonction pulmonaire :
  - VEMS pré et post-bronchodilatateur
  - VEMS/CVF pré et post-bronchodilatateur
- La description du traitement de l'asthme :
  - Doses de CSI
  - Dose de BALA
  - Antagonistes aux récepteurs des leucotriènes (ARLT)
  - Corticostéroïdes oraux d'entretien

Les données démographiques sont aussi collectées, comme le poids, la taille, l'IMC, l'âge et le sexe.



## Traitement des échantillons de la cohorte SevAsthma

Lors de l'évaluation clinique de l'enfant, et sous condition d'un consentement des deux parents, des prélèvements de biopsies pulmonaires, de sang total, de lavages bronchoalvéolaire (LBA) ainsi qu'un brossage nasal sont réalisés, sous anesthésie générale. Les échantillons sont envoyés aux laboratoires de recherche du projet (INEM et CEA de Saclay), pour être pris en charge et traités dans les 3h après leurs prélèvements. Les LBA et biopsies sont transportées à +4°C, le sang total à température ambiante (TA), par coursier. Ces différents échantillons vont permettre de réaliser diverses analyses extemporanément (analyse des cellules immunitaires, mise en culture des cellules épithéliales, isolement de souches bactériennes d'intérêt), ou sur des échantillons traités puis conservés à -80°C (métabolomique, dosage des cytokines, analyse du microbiote). En parallèle, des échantillons de sang et de LBA sont analysés au laboratoire d'analyse de l'Hôpital Necker pour les analyses entrant dans la pratique clinique courante (numération cellulaire, bactériologie/virologie, dosage des IgE spécifiques).

Pour mon projet de thèse, les échantillons de LBA, les biopsies, les écouvillons nasaux et le sang, ont servi à l'étude des différents paramètres détaillés ci-dessous et dans le Tableau 5. Brièvement, une biopsie pulmonaire et un brossage nasal sont collectées directement en milieu de culture et permettent l'établissement de banques de cellules épithéliales primaires et participent à l'analyse du microbiote, par l'établissement de banques de souches bactériennes. Les LBA, après avoir subi différentes étapes de centrifugation (détaillées par la suite), sont utilisés pour la métabolomique, pour les dosages d'immunoglobulines (Ig) et de cytokines ainsi que pour l'analyse des sous-populations cellulaires de l'hôte (immunophénotypage) et celles du microbiote. Pour finir, le sang total est traité pour obtenir le plasma et les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC). Le premier permet l'étude métabolomique ainsi que l'analyse des immunoglobulines et des cytokines alors que les deuxièmes sont utilisées pour l'analyse des sous-populations cellulaires (immunophénotypage).

*Tableau 5 : Analyses réalisées sur les différents échantillons issus d'enfants asthmatiques sévères ou d'enfants contrôles.*

*Ig : Immunoglobulines, LBA : Lavage bronchoalvéolaire, PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique.*

<b>Métabolomique</b>	<b>Analyse cellulaire</b>	<b>Analyse des cytokines et des Ig</b>	<b>Analyse du microbiote</b>
Plasma LBA	PBMC LBA	Plasma LBA	LBA Brossage nasal Biopsie pulmonaire

## Traitement des prélèvements sanguins

Le prélèvement sanguin (<10ml) est réalisé sur tube hépariné (BD Vacutainer®, NH 170 I.U), puis conservé à température ambiante, sous légère agitation. Dès réception au laboratoire, une partie du sang total (500 µL) est centrifugé (1500×g, 4°C, 10 min). Le surnageant correspondant au plasma est récupéré, aliquoté et conservé à -80°C pour les analyses de métabolomique.

Le volume restant de sang est mélangé volume à volume au milieu AIM-V (Thermo Fisher Scientific). Ce sang dilué est ensuite déposé sur Histopaque® (solution de polysucrose et de diatrizoate de sodium ; Sigma-Aldrich, 10 mL de sang pour 5 mL de solution). Après centrifugation (1000×g, 20 min, 20°C), le plasma est récupéré, aliquoté et stocké à -80°C pour les analyses des cytokines et des immunoglobulines. L'anneau de PBMC est prélevé et est lavé deux fois dans 50 mL de PBS-EDTA 2mM (150×g, 10 min, température ambiante). Si nécessaire, une lyse des érythrocytes est réalisée. Pour cela, le culot est incubé 1 minute dans 1 mL de tampon de lyse des erythrocytes (Red Blood Cell Lysing Buffer ; Roche, Boulogne-Billancourt, France). Ensuite, 20 mL de RPMI sont ajoutés et une étape de centrifugation est réalisée (300×g, 5 min, 4°C). Les cellules, environ  $7,5 \times 10^6$ , sont récupérées dans 5mL d'AIM-V + 2% plasma autologue, et conservées dans la glace (<12h) jusqu'aux marquages pour l'analyse, par cytométrie en flux, des lymphocytes T auxiliaire (Th), des cellules lymphoïdes innées (ILC) ainsi que des lymphocytes T régulateurs (Treg) (voir plus loin). Le reste des PBMC est centrifugé (10 min, 500×g, 4°C) puis repris avec 0,5 mL de plasma puis congelé (avec 0,5 ml de plasma + 20% DMSO) pour des restimulations non spécifiques par batch.

## Traitement des brossages nasaux

Un brossage nasal est réalisé, puis immédiatement placés dans du milieu RPMI1640 stérile. Les échantillons sont placés dans la glace, puis transférés aux laboratoires MTS/Micalis.

Après agitation dans le RPMI1640, l'écouvillon est retiré puis le tube est centrifugé (500×g, 5 min, 4°C). Le surnageant est prélevé et divisé en deux aliquots de 1ml pour subir une ultra-centrifugation (16000×g, 4°C, 20 min, Figure 18). Un culot est repris en PBS-glycérol 16 % et l'autre est laissée à sec. Le tout est stocké à -80°C pour l'analyse ultérieure du microbiote (isolement de souches bactériennes et séquençage de l'ARN 16S, respectivement, Figure 18).

En parallèle, le culot cellulaire issu de la première centrifugation, contenant les cellules épithéliales nasales humaines primaires (PhNec), est repris dans 5 mL de milieu d'expansion (StemCell Technologies PneumaCult™-Ex Plus Medium) contenant des antibiotiques (pénicilline G et streptomycine 1%, primocin 100 µg/mL). Les cellules épithéliales sont ensuite transférées dans une flasque T25 (revêtue de PureCol™, Sigma-Aldrich) et incubées (37°C,

5% CO<sub>2</sub>) jusqu'à l'obtention d'un tapis cellulaire confluent à environ 80%. Une fois le tapis cellulaire obtenu, les cellules sont lavées (2 x 4 mL de milieu F12-K, Gibco, ThermoFisher Scientific) détachées puis collectées (incubation 10 min à 37°C dans 2 mL d'Accutase™, Sigma-Aldrich). Les cellules sont ensuite soit réensemencées pour être utilisées dans un modèle cellulaire *in vitro* (présenté plus bas) ou congelées. Pour la congélation, les cellules sont centrifugées (500xg, 5 min, 4°C), et le culot est repris dans 1 mL de milieu F12, avant congélation puis stockage dans du milieu de conservation (2 % 1,5 M HEPES, Sigma, 10 % sérum bovin fœtal, Gibco, 78 % F12-K et 10 % DMSO, Sigma) en azote liquide.

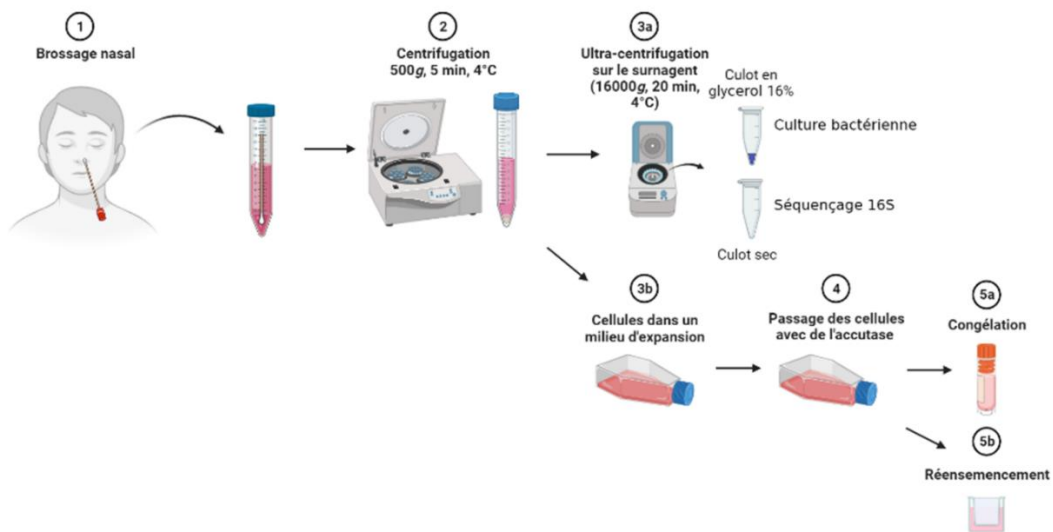


Figure 18 : Traitement de brosse nasale pour l'analyse du microbiote et pour la culture cellulaire. Figure éditée avec Biorender

## Traitement des biopsies

Une biopsie est prélevée lors de la bronchoscopie, et placées directement en RPMI stérile, puis conservée dans la glace.

Une fois réceptionnée au laboratoire (INRAE/Micalis), la biopsie est digérée pendant 30 min à 37°C à l'aide d'une solution de collagénase-dispase (à 1mg/mL en PBS ; Sigma). Après une étape de centrifugation (500xg, 5 min, 4°C), la biopsie est ensuite traitée comme le brosse nasale (Figure 19) : ultracentrifugation du surnageant puis culot laissé à sec ou repris en PBS-glycérol 16% pour l'analyse du microbiote, tandis que le culot cellulaire issu de la première centrifugation (cellules épithéliales bronchiques humaines primaires, PhBec) est mis en culture, collecté puis congelé.

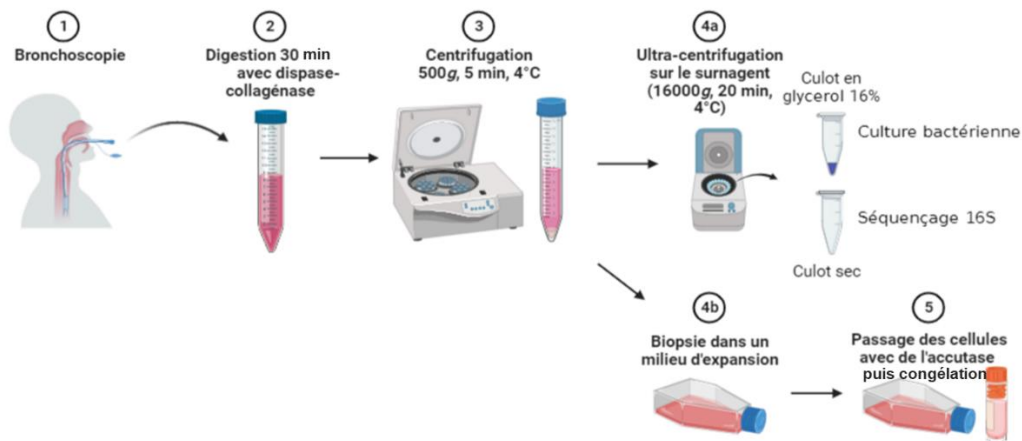


Figure 19 : Traitement des biopsies pour analyse du microbiote et pour la culture cellulaire.  
Figure éditée avec Biorender

### Traitement des lavages bronchoalvéolaires

Les LBA sont collectés après injection de 5 mL/ kg de poids corporel de sérum physiologique stérile préalablement chauffé à 37°C, sous bronchoscopie. Après collecte, les LBA sont placés dans la glace. Les LBA subissent des étapes successives de centrifugations dès leur arrivée dans le laboratoire MTS/LIAA (Figure 20). A la suite d'une première centrifugation (400xg, 10 min, 4°C), le culot cellulaire est repris en AIM-V + 2% plasma autologue, pour l'analyse des sous-populations cellulaires par cytométrie en flux. Le surnageant est collecté et réparti en deux tubes : i) une partie sera aliquotée et stockée à -80°C, pour les analyses de métabolomique, et celles des concentrations en Ig et en cytokines ; ii) la seconde partie (2 x 1.8 mL) subira une ultracentrifugation (16000xg, 4°C, 20 min). Les culots issus de cette dernière étape sont soit laissés à sec, soit repris en PBS-glycérol 16% puis stockés à -80°C pour l'analyse du microbiote (respectivement pour le séquençage de l'ARN 16S et l'isolement de souches bactériennes).

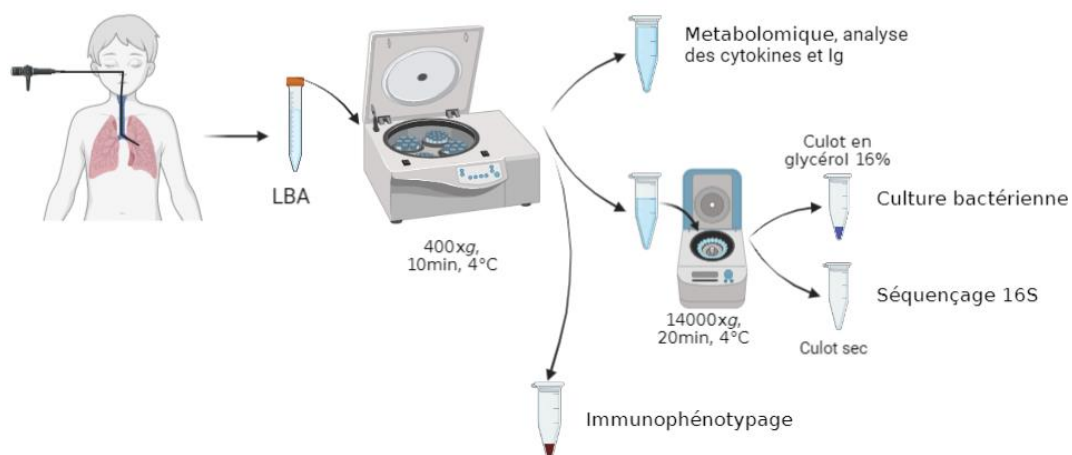


Figure 20 : Traitement des lavages bronchoalvéolaires (LBA) pour analyse métabolomique, du système immunitaire et du microbiote.  
Figure éditée avec Biorender



Partie 1 : Etude multi-omique sur les échantillons de la  
cohorte CLASSE

# Chapitre 1 : Mise en place d'une méthodologie pour l'analyse métabolomique des lavages bronchoalvéolaires

## Mise au point du protocole de préparation des LBA

### Contexte

Réalisé au cours d'une bronchoscopie, le lavage bronchoalvéolaire (LBA), est une méthode d'aide au diagnostic, consistant à injecter par le fibroscope un liquide physiologique porté à 37°C dans les bronches et les alvéoles pulmonaires.

Le LBA est une matrice pauvre puisque les métabolites sont dilués dans une grande quantité de sérum physiologique. De plus, cette matrice n'est pas habituellement étudiée au laboratoire. La première étape a donc été de mettre au point une méthodologie pour l'analyse de cette dernière par des approches de métabolomique. A noter que pour l'annotation finale des métabolites, une base de données interne au laboratoire est utilisée. Cette base de données a été réalisée à partir de standards qui ont été préparés dans des conditions spécifiques : les conditions d'extraction et de préparation des échantillons doivent donc rester similaires à celles des standards.

L'unique contrainte à prendre en compte, lors de la mise au point du protocole d'extraction et de préparation des échantillons, est donc de ne pas s'éloigner du protocole de préparation des standards en termes de solvants utilisés et de proportions.

### Matériels et méthodes

#### a) Protocole de préparation des échantillons sans optimisation préalable

Avant de commencer toute mise au point, nous avons voulu évaluer la pertinence des résultats obtenus en suivant les protocoles d'extraction et de préparation habituellement utilisés au laboratoire sur des matrices comme sérum ou les urines<sup>150</sup>. Pour cela, nous avons utilisé un mélange de quatre LBA de patients qui avait été exclus de l'étude pour des incertitudes diagnostiques.

#### **Extraction des métabolites**

L'extraction des métabolites a été réalisée par précipitation des protéines : 400 µL de méthanol froid ont été ajoutés à 100 µL du pool de LBA<sup>150</sup>. Après une étape de sonication de 15 minutes et une incubation de 90 min sur glace pour précipiter les protéines, les échantillons ont été centrifugés (15 min, 20000xg, 4°C) et le surnageant, contenant les métabolites, a été collecté. Des échantillons de contrôle qualité (QC) ont été préparés en regroupant des volumes

équivalents des différents échantillons (lyophilisé, ou concentré sous-vide, cf. ci-dessous). Enfin, tous les échantillons et les QC ont été séchés sous azote (RotorVap LV-Biotage, 30°C, 5 bars) puis stockés à -80°C.

Par la suite, les échantillons ont été préparés pour l'analyse en spectrométrie de masse couplé à la chromatographie en phase liquide (LC-MS). Deux conditions complémentaires de séparation et d'ionisation ont été réalisées, permettant d'avoir une couverture large en terme de métabolites : une chromatographie liquide sur colonne C18 (conservation des composés polaires) puis une analyse par spectrométrie de masse après une ionisation positive (C18-ESI<sup>+</sup>), et une chromatographie liquide sur colonne HILIC (séparation des composés contenant des groupes fonctionnels hydrophiles) puis une analyse en ionisation négative (HILIC-ESI<sup>-</sup>).

### **Préparation des échantillons**

Pour le passage sur colonne C18, les culots secs ont été repris dans un volume de tampon, contenant 95% d'eau et 5% d'acétonitrile (ACN, Biosolve, Dieuze, France) contenant tous les deux 0.1% d'acide formique (FisherScientific). Le volume de reprise était équivalent à trois fois le volume de l'échantillon de départ.

Pour le passage sur colonne HILIC, les culots secs ont été repris dans un volume de tampon, contenant 40% de carbonate d'ammonium (10 mM, pH 10.5 ; Sigma) et 60% d'ACN, équivalent à trois fois le volume de l'échantillon de départ. La reprise s'est faite en deux étapes, d'abord en carbonate d'ammonium puis en ACN, avec une étape de sonication et de centrifugation (15 min, 20000xg, 4°C).

Pour chaque condition, des tubes de blancs, contenant le tampon de reprise (soit eau/ACN, soit carbonate d'ammonium/ACN) ainsi que des tubes de QC dilués (au 1/2, 1/4 et 1/8, avec le tampon de reprise), ont été préparés. Enfin, 10 µL d'étalons (Annexe 1) ont été ajoutés dans tous les échantillons, les QC et les QC dilués.

### **Protocole d'acquisition**

Les échantillons ainsi préparés ont été analysés grâce à un système Ultimate 300 pour la chromatographie en phase liquide, puis par un spectromètre de masse haute résolution QExactive (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France). Deux conditions analytiques ont été réalisées : C18 en ionisation par électronébuliseur positive (ESI<sup>+</sup>) et HILIC-ESI<sup>-</sup>.

Condition analytique C18-ESI<sup>+</sup> : La colonne C18 est une colonne Hypersil gold (1,9 µm, 150 mm x 2,1 mm, porosité : 175 Å, à 30°C ; Thermo Scientific). Les phases mobiles étaient de 100 % d'eau ultrapure (Honeywell, Saint-Germain-en-Laye, France) en A et 100 % d'ACN en B, tous deux contenant 0,1 % d'acide formique. L'élution chromatographique a été réalisée



étape isocratique de 2 min à 5% de phase B, suivie d'un gradient linéaire de 5% à 100% de phase B pendant les 11 min suivantes. Ces proportions ont été maintenues constantes pendant 12,5 min avant de revenir à 5 % de B pendant 4,5 min. L'effluent de la colonne a été introduit directement dans la source d'électronébulisation du spectromètre de masse et les analyses ont été effectuées en mode d'ionisation positif.

Les paramètres de la source étaient les suivants : température d'évaporation des gouttelettes, 280 °C ; tension capillaire, 5 kV ; pression du gaz gaine et pression du gaz auxiliaire, respectivement à 60 et 10 unités arbitraires avec de l'azote gazeux ; puissance de résolution de masse, 50000 m/ $\Delta$ m ; pleine largeur à mi-hauteur (FWHM) à m/z 200, pour les ions à charge unique ; détection de m/z 85 à 1000.

Condition analytique HILIC-ESI : Pour la séparation sur colonne HILIC (Zic-pHILIC, l : 150 mm, D : 2,1 mm, granulométrie : 5  $\mu$ m ; Merck), la phase mobile A consistait en un tampon aqueux de 10 mM de carbonate d'ammonium dans de l'eau ultrapure avec de l'hydroxyde d'ammonium pour ajuster la basicité à pH 10,5, et une phase mobile B de 100 % d'ACN. L'élution chromatographique a été réalisée avec un débit de 200  $\mu$ L/min. Après injection de 10  $\mu$ L d'échantillon, l'élution a débuté par une étape isocratique de 2 min à 80% de B, suivie d'un gradient linéaire de 80% à 40% de phase B de 2 à 12 min. Le système chromatographique a ensuite été rincé pendant 5 min à 0 % de B, et l'essai s'est terminé par une étape d'équilibrage de 15 min. L'effluent de la colonne a été introduit directement dans la source d'électronébulisation du spectromètre de masse, et les analyses ont été effectuées en mode d'ionisation négatif.

Les paramètres de la source étaient les suivants : température d'évaporation des gouttelettes, 280 °C ; tension capillaire, -3 kV ; pression du gaz gaine et pression du gaz auxiliaire, respectivement à 60 et 10 unités arbitraires avec de l'azote gazeux ; puissance de résolution de masse, 50000 m/ $\Delta$ m ; pleine largeur à mi-hauteur (FWHM) à m/z 200, pour les ions à charge unique ; détection de m/z 85 à 1000.

Les échantillons ont suivi une séquence bien définie contenant les échantillons répartis de manière aléatoire et des blancs (en début et en fin de séquence). Cette séquence contient aussi une série de contrôle qualité (QC), correspondant à un pool de tous les échantillons, disposés tous les 8 échantillons et des QC dilués en début de séquence. Ces derniers permettent de suivre le déroulé de la séquence au cours du temps et d'ainsi palier aux problèmes de perte de pression notamment.

## Traitement des données

L'interface logicielle utilisée était Xcalibur (version 2.1) (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Les fichiers de données brutes (.raw) obtenus ont été convertis à l'aide du logiciel MSConvert (ProteoWizard). Le prélèvement, l'alignement et l'intégration des pics ont été réalisés à l'aide du logiciel XCMS sur la plateforme Workflow4Metabolomics (W4M, <https://workflow4metabolomics.usegalaxy.fr/>). Deux tableaux ont été générés pour chacune des deux conditions chromatographiques : une matrice de données contenant toutes les intensités de toutes les variables dans chacun des échantillons, et un tableau de métadonnées contenant les temps de rétention (rt) et les masses exactes pour chaque variable. Le tri des variables ainsi que la vérifications des métriques ont été réalisés à l'aide du package R « phenomis » (version 1.0.2)<sup>151</sup>. Les variables générées à partir du workflow XCMS ont été filtrées selon les critères suivants : (i) une corrélation supérieure à 0,7 entre les facteurs de dilution des QC et les aires des pics chromatographiques, (ii) un coefficient de variation (CV) des aires des pics chromatographiques des QC inférieur à 30 %, et (iii) un rapport des aires des pics chromatographiques des échantillons biologiques par rapport à celles des blancs analytiques supérieur à 3. Les intensités ont été corrigées pour la dérive du signal en ajustant un modèle de régression localement quadratique (Loess) aux valeurs des QC.

L'annotation des métabolites a été effectuée en acceptant une tolérance de masse de  $\pm 10$  ppm et en utilisant une base de données spectrale interne<sup>150,152</sup>. La base de données interne du laboratoire a été établie avec l'analyse de plus de 1200 standards de métabolites d'intérêt analysés selon différentes conditions chromatographiques, répertoriant ainsi les différents temps de rétention et rapports m/z selon les différentes colonnes ainsi que les spectres MS/MS. Les annotations n'ont pas été vérifiées par MS/MS pour les différentes mises au point.

### b) Choix de la méthode de concentration des LBA

Par la suite, nous avons voulu optimiser le protocole de préparation des échantillons, pour obtenir un plus grand nombre de métabolites. Pour ne pas s'éloigner du protocole précédent, nous avons voulu optimiser la préparation des échantillons en amont de l'extraction. Puisque le LBA est une matrice pauvre, nous avons testé l'effet d'une concentration sur le nombre et l'intensités des métabolites obtenus après analyse. Pour cela, nous nous sommes intéressés à deux types de procédés : la concentration par lyophilisation (CHRIST Alpha 1-2 LD plus) pendant 24h, et la concentration sous-vide (Concentrator plus, Eppendorf) pendant 1h ou 3h en fonction du volume d'échantillon initial : 100  $\mu$ L, 500  $\mu$ L ou 1000  $\mu$ L (Figure 21). Pour réaliser cette première optimisation, nous avons utilisé le même mélange de LBA que précédemment. Après concentration, les culots secs ont tous été repris dans 100  $\mu$ L d'eau

pure. La suite du protocole (extraction et préparation) est identique à celui présenté plus haut. Les échantillons préparés ont ensuite été analysés comme précédemment. Des analyses XCMS indépendantes ont été réalisés pour chaque conditions de concentration et pour chaque volume. Dans un premier temps, les résultats ont été comparés entre procédés de concentration et LBA non concentré pour le même volume de départ (100 $\mu$ L).

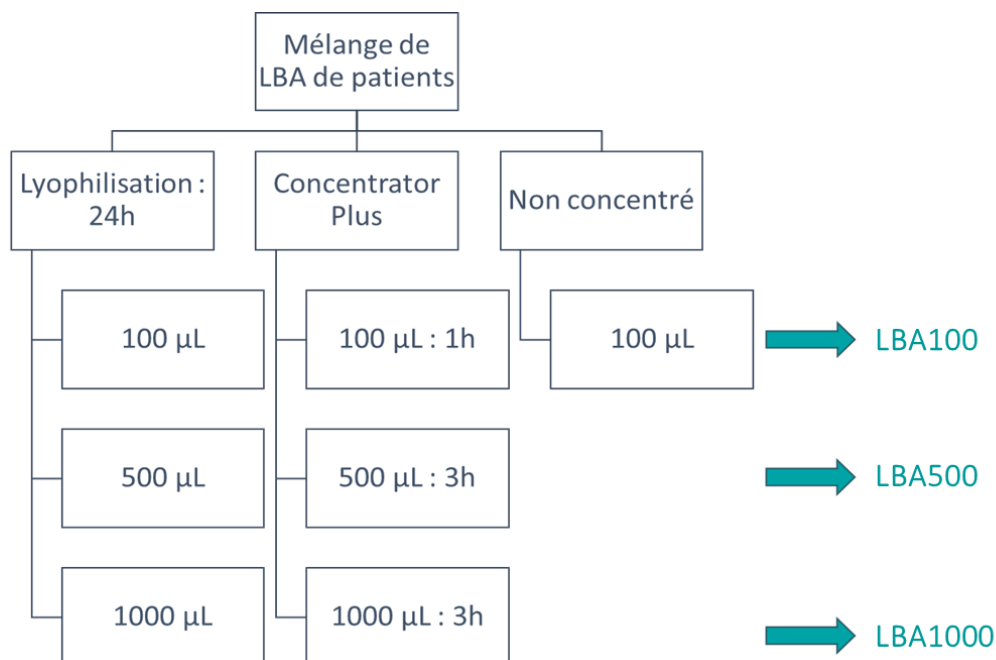


Figure 21 : Processus de mise au point de la préparation des lavages bronchoalvéolaires (LBA) par séchage sous-vide ou lyophilisation en amont de leur passage en LC-MS.

#### c) Sélection du volume initial d'échantillon à concentrer

Une fois le choix arrêté sur la méthode de concentration et le type de traitement, nous nous sommes intéressés au choix du volume initial à concentrer. Nous avons donc comparé les chromatogrammes, obtenus dans le logiciel TraceFinder™ (Thermo Fisher Scientific) pour un volume initial de 100 $\mu$ L, 500 $\mu$ L ou 1000  $\mu$ L, pour les deux conditions d'acquisition. Pour finir, nous avons réalisé le même type d'analyse sur trois nouveaux volume (250, 500 et 1 000  $\mu$ L) uniquement concentrés au Concentrator plus. Pour cela, nous avons utilisés les LBA de 6 patients (exclus de la cohorte) pris de façon individuelle. Nous avons regardé le nombre de métabolites commun entre les différents volumes d'échantillons, en prenant en compte un delta de 10 ppm pour le rapport masse sur charge ( $m/z$ ) et un décalage de temps de rétention ( $rt$ ) de 0.25 ou 1.5 minutes respectivement pour les conditions C18-ESI<sup>+</sup> et HILIC-ESI<sup>-</sup>.

#### d) Etude de différents traitements pour améliorer le signal en ionisation négative

Pour essayer d'améliorer le chromatogramme obtenu en condition HILIC-ESI<sup>-</sup>, nous avons essayé différents traitements seuls ou de manière combinée (Figure 22). Pour chaque traitement, nous avons réalisé un contrôle sans traitement. Cette analyse a été réalisée sur un nouveau pool de LBA de patients non inclus (différent du précédent). Ainsi, nous avons soit

ajouté 0.1 % de  $\beta$ -octyl-glucoside (Thermo Scientific), détergent non ionique de faible poids moléculaire, soit réalisé une étape de filtration sur membrane de porosité 0,22  $\mu\text{m}$  (Millex-GP, 0,22  $\mu\text{m}$ , polyéthersulfone, 33 mm, Merck), soit récupéré le LBA après une étape de filtration par centrifugation sur une membrane présentant un seuil de rétention des molécules de 3KDa (« cut-off 3KDa » ; Amicon Ultra-15, PLBC, membrane Ultracel-PL, 3 kD, Millipore). Pour trouver le traitement optimal, nous avons aussi regardé l'effet d'une combinaison de chaque traitement (Figure 22).

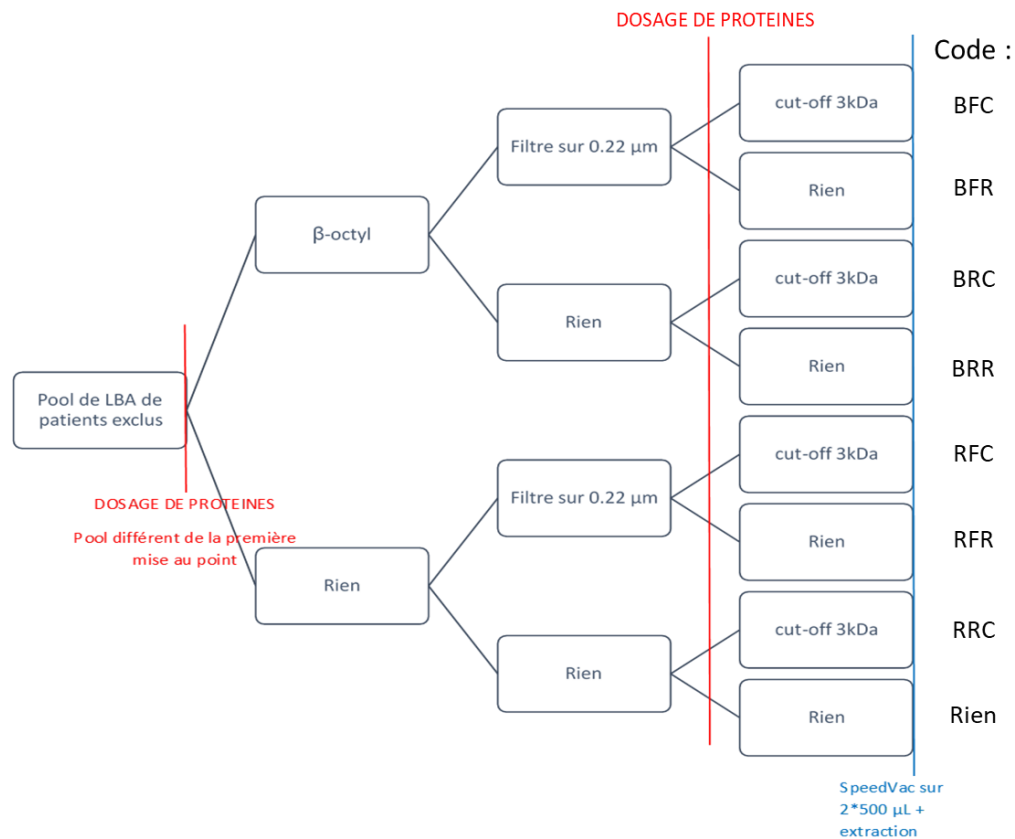


Figure 22 : Protocole de traitement d'un pool de lavage bronchoalvéolaire (LBA) pour le choix d'un traitement permettant d'améliorer le signal obtenu en LC-MS en condition analytique HILIC-ESI. Code : B = ajout de  $\beta$ -octyl-glucoside ; F = filtre 0,22  $\mu\text{m}$  ; C = cut-off à 3 kDa ; R = pas de traitement.

Un dosage de la concentration protéique totale a été réalisé à l'aide d'un kit commercial (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientifique) avant tout traitement puis avant de réaliser l'étape de séparation sur membrane (3 kDa). A la suite des différents traitements, les échantillons ont été séchés sous-vide puis repris dans 100  $\mu\text{L}$  d'eau pure. Par la suite, le protocole d'extraction et de préparation a été identique à celui présenté précédemment. Deux répliques expérimentaux pour chaque traitement ainsi que deux répliques analytiques ont été ajoutés.

## Résultats

### a) Nombre et intensités des variables obtenues en LC-MS sur les LBA non traités

Dans les conditions classiques d'extraction et de préparation des échantillons, optimisées sur du plasma, nous avons extrait 6915 variables dans le fichier brut, puis obtenu 1430 variables après application de nos filtres en conditions HILIC-ESI<sup>-</sup>. En conditions C18-ESI<sup>+</sup>, 13738 variables ont été extraites, mais nous en avons obtenu seulement 671 après filtres. Les intensités des variables obtenues après filtre variaient de 69954,91 à  $1,47 \times 10^8$  en C18-ESI<sup>+</sup>, et de 691,57 à  $8,39 \times 10^8$  en HILIC-ESI<sup>-</sup>. Au regard des matrices préalablement analysées sur la plateforme, dans des conditions d'extraction et d'acquisition équivalentes, le nombre de variables obtenues était faible, surtout en conditions C18-ESI<sup>+</sup>. Par exemple l'étude de Roux et al.,<sup>152</sup> réalisée au laboratoire, a conduit à l'annotation de 825 métabolites dans les urines humaines en condition C18-ESI<sup>+</sup>. Le LBA apparaît donc comme une matrice relativement pauvre en métabolites, pour laquelle il a été nécessaire d'optimiser le protocole de préparation des échantillons en amont du passage en LC-MS.

### b) Test de concentration des LBA par évaporation ou lyophilisation en amont de la LC-MS

Pour observer l'effet du procédé de concentration sur le nombre et l'intensité des métabolites détectables dans les LBA, un volume initial de 500 µL d'un mélange de LBA issus de 4 patients (exclus de l'étude) a été concentré soit par lyophilisation, soit par séchage sous vide, puis analysé par LC-HRMS après reprise dans un même volume (100µl, soit une concentration de 5 fois). Trois répliques analytiques ont été réalisés.

Pour choisir la méthode de séchage des échantillons, nous avons regardé le nombre de variables issues des deux méthodes de concentration, ainsi que leur intensité. En condition d'analyse C18-ESI<sup>+</sup>, le nombre de variables extraites était respectivement de 13699 et 13775 pour le pool de LBA lyophilisé et séché sous-vide. Après tris, nous avons obtenu 865 et 862 métabolites (dont 47 et 45 annotés, respectivement) pour ces deux conditions de concentration. Parmi les métabolites annotés, 44 sont communs aux deux conditions. Les trois métabolites trouvés uniquement dans le pool de LBA lyophilisé sont la proline, la glutamine et le 5-hydroxy-L-tryptophan. Le métabolite trouvé uniquement dans le pool LBA séché sous-vide est le furane-2,5-acide dicarboxylique. En condition analytique HILIC-ESI<sup>-</sup>, le nombre de variables extraites pour le pool de LBA lyophilisé était de 6980. Après application des filtres, nous avons obtenu 1560 variables dont 151 annotées. Pour le pool de LBA séché sous-vide, nous avons obtenu 6973 variables totales, 1570 après filtres dont 151 ont pu être annotées. Sur l'ensemble des métabolites annotés, nous avons obtenu 131 métabolites communs aux deux conditions de préparation des LBA.

Nous n'avons observé aucune différence significative de l'intensité globale des métabolites annotés selon le mode de concentration du LBA, quel que soit le mode analytique utilisé (Tableau 6).

Tableau 6 : Valeurs minimale, maximale, moyenne et écart-type de l'ensemble des métabolites annotés communs aux deux types de concentration.

	Type	min	max	moy	std
C18-ESI <sup>+</sup>	Lyophilisation	21825,58	4,50x10 <sup>8</sup>	2,22x10 <sup>7</sup>	70521777
	Sous-vide	11694,70	4,43x10 <sup>8</sup>	2,26x10 <sup>7</sup>	70476769
HILIC-ESI <sup>-</sup>	Lyophilisation	15226,43	4,34x10 <sup>8</sup>	1,85x10 <sup>7</sup>	55412272
	Sous-vide	25516,44	4,48x10 <sup>8</sup>	1,88x10 <sup>7</sup>	57394411

Globalement, les intensités de la majorité des métabolites annotés n'étaient pas significativement différentes entre les deux méthodes de concentration, et ce quel que soit la condition d'analyse en LC-MS. Cependant, les intensités de 17 métabolites en condition analytique C18-ESI<sup>+</sup>, et de 65 métabolites en condition HILIC-ESI<sup>-</sup> ont été trouvées significativement différentes dans le pool de LBA lyophilisé par rapport au pool de LBA concentré sous-vide : parmi ces métabolites ont été trouvés l'uracile, l'acide méthyl-imidazole acétique, la nicotinamide et l'acide tiglique, (Figure 23). Ces différences d'intensités ne vont pas toujours dans le même sens. En effet, selon le métabolite considéré, l'intensité est soit plus forte pour la lyophilisation pour 18% des métabolites en C18-ESI<sup>+</sup> et 20% en HILIC-ESI<sup>-</sup>, soit plus forte pour la concentration sous-vide pour 20% des métabolites en C18-ESI<sup>+</sup> et 30% en HILIC-ESI<sup>-</sup>.

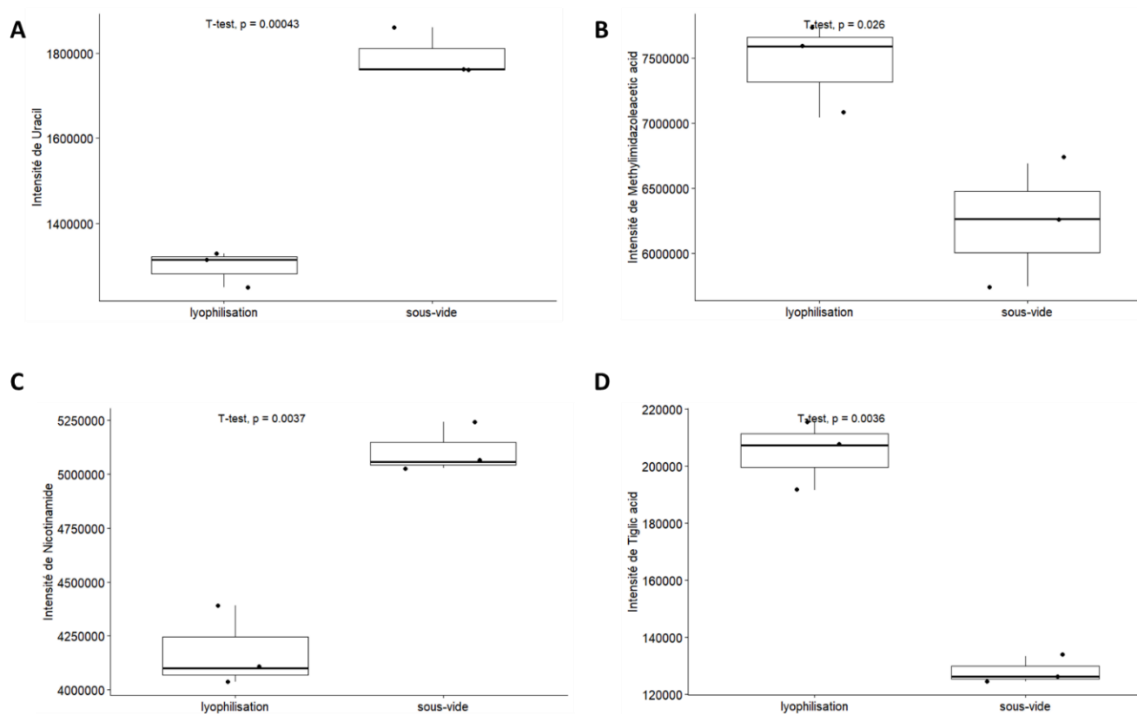


Figure 23 : Intensités de l'uracile (A) et de l'acide méthyl-imidazole acétique (B) obtenues lors de l'analyse de 500  $\mu$ L d'un pool de LBA séché sous-vide ou lyophilisé, en condition C18-ESI<sup>+</sup>. Intensités du nicotinamide (C) et de l'acide tiglique (D) mesurées sur ces mêmes échantillons en condition HILIC-ESI<sup>-</sup>.

Les résultats sont présentés sous forme de boîte à moustache (boxplot, 2,5 et 97,5 percentiles sont utilisés comme limites de confiance inférieure et supérieure, respectivement),  $p$  = obtenu par test  $t$  de Student.

Globalement, les résultats obtenus par lyophilisation ou séchage sous-vide sont néanmoins comparables. Nous avons donc décidé de concentrer les échantillons de LBA en utilisant le séchage sous-vide.

#### a) Optimisation du volume de LBA à concentrer

Après le choix de la méthode de séchage, nous avons cherché à optimiser le volume initial d'échantillon à concentrer. Pour cela, nous avons d'abord comparé les différents chromatogrammes obtenus pour trois volumes de départ (100 $\mu$ L, 500 $\mu$ L et 1000 $\mu$ L) en conditions d'acquisition C18-ESI<sup>+</sup> et HILIC-ESI<sup>-</sup>.

En HILIC-ESI<sup>-</sup> (Figure 24A), nous pouvons observer sur les chromatogrammes un décalage progressif du temps de rétention (rt) avec l'augmentation du volume de départ, ainsi que l'apparition d'un pic de plus en plus étalé entre 12 et 18 minutes de temps de rétention. Inversement, les chromatogrammes obtenus en condition analytique C18-ESI<sup>+</sup> ne présentaient pas de différences majeures selon le volume initial de LBA considéré (Figure 24B). Ainsi, les résultats en conditions C18-ESI<sup>+</sup> semblent satisfaisants pour tous les volumes d'échantillons de départ considérés. Cependant, nous pouvons observer un probable encrassement de la source au fur et à mesure de la concentration de l'échantillon, qui serait

dû au NaCl présent dans les échantillons de LBA. A ce stade, nous n'avons pas pu sélectionner un volume optimal à concentrer.

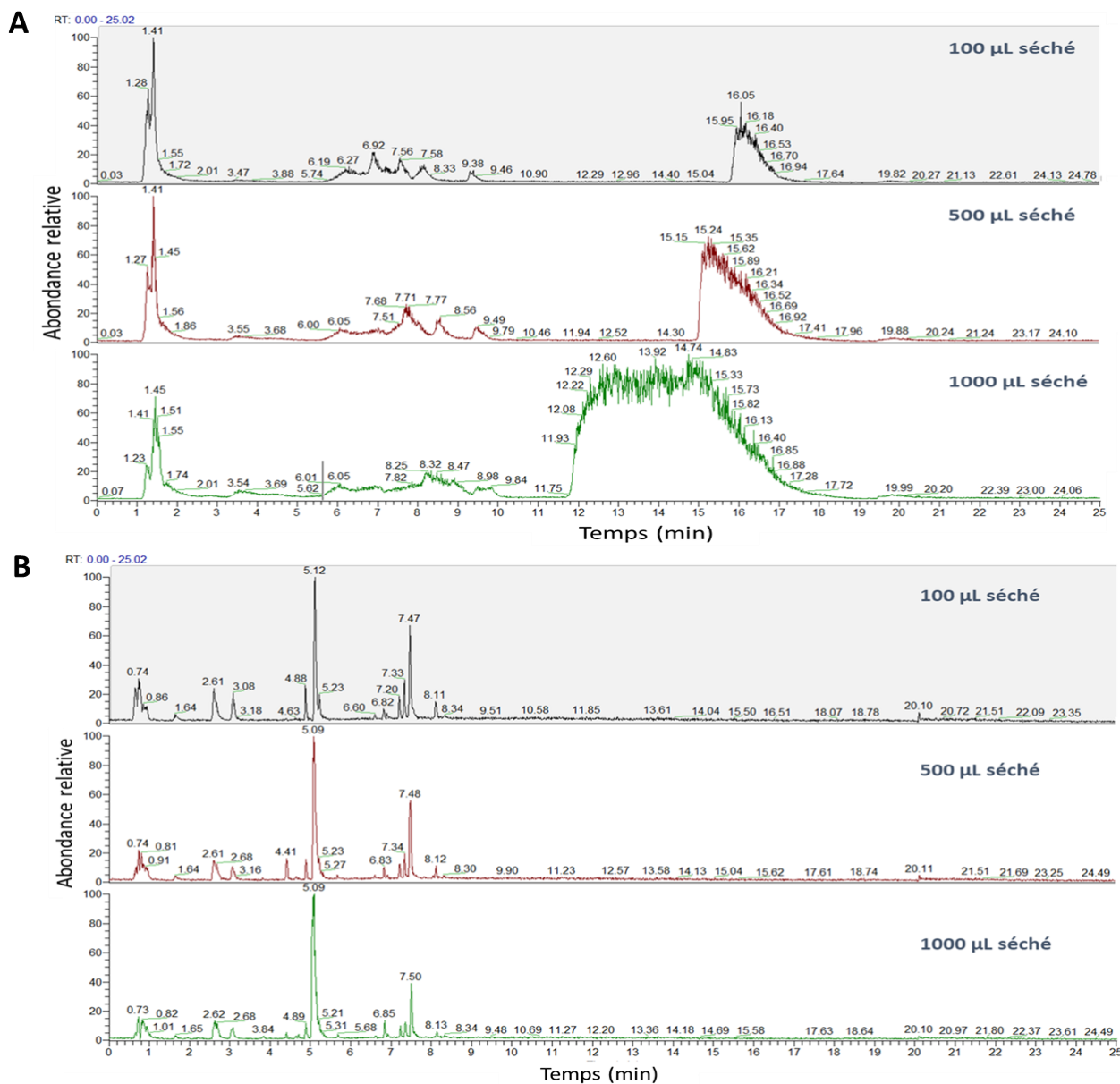


Figure 24 : Chromatogrammes pour les analyses en conditions **A.** HILIC-ESI<sup>+</sup> et **B.** C18-ESI<sup>+</sup> pour les trois volumes de pool de LBA de patients (100, 500 et 1 000 µL) concentrés par séchage sous-vide.

### b) Etude de traitement supplémentaire

Pour essayer d'éliminer ou de diminuer les pics observés entre 12 et 18 minutes de temps de rétention en condition d'acquisition HILIC-ESI<sup>+</sup>, masquant potentiellement de nombreux autres métabolites, nous avons testé différents traitements de l'échantillon en amont de l'analyse par LC/MS (Figure 22). Ces mises au point ont été réalisées sur un nouveau pool de LBA, car les volumes encore disponibles n'étaient malheureusement pas suffisants pour pouvoir utiliser le même pool. Le volume de LBA séché sous vide était de 500 µL et les analyses ont été réalisées dans les deux modes d'acquisition.



Tout d'abord, nous n'avons pas observé de différence de concentrations en protéines totales entre les deux pools de LBA utilisés pour les mises au point, ni entre les différents traitements testés. La concentration moyenne des protéines totales était de 0.156 mg/mL quel que soit l'échantillon (non montré).

En condition d'acquisition HILIC-ESI<sup>-</sup>, seule la centrifugation sur une membrane présentant un seuil de rétention des molécules de 3KDa (« cut-off 3KDa ») ou l'ajout de  $\beta$ -octyl-glucoside permettaient de diminuer l'intensité du pic observé entre 12-18 min de temps de rétention (Figure 25A). Cependant le prétraitement « cut-off 3 kDa », a permis de diminuer significativement l'intensité du premier pic à 1.53 min, tandis qu'un pic diffus est apparu entre 3.9 et 6.8 min de temps de rétention. L'ajout de  $\beta$ -octyl-glucoside de son côté a conduit à la disparition ou à la forte baisse de l'intensité de nombreux pics entre 7 et 10 minutes de temps de rétention. En condition d'acquisition C18-ESI<sup>+</sup>, aucune différence n'a pu être observée sur les chromatogrammes obtenus sur les échantillons ayant subis les différents traitements (Figure 25B).

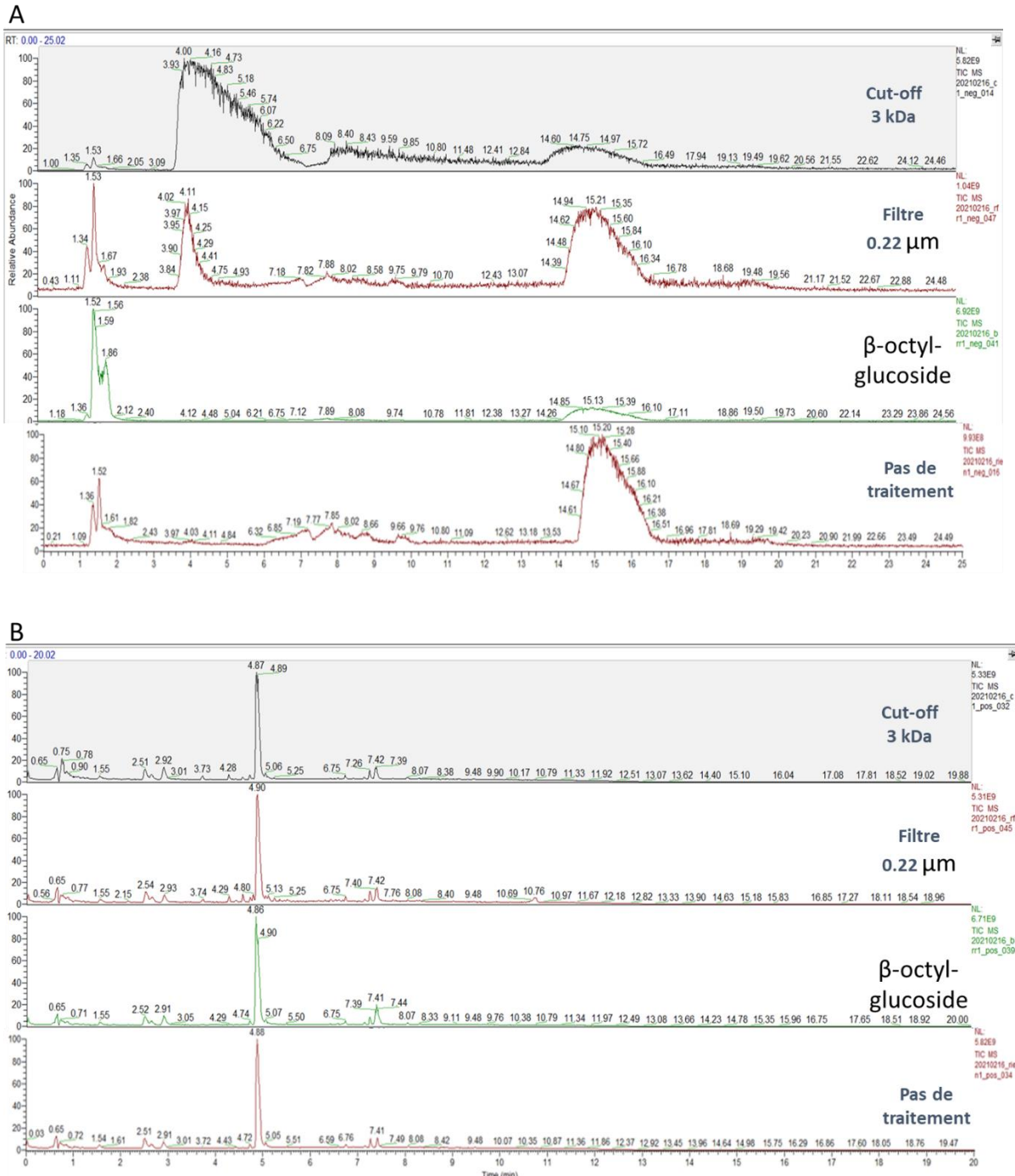


Figure 25 : Chromatogrammes obtenus **A.** en condition HILIC-ESI<sup>-</sup> et **B.** en condition C18-ESI<sup>+</sup> en pour visualiser l'effet des différents traitements (cut-off à 3 kDa, filtre à 0,22 µm et ajout de β-octyl-glucoside) pris de manière individuelle (temps en minutes).

Concernant le nombre de variables obtenues, en condition d'acquisition C18-ESI<sup>+</sup>, le nombre de variables extraites et de variables après tris était plus élevé dans le pool de LBA filtré sur 0,22 µm, qu'il y ait ajout de β-octyl-glucoside ou non (Tableau 7A). Cependant, le nombre de métabolites annotés était identique peu importe le traitement testé. En condition HILIC-ESI<sup>-</sup>, le nombre total de variables était plus élevé dans le pool de LBA additionné de β-octyl-glucoside, ce traitement étant considéré seul ou suivi d'une étape de filtration sur 0,22µm

(Tableau 7B). Cette observation a été confirmée pour le nombre de variables obtenues après tris et le nombre de variables annotées

Tableau 7 : Nombres de variables totales et après le tri et nombre de métabolites annotés **A.** en condition C18-ESI<sup>+</sup> et **B.** en condition HILIC-ESI<sup>-</sup>.

Code : B = ajout de  $\beta$ -octyl-glucoside ; F = filtre 0,22  $\mu$ m ; C = cut-off à 3 kDa ; R = pas de traitement.

A

	BFR :	BFC :	BRC :	BRR :	RFC :	RFR :	RRC :	Rien :
Variables totales	12628	10844	9932	9878	9732	12280	9612	9191
Après tris	7226	5828	4256	3450	3711	6920	4333	2574
Annotées	45	47	46	42	44	44	44	43

B

	BFR :	BFC :	BRC :	BRR :	RFC :	RFR :	RRC :	Rien :
Variables totales	4199	3171	3144	4496	3361	3968	3191	3428
Après tris	2079	1644	1512	2135	1633	1839	1442	1587
Annotées	156	54	109	157	123	137	123	123

En condition C18-ESI<sup>+</sup> et en condition HILIC-ESI<sup>-</sup>, 32 (environ 74 % des annotés) et 79 (environ 59 % des annotés) métabolites annotés, respectivement, ont été trouvés en communs pour chaque traitement pris de manière indépendante ( $\beta$ -octyl-glucoside, filtre ou cut-off) et dans le pool de LBA n'ayant pas subi de traitement. De plus, la différence d'intensité de ces métabolites communs dans chaque condition est assez faible (non montré).

Comme nous pouvons le voir, le gain apporté par les différents traitements est assez faible, pour un temps de préparation et des manipulations supplémentaires sur nos échantillons. Nous avons donc décidé de ne pas ajouter de traitement supplémentaire à nos échantillons pour limiter tout biais analytique.

### c) Volume final de LBA à concentrer

Il était donc nécessaire de trouver un compromis entre le nombre de métabolites obtenus et l'encrassement de la source d'ionisation du spectromètre de masse. Une dernière mise au point a donc été réalisée en prenant en compte tous ces paramètres pour trouver le meilleur volume d'échantillon à concentrer et le traitement à lui appliquer. Au vu des résultats précédemment obtenus, nous avons testé des nouveaux volumes à concentrer : 250  $\mu$ L, 500  $\mu$ L et 1000  $\mu$ L.

Les résultats obtenus sont présentés dans les diagrammes de Venn sur la Figure 26. Le nombre total de variables extraites était plus élevé pour un volume de départ de LBA de 1000  $\mu$ L en condition C18-ESI<sup>+</sup> (Figure 26A), alors qu'en condition HILIC-ESI<sup>-</sup> (Figure 26C), il était plus élevé pour un volume de 500  $\mu$ L. Dans les deux conditions d'acquisition, un volume initial de 250  $\mu$ L résultait en un moindre nombre de variables extraites.

Le nombre de métabolites annotés en condition C18-ESI<sup>+</sup> était assez faible et équivalent peu importe le volume initial considéré (Figure 26B). En condition d'analyse HILIC-ESI<sup>-</sup>, le nombre de métabolites annotés est également plus important en considérant un volume de LBA initial de 500 µL (Figure 26D).

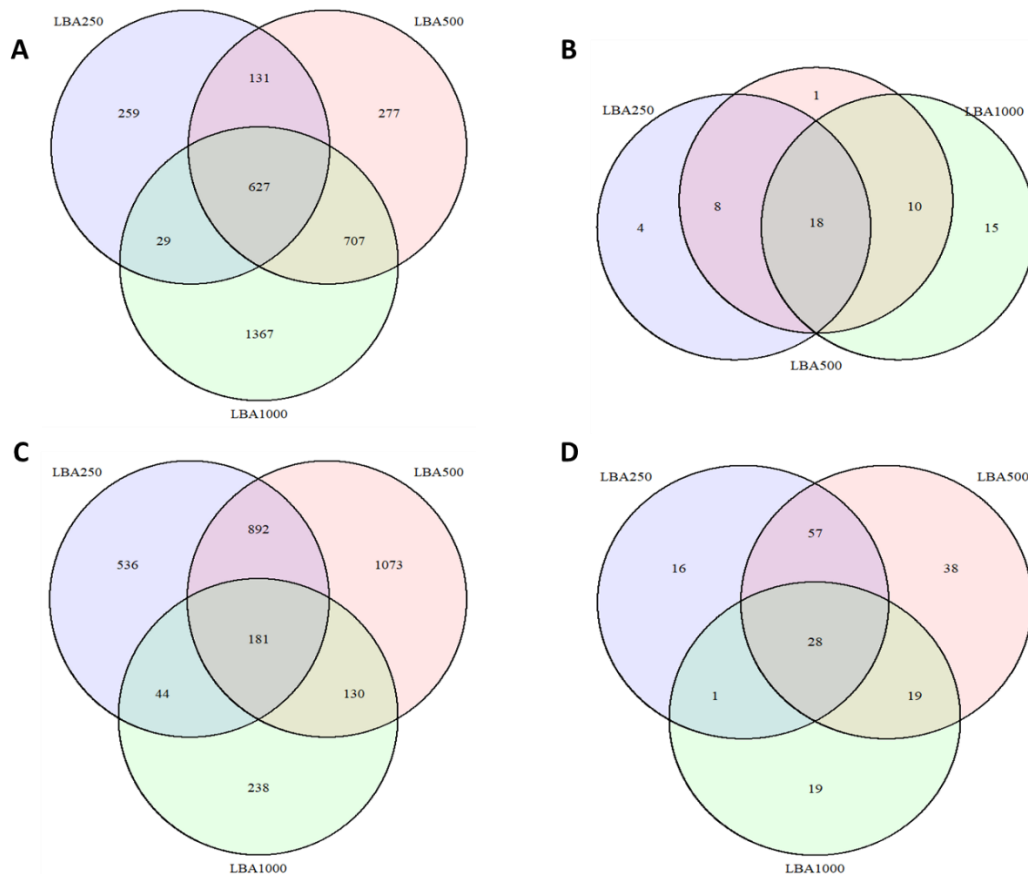


Figure 26 : Diagrammes de Venn du nombre de variables extraites (A) et de métabolites annotés (B) en condition C18-ESI<sup>+</sup>, pour les différents volumes séchés sous vide (250, 500 et 1000 µL) ainsi que le nombre de variables extraites (C) et métabolites annotés (D) en condition d'analyse HILIC-ESI<sup>-</sup>. LBA : Lavage bronchoalvéolaires.

Des volumes initiaux de 500 µL ou 1000 µL de LBA semblaient comparables pour le nombre et l'intensité des variables obtenues alors qu'un volume de 250 µL résultait en un moins grand nombre de métabolites. Ainsi, nous avons opté pour un volume d'échantillon à sécher de 500 µL.

## Conclusion

Tout d'abord, les résultats obtenus sur des échantillons de LBA concentrés par séchage sous-vide ou par lyophilisation sont comparables, mais le séchage sous-vide reste une méthode plus rapide et plus facile à mettre en œuvre. Nous avons donc décidé de concentrer les échantillons de LBA individuels de nos patients en utilisant le séchage sous-vide.

Par ailleurs, des volumes initiaux de 500  $\mu$ L ou 1000  $\mu$ L de LBA semblent comparables pour le nombre et l'intensité des variables obtenues. Disposant d'un volume de LBA parfois limité pour conduire l'ensemble des analyses (notamment chez les enfants de moins de 3 ans), nous avons fixé le volume d'analyse à 500  $\mu$ L.

Une analyse de la littérature suggère que le pic diffus présent en HILIC-ESI<sup>-</sup> entre les temps de rétention de 12 et 16 minutes correspondrait aux anions chlorure et autres sels présents dans le sérum physiologique<sup>153</sup>, liquide utilisé pour réaliser le LBA au moment de la bronchoscopie. Ces composés seraient retenus par la colonne, puis élués sur une large plage de temps de rétention. L'augmentation de la largeur et de l'intensité du pic, observée suite à la concentration de l'échantillon, est en accord avec cette hypothèse. Le pic diffus apparaît après les temps de rétention contenant les métabolites d'intérêt, mais il contribue fortement à un encrassement de la source. Pour diminuer cet encrassement de la source, nous avons testé différents protocoles de préparation des échantillons, avec des résultats encourageants notamment lors de l'ajout de  $\beta$ -octyl-glucoside ou en réalisant des étapes de filtration. Cependant, un nombre relativement faible de variables supplémentaires a été obtenu tandis que des pics ont été perdus ou élargis et des étapes de manipulations supplémentaires en ont résulté (sources d'erreur et consommables de temps, et l'encrassement perdure). Nous avons donc décidé de ne pas appliquer de traitement supplémentaire aux échantillons.

Par ailleurs, il nous est apparu que les échantillons de LBA restaient très hétérogènes, plus ou moins concentrés en fonction des patients, probablement du fait de la méthode de prélèvement. Il semblait donc nécessaire de normaliser les échantillons en amont de leur analyse pour pouvoir comparer les intensités des variables obtenues en métabolomique.

## Normalisation des LBA pour l'analyse métabolomique

### Contexte

La réalisation d'un lavage bronchoalvéolaire (LBA) permet de collecter puis analyser les composants cellulaires et moléculaires présents dans la lumière pulmonaire. La technique de prélèvement utilisée conduit à la récupération partielle de la solution saline instillée, estimée entre 60-70%), solution qui se retrouve plus ou moins mélangée au surfactant et au liquide de surface de l'épithélium (LSE)<sup>154</sup> selon le degré d'homogénéisation au site de prélèvement. La concentration des composants d'intérêts dans le LBA dépend non seulement de leurs concentrations dans le LSE, mais aussi de la dilution de ce fluide dans la solution saline. Il apparaissait donc nécessaire de déterminer un marqueur de la dilution du LSE dans les LBA pour tous les échantillons, en amont de la réalisation des analyses de métabolomique.

Il n'existe pas de méthode pratique permettant de mesurer directement le volume total de LSE dans les poumons. L'utilisation de biomarqueurs endogènes a été évaluée pour mesurer le ratio du LSE dans les LBA et ainsi d'en estimer les concentrations de composants cellulaires et non cellulaires<sup>155-157</sup>. Les marqueurs endogènes de la dilution du LSE doivent être des solutés mesurables, qui ne sont pas dans le sérum physiologique instillé, mais qui sont normalement présents dans le LSE. Idéalement, la concentration du soluté dans le LSE avant le lavage doit être équilibrée avec sa concentration plasmatique ou à une fraction constante connue avec le plasma<sup>158</sup>. Le marqueur endogène ne doit pas non plus être affecté par la maladie elle-même. Ainsi, les marqueurs endogènes les plus fréquemment utilisés pour normaliser les LBA sont l'albumine, l'urée et les protéines totales<sup>159</sup>.

L'urée est un composé endogène facilement mesurable, présent à des concentrations équivalentes dans le plasma et le LSE<sup>159</sup>. Cela est dû au fait que l'urée est une petite molécule diffusant facilement et librement dans tout le corps, y compris au travers de la paroi alvéolaire<sup>155,160</sup>. De plus, l'urée est peu affectée par la fuite capillaire qui peut être associée à de nombreux troubles pulmonaires<sup>154</sup>.

Les protéines totales dans les LBA n'ont que très peu été étudiées comme marqueur de dilution. Cependant, l'albumine est l'un des composants majoritaires de la fraction protéique<sup>161</sup>. Ward et al., ont montré que les concentrations d'albumine dans les LBA sont comparables entre des patients asthmatiques stables et des sujets non asthmatiques, et qu'elles restent stables chez les sujets asthmatiques après une longue période de traitement avec des corticostéroïdes inhalés<sup>159</sup>. Cependant, les travaux de Jones et al.<sup>157</sup> indiquent que la concentration d'albumine dans le LBA est augmentée chez les patients atteints de maladie

pulmonaire interstitielle par rapport aux témoins, limitant l'intérêt de l'albumine pour une normalisation de nos échantillons.

Pour notre étude, nous avons donc mesuré les concentrations en protéines totales et en urée comme potentiels marqueurs de dilution du LSE dans les LBA de nos patients, et en avons analysé les corrélations.

Le volume de LBA obtenu n'est pas toujours suffisant pour réaliser les analyses et le dosages. Les volumes de plasma sont généralement plus importants que ceux des LBA. Nous avons donc également quantifié ces composants dans le plasma des mêmes patients, prélevés au même moment que les LBA, et analysé les corrélations entre les données obtenues sur plasma et LBA.

## Matériels et méthodes

### Dosage des protéines totales

Les concentrations protéiques totales des LBA et des plasmas collectés des 30 patients de la cohorte CLASSE ont été quantifiées à l'aide d'un kit commercial (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientifique), selon le protocole fourni. Le dosage repose sur la réduction du  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  par les protéines, en milieu alcalin. L'acide bicinchoninique (BCA) réagit ensuite avec le cation réduit. Le produit réactionnel formé, résultant de la chélation de deux molécules de BCA avec un ion cuivreux, est soluble dans l'eau et présente une forte absorbance à une longueur d'onde de  $\lambda=562$  nm. Cette absorbance, mesurée grâce à un spectromètre (Thermo Fisher Multiskan® EX), est directement proportionnelle à la concentration totale en protéines. Les échantillons ont été testés à différentes dilutions (pur et au  $\frac{1}{2}$  pour les LBA, au 10<sup>ème</sup> et 20<sup>ème</sup> pour le plasma), chaque dilution étant testée en duplicat. Une gamme étalon allant de 0.0156 à 1 mg/mL, pour les LBA ou de 0.03125 à 2 mg/mL, pour le plasma a été réalisée en parallèle, grâce à une solution de BSA standardisée fournie dans le kit. Toutes les dilutions (gamme de référence et échantillons) ont été réalisées en eau milli-Q. Les courbes étalons ont été tracées à l'aide du logiciel Gen5 (Gen5.1.09 Software, BioTek), permettant également de déterminer les concentrations en protéines totales dans les échantillons.

### Dosage de l'urée

La concentration en urée dans les échantillons de plasma et de LBA a été quantifiée avec un kit commercial (Urea Nitrogen (BUN) Colorimetric Detection Kit, Invitrogen™), selon le protocole fourni. Les échantillons ont été testés à différentes dilutions. Pour le plasma, issu de la séparation sur Histopaque, nous avons réalisé une dilution au 10<sup>ème</sup> et au 20<sup>ème</sup>. Ces dilutions correspondent à une dilution finale au 20<sup>ème</sup> et au 40<sup>ème</sup> des échantillons, après prise

en compte de la dilution en AIM-V (voir préparation et traitement des échantillons cliniques, page 66). Pour les LBA, deux dilutions ont été réalisées, au  $\frac{1}{2}$  et  $\frac{1}{4}$ , en plus du dépôt de l'échantillon pur. Une gamme étalon allant de 0.156 à 10 mg/mL a été réalisée en parallèle, grâce à une solution d'azote uréique fournie dans le kit. Les dilutions des échantillons et du standard ont été réalisées en eau milli-Q. Les échantillons dilués et la gamme standard ont été mélangés avec les réactifs colorés A et B fournis, puis incubés à température ambiante pendant 30 minutes. La mesure de l'intensité de la coloration du produit a été réalisée à  $\lambda = 450$  nm, et est directement proportionnelle à la quantité d'urée. Les courbes étalons ont, là encore, été tracées à l'aide du logiciel Gen5, permettant également de déterminer les concentrations en urée dans les échantillons.

En ce qui concerne les LBA, les signaux obtenus pour les échantillons dilués étaient tous inférieurs à ceux obtenus avec le dernier point de la gamme étalon, bien qu'au-dessus du bruit de fond. De plus, seuls 17 des 30 LBA déposés purs ont permis d'obtenir des valeurs d'absorbance comprises dans la gamme étalon. Ainsi, nous avons dû concentrer les échantillons correspondants et réaliser à nouveaux le dosage : 500  $\mu$ L de LBA ont été évaporés durant 3 heures sous-vide (comme précédemment décrit pour les analyses métabolomiques). Malheureusement, pour 2 de ces 13 échantillons, le volume de lavage bronchoalvéolaire restant n'était plus suffisant pour réaliser cette concentration. Les culots secs ont été repris dans 50  $\mu$ L d'eau (concentration 10 fois) puis analysés à nouveau. Les valeurs d'absorbance obtenus pour les échantillons concentrés se situaient dans la gamme standard, permettant leur quantification. Pour les deux échantillons dont les volumes étaient insuffisants pour déterminer la concentration en urée, nous avons utilisé les résultats obtenus lors du premier dosage sur échantillon pur, en extrapolant les absorbances obtenues sur les derniers points de la gamme. Nous avons réalisé cette même extrapolation sur les 11 échantillons précédents, permettant de vérifier la fiabilité et de valider nos valeurs extrapolées : nous avons en effet observé une forte corrélation ( $R = 0.8062$ , corrélation de Pearson) entre les concentrations calculées (extrapolées) et les concentrations obtenues après dosage sur les 11 échantillons concentrés (non montré).



## Résultats

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la concentration totale en protéines dans le plasma et dans les LBA collectés des 30 enfants inclus dans la cohorte CLASSE. Les résultats obtenus sont présentés Figure 27A.

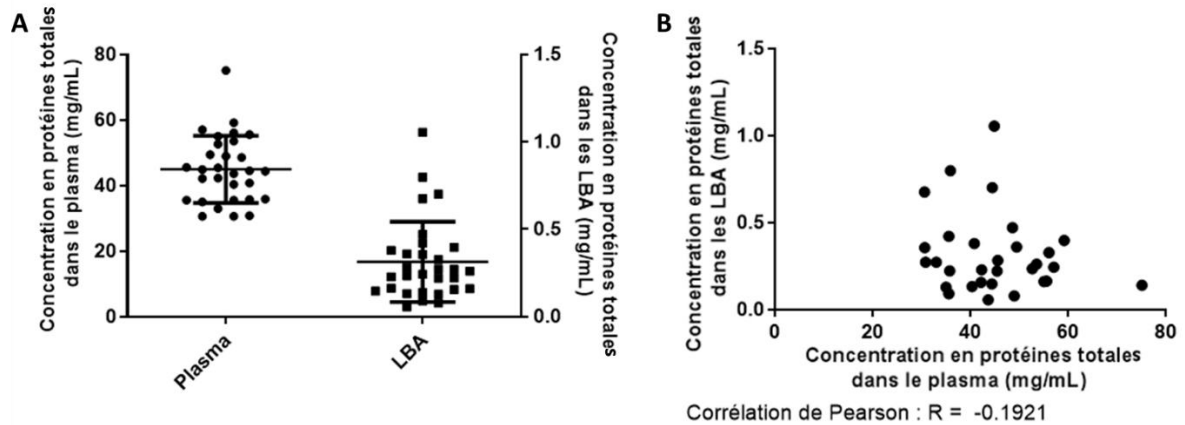


Figure 27 : **A.** Concentrations en protéines totales (mg/mL) dans les plasmas et dans les lavages bronchoalvéolaires (LBA) des 30 enfants inclus dans la cohorte CLASSE. **B.** Corrélation entre la concentration en protéines totales entre le plasma et les LBA.

Ainsi, la concentration totale en protéines était comprise entre 0,055 et 1,054 mg/mL (moyenne de 0,31 mg/mL) pour les LBA et entre 30,62 et 75,10 mg/mL (moyenne de 44,9 mg/mL) pour le plasma. Les concentrations en protéines totales dans les deux types d'échantillons n'étaient pas corrélées (Figure 27B).

Nous nous sommes aussi intéressés à la concentration en urée dans les échantillons de plasma et de LBA. Les résultats obtenus sont présentés Figure 28A.

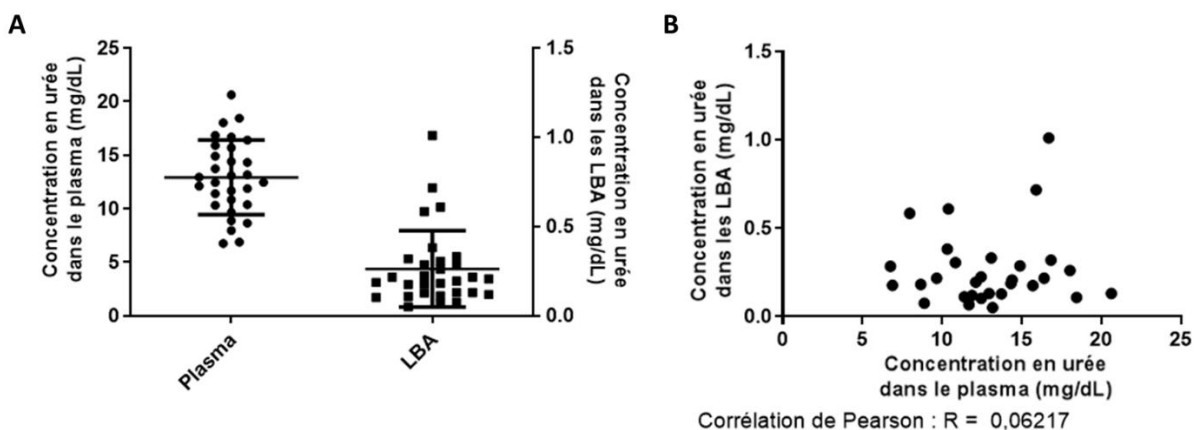


Figure 28 : **A.** Concentrations en azote uréique (mg/dL) dans les plasmas et dans les lavages bronchoalvéolaires (LBA) des 30 enfants inclus dans la cohorte CLASSE. **B.** Corrélation de la concentration en azote uréique entre le plasma et les LBA.

Les concentrations en azote uréique dans le plasma étaient comprises entre 6,756 et 20,635 mg/dL (moyenne de 12,9 mg/dL), alors que celles dans les LBA étaient comprises entre 0,023

et 0,687 mg/dL (moyenne de 0,233 mg/dL). Aucune corrélation entre les concentrations en urée dans les LBA et dans les plasmas n'a été mise en évidence (Figure 28B).

Nous avons ensuite vérifié que les composants endogènes de dilution du LSE ne sont pas affectés par la maladie. Nous avons réalisé des analyses statistiques univariées (test de Mann-Whitney) comparant les concentrations de nos deux composants mesurés sur les différentes matrices, entre les enfants présentant un asthme sévère (AS) et les enfants contrôles (NA). Aucune différence significative n'a été observée entre nos deux groupes de patients, que ce soit pour les concentrations en urée ou en protéines totales dans le plasma ou le LBA (Figure 29).

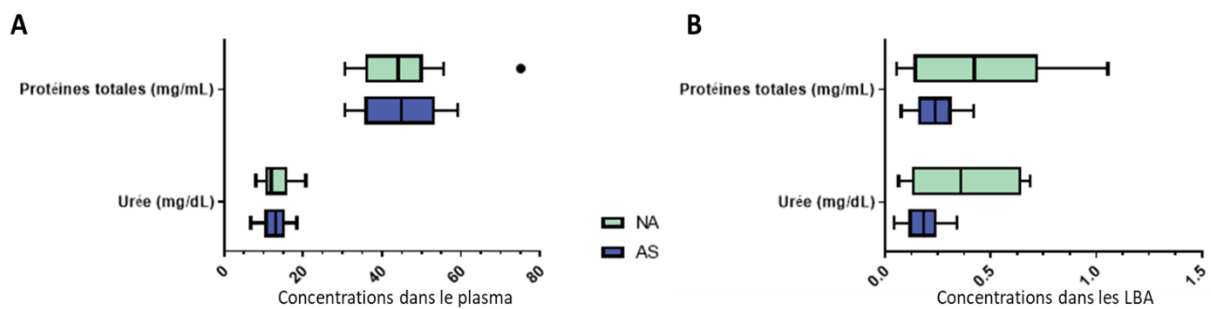


Figure 29 : Concentrations en urée (mg/dL) et en protéines totales (mg/mL) **A.** dans le plasma et **B.** dans les lavage bronchoalvéolaires (LBA) des patients non-asthmatiques (NA, en vert) et asthmatiques sévères (SA, en bleu).

Enfin, nous avons analysé la corrélation entre la concentration en protéines totales et la concentration en urée dans les échantillons de LBA (Figure 30). Le test de corrélation de Pearson sur l'ensemble des concentrations obtenues par dosage a montré qu'il existe une forte corrélation entre la concentration en protéines totales et la concentration en urée dans les LBA.

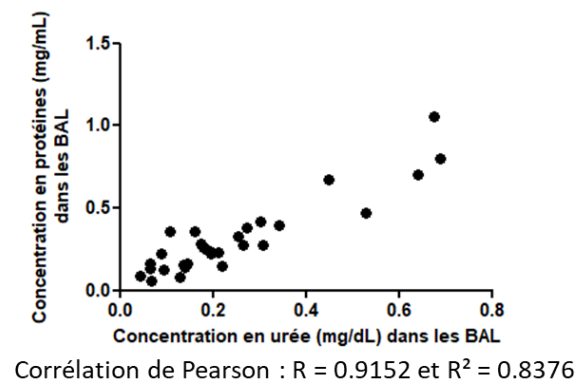


Figure 30 : Test de corrélation de Pearson entre la concentration en protéines totales et la concentration en urée dans les lavages bronchoalvéolaires.

## Conclusion

Les différentes concentrations obtenues, en urée ou en protéines totales, sont en accord avec les données de la littérature. En effet, il a été montré que la concentration en urée dans les LBA est d'environ 0,12 mg/dL chez les sujets sains<sup>155</sup> (0,233 mg/dL dans notre cohorte incluant sujets asthmatiques et non asthmatiques), et celle dans le plasma est de 15,82 mg/dL en moyenne chez les patients asthmatiques<sup>162</sup> et de 13 mg/dL chez les sujets sains<sup>155</sup>. Nous avons observé des valeurs moyennes de 12,9 mg/dL dans les plasmas de notre cohorte, indépendamment du statut asthmatique

La concentration en albumine dans le plasma de sujets sains est d'en moyenne 45 mg/mL alors qu'elle est en moyenne de 0,034 mg/mL dans les LBA<sup>155</sup>. La concentration en protéines totales est plus élevée et est d'environ 0,066 mg/mL dans les LBA<sup>163</sup> et entre 82,6 et 109,1 mg/mL dans le plasma en fonction de la méthode utilisée<sup>164</sup>. En accord avec ces données, nous avons observé des concentrations moyennes de 0,31 mg/mL et 44,9 mg/mL, respectivement dans les LBA et les plasmas, indépendamment du statut asthmatique.

Au vu des résultats précédents, les deux méthodes investiguées, à savoir la mesure de la concentration protéique et celle de l'urée, peuvent être utilisées pour normaliser les échantillons même s'il n'y a pas de corrélations entre les concentrations trouvées dans les LBA et dans les plasmas. Pour la suite de l'étude, nous avons décidé d'utiliser le dosage protéique car celui-ci est moins coûteux en termes de prix mais aussi en terme de volume d'échantillons nécessaire. En effet, pour le dosage d'urée, nous avons dû utiliser 500 µL d'échantillons pour concentrer les échantillons et ainsi obtenir des valeurs comprises dans la gamme standard, tandis que moins de 100 µL sont suffisants pour réaliser le dosage des protéines totales.

## Conclusion générale du chapitre 1

Le prélèvement du LBA est une méthode d'aide au diagnostic médical, consistant à injecter dans les alvéoles pulmonaires une solution de liquide physiologique stérile, puis à le récupérer. L'examen de la composition du LBA peut ainsi permettre d'obtenir des informations sur le microenvironnement du poumon, dans un contexte physiopathologique donné. Cependant, la méthode de prélèvement, réalisée pendant la bronchoscopie, ne permet pas de garantir le volume récupéré par rapport au volume infusé, ni l'homogénéité de sa composition selon les patients ce qui rend l'interprétation des résultats de composition du LBA difficile<sup>165</sup>. Par ailleurs, cette matrice n'avait jamais été étudiée au niveau de la plateforme de métabolomique du département MTS, nécessitant des développements méthodologiques en amont des analyses des échantillons de nos patients pour leur composition globale en métabolites.

Nous avons montré qu'il était possible d'utiliser la concentration totale en protéines ou la concentration en urée pour standardiser nos échantillons de LBA. Nous avons choisi d'utiliser la concentration totale en protéines, car moins coûteuse en termes de volume d'échantillon à utiliser. Ce dernier point était pour nous le plus important car nous ne disposons pas toujours de volume suffisant pour réaliser les différentes analyses. Pour les analyses de métabolomique, au-delà de l'aspect normalisation, nous avons testé différentes méthodes de préparation des échantillons en amont de l'extraction des métabolites : concentration des échantillons selon différentes approches, à partir de différents volumes de LBA, ainsi que différents traitements des échantillons (ajout d'agent chaotropique, étapes de filtration...). La problématique était d'obtenir le plus de métabolites possibles par analyse LC-MS, tout en limitant l'encrassement de la source d'ionisation du spectromètre de masse. Nos mises au point nous ont permis de fixer notre protocole de préparation de l'échantillon de LBA, qui consiste à concentrer par évaporation sous vide 500 µL de LBA, en amont de la précipitation des protéines au méthanol et de l'analyse en LC-HRMS selon deux conditions analytiques complémentaires.

Ces méthodes ont été appliquées sur les 30 échantillons de LBA disponibles au sein de la cohorte CLASSE, en parallèle d'une analyse métabolomique des plasmas de ces mêmes enfants selon un protocole établi. De plus, des analyses du microbiote des LBA ont été réalisées, selon des techniques et workflow déjà en place à l'Unité Micalis. Les concentrations de nombreux facteurs immunitaires solubles avaient préalablement été obtenus sur ces mêmes échantillons<sup>79,80</sup>, et seront intégrés avec ces nouveaux blocs de données.

Malgré les différentes mises au point, lors du passage des échantillons de LBA en condition analytique HILIC-ESI<sup>-</sup>, un problème de suppression est survenu au niveau de la colonne et les résultats obtenus en HILIC-ESI<sup>-</sup> sont, après analyse, difficilement exploitables (Annexe 2 et Annexe 3). Une solution aurait été de réaliser une extraction unique de type Bligh and Dyer<sup>166</sup>, à l'aide méthanol et chloroforme, et d'ainsi récupérer la fraction polaire qui aurait été plus pure.

## Chapitre 2 : L'analyse intégrée de données multi-omiques permet de distinguer les enfants asthmatiques sévères des contrôles

### Introduction

Pour mieux caractériser et comprendre les mécanismes biologiques impliqués dans l'asthme sévère au niveau local, et après optimisation de différentes techniques, nous avons donc réalisé une analyse multi-omique sur les échantillons de LBA d'enfants asthmatiques sévères et contrôles. Pour cela, nous avons étudié la composante microbienne (séquençage du gène codant l'ARN 16S) et le métabolome global. L'analyse de différents composants du système immunitaire dans les LBA de ces mêmes enfants avaient déjà été réalisée au laboratoire<sup>79,80</sup> (publications auxquelles j'ai été associée).

Ce travail fait l'objet d'un article, pour lequel je suis premier auteur. Cet article est en cours de révision, et fourni ci-dessous. Au cours de ce travail, j'ai réalisé les acquisitions des données (métabolomique sur la plateforme du MTS ; extraction des ADN et PCR à Micalis, puis séquençage par sous-traitance sur la plateforme @Bridge), puis ai réalisé les extractions et prétraitement des données, puis les différentes analyses statistiques principalement sous R (avec écriture de nouveaux scripts si nécessaire). Les intégrations de données ont été réalisées avec l'aide de Christelle Hennequet-Antier.

*Multi-omics analysis of bronchoalveolar lavage fluids:  
metabolites and cytokines discriminate severe asthmatic  
children from age-matched controls*

Soumission le 07/06/2023 dans Respiratory Research dans la collection « Asthma: Towards a Cure »  
(Annexe 4).

## Authors

Mélanie Briard<sup>1,2</sup>, Blanche Guillon<sup>1</sup>, Eric Venot<sup>1</sup>, Marta Grauso<sup>1</sup>, Christelle Hennequet-Antier<sup>3</sup>, Aurélia Bruneau<sup>2</sup>, François Fenaille<sup>4</sup>, Florence Castelli<sup>4</sup>, Muriel Thomas<sup>2</sup>, Guillaume Lezmi<sup>5</sup>, Maria Leite-de-Moraes<sup>6</sup>, Vinciane Saint-Criq<sup>2,\*§</sup>, Karine Adel-Patient<sup>1,\*§</sup>

## Affiliations

1. Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, UMR Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS)/SPI/Laboratoire d'Immuno-Allergie Alimentaire, 91190 Gif-sur-Yvette, France

2. Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR1319 Micalis Institute, Jouy-en-Josas, France.,

3. INRAE, Université Paris-Saclay, BioinfOmics, MIGALE Bioinformatics Facility, Jouy-en-Josas, France

4. Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, UMR Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS)/SPI/Laboratoire innovations en spectrométrie de masse pour la santé, MetaboHUB, 91191 Gif-sur-Yvette, France.

5. AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades, Service de Pneumologie et Allergologie Pédiatriques, Paris, France.

6. Université de Paris Cité, Institut Necker Enfants Malades, Equipe Immunorégulation et Immunopathologie, Inserm UMR1151, CNRS UMR8253, F-75015, Paris, France.

§ co-Last authors

## Corresponding authors

*. Karine Adel-Patient	*. Vinciane Saint Criq
UMR MTS, Université Paris-Saclay, CEA, INRAE	Micalis Institute, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay

Laboratoire d'Immuno-Allergie Alimentaire	Equipe Probiôte
DRF/Institut Joliot/DMTS/SPI - Bat 136 CEA de Saclay 91191 Gif-sur-Yvette cedex	Bâtiment 440, Bureau 237 Domaine de Vilvert 78352 Jouy-en-Josas cedex
Email: <a href="mailto:karine.adel-patient@cea.fr">karine.adel-patient@cea.fr</a>	Email: <a href="mailto:vinciane.saint-crig@inrae.fr">vinciane.saint-crig@inrae.fr</a>
Phone number: +(33) 1 69084583	Phone number: +(33) 1 34652485

### Keywords

Severe asthma; Children; Microbiota; Metabolomic; Immune system; Bronchoalveolar lavage;  
Multi-omics



## Abstract

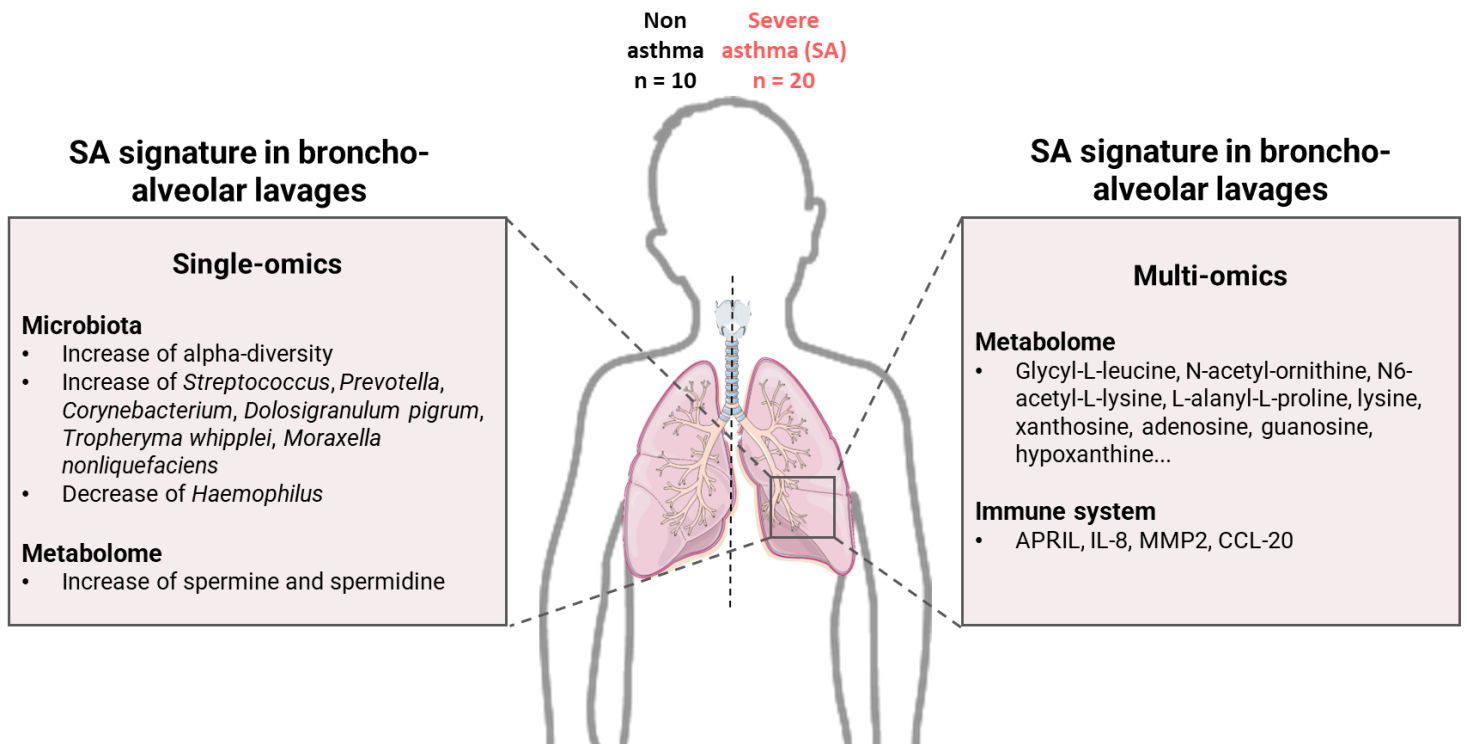
**Background.** Severe asthma (SA) is a heterogeneous condition with multiple phenotypes. There is still an unmet need to characterize and understand underlying mechanisms taking place in the lungs in order to propose the most suitable therapeutic strategies for SA. For this purpose, we aimed to identify a local signature of severe asthma by conducting comprehensive multi-omics analysis of bronchoalveolar lavages fluids (BALs) from children with SA *versus* non-asthmatic (NA) controls.

**Method.** BALs were collected from twenty children with SA and from ten age-matched NA. We previously analyzed soluble and cellular immune components in those samples, and now propose to perform comprehensive analysis of their microbiota and their metabolome. Briefly, DNA from BALs was extracted and 16S rRNA gene (V3-V4 region) was amplified by PCR and sequenced. In parallel, untargeted metabolomics was performed using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) following an established workflow for sample preparation, data acquisition and treatment. Each microbiome and metabolome dataset was first analysed independently by unsupervised multivariate analyses (Principal component analyses, PCA). Differences between groups for microbiota diversity indices, the relative distribution of each phyla and genera were then analysed. Metabolite set enrichment analysis (MSEA) and univariate supervised analysis were also performed. To identify a local signature of severe asthma, microbiota and metabolome data were further integrated, together with immune and with clinical data, using unsupervised Multi-Omics Factor Analysis (MOFA).

**Results.** Microbiota diversity was higher in children with SA *versus* NA, with higher relative abundances of *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Tropheryma whipplei*, *Dolosigranulum pigrum* and *Moraxella nonliquefaciens*. We identified 88 metabolites in BALs, but unsupervised PCA of corresponding data did not differentiate children with SA from NA. However, MSEA evidenced that biotin and carnitine synthesis, lysine degradation, methionine metabolism and spermidine and spermine biosynthesis pathways were significantly enriched in children with

SA. Finally, multiblocks data integration identified a signature of SA, mainly described by metabolites and cytokines.

**Conclusion.** By integrating metabolome, microbiome and cytokines data obtained on BALs from children with severe asthma *versus* NA, our study uniquely described a local signature of SA.



Graphical abstract

## 1. Introduction

Asthma is characterized by chronic inflammation of the airways causing hyperresponsiveness to environmental exposures or viral infections (Global Initiative for Asthma, 2022). Severe asthma (SA) is defined as uncontrolled asthma, i.e. occurrence of exacerbations despite high doses of inhaled corticosteroids (ICS) associated with second controllers, and despite correct use of medication and removal of modifiable and environmental factors such as tobacco exposure (Chung et al., 2014). To compensate this poor response to treatment in SA patients, the last few years have seen the emergence of biotherapies. However, in order to propose them, it is necessary to know the phenotype of the disease, i.e. observable characteristics that result from a combination of hereditary and environmental influences (Kuruville et al., 2019; Lezmi and de Blic, 2018), but also the underlying endotypes, i.e. distinct pathophysiologic mechanisms at cellular and molecular levels. The most well established classification of SA is the T2-high (eosinophilic) and T2-low (non-eosinophilic) endotypes (Haktanir Abul and Phipatanakul, 2019; Kuruville et al., 2019). However recent studies have described the presence of several other cell types and markers of T1, T2, and/or T17 inflammation locally, underlying immune mechanisms far beyond a simplistic T2 paradigm (Adel-Patient et al., 2021; Lezmi et al., 2019; Wisniewski et al., 2018). Thus, the development of treatments adapted to each patient (precision medicine) needs a deeper description of endotypes and identification of associated biomarkers.

To date, biomarkers indicative of T2-high asthma include mainly fractional exhaled nitric oxide (FeNO), serum levels of periostin, and blood or sputum eosinophils (Haktanir Abul and Phipatanakul, 2019; Kuruville et al., 2019; Ray et al., 2022). Recently, we also showed that a large set of immune variables in blood and bronchoalveolar lavages (BALs) may differentiate children with SA from control subjects (Adel-Patient et al., 2021) and, among children with SA, frequent exacerbators from non-frequent exacerbators (Adel-Patient et al., 2021). Adult patients with SA has also been associated with changes in the concentrations of some plasma metabolites, notably decreased levels of 1-stearoyl glycerol sulfate, dehydroisoandrosterone

sulfate and androsterone sulfate and increased levels of oleoylethanolamide, sphingosine-1-phosphate, N-palmitoylethanolamine, 22-hydroxycholesterol and xanthine (Reinke et al., 2017). Another study of exhaled breath condensate (EBC) in adults, highlighted the contribution of amino acids (lysine) and lipids (eicosanoids, phospholipids and unsaturated fatty acids) metabolism in asthma severity (Ntontsi et al., 2020). To date, metabolomic studies of childhood asthma have been mainly performed on blood, urine, and exhaled breath condensate samples. A study performed in BALs indicated that children with persistent wheezing had higher abundances of choline, oleamide, nepetalactam, butyrylcarnitine, l-palmitoylcarnitine, palmitoylethanolamide, and various phosphatidylcholines (Liang et al., 2022).

The lung microbiota gradually develops after birth. Indeed, a study has detected viable bacteria in the lungs of mice as early as 3 days after birth, which increased slightly the first two weeks (Remot et al., 2017). Its composition is influenced by physiological changes and exposure to environmental factors (Saint-Criq et al., 2021) and although it has not been as deeply investigated as the gut microbiota, studies have shown that microorganisms in the respiratory tract finely influence the local immune system and its regulation, epithelial barrier function (mucus production, epithelial cell permeability) and alveolarisation (Mathieu et al., 2018). Imbalance between the symbiotic and pathological bacterial strains in the lung may then lead to altered immune development and inappropriate inflammatory responses (Barcik et al., 2020). The lungs of a healthy adult are colonised mainly by two phyla, *Bacteroidetes* and *Firmicutes* (Mathieu et al., 2021). Several studies have shown that the airway microbiome of asthmatics differs from that of healthy adult subjects, with increased relative abundance of certain genera such as *Haemophilus*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, and *Streptococcus* (Green et al., 2014; Hilty et al., 2010) and interestingly, the composition of the respiratory microbiota seems to be linked to phenotypic characteristics of asthma (Taylor et al., 2018). However, whether the dysbiosis encountered in asthmatic patients is the cause or the consequence of the disease is not elucidated and microbiota composition appears to be influenced by treatments. A systematic review from Hartmann et al. (Hartmann et al., 2021)

reported that corticosteroids may alter the composition of the respiratory microbiome and another study found that asthmatic patients had an increased abundance of *Ascomycota*, and a lower abundance of *Basidiomycota*, after 3 months of inhaled corticosteroid (ICS) treatment (Huang et al., 2022).

To improve our understanding of the pathogenesis of SA and go further into precision medicine, we used an integrated approach combining the description of phenotype (asthma symptoms, atopy, and lung function) with immune components (innate and adaptive immunity), metabolome, and microbiota composition in BAL samples. Multiblocks data integration of metabolites intensities, microbiota composition and cytokines concentrations assayed in BALs, allowed to describe a signature of SA in children, which the main contributors were cytokines and metabolites.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Patients**

Twenty children with severe asthma (SA) were included. All patients were mainly from the Paris region and they were followed regularly in the department of paediatric pulmonology and allergy of Necker Hospital (Paris, France). Ten children with chronic respiratory disorders other than asthma and requiring endoscopy were also recruited as age-matched disease-control subjects (thereafter-called non-asthmatic, NA). Clinical data, patient characteristics and ethical statements are described in our previous studies (Adel-Patient et al., 2021; Adel-Patient et al., 2021; Lezmi et al., 2019). Children with SA used higher doses of ICS and had a higher post-bronchodilator Forced Expiratory Volume in 1 sec (FEV<sub>1</sub>) over Forced Vital Capacity (FVC) ratio, and higher blood eosinophil counts than control.

### **2.2. Sample collections**

Broncho-alveolar lavages were collected during endoscopy that was performed at least four weeks after an infection or asthma exacerbation. Lavages were recovered after injection of

3 mL/kg of body weight of NaCl 0.9%. The standard bronchoscopy procedure was followed for each patient.

Cytology, bacterial cultures, and immunofluorescence testing for common viruses were performed as part of the clinical assessments (Adel-Patient et al., 2021; Lezmi et al., 2015). Among children with SA, bacterial cultures were positive for five children (three for *Haemophilus influenzae*, one for *Streptococcus pyogenes*, and one for *Staphylococcus aureus*). In NA children's, bacterial cultures were positive for five children (three for *Haemophilus influenzae*, one for *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*, and one for *Staphylococcus aureus*). Viruses were found in four SA children (two with rhinovirus, one with both adenovirus and parainfluenza virus, and one with respiratory syncytial virus) while only one NA children had positive virology (non SARS-CoV2 coronavirus).

Recovered lavages were kept on ice and transferred to the research lab within 3-4hrs. After centrifugation (400xg, 10 min, 4°C), bronchoalveolar lavage supernatants were collected (thereafter called BALs). Two BALs aliquots were transferred at -80°C until metabolomics and cytokines analyses. Remaining BALs were additionally centrifuged (14,000xg, 20 min, 4°C), and dry pellets were stored at -80°C until DNA extraction and 16S rRNA sequencing.

### 2.3. Bronchial airway microbiota analysis

**DNA extraction from BALs.** DNA was extracted in sterile conditions from dry pellets, using the QIAamp Power Fecal DNA kit following manufacturer's recommendations (Qiagen; Courtaboeuf, France). Briefly, chemical then mechanical (FastPrep-24™, 2 x 40 s, 4 m/s) lyses were performed. After centrifugation (3 min, 18000xg), and protein precipitation, the DNA was purified on spin filter columns. DNA was eluted with 2 x 50 µL of water. Two extraction blanks (no BALs) were prepared alongside other samples to evaluate the contaminants from reagents, consumables and surrounding environment. DNA quantity was assessed using Qubit™ (INVITROGEN, Villebon-sur-Yvette, France). The DNA concentration values were between 0.164 and 174 ng/µL.

**PCR amplification of 16S rRNA gene.** For both samples and extraction blanks, the V3 and V4 hyper-variable regions of the 16S rRNA gene were amplified with a forward 43-nucleotide fusion primer (5' CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC TAC GGR AGG CAG CAG 3') and the 14-nt broad range bacterial primer 343 F, and a reverse 47-nucleotide fusion primer (5'GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TTA CCA GGG TAT CTA ATC CT 3') (Mata-Garrido et al., 2022). The amplifications were carried out using the following PCR conditions: 1 cycle at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s, and a finishing step at 60°C for 60 s, with MolTaq 16S DNA Polymerase (Molzym). Amplifications were checked by visualization on agarose gel, and PCR products were sent to the sequencing platform (@BRIDGE platform, INRAE, Jouy-en-Josas, <http://abridge.inra.fr/>). Preparation of purified DNA libraries and sequencing of amplicons were carried out using MiSeq Illumina technology (Illumina, USA). Sequencing was performed in two independent batches, including both internal controls and replicates of several samples. Data were merged after various internal checks and validations: PCoA and PERMANOVA were performed after combining both datasets to ensure there was no significant difference between batches.

**Bioinformatic analysis of 16S rRNA.** Sequencing quality was checked using MultiQC tools from Galaxy-migale platform (<https://galaxy.migale.inra.fr/>) (Ewels et al., 2016). Sequences were first analysed using the FROGS pipeline (version 3.2.2) to obtain the OTU (Operational Taxonomic Unit) abundance table (Escudié et al., 2018). This bioinformatic analysis included noise suppression and grouping of sequences into OTUs using SWARM (Aggregation distance clustering = 1), removal of chimeras using VSEARCH, OTUs filtering (cluster size > 5.10e5, remove contaminant from phiX databank), taxonomic affiliation for each OTU (Silva-Pintail 100 database) and affiliations filtering (Minimum coverage 80%). After performing these filtrations and suppressing the reads obtained in extraction blanks from the dataset, we obtained  $1.73 \times 10^6$  sequences. The final OTU table contained 514 OTUs with taxonomic affiliation. The representativeness of the obtained sequences and the sequencing depth were checked by

performing rarefaction curves. Only two samples showed a lower depth in sequencing (12,663 and 16,694 reads respectively), which was however considered sufficient for further analyses.

#### 2.4. Metabolomic analysis

**Sample preparation.** In order to perform sample normalisation (Jones et al., n.d.; Ward et al., 1993), total protein concentration (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) of BALs was first assessed. Protein concentrations ranged between 0.051 to 1.011 mg/mL. Then, 500 µL of BALs were concentrated (SpeedVac™), and solubilized in ultrapure water to obtain a final concentration of 0.139 mg of total protein /mL. Proteins were then precipitated by adding 4 volume of MeOH / 1 volume of samples (Boudah et al., 2014). After 90 minutes of incubation on ice and centrifugation (20,000×g, 15 min, 4°C), the supernatants were collected and aliquoted. Quality control (QC) was prepared by pooling equivalent volumes of all samples. Finally, all the samples and QC were dried under nitrogen (RotorVap LV-Biotage, 30°C, 5 bars).

**LC-HRMS Analysis.** Dried pellets were resuspended in 108 µL of buffer, containing 95% water and 5% acetonitrile both containing 0.1% formic acid. QC and diluted QC (1/2, 1/4 and 1/8) were prepared in the same buffer. QC, diluted QC and 100 µL of each biological samples were spiked with 5 µL of a standard mixture (Supplementary Table 1), and 10 µL of the resulting samples were analysed by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS). LC-HRMS was performed on an Ultimate 3000 chromatographic system coupled to a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) fitted with an electrospray (ESI) source operating in the positive (ESI<sup>+</sup>) ionization mode. Ultra-high-performance LC (UHPLC) separation was performed at 30°C using C18 column (Hypersil GOLD C18, 1.9 µm, 2.1 mm × 150 mm column, Thermo Fisher Scientific). Mobile phases were 100 % ultrapure H<sub>2</sub>O (phase A) and 100 % acetonitrile (phase B), both containing 0.1 % formic acid. Chromatographic elution was achieved with a flow rate of 500 µL/min. After injection of 10 µL of sample, elution consisted of an isocratic step of 2 min at 5% phase B, followed by a linear gradient from 5 to 100% of phase B for the next 11 min.



These proportions were kept constant for 12.5 min before returning to 5% B for 4.5 min. The column effluent was directly introduced into the electrospray source of the mass spectrometer. Source parameters were as follows: droplet evaporation temperature, 280°C; capillary voltage, 5 kV; sheath gas pressure and the auxiliary gas pressure, respectively at 60 and 10 arbitrary units with nitrogen gas; mass resolution power, 50,000  $m/\Delta m$ ; full width at half maximum (FWHM) at  $m/z$  200, for singly charged ions; detection from  $m/z$  85 to 1000.

Diluted QCs were analysed in triplicates at the beginning of the sequence, while non-diluted QCs were introduced every six randomised biological samples for data normalization/standardization purposes.

Raw data (.raw files) were manually inspected using the Qual-browser module of Xcalibur (version 4.1, Thermo Fisher Scientific) and then converted to .mzXML format using MSconvert ("ProteoWizard", version 3.0.21079). Data extraction was performed using "XCMS" R package deployed on the open-source web-based W4M platform (<https://workflow4metabolomics.org/>) (Smith et al., 2006). The filtration of the variables as well as the quality metrics were carried out using the phenomis R package (version 1.0.2) (Imbert et al., 2021). Features generated from XCMS were filtered according to the following criteria: (i) correlation between QC dilution factors and areas of chromatographic peaks ( $> 0.7$ ), (ii) coefficient of variation of chromatographic peak areas of QC samples ( $< 30\%$ ), and (iii) ratio of chromatographic peak areas of biological to that of blank samples ( $> 3$ ). Intensities were corrected for signal drift by fitting a locally quadratic (loess) regression model to the QC values. Initially, 25,698 variables were extracted with XCMS package, and 2,972 variables were retained after filtering. Feature annotation was then performed along the 2,972 variables using an in-house spectral database based on chemical standards analysed under the same analytical conditions (Boudah et al., 2014; Roux et al., 2012). To be annotated features had to match accurate measured mass, considering a  $\pm 10$  ppm tolerance, and measured retention time, considering a 45 seconds tolerance. Annotations were then confirmed by MS/MS analyses based on in-house database

spectra, allowing the highest level of confidence (level 1 according to Metabolomic Standards Initiative) [ 23].

## 2.5. Local cytokines and immunoglobulines

We analysed 76 immune soluble components in BALs for each individual (cytokines, antibodies). Method and results are described in (Adel-Patient et al., 2021; Adel-Patient et al., 2021).

## 2.6. Statistical analysis of microbiota and metabolites datasets

Metabolome datasets were log<sub>10</sub> transformed and the variables were centered to the mean and scaled to unit variance.

Metabolites and microbiota datasets were then first analysed independently, using multivariate unsupervised methods. Principal component analysis (PCA) was used to identify potential outliers (none identified) and to construct principal components to explain the variability in the dataset ("ropls" R package). Hierarchical clustering was built using the Pearson's distance and Ward's linkage on both rows and columns with the R package "complexHeatmap" (version 2.14.0) [37]. Correlation analyses between demographic and clinical data and microbiota or metabolites variables were then calculated independently of the asthmatic status, using the Spearman correlation test. We considered demographic variables collected at recruitment (age, Body Mass Index (BMI), gender, rural *versus* urban lifestyle), variables participating in the definition of the asthmatic status (FEV<sub>1</sub>, FEV<sub>1</sub>/FVC, number of severe exacerbations in the past years, Asthma Control Test (ACT) score, ICS dose), and those assessed independently in hospital lab (bacteriology and virology). Correlation matrices were represented using the R package "Heatmaply" (version 1.4.2).

For microbiota, we also determined diversity indices and the relative distribution of each phylum and genus (and species, if possible) using Easy16S tool (<https://shiny.migale.inrae.fr/app/easy16S>). The  $\alpha$ -diversity was analysed by calculating the Chao1 index (estimated community richness) on rarefied data (all samples were normalized

to have the same number of reads). ANOVA was performed to compare the  $\alpha$ -diversity between groups. Statistical differences between NA and SA groups for individual OTUs abundance were also tested using the Mann-Whitney test with Benjamini-Hochberg false discovery rate (FDR) correction for multiple testing.

OTUs were then combined by genus ("OTUtable" R package, version 1.1.2), allowing to sum into a single vector the abundances of OTUs within the same genus. This allowed avoiding redundancy and bias for the integration, due to repetition of the same genus with multiple affiliations. The 514 OTUs (see results) were grouped in 119 final genera. Microbiota dataset were transformed using Centered Log Ratio transformation (CLR, "mixOmics" R package, version 6.22.0)

In parallel, Metabolite set enrichment analysis (MSEA) was performed on the peak intensity table of annotated metabolites using KEGG ID and MetaboAnalyst 5.0 (Pang et al., 2022), and using the Small Molecule Pathway Database (SMPDB, version 2.0) as a metabolite set library. The pathways with an adjusted p-value (FDR correction) less than 0.1 were selected. Statistical differences between NA and SA groups for metabolites involved in enriched pathways were investigated using the Mann-Whitney test on non-transformed data. Correlations between clinical data and metabolites were carried out as described for microbiota data. Supervised OPLS-DA analysis was computed in R ("ropls" package, version 1.30.0 (Thévenot et al., 2015)).

Immune datasets were log<sub>10</sub> transformed and the variables were centered to the mean and scaled to unit variance

## 2.7. Multiblock data integration.

The three different datasets obtained from the same patients were then integrated together: 119 OTUs at genus level, 88 metabolites and 76 cytokines and immunoglobulines from microbiota, metabolome and immune dataset, respectively. Integration was performed for all patients with no missing values in the different data set (NA = 30, SA = 20) The integrative

analyses of these datasets in multi-blocks was performed using Multi-Omics Factor Analysis (MOFA) implemented in R ("MOFA2", version 1.8.0) (Argelaguet et al., 2020, 2018) to identify variations that are shared across multiple datasets and those that are supported by only one. Each variable from the three datasets participates to each factor construction, but with different weight scores. Features with no association with the corresponding factor are expected to have absolute weight values close to zero, whereas features with strongest association with the Factor are expected to have larger absolute weight values.

### 3. Results

#### 3.1. Children with SA have higher microbial diversity and increased relative abundance of some bacteria in BALs

Whatever the asthmatic status, taxonomic analysis first showed that most of the OTUs detected in BALs were associated with *Firmicutes* (new name: *Bacillota*) phylum (34.28%), then *Proteobacteria* (or *Pseudomonadota*) (24.09%), *Bacteroidota* (20.88%) and *Actinobacteriota* (*Actinomycetota*) (14.82%) (Supplementary figure 1).

We then visualized microbiota composition of BALs using unsupervised methods (i.e. PCA) that we just coloured depending on the asthmatic status (Figure 1A). Microbial composition of BALs from control subjects appeared to be more homogeneous than that of children with SA, but no visible distinction between the two groups of children was evidenced (i.e. centroids overlapped), whatever the ACP component considered (Figure 1A and not shown). Unsupervised ascendant hierarchical clustering (AHC) gave comparable result (Figure 1B). Indeed, AHC identified four clusters of individuals, with one cluster containing most of the samples (i.e. 80% of control subjects and 85% of children with SA). It is worth noting that patients #14 and #15 (SA) formed a separate cluster, which is also the case for patient #1 (SA) and patients #12 and #27 (NA).

We then assessed the correlations between the bacterial genera identified in the BALs from all collected samples (independently of NA/SA status) and some demographic and clinical data

(Figure 2). Abundance of *Kingella* genus was negatively and significantly correlated with age ( $\rho = -0.48$ ) and that of *Lentimicrobium* ( $\rho = -0.48$ ) with female gender. Female gender was also correlated with higher *Alloprevotella* ( $\rho = 0.49$ ) and *Cantonella* ( $\rho = 0.51$ ) relative abundances. *Treponema* ( $\rho = 0.47$ ) was positively correlated to BMI and *Stomatobaculum* ( $\rho = 0.54$ ) to rural lifestyle (Figure 2A). Significant negative correlations were observed between ICS dose and the abundances of *Marvinbryantia* ( $\rho = -0.48$ ), *Kocuria* ( $\rho = -0.47$ ) and *Coriobacteriales Incertae Sedis* ( $\rho = -0.47$ ). ACT score was positively correlated to *Blautia* ( $\rho = 0.56$ ) and negatively to *Pasteurellaceae* family ( $\rho = -0.58$ ), whereas FEV<sub>1</sub>/FVC negatively correlated to *Bacillus* ( $\rho = -0.46$ ) and *Eikenella* ( $\rho = -0.60$ , Figure 2B).

We then analysed the relative abundances of bacterial taxa at the genus level from the 30 children included in our cohort (Figure 3A). We observed a strong heterogeneity within both children with SA and control subject children, without evidencing any difference related to asthma (Figure 3A). Control subjects' children #12 and #27 and SA child #1, already highlighted in HCA, showed very low diversity.

Despite the high heterogeneity and low number of individuals, the  $\alpha$ -diversity (i.e. reflecting the number of different species observed in each sample) tended to be higher in children with SA than in control subjects (Figure 3B). Moreover, differential expression analysis evidenced nine genera/species that were significantly more abundant in BALs from SA than in that from control subjects (Volcano plot, Figure 4A). Indeed, BALs from children with SA had significantly more bacteria belonging to the genera *Streptococcus*, *Corynebacterium* and *Prevotella*, and to the species *Tropheryma whipplei*, *Dolosigranulum pigrum* and *Moraxella nonliquefaciens* (Figure 4B). Conversely, OTU corresponding to *Haemophilus* genus was drastically decreased in BALs from children with SA compared to controls (Figure 4B).

### 3.2. SA children have a specific BAL metabolome

We identified 88 metabolites in BALs, with the highest level of confidence (Supplementary Table 2). Annotated metabolites belonged mainly to amino acids/peptides, aromatic and

aliphatic compounds and nucleosides/nucleotides analogues classes (Supplementary figure 2).

Unsupervised and colored PCA highlighted that annotated metabolome appeared more homogeneous in BALs from children with SA than in control subjects, but no visible distinction was observed between patient groups (Figure 5A). This was confirmed by non-supervised AHC, which identified two clusters of individuals, the first one containing most of the samples independently of the group (Figure 5B). The second cluster contained samples from three control subjects, including patients' number #12 and #27, i.e. for which BALs were already distinguishable by microbiota composition and diversity. No difference between the groups was observed on the other PCA axes (not shown).

Correlations between metabolites and the demographic data (Figure 6; independently of asthmatic status) evidenced that a rural lifestyle was negatively associated to 5-aminovalerate ( $\rho = -0.51$ , Figure 6A), and that a positive bacteriology was positively correlated to adenine ( $\rho = 0.48$ ) and glycine-N-prolyl (Pro-Gly,  $\rho = 0.57$ ) and negatively correlated to phenylacetyl-L-glutamine ( $\rho = -0.52$ ). For clinical data, we observed the dose of ICS positively correlated with the levels of benzocaine ( $\rho = 0.54$ ), pyridoxal ( $\rho = 0.59$ ), cotinine ( $\rho = 0.46$ ), spermine ( $\rho = 0.50$ ) and 5 methylthioadenosine ( $\rho = 0.54$ ), and it was negatively associated with the levels of L-homoserine ( $\rho = -0.50$ ), L-lysine ( $\rho = -0.54$ ) and arginine ( $\rho = -0.55$ ). Number of exacerbations positively correlated to spermine ( $\rho = 0.48$ ). FEV<sub>1</sub>/FVC was negatively correlated to N6-acetyl-L-lysine ( $\rho = -0.54$ , Figure 6B).

Despite the absence of a structuration depending on the asthmatic status, univariate analysis identified ten metabolites that were significantly increased in children with SA compared to control and 6 metabolites that were significantly decreased (Supplementary Figure 3), but differences did not remain after correction for multiple testing. Supervised analysis (OPLS-DA) did not allow defining a model that discriminated the two groups (not shown).

However, Metabolite Set Enrichment Analysis (MSEA) showed that pathways related to (i) biotin metabolism, (ii) carnitine synthesis, (iii) lysine degradation, (iv) methionine metabolism and (v) spermidine and spermine (also named polyamines) biosynthesis were significantly enriched in BALs from children with SA (Figure 6C and Supplementary Table 3). Within the biotin and carnitine synthesis and the lysine degradation pathways, we could only evidence a significant decrease of L-lysine levels in BALs from children with SA vs control subjects. Additionally, L-homoserine (methionine metabolism pathway) levels decreased in BALs from children with SA, whereas level of adenosine increased. Interestingly, this later pathway interacts with the polyamine biosynthesis pathway by enabling spermine and spermidine synthesis via S-adenosyl-methioninamine conversion into 5-methylthio-adenosine (Figure 6D and Supplementary Figure 4). Over the five metabolites belonging to the polyamines biosynthesis pathway, both spermidine and spermine levels were significantly increased in BALs children with SA compared to controls (Figure 6D).

### 3.3. Multiblock dataset integration evidenced that children with SA are discriminated from control subjects by combined metabolites and cytokines data

In a non-supervised framework, we performed a multi-omics factor analysis (MOFA) to obtain an integrative view of the covariations between multiple datasets assessed in BALs. The datasets considered were that of soluble immune factors (76 cytokines and total antibodies, see (Adel-Patient et al., 2021; Adel-Patient et al., 2021)), and that of the 119 microbial genera and the 88 metabolites identified in the present study.

In this analysis, the 8 factors retained in the model were sufficient to reduce dimensions while explaining most of the global variance. This model explained up to ~48% of the variation in the metabolites dataset, ~50% of the variation in the immune dataset and ~26% of the variation in the microbiota dataset (Supplementary Figure 5A). The variance decomposition analysis calculated the percentage of variance explained by each factor and data modality. Factor1 and Factor2 captured a source of variability that was present across metabolites and immune modalities (Factor1: 27.71% and 22.24% for metabolites and cytokines, respectively, and

Factor2: 12.64% and 4.01%, respectively). Factor3 and Factor5 captured a source of variation that was exclusive to the immune datasets (15.91% and 8.30%, respectively). Factor4, Factor7 and Factor8 captured variations from microbiota data (15.59, 5.63% and 4.46% respectively, Supplementary Figure 5B). Pearson correlation was calculated between the eight factors. The highest correlations were observed between latent Factor1 and the Factors4, 6 and 7 ( $\rho = 0.46$ ; 0.33 and 0.38 respectively). As expected, the correlations between Factors confirmed that each data modality provided different information, and allowed further analysis using this model (Supplementary Figure 5C).

Association between MOFA factors and clinical parameters was then investigated (Figure 7A). We observed that Factor1, mainly explained by the variance of immune components and metabolites, was significantly associated with severe asthma status, which was confirmed when projecting SA and NA patients separately on Factors 1 to 8 (Figure 7B). Indeed, Factor1 was evidenced as the only one that distinguished children with SA from control subjects. Factor 8, mainly explained by the variance of microbiota variables, correlated with a positive virology in BALs (Figure 7A). Other factors were not correlated to any of the clinical or demographic variables considered.

As Factor1 captured the variance associated with the severe asthmatic status (Figure 7B), and was mainly constructed by metabolites and cytokines variables, we went deeper to identify the metabolites and cytokines that mostly contributed to Factor1 and then that may participate in describing SA phenotypes. In the top 20 of features that contributed positively to the Factor1, we evidenced the cytokine APRIL (Figure 7C, Supplementary Figure 6) and the metabolites adenosine, guanosine, hypoxanthine and  $\alpha$ -pinene-oxide (Figure 7C, Supplementary Figure 7). Conversely, the metabolites that contributed negatively to Factor1 were glycyl-L-leucine, N-acetyl-ornithine, N6-acetyl-L-lysine, L-alanyl-L-proline, lysine, L-prolyl-L-leucine (Pro-Leu), xanthosine, methionine, valyl-proline (Val-Pro), arginine, L-homoserine and phenylpyruvic acid (Figure 7C, Supplementary Figure 7). Cytokines that contributed negatively to Factor1 were IL-8, Matrix metalloproteinases 2 (MMP-2) and CCL20 (Figure 7C, Supplementary Figure 6).



## Discussion

The objective of this study was to identify a signature of SA in BALs based on single-block and multi-block integration statistical analysis of microbiota, metabolome and immune datasets. Through this small but well-phenotyped cohort, we evidenced higher microbiota diversity and altered metabolic pathways and immune responses in SA children. Integration of all datasets highlighted that immune and metabolomics factors are the main contributors to the SA signature, when compared to NA.

First, we showed that SA children tend to have greater bacterial diversity than non-asthmatics. While there appears to be a consensus that a decreased alpha-diversity of the gut microbiome is linked to a declined health status, there is no clear evidence how this generalizes to the microbiomes of the lungs (Avalos-Fernandez et al., 2022). Moreover, some studies also revealed an increase in alpha diversity in the gut in epilepsy (Huang et al., 2019), autism spectrum disorders (Coretti et al., 2018), or transient ischemic patients (Yin et al., 2015). Then, we evidenced some genera/species that were more abundant in BALs from children with SA including *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Dolosigranulum pigrum*, *Moraxella nonliquefaciens*, and *Tropheryma whipplei*. Conversely, *Haemophilus* was less abundant in BALs from children with SA compared to control subjects. Other groups have shown that the airway microbiome of adult asthmatics had higher relative abundance of certain genera such as *Haemophilus*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, and *Streptococcus* (Green et al., 2014; Hilty et al., 2010). Some studies rather confirmed that *Proteobacteria* (*Pseudomonadota*) phylum, particularly *Haemophilus spp.*, is more frequent in bronchial airway samples from adults and children with SA than in controls (Hilty et al., 2010; Simpson et al., 2016; Zhang et al., 2012). The control patients included in our study had various non-asthmatic pathologies including non-cystic fibrosis bronchiectasis, bronchopathy, and ciliary dyskinesia. Forty percent of these control subjects also had a positive bacteriology for *Haemophilus* (4/10), while only two out of 20 (10%) of children with SA had such a positive bacteriology. This may explain the discrepancy between our results and data published by other groups on the relative

abundances of *Haemophilus*. *Actinobacteria* (*Actinomycetota*) or *Firmicutes* (*Bacillota*), mainly *Streptococci* have been found more prevalent in children with SA (Chung, 2017; Green et al., 2014; Simpson et al., 2016), which is consistent with our results. In addition to our results, others have shown that decreased abundance in *Corynebacterium* were associated with asthma exacerbations in asthmatic children (McCauley et al., 2019) and that airway microbiota of children dominated by *Corynebacterium* and *Dolosigranulum* genera were associated with a lower risk of developing loss of asthma control (Zhou et al., 2019). This will be investigated in the follow-up of the children involved in our study. Hilty et al. (Hilty et al., 2010), showed that *Staphylococcus spp.* were also present in excess in the airways of children with difficult asthma. However, we did not find any difference in the relative abundance of *Staphylococcus* between the two groups of children.

In parallel, a non-supervised analysis of the metabolome did not make it possible to distinguish between the two groups of children. Using grouped-based approach such as MSEA, we were able to highlight metabolic pathways enriched in children with SA, such as those of spermine and spermidine biosynthesis, also called the “polyamine biosynthesis pathway”. In line with our results, increased levels of these metabolites were reported in the blood of adult asthmatics with active symptoms (Kurosawa et al., 1992) and in lung tissue of ovalbumin (OVA)-sensitized and challenged mice, which are widely used as an animal model of asthma (Jain et al., 2018; North et al., 2013). Polyamines play important roles in cell survival and cell death pathways. For example, spermine was reported to promote eosinophils survival by inhibiting mitochondrial permeability transition and repressing caspases activities (Ilmarinen et al., 2015). In addition, the three polyamines spermine, spermidine and putrescine, have been shown to stimulate superoxide generation by neutrophils activated by fMLP (fMet-Leu-Phe) (Guarnieri et al., 1987), which enhanced the surrounding oxidative stress and aggravated airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness. Therefore, our study further supports the major role of polyamines in severe asthma. This is confirmed by the strong correlation between BALs levels of spermine and the number of exacerbations. The metabolites identified

in our analysis are however entirely dependent on the database used. Our internal base allowing metabolite annotations contains a majority of endogenous metabolites: it is therefore more difficult to highlight altered bacterial metabolic pathways and / or correlation between metabolome and microbiota in our analysis.

To go deeper in the complexity of SA, we integrated BALs datasets for immune components (with cytokines and Ig variables previously described in (Adel-Patient et al., 2021; Adel-Patient et al., 2021; Lezmi et al., 2019)), microbiota and metabolome using a multi-omics factorial analysis with a non-supervised approach. The major sources of variations from the three datasets, comprising a total of 283 variables (distributed in 88 metabolites, 119 bacteria, 76 cytokines and Ig), were captured in eight latent factors. Interestingly, the first factor explained almost 50% of the total variance, and was strongly associated with SA. Main contributors of Factor1 were data from metabolites and immune datasets, whereas microbiota was a poor contributor. Furthermore, Factor4 captured the variance associated with microbiota variables and did not permit to distinguish the two groups. These results thus confirm the complexity of SA, but also the interest of combining different omics-datasets to obtain a local signature of this disease, as we recently observed in eosinophilic oesophagitis, a non-IgE mediated food allergy restricted to oesophagus (Adel-Patient et al., 2023).

In the present study, data integration evidenced that BALs from severe asthmatics were characterised by high concentrations of APRIL and CCL20 and by higher levels of metabolites from purine metabolism (guanosine, hypoxanthine and adenosine) and  $\alpha$ -pinene-oxide. In accordance with our results, it was shown that the circulating levels of APRIL were significantly increased in patients with asthma compared with healthy normal controls [7, 36]. This cytokine then appears to be a consistent marker between BALs and blood. High concentrations of adenosine were already reported in BAL fluids from patients with asthma (Driver et al., 1993), and adenosine is known to cause bronchoconstriction when inhaled by asthmatic subjects (Wilson et al., 2009). Moreover, purine metabolism has been identified as being involved in asthma with higher levels of hypoxanthine in serum of asthmatic patients compared with

healthy individuals (Ying et al., n.d.). However, in our study we did not find a strong correlation between parameters measured during spirometry tests (FEV<sub>1</sub>, FVC), exacerbation number or ACT score and the metabolites belonging to this pathway.

With regards to the limited number of patients in this study, these results need to be confirmed on another independent cohort, with integration of other omic-dataset such as transcriptomic data that could indeed provided interesting information to refine asthma endotypes into intra-SA specific new groups (Ray et al., 2022).

In conclusion, thanks to a multi-omics approach, our study uniquely described composition of BALs collected from severe asthmatic children compared to non asthmatic. Our study provides new leads to understand the complex mechanisms involved locally in severe asthma. Such approach and results may soon be used to identify new targets that will allow better diagnosis and treatment of children with severe asthma,.

### **Abbreviations**

ACT: Asthma Control Test; AHC: Ascendant Hierarchical Clustering; BAL: BronchoAlveolar Lavage; CV: coefficient of variation; EBC: Exhaled Breath Condensate; FA: Formic Acid; FeNO: Fractional Exhaled Nitric Oxide; FEV<sub>1</sub>: Forced Expiratory Volume in the first second; FVC: Forced Vital Capacity; ICS: Inhaled CorticoSteroid; Ig: Immunoglobuline; MSEA: Metabolite Set Enrichment Analysis; MOFA: Multi-Omics Factor Analysis; NA: Non Asthmatic; OTU: Operation Taxonomic Unit; PCA: Principal Component Analysis; Pro-Gly: Glycine-N-propyl; QC: Quality Controls; SA: Severe Asthmatic; UHPLC: Ultra-high performance liquid chromatographic

### **Author Contributions**

F.F, F.C, B.G, M.B: metabolomic extraction process development

M.G. & K.A.-P. sample processing & immune analysis

B.G, M.B: metabolomic data acquisition

A.B: PCR amplification of 16S rDNA

V.S.-C, M.B: microbiota data acquisition and treatment

E.V, C.H.-A, M.B: statistical analysis

K.A.-P, V.S.-C, M.B: writing—correction, review and editing

M.T, G.L, M.L.-M, K.A.-P: funding acquisition

All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

### **Acknowledgments**

We thank all the patients involved in the study and their parents. We are grateful to the INRAE MIGALE bioinformatics facility (MIGALE, INRAE, 2020. Migale bioinformatics Facility, doi: 10.15454/1.5572390655343293E12) for providing help and computing and storage resources. This work has benefited from the facilities and expertise of @BRIDGe (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350 Jouy-en-Josas, France) for the 16S rRNA sequencing. We also thank Etienne Thevenot for his advice on statistical analysis. Graphical abstract was drawn by using pictures from Servier Medical Art. Servier Medical Art by Servier is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

### **Availability of data and materials**

The datasets supporting the conclusions of this article are available in the data INRAE repository, BRIARD, Melanie, 2023, "Multi-omics analysis of bronchoalveolar lavages of children with severe asthma", <https://doi.org/10.57745/TTLZCF>, Recherche Data Gouv, V1, UNF:6:Z1oENwpcuW/D/XOUs4xMvQ== [fileUNF].

## References

- Adel-Patient, K., Campeotto, F., Grauso, M., Guillon, B., Moroldo, M., Venot, E., Dietrich, C., Machavoine, F., Castelli, F.A., Fenaille, F., Molina, T.J., Barbet, P., Delacourt, C., Leite-de-Moraes, M., Lezmi, G., 2023. Assessment of local and systemic signature of eosinophilic esophagitis (EoE) in children through multi-omics approaches. *Front. Immunol.* 14, 1108895. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1108895>
- Adel-Patient, K., Grauso, M., Abou-Taam, R., Guillon, B., Dietrich, C., Machavoine, F., Briard, M., Garcelon, N., Faour, H., Neuraz, A., Delacourt, C., Molina, T.J., Leite-de-Moraes, M., Lezmi, G., 2021. A Comprehensive Analysis of Immune Constituents in Blood and Bronchoalveolar Lavage Allows Identification of an Immune Signature of Severe Asthma in Children. *Front. Immunol.* 12, 700521. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.700521>
- Adel-Patient, K., Grauso, M., Abou-Taam, R., Guillon, B., Dietrich, C., Machavoine, F., Garcelon, N., Briard, M., Faour, H., Neuraz, A., Delacourt, C., Molina, T.J., Leite-de-Moraes, M., Lezmi, G., 2021. Immune signatures distinguish frequent from non-frequent exacerbators among children with severe asthma. *Allergy* 76, 2261–2264. <https://doi.org/10.1111/all.14759>
- Alturaiki, W., Mubarak, A., Mir, S.A., Afridi, A., Premanathan, M., Mickymaray, S., Vijayakumar, R., Alsagaby, S.A., Almalki, S.G., Alghofaili, F., Alnemare, A.K., Flanagan, B.F., 2021. Plasma levels of BAFF and APRIL are elevated in patients with asthma in Saudi Arabia. *Saudi J. Biol. Sci.* 28, 7455–7459. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.044>
- Argelaguet, R., Arnol, D., Bredikhin, D., Deloro, Y., Velten, B., Marioni, J.C., Stegle, O., 2020. MOFA+: a statistical framework for comprehensive integration of multi-modal single-cell data. *Genome Biol.* 21, 111. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02015-1>
- Argelaguet, R., Velten, B., Arnol, D., Dietrich, S., Zenz, T., Marioni, J.C., Buettner, F., Huber, W., Stegle, O., 2018. Multi-Omics Factor Analysis—a framework for unsupervised integration of multi-omics data sets. *Mol. Syst. Biol.* 14.
- Arrieta, M.-C., Sadarangani, M., Brown, E.M., Russell, S.L., Nimmo, M., Dean, J., Turvey, S.E., Chan, E.S., Finlay, B.B., 2016. A humanized microbiota mouse model of ovalbumin-induced lung inflammation. *Gut Microbes* 7, 342–352. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1182293>
- Avalos-Fernandez, M., Alin, T., Métayer, C., Thiébaud, R., Enaud, R., Delhaes, L., 2022. The respiratory microbiota alpha-diversity in chronic lung diseases: first systematic review and meta-analysis. *Respir. Res.* 23, 214. <https://doi.org/10.1186/s12931-022-02132-4>
- Barcik, W., Boutin, R.C.T., Sokolowska, M., Finlay, B.B., 2020. The Role of Lung and Gut Microbiota in the Pathology of Asthma. *Immunity* 52, 241–255. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.01.007>
- Boudah, S., Olivier, M.-F., Aros-Calt, S., Oliveira, L., Fenaille, F., Tabet, J.-C., Junot, C., 2014. Annotation of the human serum metabolome by coupling three liquid chromatography methods to high-resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 966, 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.04.025>
- Chung, K.F., 2017. Potential Role of the Lung Microbiome in Shaping Asthma Phenotypes. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 14, S326–S331. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201702-138AW>
- Chung, K.F., Wenzel, S.E., Brozek, J.L., Bush, A., Castro, M., Sterk, P.J., Adcock, I.M., Bateman, E.D., Bel, E.H., Bleecker, E.R., Boulet, L.-P., Brightling, C., Chaney, P., Dahlen, S.-E., Djukanovic, R., Frey, U., Gaga, M., Gibson, P., Hamid, Q., Jarjour, N.N., Maud, T., Sorkness, R.L., Teague, W.G., 2014. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur. Respir. J.* 43, 343–373. <https://doi.org/10.1183/09031936.00202013>
- Coretti, L., Paparo, L., Riccio, M.P., Amato, F., Cuomo, M., Natale, A., Borrelli, L., Corrado, G., De Caro, C., Comegna, M., Buommino, E., Castaldo, G., Bravaccio, C., Chiariotti, L., Berni Canani, R., Lembo, F., 2018. Gut Microbiota Features in Young Children With

- Autism Spectrum Disorders. *Front. Microbiol.* 9, 3146. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03146>
- Driver, A.G., Kukoly, C.A., Ali, S., Mustafa, S.J., 1993. Adenosine in Bronchoalveolar Lavage Fluid in Asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148, 91–97. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/148.1.91>
- Escudíe, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., Käller, M., 2016. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* 32, 3047–3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Global Initiative for Asthma, 2022. Global strategy for asthma management and prevention.
- Green, B.J., Wiriyaichaiorn, S., Grainge, C., Rogers, G.B., Kehagia, V., Lau, L., Carroll, M.P., Bruce, K.D., Howarth, P.H., 2014. Potentially Pathogenic Airway Bacteria and Neutrophilic Inflammation in Treatment Resistant Severe Asthma. *PLoS ONE* 9, e100645. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100645>
- Guarnieri, C., Georgountzos, A., Caldarera, I., Flamigni, F., Ligabue, A., 1987. Polyamines stimulate superoxide production in human neutrophils activated by N-fMet-Leu-Phe but not by phorbol myristate acetate. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 930, 135–139. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(87\)90024-3](https://doi.org/10.1016/0167-4889(87)90024-3)
- Haktanir Abul, M., Phipatanakul, W., 2019. Severe asthma in children: Evaluation and management. *Allergol. Int.* 68, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2018.11.007>
- Hartmann, J.E., Albrich, W.C., Dmitrijeva, M., Kahlert, C.R., 2021. The Effects of Corticosteroids on the Respiratory Microbiome: A Systematic Review. *Front. Med.* 8, 588584. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.588584>
- Hilty, M., Burke, C., Pedro, H., Cardenas, P., Bush, A., Bossley, C., Davies, J., Ervine, A., Poulter, L., Pachter, L., Moffatt, M.F., Cookson, W.O.C., 2010. Disordered Microbial Communities in Asthmatic Airways. *PLoS ONE* 5, e8578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008578>
- Huang, C., Li, Y., Feng, X., Li, D., Li, X., Ouyang, Q., Dai, W., Wu, G., Zhou, Q., Wang, P., Zhou, K., Xu, X., Li, S., Peng, Y., 2019. Distinct Gut Microbiota Composition and Functional Category in Children With Cerebral Palsy and Epilepsy. *Front. Pediatr.* 7, 394. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00394>
- Huang, C., Ni, Y., Du, W., Shi, G., 2022. Effect of inhaled corticosteroids on microbiome and microbial correlations in asthma over a 9-month period. *Clin. Transl. Sci.* 15, 1723–1736. <https://doi.org/10.1111/cts.13288>
- Ilmarinen, P., Moilanen, E., Erjefält, J.S., Kankaanranta, H., 2015. The polyamine spermine promotes survival and activation of human eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 136, 482–484.e11. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.12.1922>
- Imbert, A., Rompais, M., Selloum, M., Castelli, F., Mouton-Barbosa, E., Brandolini-Bunlon, M., Chu-Van, E., Joly, C., Hirschler, A., Roger, P., Burger, T., Leblanc, S., Sorg, T., Ouzia, S., Vandenbrouck, Y., Médigue, C., Junot, C., Ferro, M., Pujos-Guillot, E., de Peredo, A.G., Fenaille, F., Carapito, C., Herault, Y., Thévenot, E.A., 2021. ProMetIS, deep phenotyping of mouse models by combined proteomics and metabolomics analysis. *Sci. Data* 8, 311. <https://doi.org/10.1038/s41597-021-01095-3>
- Jain, V., Raina, S., Gheware, A.P., Singh, R., Rehman, R., Negi, V., Murray Stewart, T., Mabalirajan, U., Mishra, A.K., Casero, R.A., Agrawal, A., Ghosh, B., 2018. Reduction in polyamine catabolism leads to spermine-mediated airway epithelial injury and induces asthma features. *Allergy* 73, 2033–2045. <https://doi.org/10.1111/all.13472>
- Jones, K.P., Edwards, J.H., Reynolds, S.P., Peters, T.J., Davies, B.H., n.d. A comparison of albumin and urea as reference markers in bronchoalveolar lavage fluid from patients with interstitial lung disease 5.

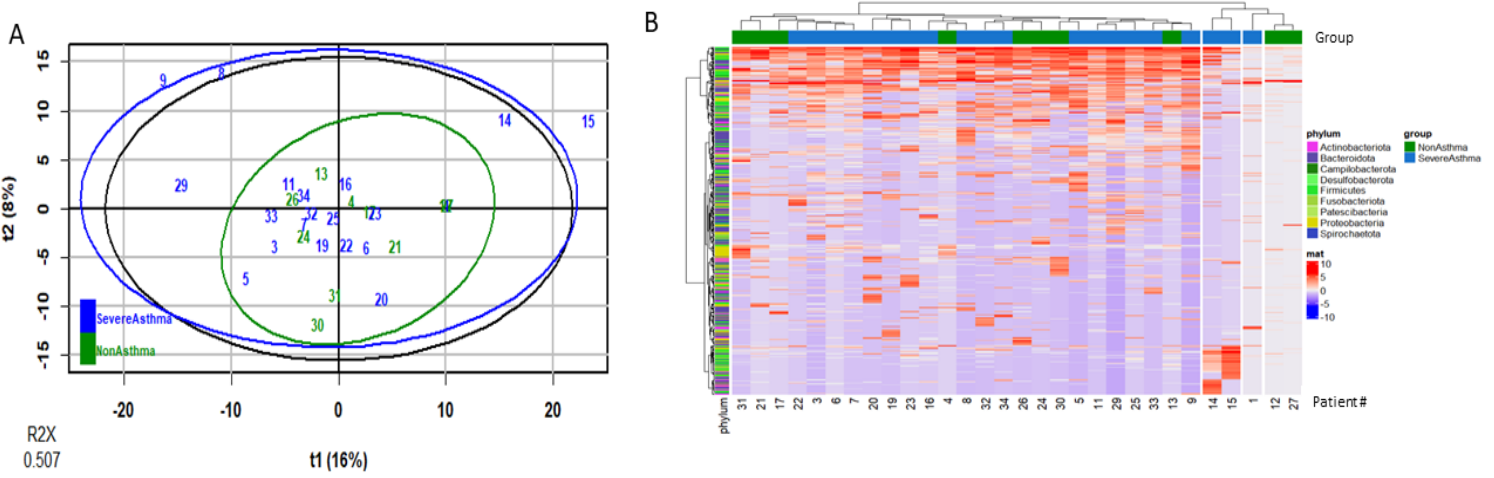
- Kurosawa, M., Shimizu, Y., Tsukagoshi, H., Ueki, M., 1992. Elevated levels of peripheral blood, naturally occurring aliphatic polyamines in bronchial asthmatic patients with active symptoms. *Allergy* 47, 638–643.
- Kuruwilla, M.E., Lee, F.E.-H., Lee, G.B., 2019. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 56, 219–233. <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8712-1>
- Lezmi, G., Abou-Taam, R., Garcelon, N., Dietrich, C., Machavoine, F., Delacourt, C., Adel-Patient, K., Leite-de-Moraes, M., 2019. Evidence for a MAIT-17–high phenotype in children with severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 144, 1714–1716.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.08.003>
- Lezmi, G., de Blic, J., 2018. Assessment of airway inflammation and remodeling in children with severe asthma: The next challenge. *Pediatr. Pulmonol.* 53, 1171–1173. <https://doi.org/10.1002/ppul.24051>
- Lezmi, G., Gosset, P., Deschildre, A., Abou-Taam, R., Mahut, B., Beydon, N., de Blic, J., 2015. Airway Remodeling in Preschool Children with Severe Recurrent Wheeze. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 192, 164–171. <https://doi.org/10.1164/rccm.201411-1958OC>
- Liang, L., Hu, M., Chen, Y., Liu, L., Wu, L., Hang, C., Luo, X., Xu, X., 2022. Metabolomics of bronchoalveolar lavage in children with persistent wheezing. *Respir. Res.* 23, 161. <https://doi.org/10.1186/s12931-022-02087-6>
- Mata-Garrido, J., Xiang, Y., Chang-Marchand, Y., Reisacher, C., Ageron, E., Guerrero, I.C., Casafont, I., Bruneau, A., Cherbuy, C., Treton, X., Dumay, A., Ogier-Denis, E., Batsché, E., Costallat, M., Revêchon, G., Eriksson, M., Muchardt, C., Arbibe, L., 2022. The Heterochromatin protein 1 is a regulator in RNA splicing precision deficient in ulcerative colitis. *Nat. Commun.* 13, 6834. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34556-3>
- Mathieu, E., Escribano-Vazquez, U., Descamps, D., Cherbuy, C., Langella, P., Riffault, S., Remot, A., Thomas, M., 2018. Paradigms of Lung Microbiota Functions in Health and Disease, Particularly, in Asthma. *Front. Physiol.* 9, 1168. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01168>
- Mathieu, E., Marquant, Q., Descamps, D., Riffault, S., Saint-Criq, V., Thomas, M., 2021. Le poumon est sensible aux effets locaux et à distance des microbiotes. *Nutr. Clin. Métabolisme* 35, 242–252. <https://doi.org/10.1016/j.nupar.2021.04.002>
- McCauley, K., Durack, J., Valladares, R., Fadrosch, D.W., Lin, D.L., Calatroni, A., LeBeau, P.K., Tran, H.T., Fujimura, K.E., LaMere, B., Merana, G., Lynch, K., Cohen, R.T., Pongratic, J., Khurana Hershey, G.K., Kerckmar, C.M., Gill, M., Liu, A.H., Kim, H., Kattan, M., Teach, S.J., Togias, A., Boushey, H.A., Gern, J.E., Jackson, D.J., Lynch, S.V., 2019. Distinct nasal airway bacterial microbiotas differentially relate to exacerbation in pediatric patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 144, 1187–1197. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.05.035>
- North, M.L., Grasmann, H., Khanna, N., Inman, M.D., Gauvreau, G.M., Scott, J.A., 2013. Increased Ornithine-Derived Polyamines Cause Airway Hyperresponsiveness in a Mouse Model of Asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 48, 694–702. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0323OC>
- Ntontsi, P., Ntzoumanika, V., Loukides, S., Benaki, D., Gkikas, E., Mikros, E., Bakakos, P., 2020. EBC metabolomics for asthma severity. *J. Breath Res.* 14, 036007. <https://doi.org/10.1088/1752-7163/ab9220>
- Pang, Z., Zhou, G., Ewald, J., Chang, L., Hacariz, O., Basu, N., Xia, J., 2022. Using MetaboAnalyst 5.0 for LC–HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. *Nat. Protoc.* 17, 1735–1761. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00710-w>
- Penders, J., Stobberingh, E.E., Brandt, P.A. van den, Thijs, C., 2007. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy* 62, 1223–1236. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2007.01462.x>



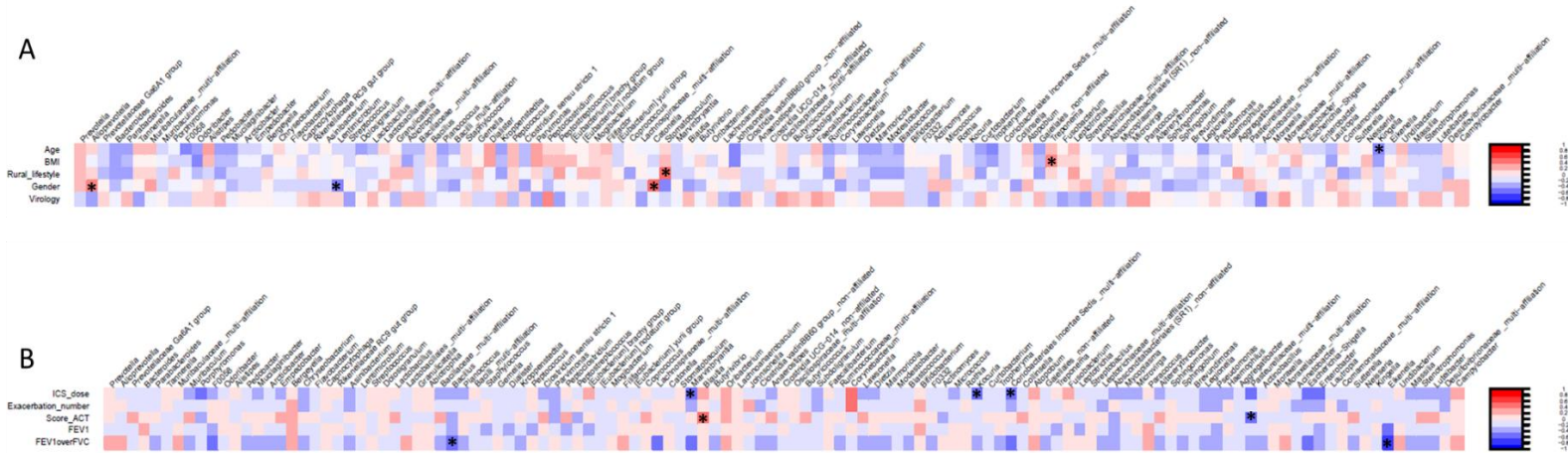
- Ray, A., Das, J., Wenzel, S.E., 2022. Determining asthma endotypes and outcomes: Complementing existing clinical practice with modern machine learning. *Cell Rep. Med.* 3, 100857. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100857>
- Reinke, S.N., Gallart-Ayala, H., Gómez, C., Checa, A., Fauland, A., Naz, S., Kamleh, M.A., Djukanović, R., Hinks, T.S.C., Wheelock, C.E., 2017. Metabolomics analysis identifies different metabolotypes of asthma severity. *Eur. Respir. J.* 49, 1601740. <https://doi.org/10.1183/13993003.01740-2016>
- Remot, A., Descamps, D., Noordine, M.-L., Boukadiri, A., Mathieu, E., Robert, V., Riffault, S., Lambrecht, B., Langella, P., Hammad, H., Thomas, M., 2017. Bacteria isolated from lung modulate asthma susceptibility in mice. *ISME J.* 11, 1061–1074. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.181>
- Roux, A., Xu, Y., Heilier, J.-F., Olivier, M.-F., Ezan, E., Tabet, J.-C., Junot, C., 2012. Annotation of the Human Adult Urinary Metabolome and Metabolite Identification Using Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled to a Linear Quadrupole Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* 84, 6429–6437. <https://doi.org/10.1021/ac300829f>
- Saint-Criq, V., Lugo-Villarino, G., Thomas, M., 2021. Dysbiosis, malnutrition and enhanced gut-lung axis contribute to age-related respiratory diseases. *Ageing Res. Rev.* 66, 101235. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101235>
- Simpson, J.L., Daly, J., Baines, K.J., Yang, I.A., Upham, J.W., Reynolds, P.N., Hodge, S., James, A.L., Hugenholtz, P., Willner, D., Gibson, P.G., 2016. Airway dysbiosis: *Haemophilus influenzae* and *Tropheryma* in poorly controlled asthma. *Eur. Respir. J.* 47, 792–800. <https://doi.org/10.1183/13993003.00405-2015>
- Smith, C.A., Want, E.J., O'Maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G., 2006. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Anal. Chem.* 78, 779–787. <https://doi.org/10.1021/ac051437y>
- Sumner, L.W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M.H., Beger, R., Daykin, C.A., Fan, T.W.-M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J.L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A.N., Lindon, J.C., Marriott, P., Nicholls, A.W., Reily, M.D., Thaden, J.J., Viant, M.R., 2007. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* 3, 211–221. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>
- Taylor, S.L., Leong, L.E.X., Choo, J.M., Wesselingh, S., Yang, I.A., Upham, J.W., Reynolds, P.N., Hodge, S., James, A.L., Jenkins, C., Peters, M.J., Baraket, M., Marks, G.B., Gibson, P.G., Simpson, J.L., Rogers, G.B., 2018. Inflammatory phenotypes in patients with severe asthma are associated with distinct airway microbiology. *J. Allergy Clin. Immunol.* 141, 94-103.e15. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.03.044>
- Thévenot, E.A., Roux, A., Xu, Y., Ezan, E., Junot, C., 2015. Analysis of the Human Adult Urinary Metabolome Variations with Age, Body Mass Index, and Gender by Implementing a Comprehensive Workflow for Univariate and OPLS Statistical Analyses. *J. Proteome Res.* 14, 3322–3335. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00354>
- Ward, C., Duddridge, M., Fenwick, J., Gardiner, P.V., Fleetwood, A., Hendrick, D.J., Walters, E.H., 1993. Evaluation of albumin as a reference marker of dilution in bronchoalveolar lavage fluid from asthmatic and control subjects. *Thorax* 48, 518–522. <https://doi.org/10.1136/thx.48.5.518>
- Wilson, C.N., Nadeem, A., Spina, D., Brown, R., Page, C.P., Mustafa, S.J., 2009. Adenosine Receptors and Asthma, in: Wilson, C.N., Mustafa, S.J. (Eds.), *Adenosine Receptors in Health and Disease, Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 329–362. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-89615-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-540-89615-9_11)
- Wisniewski, J.A., Muehling, L.M., Eccles, J.D., Capaldo, B.J., Agrawal, R., Shirley, D.-A., Patrie, J.T., Workman, L.J., Schuyler, A.J., Lawrence, M.G., Teague, W.G., Woodfolk, J.A., 2018. TH1 signatures are present in the lower airways of children with severe

- asthma, regardless of allergic status. *J. Allergy Clin. Immunol.* 141, 2048-2060.e13. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.020>
- Yin, J., Liao, S.-X., He, Y., Wang, S., Xia, G.-H., Liu, F.-T., Zhu, J.-J., You, C., Chen, Q., Zhou, L., Pan, S.-Y., Zhou, H.-W., 2015. Dysbiosis of Gut Microbiota With Reduced Trimethylamine-N-Oxide Level in Patients With Large-Artery Atherosclerotic Stroke or Transient Ischemic Attack. *J. Am. Heart Assoc.* 4. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002699>
- Ying, L., Yan, G.X., Chun, C., Xu, Z., Juan, W., Ting, L.T., n.d. Metabolomic Profiling Differences among Asthma, COPD, and Healthy Subjects: A LC-MS-based Metabolomic Analysis. *Biomed Env. Sci.*
- Zhang, Q., Illing, R., Hui, C.K., Downey, K., Carr, D., Stearn, M., Alshafi, K., Menzies-Gow, A., Zhong, N., Fan Chung, K., 2012. Bacteria in sputum of stable severe asthma and increased airway wall thickness. *Respir. Res.* 13, 35. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-13-35>
- Zhou, Y., Jackson, D., Bacharier, L.B., Mager, D., Boushey, H., Castro, M., Durack, J., Huang, Y., Lemanske, R.F., Storch, G.A., Weinstock, G.M., Wylie, K., Covar, R., Fitzpatrick, A.M., Phipatanakul, W., Robison, R.G., Beigelman, A., 2019. The upper-airway microbiota and loss of asthma control among asthmatic children. *Nat. Commun.* 10, 5714. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13698-x>

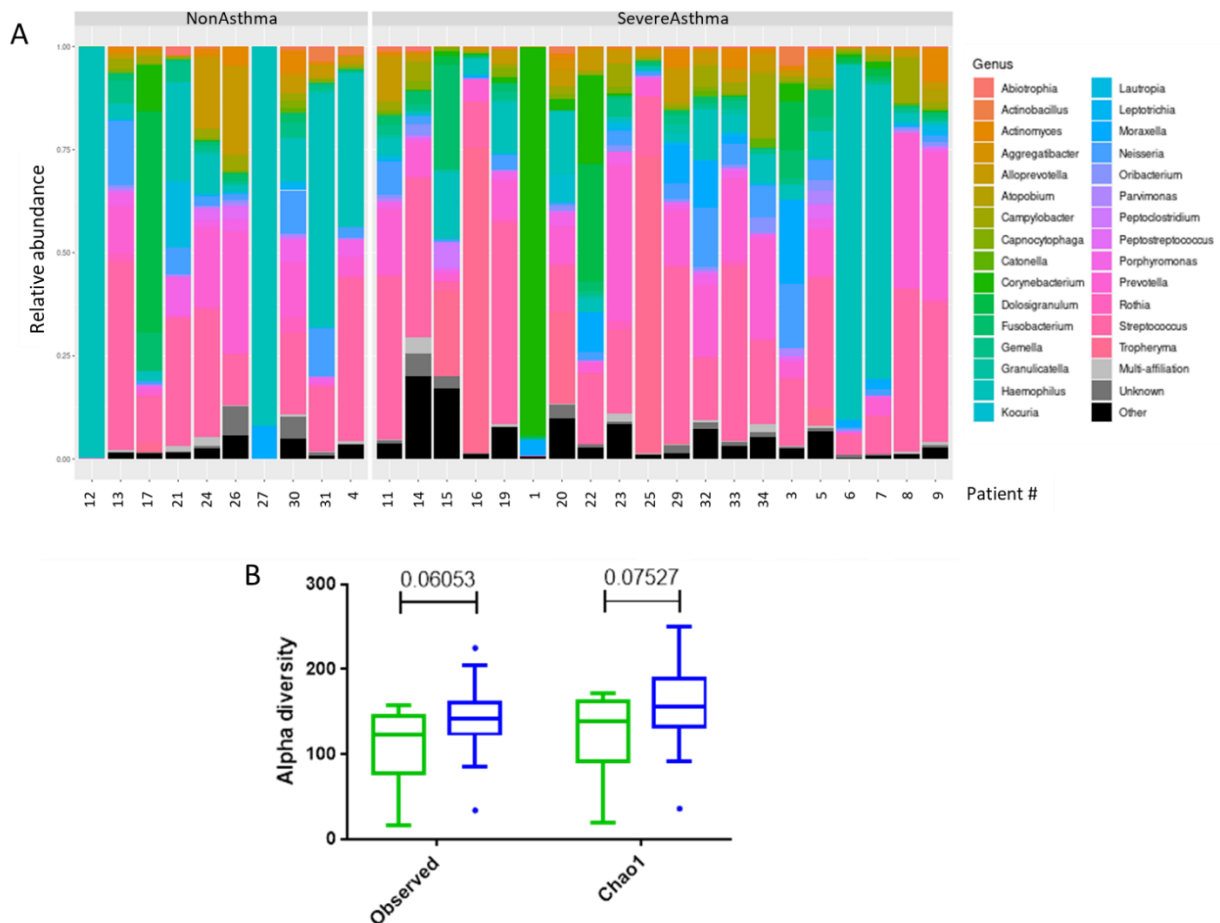
# Figures



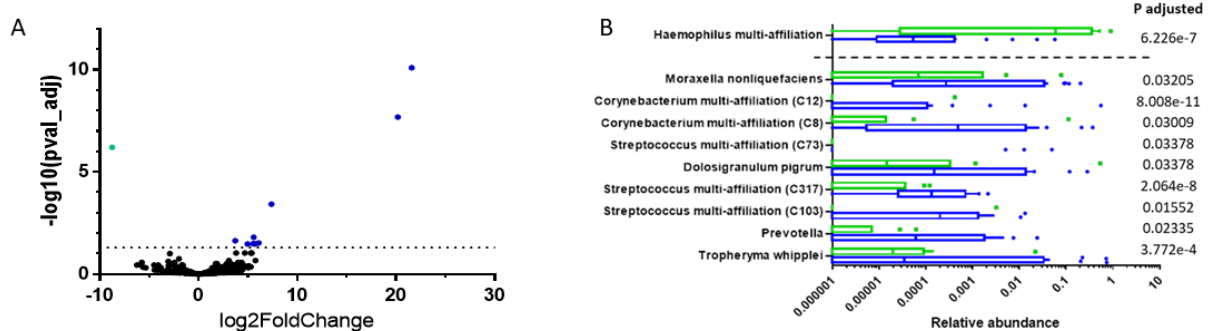
**Figure 1:** **A.** Graph of individuals on the first two dimensions of non-supervised PCA constructed with OTU dataset, representing 24% of the total variance. 95% confidence ellipses based on Mahalanobis distance are represented in blue for SA data, and in green for NA data. Black circle correspond to correlation circle. **B.** Unsupervised hierarchical agglomerative clustering (HAC, Pearson correlation distance and Ward.D2 linkage). Columns represent individuals, with group indicated by colors (green: NA and blue: SA) and rows represent OTUs coloured by phylum.



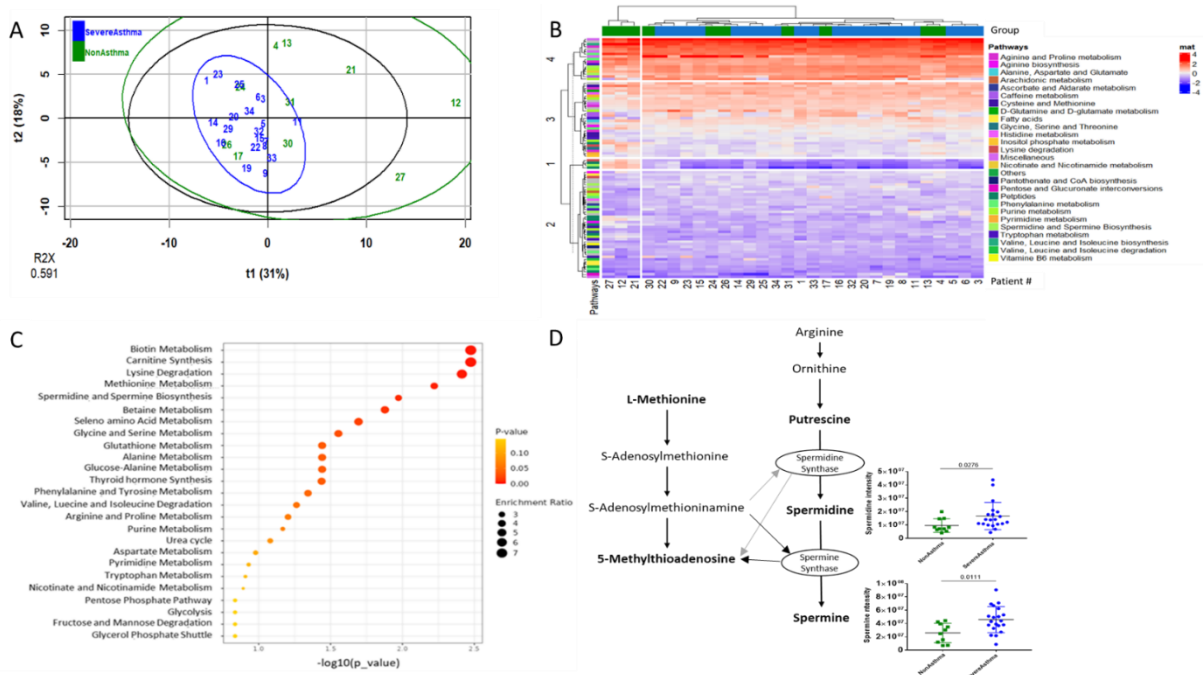
**Figure 2:** Correlogram representing correlation between genus abundances and **A.** clinical data associated with asthma, or **B.** demographic data. ACT: Asthma Control Test; BMI: Body Mass Index; FEV<sub>1</sub>: Forced Expiratory Volume in the first second; FVC: Forced Vital Capacity; ICS: Inhaled corticosteroid. \*correspond to p value < 0.01.



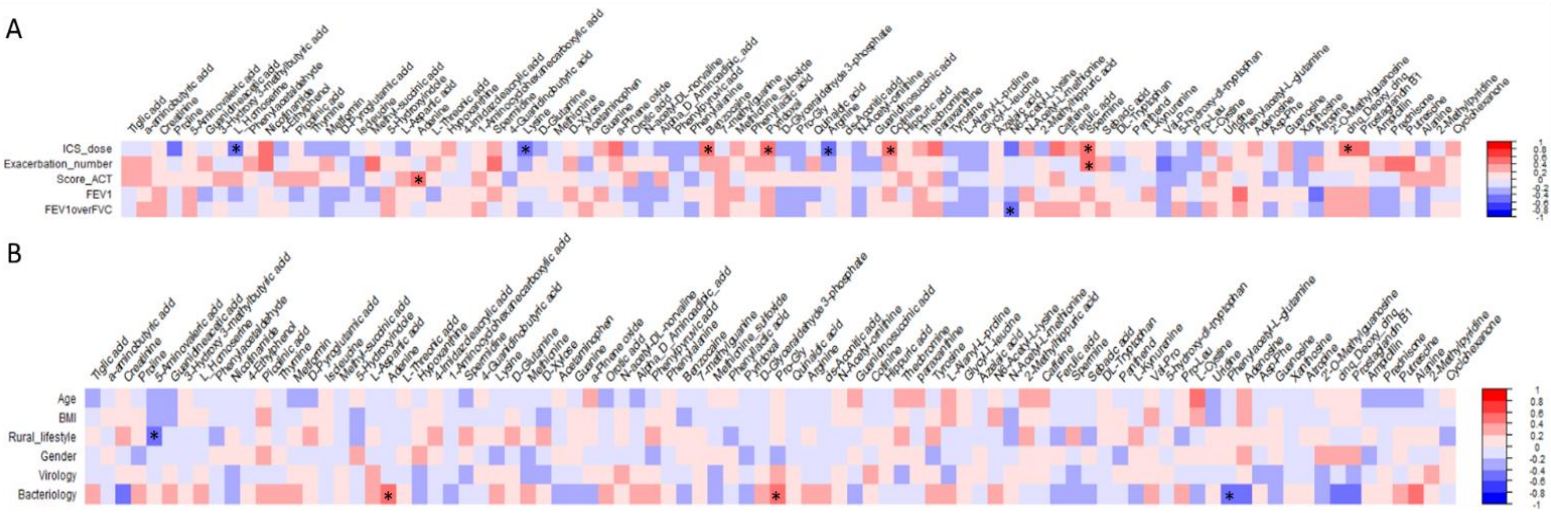
**Figure 3:** **A.** Stacked bar graph showing taxonomic composition at the genus level for each individual sample, expressed as a proportion of total reads. Sample ID is on the x-axis. The top 30 genera with the highest average relative abundance are shown. Samples are stratified by asthma status. **B.** Box plots of microbiota alpha diversity values distribution for both indices (Observed and Chao1 diversity) in BALs from non asthmatics (NA, green bars) and of the severe asthmatics (SA, blue bars). Outliers are shown as dots.



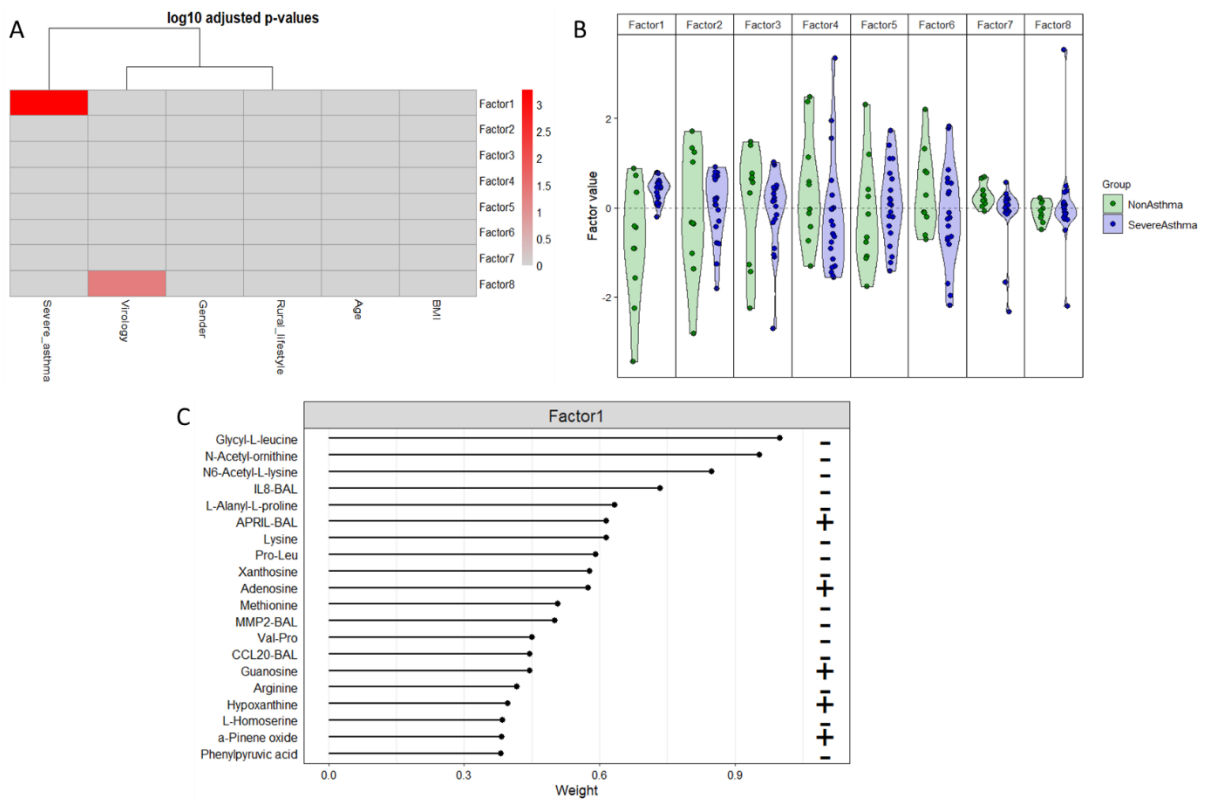
**Figure 4:** **(A)** Differential univariate analysis on the whole OTU dataset, presented by Volcano Plot for the comparison between SA and NA. Plot represents statistical significance (P-value)  $\times$  magnitude of change (fold change). P-values were corrected with Benjamini-Hochberg (BH) method and considered significant for  $p < 0.05$ . Blue points correspond to OTUs significantly more abundant in BALs from SA than in NA, and green point OTUs significantly more abundant in BALs from NA than in SA. **(B)** Significantly different genera or species abundances in BALs from NA (green bars) and SA (blue bars) patients, represented as box plot. P-values were corrected with BH method.



**Figure 5A.** Graph of individuals on the first two dimensions of non-supervised PCA constructed with all annotated metabolites dataset, representing 49% of the total variance. 95% confidence ellipses based on Mahalanobis distance are represented in blue for severe asthmatics data, and in green for non-asthmatics data. Black circle corresponds to correlation circle. **B.** Unsupervised HAC (Pearson correlation distance and Ward.D2 linkage). Columns represent individuals (green: non asthmatics; blue: severe asthmatics) and rows represent metabolites (coloured by metabolic pathways). **C.** Metabolite Set Enrichment Analysis results (top 25) from the analysis of metabolites mapped in KEGG human metabolic pathways and significantly altered by severe asthma (Pathway enrichment analysis, MetaboAnalyst 5.0). The size of the circles per metabolite set represents the Enrichment Ratio and the color represents the p-value. **D.** Spermidine and spermine biosynthesis pathway. Metabolites in bold were detected and annotated in our analysis. Comparison of metabolites intensity, involved in pathways, in non-asthmatic (green) and severe asthmatic (blue) patients. P-values were calculated with Mann-Whitney tests (no correction for multiple testing).



**Figure 6:** Correlogram representing correlation between metabolites intensities and **A.** clinical data link to the pathology, or **B.** demographic data. ACT: Asthma Control Test; BMI: Body Mass Index; FEV<sub>1</sub>: Forced Expiratory Volume in the first second; FVC: Forced Vital Capacity; ICS: Inhaled corticosteroid. \*correspond to p value < 0.01.



**Figure 7: A.** Association of factors, identified with Multi-Omic Factor Analysis (MOFA), and clinical and demographic data. Only association with p-value adjusted  $<0.05$  are represented. The color key bar indicates the log (p-value) of the correlation analysis. BMI: Body Mass Index. **B.** Values of the eight latent factors grouped and coloured by cell type and coloured by asthma pathology. Green points represent non asthmatics and blue points severe asthmatics. As the data is centered prior to running MOFA, each Factor ordiates along a one-dimensional axis that is centered to zero. **C.** Absolute weights of the top 20 features of Factor1. The weights provide a score for each feature on Factor1 construction. The sign of the weights indicates the direction of the effect. Features with no association with the corresponding factor are expected to have values close to zero, whereas features with strong association with the factor are expected to have higher absolute values, close to 1. The sign of the weights indicates the direction of the effect: a positive weights indicates that the feature has higher levels in the BALs of patients with positive factor values, and vice-versa. Pro-Leu: L-prolyl-L-leucine; Val-Pro: valyl-proline.

## Supplementary data

**Table 1:** List of external standards used for LC-HRMS analysis (with C18 column).

Compound	Elemental formula	Accurate Mass	Retention time (min)
Alanine <sup>13</sup> C	<sup>13</sup> C <sub>1</sub> <sup>12</sup> C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> N O <sub>2</sub>	90.05103	0.88
Metformin	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub>	129.10145	0.83
Aspartate <sup>15</sup> N	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> <sup>15</sup> N <sub>1</sub> O <sub>4</sub>	134.03454	0.81
Glucose <sup>13</sup> C	<sup>13</sup> C <sub>1</sub> <sup>12</sup> C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	181.06674	0.85
2-Aminoanthracene	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> N	193.08915	8.05
Amiloride	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> Cl N <sub>7</sub> O	229.04789	3.1
Imipramine	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub>	280.19395	7.5
Atropine	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> N O <sub>3</sub>	289.16779	5.2
Prednisone	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	358.17802	6.75 and 7.00
Colchicine	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N O <sub>6</sub>	399.16819	6.44
Dihydrostreptomycin	C <sub>21</sub> H <sub>41</sub> N <sub>7</sub> O <sub>12</sub>	583.28132	0.72
Roxithromycin	C <sub>29</sub> H <sub>54</sub> O <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	590.37784	5.87 and 6.08



**Table 2:** Annotations, mass to charge ratio (mz), retention time (rt), KEGG identifier and class of annotated metabolites. NA: not applicable.

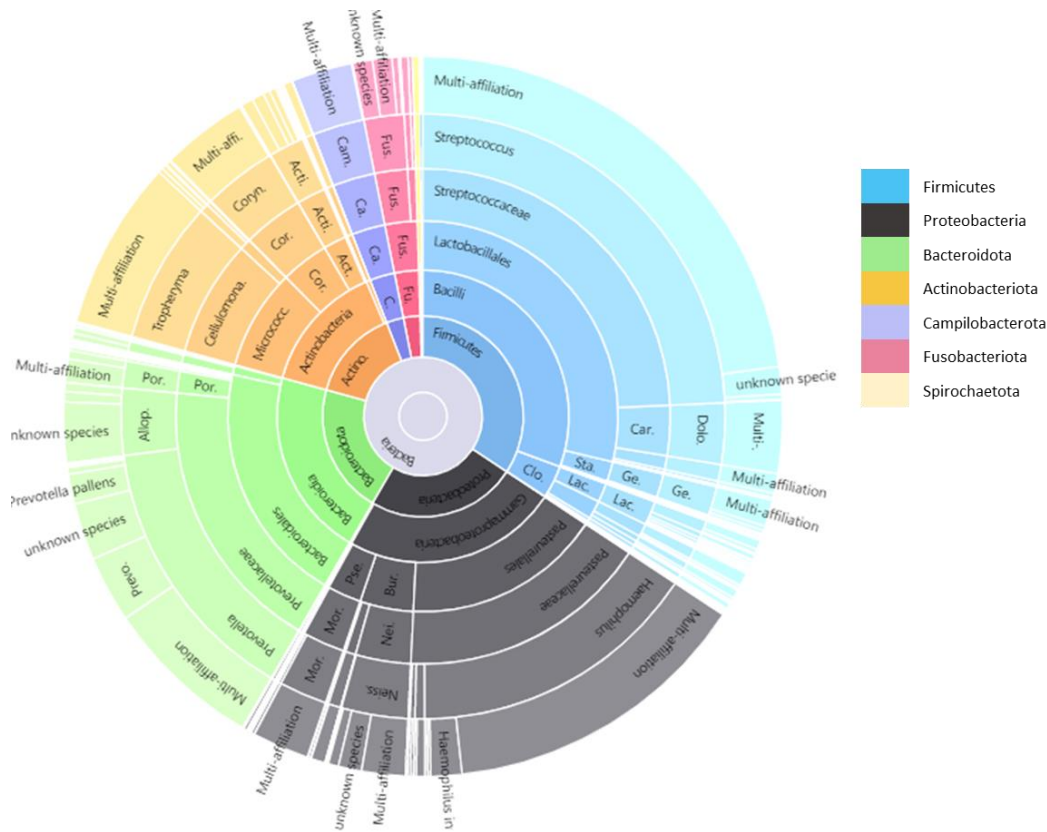
annotation	mz	rt (min)	kegg_id	Class
Metformin	130.1087	0.7562	C07151	Aliphatic Acyclic Compounds
Panthenol	206.1388	2.3827	C05944	Aliphatic Acyclic Compounds
Putrescine	89.1072	0.6368	C00134	Aliphatic Acyclic Compounds
Spermidine	146.1652	0.6185	C00315	Aliphatic Acyclic Compounds
Spermine	203.2231	0.6188	C00750	Aliphatic Acyclic Compounds
Creatinine	114.0661	0.7658	C00791	Aliphatic Heteromonocyclic Compounds
D-Pyroglutamic acid	130.0499	1.0120	C02237	Aliphatic Heteromonocyclic Compounds
Cyclohexanone	99.0804	1.8012	C00414	Aliphatic Homomonocyclic Compounds
Cotinine	177.1023	1.0310	NA	Alkaloids and Derivatives
1-Aminocyclohexanecarboxylic acid	144.1018	0.7870	NA	Amino Acids, Peptides, and Analogues
2-Methylhippuric acid	194.0812	5.5215	C01586	Amino Acids, Peptides, and Analogues
4-Guanidinobutyric acid	146.0924	0.8748	C01035	Amino Acids, Peptides, and Analogues
5-Aminovaleric acid	118.0862	0.7565	C00431	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Alanine	90.0549	0.7662	C00041	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Alpha-D-Aminoadipic acid	162.0761	0.5870	C00956	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Arginine	175.1190	0.7445	C00062	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Asp-Phe	281.1131	4.1367	NA	Amino Acids, Peptides, and Analogues
D-Glutamine	147.0764	0.7585	C00819	Amino Acids, Peptides, and Analogues
DL-Tryptophan	205.0972	4.0113	C00806	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Glycyl-L-leucine	189.1234	2.5380	C02155	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Guanidineacetic acid	118.0610	0.8802	C00581	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Guanidinosuccinic acid	176.0658	1.2850	C03139	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Hippuric acid	180.0655	4.6430	C01586	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Isoleucine	132.1018	1.2892	C00407	Amino Acids, Peptides, and Analogues
L-Alanyl-L-proline	187.1077	0.9667	NA	Amino Acids, Peptides, and Analogues
L-Aspartic acid	134.0447	0.7715	C00049	Amino Acids, Peptides, and Analogues
L-Cystine	241.0293	0.7627	C00491	Amino Acids, Peptides, and Analogues
L-Homoserine	120.0655	0.7640	C00263	Amino Acids, Peptides, and Analogues
L-Kynurenine	209.0921	2.0483	C00328	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Lysine	147.1128	0.6418	C00047	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Methionine	150.0584	0.9713	C00073	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Methionine sulfoxide	166.0533	0.9733	NA	Amino Acids, Peptides, and Analogues
N6-Acetyl-L-lysine	189.1233	0.8495	C02727	Amino Acids, Peptides, and Analogues
N-Acetyl-L-methionine	192.0689	4.0307	C02712	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Orotic acid	157.0238	0.7653	C00295	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Phenylacetyl-L-glutamine	265.1182	4.7642	C04148	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Phenylalanine	166.0863	2.0258	C00079	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Picolinic acid	124.0393	0.8885	C10164	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Pro-Gly (prolyglycine)	173.0921	0.8893	NA	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Pro-Leu/Leu-Pro	229.1547	4.0665	NA	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Proline	116.0705	0.7673	C00148	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Quinaldic acid	174.0547	4.9225	C06325	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Tyrosine	182.0812	1.1077	C00082	Amino Acids, Peptides, and Analogues
Val-Pro	215.1391	1.6745	NA	Amino Acids, Peptides, and Analogues
γ-aminobutyric acid	104.0705	0.7930	C00334	Amino Acids, Peptides, and Analogues

annotation	mz	rt (min)	kegg_id	Class
4-Imidazoleacrylic acid (urocanic acid)	139.0502	0.9810	C00785	Aromatic Heteromonocyclic Compounds
Nicotinamide	123.0552	0.9268	C00153	Aromatic Heteromonocyclic Compounds
Pyridoxal	168.0655	0.8877	C00250	Aromatic Heteromonocyclic Compounds
Thymine	127.0502	1.3772	C00178	Aromatic Heteromonocyclic Compounds
7-methylguanine	166.0724	0.9395	C02242	Aromatic Heteropolycyclic Compounds
Adenine	136.0618	0.8110	C00147	Aromatic Heteropolycyclic Compounds
Ampicillin	350.1167	4.9230	C06574	Aromatic Heteropolycyclic Compounds
Atropine	290.1748	5.3213	C01479	Aromatic Heteropolycyclic Compounds
Caffeine	195.0877	4.6308	C07481	Aromatic Heteropolycyclic Compounds
Guanine	152.0566	1.1378	C00242	Aromatic Heteropolycyclic Compounds
Hypoxanthine	137.0457	1.1525	C00262	Aromatic Heteropolycyclic Compounds
paraxanthine	181.0720	3.8013	C13747	Aromatic Heteropolycyclic Compounds
Theobromine	181.0720	2.5580	C07480	Aromatic Heteropolycyclic Compounds
2-Methylpyridine (2-Picoline)	94.0650	0.9313	C00292	Aromatic Homomonocyclic Compounds
4-Ethylphenol	123.0804	0.9798	C13637	Aromatic Homomonocyclic Compounds
Acetaminophen (4-Acetamidophenol)	152.0705	2.8232	NA	Aromatic Homomonocyclic Compounds
Benzocaine	166.0863	6.8862	C07527	Aromatic Homomonocyclic Compounds
Ferulic acid	195.0653	6.7078	C01494	Aromatic Homomonocyclic Compounds
Phenylacetaldehyde	121.0648	4.1652	C00601	Aromatic Homomonocyclic Compounds
Phenyllactic acid	167.0703	5.3517	C01479	Aromatic Homomonocyclic Compounds
Phenylpyruvic acid	165.0547	1.1077	C00166	Aromatic Homomonocyclic Compounds
D-Xylose	151.0615	1.4137	C00181	Carbohydrates and Carbohydrate Conjugates
$\alpha$ -Pinene oxide	153.1274	5.5515	C02759	Lipids
Prednisone	359.1851	7.0008	C07370	Lipids
Prostaglandin B1	337.2347	9.6248	C00959	Lipids
Tiglic acid	101.0596	0.8010	C08279	Lipids
5-hydroxy-dl-tryptophan	221.0921	1.4583	NA	NA
5-Hydroxyindole	134.0600	5.5623	NA	NA
L-Threonic acid	137.0455	3.4257	NA	NA
N-acetyl-DL-norvaline	160.0968	5.1180	NA	NA
N-Acetyl-ornithine	175.1078	1.2543	NA	NA
2'-O-Methylguanosine	298.1146	1.7325	NA	Nucleosides, Nucleotides, and Analogues
5'-Deoxy-5'-(methylthio)adenosine	298.0968	3.8993	C00170	Nucleosides, Nucleotides, and Analogues
Adenosine	268.1039	1.0535	C00212	Nucleosides, Nucleotides, and Analogues
Guanosine	284.0989	1.1383	C00387	Nucleosides, Nucleotides, and Analogues
Uridine	245.0768	0.9950	C00299	Nucleosides, Nucleotides, and Analogues
Xanthosine	285.0829	1.4068	C01762	Nucleosides, Nucleotides, and Analogues
3-Hydroxy 3-methylbutyric acid	119.0703	1.8138	NA	Organic Acids and Derivatives
Azelaic acid	189.1121	6.2617	C08261	Organic Acids and Derivatives
cis-Aconitic acid	175.0227	0.9767	C00417	Organic Acids and Derivatives
Methyl-succinic acid	133.0496	2.5840	C08645	Organic Acids and Derivatives
Sebacic acid	203.1278	6.8965	C08277	Organic Acids and Derivatives
D-Glyceraldehyde 3-phosphate	171.0057	0.6190	C00661	Organophosphorus Compounds

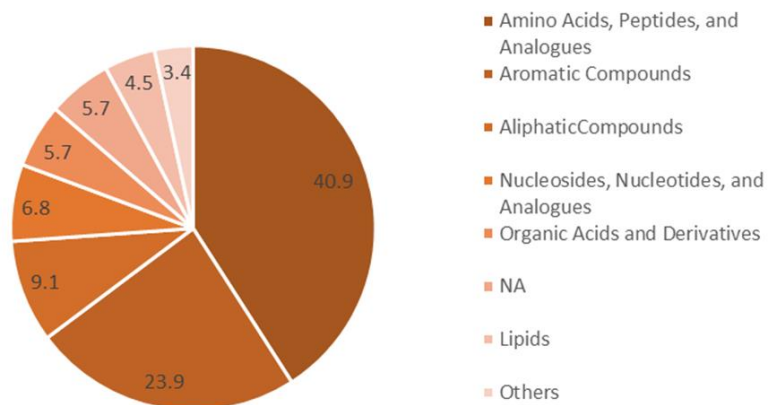
**Table 3:** Enriched metabolic pathways identified through Metabolite Set Enrichment Analysis (MSEA, *p* value after FDR correction < 0.1). Holm–Bonferroni method *p* values are also indicated.

Metabolite Set	Total	Hits	Statistic	Expected	P value	Holm P	FDR
Biotin Metabolism	8	1	26.863	3.4483	0.0033462	0.13385	0.051411
Carnitine Synthesis	22	1	26.863	3.4483	0.0033462	0.13385	0.051411
Lysine Degradation	30	2	22.799	3.4483	0.0038558	0.14652	0.051411
Methionine Metabolism	43	7	12.896	3.4483	0.006008	0.2223	0.06008
Spermidine and Spermine Biosynthesis	18	5	11.58	3.4483	0.010654	0.38355	0.085233

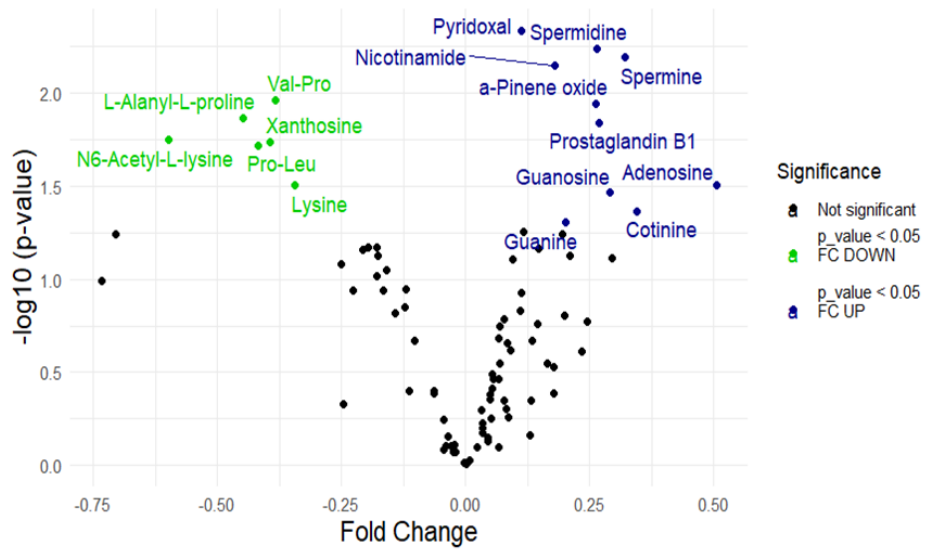
## Supplementary figures titles



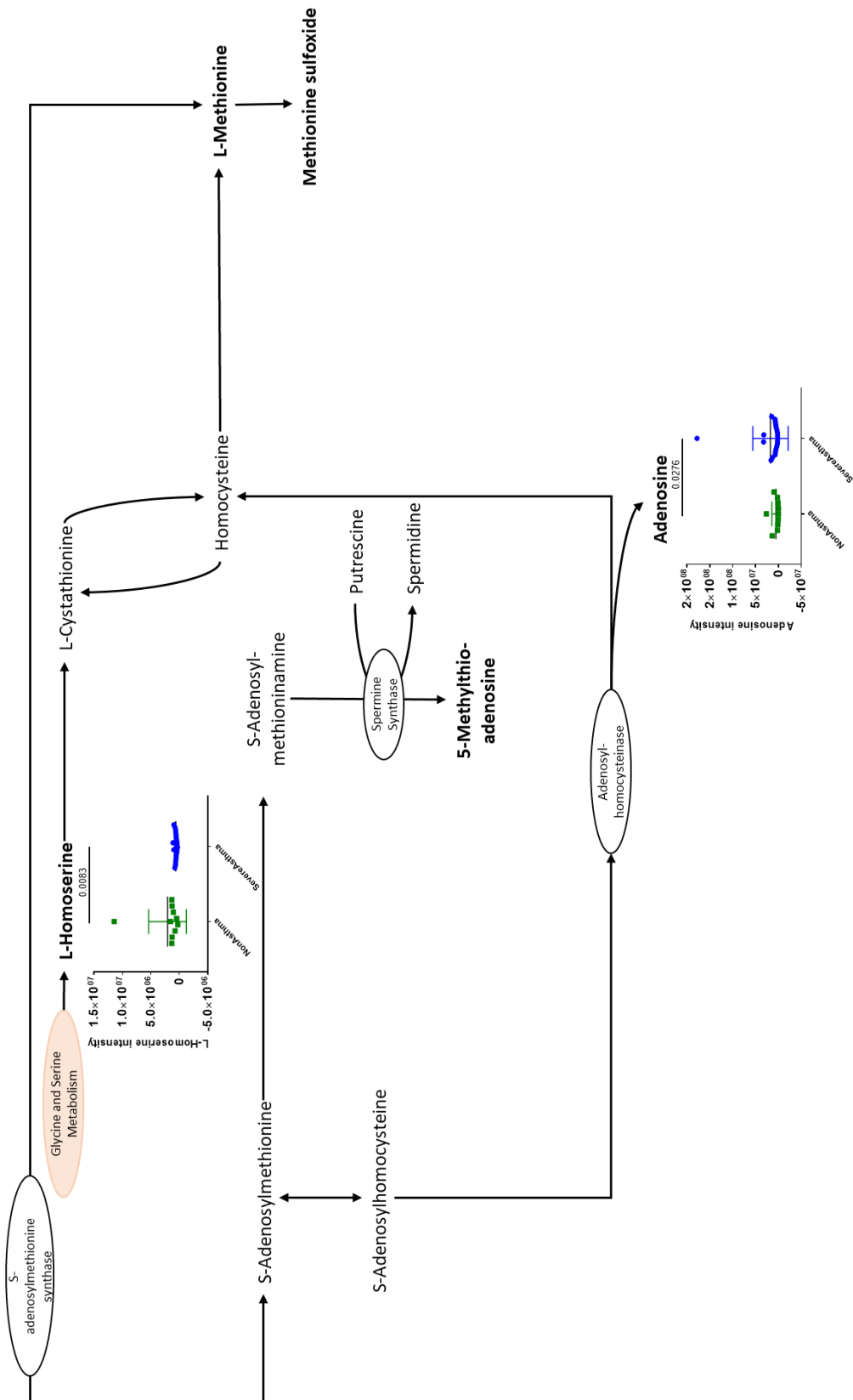
**Figure 1:** Global distribution of OTUs detected in BALs from SA and NA children. Car: Carnobacteriaceae; Dolo: Dolosigranulum; Sta: Staphylococcales; Ge: Gemellaceae (Gemella); Clo: Clostridia; Lac: Lachnospirales (Lachnospiraceae); Bur: Burkholderiales; Nei: Neisseriaceae (Neisseria); Pse: Pseudomonadales; Mor: Moraxellaceae (Moraxella); Prevo: Prevotella histicola; Allo: Alloprevotella; Por: Porphyromonadaceae (Porphyromonas); Cor: Corynebacteriales (Corynebacteriaceae); Coryn: Corynebacterium; C: Campylobacteria; Ca: Campylobacterales (Campylobacteraceae); Cam: Campylobacter; Fu: Fusobacteriota; Fus: Fusobacteriia (Fusobacteriales; Fusobacteriaceae, Fusobacterium).



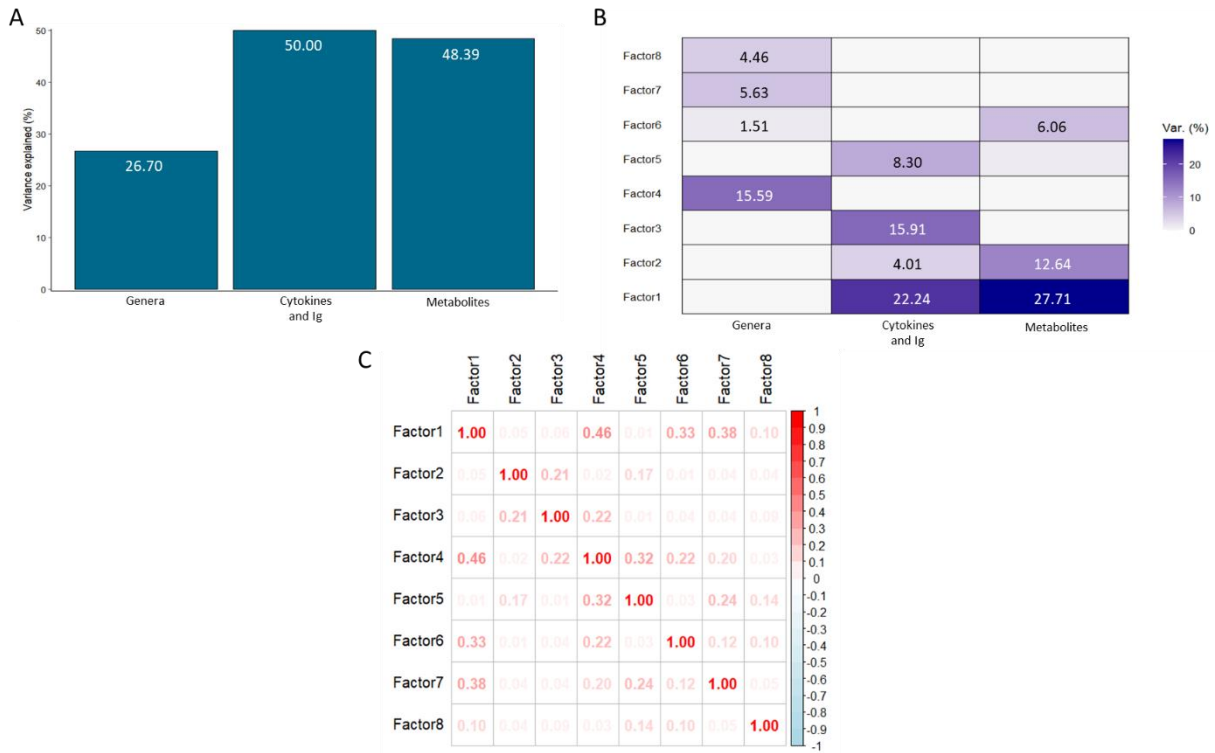
**Figure 2:** Pie chart representing the class of the metabolites identified in BALs from non-asthmatic and severe asthmatic children. NA: not applicable.



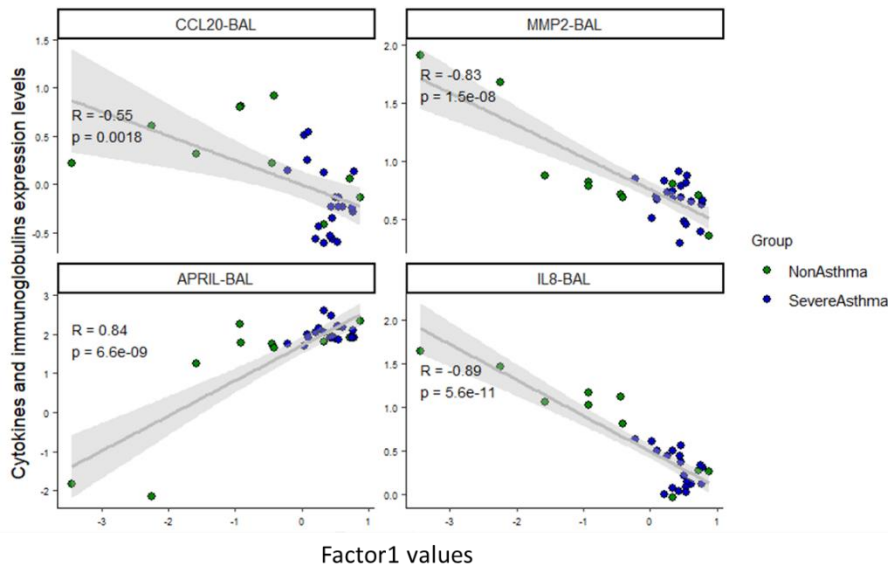
**Figure 3:** Differential univariate analysis on the whole annotated metabolites, presented by Volcano Plot for the comparison between SA and NA. Plot represents statistical significance (P value) x magnitude of change (fold change). P-values were not corrected and considered significant for  $p < 0.05$ . Blue points correspond to metabolites significantly more abundant in BALS from SA than in NA, and green point metabolites significantly more abundant in BALS from NA than in SA.



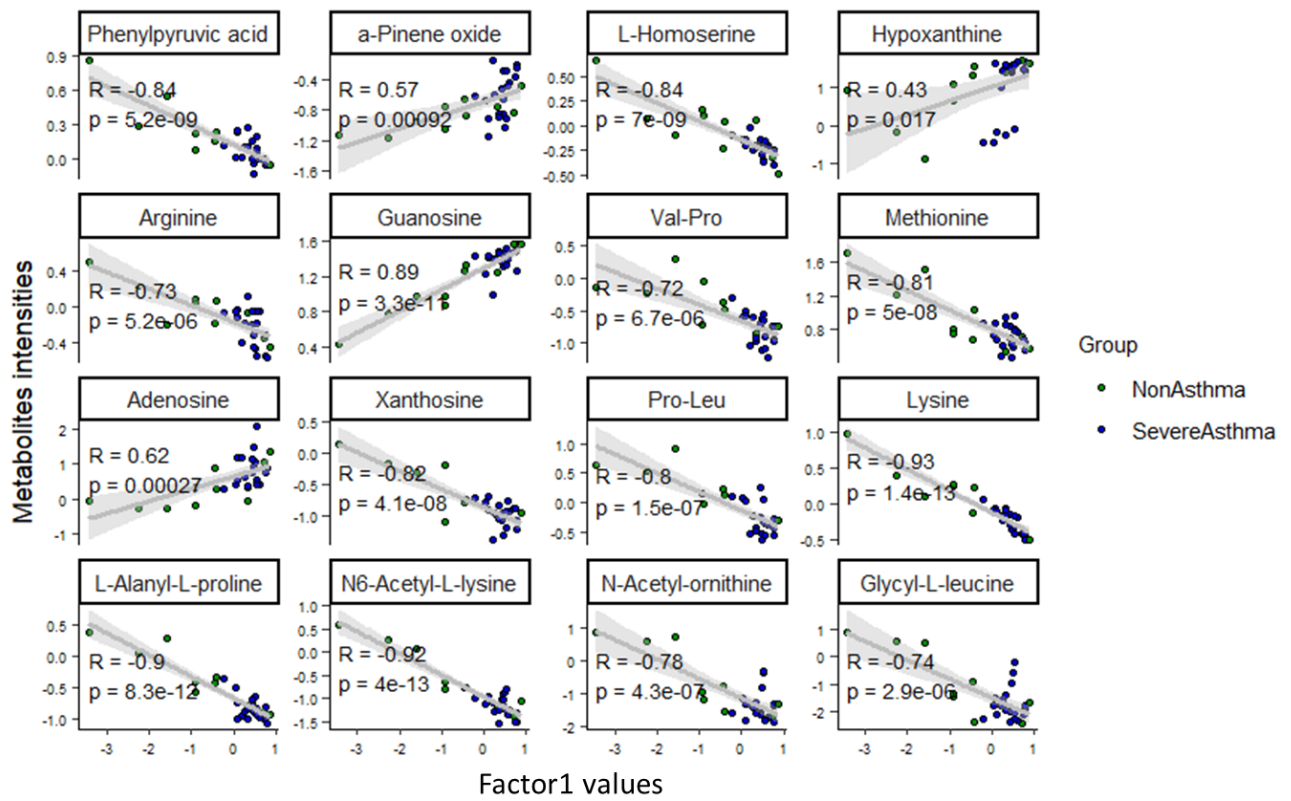
**Figure 4:** Methionine metabolism. Comparison of metabolites intensity, involved in pathways, in non-asthmatic (green dots) and severe asthmatic (blue dots) patients. P-values were calculated with Mann-Whitney tests. Metabolites in bold correspond to metabolite found in our analysis.



**Figure 5:** **A.** Explanation of the global variance of the Multi-Omic Factor Analysis (MOFA) model by the different datasets (microbiota, immunology, metabolomic). **B.** Explanation of the variance of each factor by the different datasets (microbiota, immunology and metabolomic). **C.** Correlogram representing correlation between the eight factors of MOFA analysis (positive correlation in red, negative in blue).



**Figure 6:** Scatter plots of expression levels of cytokines and immunoglobulins with the largest weight in Factor 1 from Multi-Omic Factor Analysis (MOFA), plotted against the corresponding factor values. Factor1 values (x-axis) versus expression level of cytokines (y-axis). Pro-Leu: L-prolyl-L-leucine; Val-Pro: valyl-proline.



**Figure 7:** Scatter plots of intensity of metabolites with the largest weight in Factor 1 from Multi-Omic Factor Analysis (MOFA), plotted against the corresponding factor values. Pro-Leu: L-prolyl-L-leucine; Val-Pro: valyl-proline. Factor 1 values (x-axis) versus metabolites intensities (y-axis).



## Résultats

### Analyses statistiques sur l'ensemble des métabolites

En premier lieu, nous nous sommes intéressés à l'ensemble des métabolites identifiés (soit 2972 métabolites). Les différents axes de l'ACP ne permettent pas de discriminer les deux groupes de patients. Pour les deux premiers axes, représentant 41% de la variance totale, nous pouvons observer que les centroïdes des deux populations étudiées se chevauchent (Figure 31A). Cependant, l'analyse différentielle, menée sur l'intensité de l'ensemble des métabolites, permet de mettre en évidence 198 métabolites significativement augmentés chez les enfants atteints d'AS et 140 significativement diminués par rapport aux non-asthmatiques (Figure 31B).

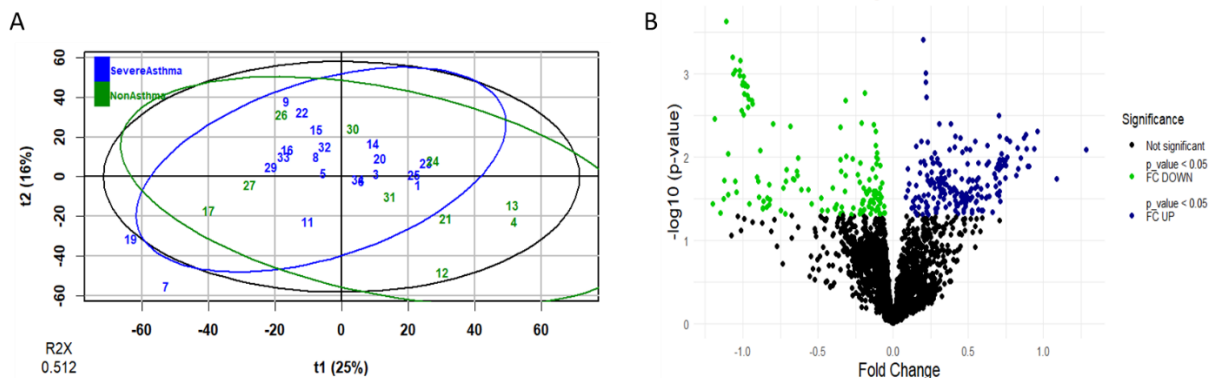


Figure 31 : **A.** Graphique des individus sur les deux premières dimensions de l'ACP construite avec l'ensemble des métabolites, représentant 41% de la variance totale. Les ellipses de confiance à 95 % basées sur la distance de Mahalanobis sont représentées en bleu pour les données relatives aux asthmatiques sévères et en vert pour les données relatives aux non-asthmatiques. Le cercle noir correspond au cercle de corrélation. **B.** Analyse différentielle sur l'ensemble des métabolites, présentée sous forme de volcano plot pour la comparaison entre AS et NA. Le graphique représente la valeur  $P \times \text{fold\_change}$ . Les valeurs  $P$  n'ont pas été corrigées et sont considérées comme significatives pour  $p < 0,05$ . Les points bleus correspondent aux métabolites significativement plus abondants dans les LBA des patients atteints d'AS que dans ceux des NA, et les points verts aux métabolites significativement plus abondants dans les LBA des NA que dans ceux des AS.

Nous avons ensuite évalué les différentes variables pour obtenir un modèle prédictif. Pour cela, nous avons utilisé le package R Biosigner (version 1.26.0)<sup>167</sup>. L'approche a été exécutée en parallèle avec les classificateurs analyse discriminante par la méthode des moindres carrés partiels (Partial Least Squares—Discriminant Analysis, PLS-DA), Random Forest et Support Vector Machines. En appliquant l'algorithme, une signature composée d'un métabolite, M872T345\_2, a été identifiée (Figure 32A). Le métabolite sélectionné présente une différence nette d'intensité entre les asthmatiques sévères et les non-asthmatiques (Figure 32B).

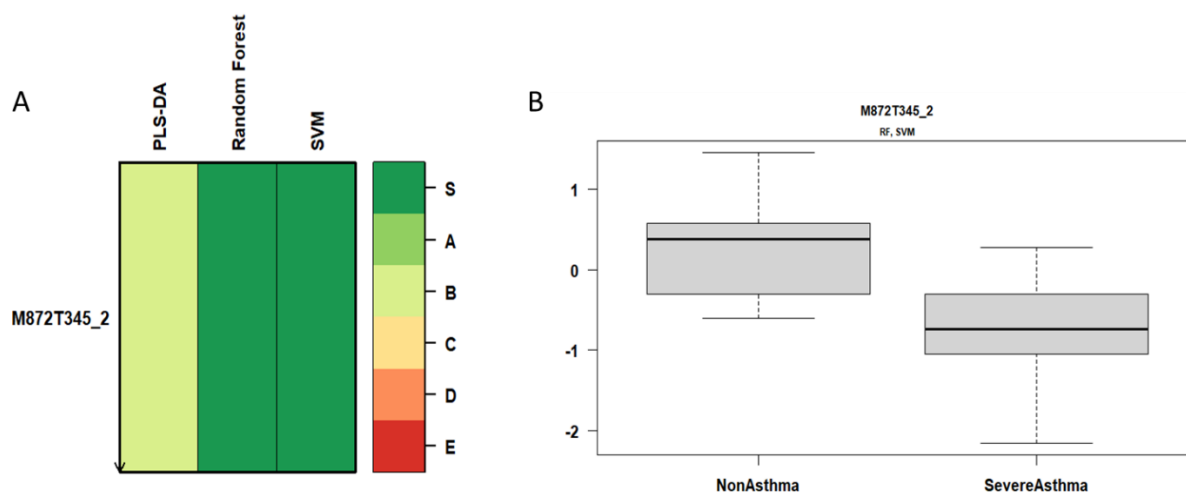


Figure 32 : **A.** Découverte d'une signature à partir des données de métabolomiques. Le niveau S correspond à la signature finale, c'est-à-dire aux métabolites qui ont passé toutes les itérations de sélection déterminant si les variables candidates améliorent significativement la prédiction du modèle. En revanche, les métabolites des autres niveaux ont été écartés pendant toutes les itérations sauf la dernière (A) ou les précédentes (B à E). PLS-DA : Analyse discriminante par la méthode des moindres carrés partiels, SVM : Support Vector Machines. **B.** Boxplot de l'intensité du métabolite M872T345\_2 chez les patients non-asthmatiques et chez les patients asthmatiques sévères.

### Analyses omiques : microbiome, métabolites annotés et cytokines

Les analyses non supervisées des données du microbiome et du métabolome, prises de manière indépendante (bloc par bloc), n'ont ainsi pas permis de séparer les deux groupes d'enfants. Cependant, la diversité du microbiote était significativement plus importante dans les LBA des enfants asthmatiques sévères, et l'analyse de l'abondance différentielle a mis en évidence neuf genres/espèces qui étaient significativement plus abondants dans les LBA d'enfants atteints d'AS que dans celui des sujets témoins. En effet, les LBA d'enfants atteints d'AS avaient significativement plus de bactéries appartenant aux genres *Streptococcus*, *Corynebacterium* et *Prevotella*, et aux espèces *Tropheryma whipplei*, *Dolosigranulum pigrum* et *Moraxella nonliquefaciens*. À l'inverse, l'OTU correspondant au genre *Haemophilus* était considérablement diminué dans les LBA des enfants AS par rapport aux témoins.

Par ailleurs, de manière intéressante, l'analyse de l'enrichissement des voies métaboliques (MSEA) a montré que les voies liées à la biotine, à la synthèse de la carnitine, à la dégradation de la lysine, au métabolisme de la méthionine ainsi qu'à la biosynthèse de la spermidine et de la spermine étaient enrichies chez les enfants atteints d'AS par rapport aux contrôles.

Dans un deuxième temps, nous avons procédé à une analyse factorielle multi-omique non supervisée (MOFA), sur l'ensemble des blocs de données des composants solubles immunitaires (cytokines et immunoglobulines), des métabolites et des genres bactériens. Celle-ci a permis de discriminer les enfants atteints d'AS des enfants NA, principalement grâce aux données des facteurs immunitaires et des métabolites, mais pas celles liées au microbiote.

Ces travaux ont ainsi permis de confirmer la complexité de la maladie et ont mis en évidence l'association de certaines cytokines, immunoglobulines et de certains métabolites avec la pathologie de l'asthme sévère.

Ces résultats sont les premières données multi-omiques obtenues sur des LBA, et permettant d'associer une signature immunitaire et métabolique à l'asthme sévère chez l'enfant. L'identification de ces facteurs devrait faire avancer les recherches sur les mécanismes de l'asthme sévère de l'enfant, qui devraient, à leur tour, accélérer le développement des stratégies de prévention de cette pathologie.

En parallèle, nous avons appliqué une autre approche pour réaliser l'intégration de nos données multi-omiques obtenues sur les LBA. Pour cela, nous avons utilisé une approche supervisée en utilisant l'outil DIABLO (package R « mixOmics », version 6.22.0, DIABLO pour « Data Integration Analysis for Biomarker discovery using Latent variable approaches for Omics studies »). Cet outil permet de réaliser une intégration de données à l'aide d'approches à variables latentes pour les études omiques, en comparant deux groupes. Cette intégration a été réalisée sur les trois jeux de données présentés dans l'article (données transformées en log10 puis centrées-réduites).

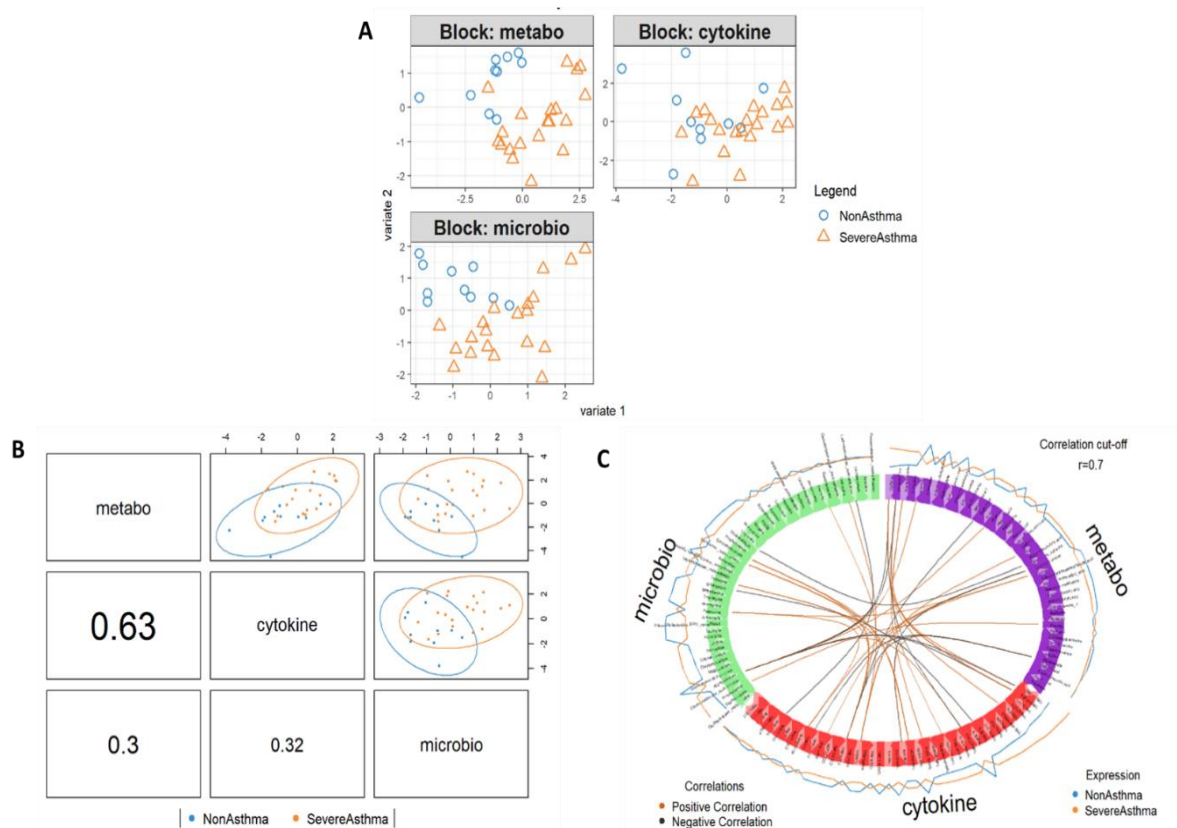


Figure 33 : Association entre les niveaux de cytokines (et immunoglobulines), de métabolites et de genre bactériens en relation avec l'asthme sévère.  
**A.** Graphes des individus pour chaque bloc de données (AS : orange, NA : bleu). **B.** Corrélations par paires entre les différents blocs de données et distribution correspondante des individus (même code couleur qu'en A). **C.** Graphique Circos montrant toutes les variables sélectionnées par le modèle DIABLO final pour chaque bloc. Les associations supérieures à  $> |0,7|$  sont indiqués par des lignes noires (négatives) ou oranges (positives).

Les graphiques obtenus pour les blocs de données sur la métabolomique et le microbiote uniquement ont montré une bonne séparation des patients asthmatiques sévères et des contrôles (Figure 34A) alors la discrimination par les données de cytokines/immunoglobulines est moins nette. Globalement, nous avons trouvé une forte corrélation entre les métabolites et les cytokines ( $\rho = 0,63$ ), alors que la corrélation entre les niveaux de métabolites et la composition du microbiote ( $\rho = 0,3$ ) ou entre le microbiote et cytokines / Ig était plus faible ( $\rho = 0,32$ ) (Figure 34B). Cependant, aucun des jeux de données pris deux à deux n'ont permis d'obtenir une bonne séparation entre les groupes de patients. Pour finir, on peut observer qu'il existe des corrélations à la fois positive et négative entres certains genres bactériens, métabolites et facteurs immunitaires solubles particuliers (Figure 34C).

## Conclusion

L'asthme est une maladie chronique qui implique une inflammation et une hyperactivité des voies respiratoires. L'asthme est reconnu comme regroupant un éventail de maladies<sup>168</sup>,

impliquant des interactions complexes entre facteurs environnementaux et génétiques. Les premières analyses en « cluster » ont permis de définir des groupes de patients asthmatiques avec des caractéristiques cliniques communes<sup>168</sup>. Cependant, les phénotypes ne nous donnent pas un aperçu des mécanismes responsables des symptômes persistants, ni des anomalies physiologiques ou de l'inflammation. Par opposition aux phénotypes, caractériser les asthmatiques sévères selon leur endotype peut être plus utile pour orienter la thérapie<sup>169</sup>. L'utilisation de biomarqueurs et des caractéristiques cliniques des patients est une étape vers la médecine de précision et pourrait fournir des indications sur la prise en charge optimale des patients<sup>170</sup>.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux différents facteurs présents au niveau pulmonaire, pouvant intervenir dans ou résultant des mécanismes physiopathologiques de l'asthme sévère chez l'enfant. Pour cela, nous avons tout d'abord évalué les différences dans la composition du microbiote et dans les niveaux de métabolites entre les patients asthmatiques sévères et non-asthmatiques. Afin de caractériser plus précisément cette population d'enfants atteints d'asthme sévère, nous avons utilisé des approches multi-omiques.

Nous avons ainsi pu montrer que la diversité du microbiote est augmentée chez les patients souffrant d'AS par rapport aux contrôles. De plus, le microbiote pulmonaire des enfants AS, était significativement enrichi en *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Tropheryma whippelii*, *Dolosigranulum pigrum* et *Moraxella nonliquefaciens*. En parallèle, des analyses d'enrichissement ont mis en évidence cinq voies métaboliques significativement enrichies chez les patients AS. De manière importante, l'intégration de données multi-blocs non-supervisée, a permis d'identifier une signature de l'asthme sévère, principalement composée de métabolites et de cytokines.

Cette étude présente, pour la première fois, une cartographie immunitaire et métabolomique commune d'une population d'enfants atteints d'asthme sévère. Bien que les résultats soient encourageants, le nombre de patients dans les deux groupes a certainement limité les puissances de nos analyses et la possibilité de mettre en évidence plus de différences significatives. Ce nombre limité a également limité la définition de sous-groupe d'enfants AS, permettant d'approcher la définition des endotypes. Nos résultats seront donc approfondis et validés sur les échantillons issus d'une plus grande cohorte qui est actuellement en cours d'inclusion (cohorte SevAsthma).

Il est à noter que les métabolites que nous avons annotés ne représentent qu'un faible pourcentage de tous les métabolites extraits et triés, et qu'ils ont été annotés à l'aide d'une base de données interne qui comprend majoritairement des métabolites endogènes. La faible

représentation des métabolites exogènes, et notamment microbiens, dans cette base de données peut expliquer les faibles corrélations entre les jeux de données du microbiote et du métabolome. Il serait important de pouvoir évaluer la présence de métabolite microbiens dans ces LBA et ainsi, potentiellement, mettre en lumière des associations entre ces métabolites et les genres bactériens présentant des abondances significativement différentes entre les enfants souffrant d'AS et les non asthmatiques.

Pour réaliser les analyses multi-omiques, nous avons opté pour l'utilisation de MOFA qui utilise de façon non supervisée des méthodes de factorisation de matrices pour extraire des facteurs latents, ainsi que l'outil DIABLO. En effet, MOFA est une méthode qui recherche des modèles dans et entre les types de données, sans connaissance des groupes auxquels appartiennent les échantillons analysés. Par la suite, il serait intéressant d'utiliser d'autres méthodes d'intégration, supervisées, comme par exemple WGCNA (Weighted Gene Co-expression Network Analysis). WGCNA permet de construire des réseaux de co-expression entre les variables. Cet algorithme permettrait, sur une plus grande cohorte, de trouver des modules de variables co-exprimées et d'explorer l'association entre le réseau de variables et le phénotype d'intérêt. Une telle approche permettrait également d'identifier des sous-groupes de patients au sein des asthmatiques sévères.

## Chapitre 3 : Métabolome et lipidome plasmatique

### Contexte

À l'ère de la médecine personnalisée, il est important de pouvoir définir des biomarqueurs capables d'aider au diagnostic, de prédire l'évolution de la maladie et la réponse au traitement. Ces biomarqueurs ne sont pas forcément directement en lien avec les mécanismes physiopathologiques présents localement, mais ils en résultent et en sont un marqueur fiable. Ainsi, un biomarqueur est un indicateur mesurable qui permet d'évaluer un processus biologique normal ou pathologique. Un biomarqueur valide aurait plusieurs caractéristiques clés : discriminer les individus selon la présence ou non de la maladie avec des valeurs prédictives positives et négatives élevées, fournir des informations sur le pronostic de la maladie et les résultats cliniques, être fiable et reproductible dans le cadre clinique et facile à collecter<sup>89</sup>. Ainsi, le sang est une matrice de choix pour l'analyse des biomarqueurs. Les IgE sériques, les éosinophiles du sang ont été utilisés comme biomarqueurs potentiels de l'asthme<sup>89</sup>.

De plus, au vu des résultats obtenus au cours de mes travaux dans les LBA (mise en évidence d'une signature de l'asthme sévère au niveau local), ainsi que ceux obtenus précédemment via l'analyse des facteurs immunitaires circulants<sup>79,80</sup>, nous pouvons espérer identifier une signature de l'AS au niveau périphérique. Pour cela, nous avons réalisé une analyse métabolomique non ciblée sur le plasma de nos patients (*versus* contrôles), selon une méthodologie telle que précédemment décrite. Les études métabolomiques préalablement réalisées ont en effet permis d'identifier des métabolites associés à l'asthme et à sa gravité, notamment des composés liés au métabolisme de l'acide tricarboxylique, à l'hyper méthylation, à la régulation des phospholipides, au stress hypoxique et oxydatif, à la réaction immunitaire et à l'inflammation<sup>112,171-173</sup>.

Nous avons complété ces analyses de métabolomique par une approche de lipidomique, un sous-groupe des analyses métabolomiques qui va s'intéresser plus particulièrement aux composés très apolaires.

Dans ce contexte, l'objectif de cette partie de mon étude a été d'identifier une signature de l'asthme sévère au niveau plasmatiques et de trouver des biomarqueurs associés à la pathologie. Pour cela, nous avons, comme pour les LBA, utilisé des approches (métabolomiques (métabolomique classique et lipidomique)) prises de individuelles ou intégrées avec les données de cytokines préalablement obtenues sur ces mêmes échantillons<sup>79,80</sup>.

## Matériels et méthodes

### a) Analyse métabolomique sur le plasma

#### **Extraction des métabolites**

L'analyse métabolomique a été réalisée sur les plasmas récupérés après la séparation des constituants sanguins sur un gradient de type Histopaque, et conservés à -80°C. L'extraction des métabolites repose sur une précipitation des protéines, protocole qui est très souvent utilisée au laboratoire pour des matrices liquides comme le sérum ou les urines<sup>150</sup>, et que nous avons également appliqué sur nos LBA. Ce type d'extraction a l'avantage de préserver la structure et l'intégrité des métabolites, tout en permettant de s'affranchir de composants pouvant impacter négativement le signal comme des protéines ou des débris cellulaires.

La préparation des échantillons était ainsi similaire à celle présentée précédemment pour les LBA. Brièvement, 400 µL de méthanol froid ont été ajoutés à 100 µL d'échantillons de plasmas. Après agitation forte par vortex et incubation pendant 15 min dans un bain à ultrason, les échantillons ont été incubés 1h30 dans la glace permettant une précipitation lente des protéines. Après centrifugation (20000xg, 15 min, 4°C), les surnageants ont été collectés, aliquotés et évaporés sous azote (RotorVap LV-Biotage, température : 30°C, pression : 5 bars).

#### **Préparation pour analyse LC-HRMS**

Les culots secs ont été repris soit avec un mélange H<sub>2</sub>O / ACN contenant 0,1% d'acide formique pour une analyse en LC-MS avec une colonne de type C18 (interactions apolaires), soit avec un mélange de carbonate d'ammonium (10mM) / ACN 60%, en deux étapes, pour une analyse en LC-MS avec une colonne de type HILIC (interactions polaires).

#### **Analyse en LC-HRMS**

Par la suite, les échantillons ont été injectés dans le spectromètre de masse en passant préalablement par une colonne chromatographique, selon deux conditions analytiques complémentaires telles que précédemment présentées pour l'analyse des LBA (C18-ESI<sup>+</sup> et HILIC-ESI<sup>-</sup>).

Comme pour l'étude des LBA, l'acquisition des données de LC-HRMS a suivi une séquence bien définie contenant les échantillons répartis de manière aléatoire, des blancs et des QC dilués, en début et en fin de séquences, et des QC tous les 7 échantillons biologiques.

La procédure d'analyse était identique à celle présentée dans la partie précédente. L'annotation des métabolites a ensuite été effectuée à l'aide d'une base de données spectrale



interne basée sur des normes chimiques analysées dans les mêmes conditions<sup>150</sup> puis vérifiées en MS/MS.

Initialement, 29547 variables ont été extraites en condition C18-ESI<sup>+</sup> et 12599 en condition HILIC-ESI<sup>-</sup>, grâce au package XCMS. Après application des filtres (voir partie précédente), 4946 et 3884 variables ont été obtenues respectivement en condition C18-ESI<sup>+</sup> et en condition HILIC-ESI<sup>-</sup>. Parmi ces variables, nous avons pu annoter respectivement 111 et 160 variables en conditions analytiques C18-ESI<sup>+</sup> et HILIC-ESI<sup>-</sup>. Toutes les annotations ont été vérifiées par MS/MS (niveau 1 de confiance).

Parmi ces variables, 57 avaient été annotées par les deux méthodes. Pour éviter la redondance provenant des deux modes d'acquisition, nous avons sélectionné un des deux métabolites communs aux deux modes et ce pour chaque variable commune. Pour faire ce choix, nous avons en amont analysé s'il y avait une forte corrélation entre les intensités selon le mode d'acquisition, puis gardé l'une ou l'autre des annotations (27 annotations concernées). Dans les autres cas, le choix de la variable à garder a tenu compte de l'aspect du pic, analysé grâce au logiciel Trace Finder, mais aussi du temps de rétention. En effet, seules les variables qui avaient un temps de rétention > 2 minutes, étaient gardées car considérées comme retenues sur la colonne. Les métabolites identifiés dans un des deux modes d'acquisition ont tous été gardés. Finalement, 138 variables ont été sélectionnées dans le mode d'acquisition HILIC-ESI<sup>-</sup> et 76 dans le mode C18-ESI<sup>+</sup>, permettant d'obtenir un nombre total de 214 métabolites annotés et vérifiés en MS/MS (Annexe 5).

#### b) Analyse lipidomique des plasmas

##### **Extraction des lipides**

L'analyse lipidomique a été réalisée sur 50 µL de plasma récupéré après la séparation des constituants sanguins sur un gradient de type Histopaque, et conservés à -80°C. A ce volume d'échantillon ont été ajoutés 250 µL d'un mélange chloroforme/méthanol (ratio 1/1) froid contenant les étalons internes (EI, Tableau 8). Le mélange a ensuite été soniqué (Sonicateur Vibra-Cell™ à 40 % d'amplification, sonde 10 mL) pendant 10 secondes. Les échantillons ont ensuite été incubés 120 min à température ambiante sous agitation. A la fin de l'incubation, de l'eau ultrapure a été ajoutée pour obtenir un ratio final chloroforme/MeOH/phase aqueuse de 1/1/0.7. Après centrifugation (12000xg, 15 min, 4°C), une phase aqueuse et une phase organique se distinguent, avec au milieu un anneau protéique. L'anneau protéique a été écarté pour récupérer les phases aqueuses et organiques, qui ont été mélangées avant d'être évaporées sous azote (température : 40°C, pression : 5 bars). Les culots ont ensuite été repris dans 200 µL d'un mélange chloroforme/méthanol froid (ratio 1/1). Après une nouvelle centrifugation (12000xg, 15 min, 4°C), les surnageants ont été de nouveau évaporés sous

azote (40°C, 5 bars). Pour finir, les culots ont été repris dans 50 µL d'un mélange chloroforme/méthanol froid (ratio 1/1).

*Tableau 8 : Références des standards utilisés comme étalons internes.*

Mix interne	std à 1mg/mL	[M+NH4] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	Références Cogem
	oleic acid-d9				861809O-10mg
L025	11:0 LPC		426.26206		AVA-855376C-25mg
L004	13:0 LPE			410.2307	AVA-110696-5mg
L024	13:0 LPG			441.22535	AVA-110709-5mg
L001	12:0 PG			609.37676	AVA-840435P-25mg
L016	13:0 PC		650.47608		AVA-850340C-25mg
L017	12:0 PE			578.3821	AVA-850702P-25mg
	10:0 PS				840036P-10mg
L019	d18:1/12:0 Cer		482.457319		AVA-860512P-5mg
L052	d18:1/12:0 lacCer		806.562969		AVA-860545P-5mg
L021	d18:1/12:0 GalCer		644.510144		AVA-860544P-5mg
L013	d18:1/12:0 Su			722.4507589	AVA-860573P-1mg
L022	d18:0/12:0 SM		649.52845		AVA-860683P-5mg
L008	17:0-17:1-17:0 D5 TG	995.9737			110544-1mg

### Préparation pour analyse en LC-HRMS

Les extraits lipidiques ont été dilués au 1/100<sup>ième</sup> dans un mélange MeOH/Isopropanol (ratio 0,65/0,35) et H<sub>2</sub>O (soit 10 µL d'extrait dans 990 µL du mélange). Ensuite, 100 µL des extraits dilués ont été transférés en tube pour analyse.

Les QC ont été préparés en mélangeant 100 µL de chaque extrait dilué. Des QC dilués ont aussi été préparés (dilution au ½, ¼ et 1/8). Un blanc analytique a été intégré au début de la séquence, correspondant à un mélange MeOH/Isopropanol.

### Analyse en LC-HRMS

Les extraits ont été analysés par chromatographie liquide sur un système Ultimate 300, relié à un spectromètre de masse Orbitrap Fusion (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) utilisé dans les deux modes d'ionisation. La chromatographie liquide a été réalisée sur une colonne avec greffage C8 (Kinetex, 2.6 µm, 100 Å, l : 150 mm, D : 2.1 mm, Phenomenex).

Pour l'acquisition en mode d'ionisation positive, les phases mobiles étaient de 60 % d'H<sub>2</sub>O ultrapure et 40 % de méthanol en A et de 90 % d'isopropanol et 10 % de méthanol en B, tous deux contenant 0,1 % d'acide formique et 10 mM de formate d'ammonium. L'équilibration de la colonne a été réalisée avec 68 % de tampon A et 32 % de B avec un débit de 0.4 mL/min (Pression d'environ 490 bars, température : 60°C).

Pour l'acquisition en mode d'ionisation négative, les phases mobiles étaient composées des mêmes mélanges mais contenant uniquement 0.1 % d'acide formique. L'équilibration de la colonne a été réalisée avec le même pourcentage des phases et le même débit.

Comme pour l'analyse métabolomique, les échantillons ont suivi une séquence bien définie contenant les échantillons biologiques répartis de manière aléatoire, des blancs analytiques

(en début et en fin de séquences), des QC répartis tous les 7 échantillons permettant de suivre le déroulé de la séquence au cours du temps, et des QC et QC dilués en début de séquence.

### Traitement des données

Comme pour la métabolomique, les fichiers bruts ont d'abord été convertis au format mzXML avec MSconvert (ProteoWizard). L'alignement et l'intégration des pics ont été réalisés à l'aide du même logiciel XCMS sur la plateforme W4M. Les filtres utilisés étaient similaires à ceux utilisés en métabolomique : (i) seuil de corrélation entre les facteurs de dilutions des QC et les aires des pics ( $> 0.7$ ), (ii) rapport des aires des pics QC sur les aires des pics des blancs ( $> 1.5$ ), (iii) CV des aires des pics des QC ( $< 30\%$ ).

L'annotation des lipides a ensuite été effectuée par Benoit Colsch sur la plateforme de lipidomique (SPI/LI-MS, plateforme MétabolomeIDF labellisée IBiSA, metaboHUB,) en se basant sur les  $m/z$  ainsi que sur le ratio isotopique par comparaison à une base de données interne. Elle a ensuite été vérifiée et complétée manuellement en regardant la masse et les ions caractéristiques pour les deux modes d'ionisation (logicielle Xcalibur, version 2.1). Par exemple, les glycérophosphocholines (PC) sont caractérisés par un adduit acide formique, à un  $m/z$  de 184, en ionisation positive. De plus, les PC sont composés d'un azote (Figure 34A) et auront donc un rapport  $m/z$  pair alors que les sphingomyélines sont composées de 2 azotes (Figure 34B) et auront donc un rapport  $m/z$  impair.

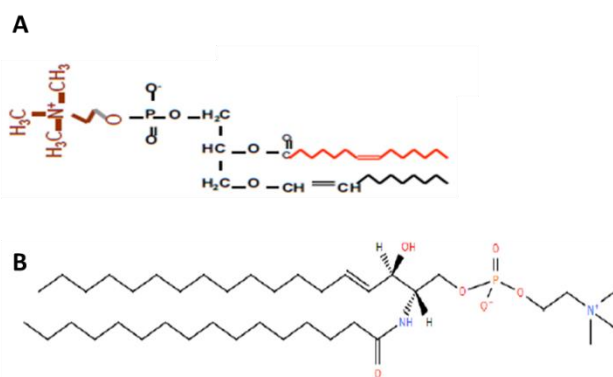


Figure 34 : Structures chimique de **A.** la glycérophosphocholines et **B.** de la sphingomyéline.

L'annotation des triglycérides (TG) a été réalisé grâce à la fragmentation des ions. Lors de la fragmentation des TG, on peut observer des massifs de diglycérides (DG), dans un intervalle de  $m/z$  compris entre 500 et 700. La première étape a été de noter les  $m/z$  de tous les DG puis de calculer le  $m/z$  des acides gras (AG) grâce à la formule  $m/z_{TG} - m/z_{DG} - 17 = m/z_{AG}$ . Le « moins 17 » correspond à une perte d'une molécule de  $NH_3$ . Pour finir, le  $m/z$  obtenu a été comparé à une base de données interne, permettant d'obtenir le nom et la structure des acides gras composant le TG.

Par exemple, pour le TG 48:4 de m/z : 816,7071 (Figure 35), nous observons cinq pics majoritaires aux m/z 495,44, 517,43, 519,44, 521,46 et 599,50 correspondant à cinq DG. En appliquant la formule, nous obtenons la m/z de cinq AG correspondant aux AG 20:4, 18:1, 18:2, 18:3 et 12:0. Le TG que nous recherchons a 48 carbones et 4 insaturations. Par déduction, il est composé de l'AG 12:0 et de deux fois l'AG 18:2. Il sera donc noté TG(12:0\_18:2\_18:2).

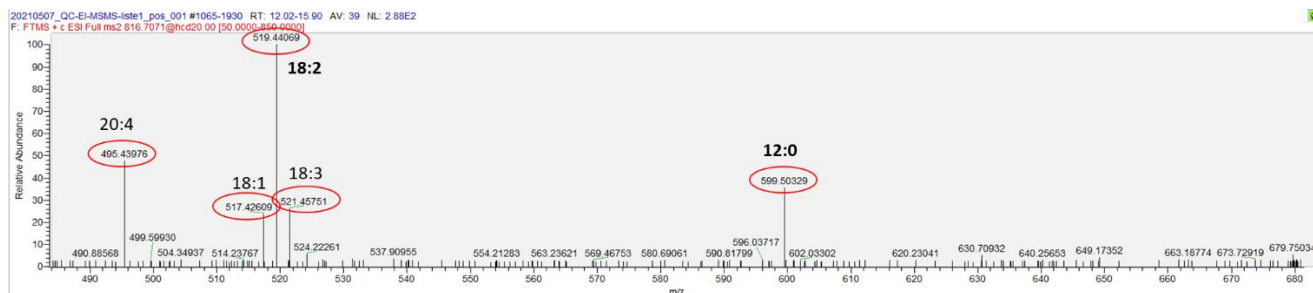


Figure 35 : Spectre MS/MS pour le rapport m/z 816,7071, permettant de vérifier l'annotation du triglycéride 48:4.

En rouge sont entourés les ions majoritaires, correspondant à des diglycérides. Par déduction, nous obtenons la composition en acides gras.

Pour vérifier l'annotation des triglycérides, il est possible de regarder le temps de rétention de ces lipides en fonction du nombre d'insaturations (Figure 36A) ou en fonction de la longueur de la chaîne carbonée (Figure 36B).

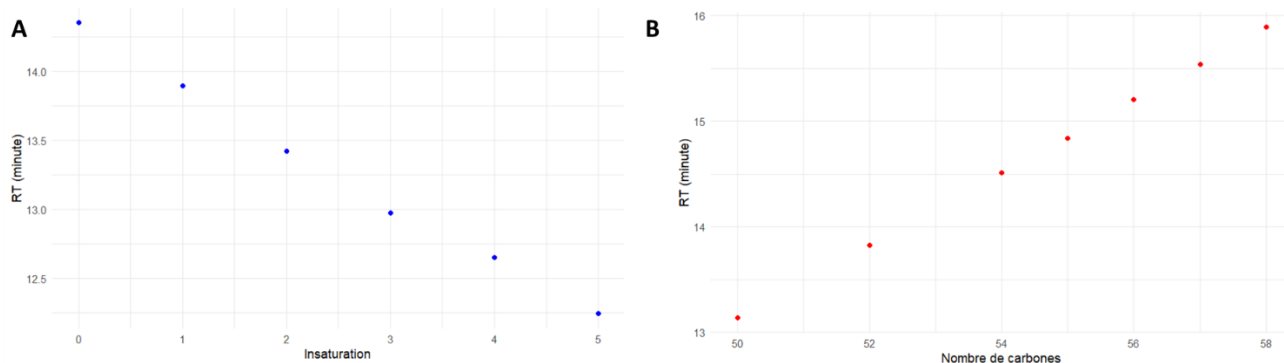


Figure 36 : Temps de rétention (min) en fonction **A.** du nombre d'insaturations (exemples des triglycérides contenant 44 carbones) ou **B.** du nombre de carbones dans la chaîne carbonée (exemple des triglycérides contenant 8 insaturations).

En effet, plus le TG a un nombre important d'insaturations, plus il sera élué tôt (rt plus faible) pour une longueur de chaîne identique. Inversement, pour un même nombre d'insaturations, plus le TG a de carbone dans sa chaîne, plus il sera élué tard (rt plus élevé).

Initialement, 19878 variables ont été extraites en mode d'ionisation positive et 18839 en mode d'ionisation négative (Figure 37). Après application des tris, 4849 et 5861 variables ont été obtenues respectivement en mode d'ionisation positive et négative. Enfin, nous avons obtenu 111 et 187 variables annotées et nettoyées dans les deux modes d'ionisation. Les différentes

annotations provenant des deux modes d'ionisation ont été concaténées, permettant ainsi d'obtenir 275 lipides annotés et vérifiés en MS/MS.

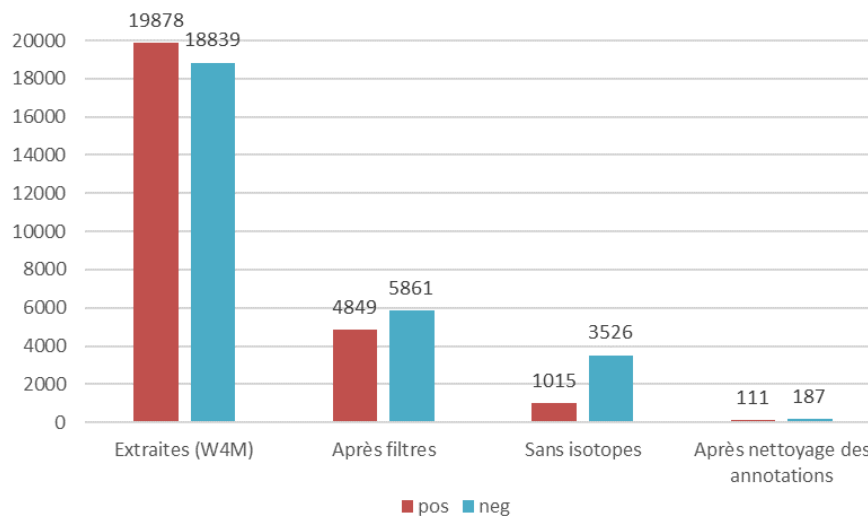


Figure 37 : Nombre de variables obtenues après les différentes étapes de traitement (extraction via W4M, application des trois filtres, suppression des isotopes et nettoyage des annotations). En rouge, est présenté le nombre de variables obtenues en ionisation positive et en bleu, en ionisation négative.

### c) Analyses statistiques

#### Corrélation entre métabolome plasmatique et pulmonaire

L'analyse de corrélation entre le métabolome pulmonaire et le métabolome plasmatique a été effectuée sous R en utilisant la méthode de Spearman. La représentation graphique a été réalisée avec le package R « stats » (version 4.2.2).

#### Métabolome plasmatique chez les enfants AS et contrôles

Nous avons réalisé des analyses statistiques univariées supervisées de type volcano plot sur l'ensemble des variables des deux jeux de données obtenues après tris et prises indépendamment (intensités log10 transformées). Les volcano plot ont été réalisés à l'aide du package R « ggplot2 » (version 3.4.2). Les valeurs de p ont été calculés par t-tests avec correction pour tests multiples, entre le groupe de patients asthmatiques sévères et les contrôles, grâce à la fonction 'hypotesting' du package R « phenomis ».

La même analyse a ensuite été réalisée sur les 214 métabolites issus des deux modes d'ionisation et annotés puis vérifiés par MS/MS. Les boxplots des métabolites significativement différents entre les enfants atteints d'AS et les NA ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 7). Nous avons ensuite réalisé les différentes analyses sur ces 214 métabolites. Une analyse non supervisée en composantes principales (ACP) a été réalisée à l'aide du package « FactoMineR » (version 2.8) afin de vérifier la présence d'outlier et d'observer la distribution des échantillons. Par la suite, une analyse d'enrichissement de l'ensemble des

métabolites annotés (comme présenté précédemment), a été réalisée en utilisant MetaboAnalyst 5.0. Sur l'ensemble des 214 métabolites, seul 165 avaient un numéro KEGG valide. Nous avons ensuite analysé la corrélation entre les données démographiques, telles que l'âge, le sexe et l'IMC, et les métabolites annotés. Nous avons réalisé le même type d'analyse sur les paramètres cliniques liés à l'asthme (VEMS, VEMS/CVF, dose d'ICS, score ACT). Ces corrélations ont été calculées avec le test de corrélation de Spearman. Les matrices ont été représentées à l'aide du package R « Heatmaply » (version 1.4.2).

### **Lipidome plasmatique chez les enfants AS et contrôles**

Comme pour l'analyse métabolomique, nous avons réalisé des analyses statistiques univariées supervisées entre le groupe de patients asthmatiques sévères et les contrôles de type volcano plot sur l'ensemble des variables obtenues après tris (intensités log10 transformées). Les volcano plot ont été réalisés comme précédemment, et les valeurs de p ont été calculées par t-tests avec correction pour tests multiples.

### **Analyse multi-omique**

Pour intégrer les données de manière non-supervisée, nous avons utilisé le package MOFA2 (version 1.8.0) comme décrit précédemment. Les jeux de données utilisées pour cette intégration comprenaient 76 cytokines et immunoglobulines détectés dans le plasma<sup>79,80</sup>, 275 lipides ainsi que 214 métabolites. Les données ont été transformées en log10 et centrées-réduites avant d'être intégrées au modèle. Les boxplots des lipides significativement différents entre les enfants atteints d'AS et les NA ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 7).

## Résultats

### a) Analyses des corrélations entre les métabolites plasmatiques et les métabolites des lavages bronchoalvéolaires

Nous avons dans un premier temps, analysé les corrélations entre les métabolites trouvés dans le plasma et ceux trouvés dans les LBA. Ces analyses ont été réalisées à partir des données obtenues des 30 patients de la cohorte, indépendamment des groupes.

Premièrement, nous avons retrouvé 44 métabolites communs entre les deux matrices. Nous observons globalement peu de corrélation entre ces deux matrices pour un même métabolite, comme nous avons pu l'observer pour les concentrations en urée ou en protéines, ou pour les cytokines et les Ac<sup>79</sup>. Nous avons cependant remarqué que la kynurénine, la phénylacétyl-L-glutamine et la théobromine présentaient des intensités corrélées dans ces deux matrices (respectivement  $\rho = 0,53$ ,  $\rho = 0,67$  et  $\rho = 0,84$ ). D'autres métabolites présentaient des intensités négativement corrélées entre les deux matrices, comme observé par exemple, pour



le nicotinamide ( $\rho = -0,47$ ). A l'inverse, des métabolites comme la putrescine ou le tryptophane, retrouvés dans les deux types d'échantillons, présentaient des intensités qui ne corrôlaient pas ensemble ( $\rho = 0,23$  et  $\rho = 0,21$  respectivement).

Par ailleurs, certains métabolites étaient associés entre eux dans les différentes matrices (Figure 38). Par exemple, les niveaux de 5-méthylthio-adénosine dans les LBA étaient corrôlé positivement à ceux de la taurine dans le plasma ( $\rho = 0,62$ ), et négativement à ceux de la nicotinamide ( $\rho = -0,53$ ), de la phénylalanine ( $\rho = -0,53$ ), de l'acide folique ( $\rho = -0,56$ ) et de l'indole ( $\rho = -0,56$ ) dans le plasma. De plus, les niveaux d'adénosine dans les LBA étaient corrôlés négativement au niveau de nicotinamide dans plasma ( $\rho = -0,49$ ), et positivement aux niveaux de méthyl-histidine plasmatique ( $\rho = 0,49$ ). Les niveaux de putrescine retrouvés dans les LBA étaient corrôlés négativement à ceux de la bilirubine dans le plasma ( $\rho = -0,55$ ). Enfin, les niveaux de spermidine dans les LBA étaient associés positivement à ceux de l'acide guanidineacétique ( $\rho = 0,47$ ) et de la spermine avec la guanosine ( $\rho = 0,53$ ) dans le plasma, tandis qu'ils étaient associés négativement au niveau de l'asparagine dans le plasma ( $\rho = -0,48$ ).

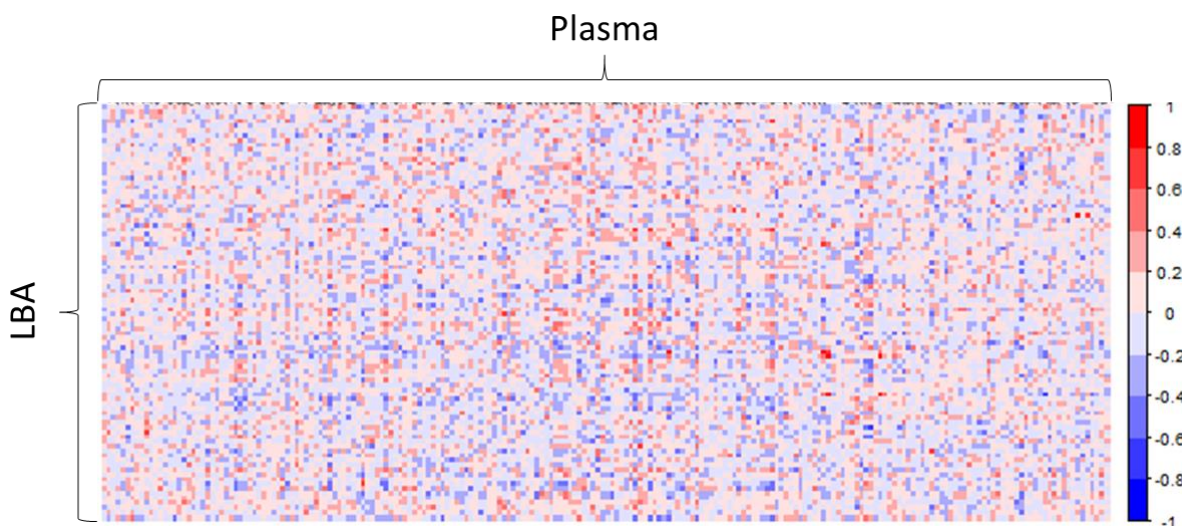


Figure 38 : Corrôlations entre les métabolites plasmatiques et les métabolites des lavages bronchoalvéolaires des 30 patients issus de la cohorte CLASSE. Les corrôlations ont été calculés par méthode de Spearman.

Au vu de ces analyses, il est difficile de conclure sur des potentielles corrôlations aux niveaux local et systémique. Il est donc indispensable de séparer les mécanismes physiopathologiques au niveau locale et les biomarqueurs d'aide au diagnostic au niveau périphérique, comme cela avait été observé pour les marqueurs immunologiques chez ces mêmes patients.

#### b) Analyses non supervisées de l'ensemble des métabolites plasmatiques

Nous avons tout d'abord mené des analyses multivariées non supervisées, sur l'ensemble des individus et à l'aide des tous les métabolites obtenus en condition C18-ESI<sup>+</sup> et HILIC-ESI<sup>-</sup>, puis sur les 214 métabolites annotés.

Premièrement, les deux premières dimensions des ACP réalisées sur l'ensemble des variables extraites en condition C18-ESI<sup>+</sup> et en condition HILIC-ESI<sup>-</sup> n'expliquent qu'un faible pourcentage de la variance (26.8 % et 28.5% pour l'axe 1 et 2 dans les deux conditions respectives, Figure 39A et B). Dans ces deux mêmes conditions, les différentes composantes de l'ACP ne permettent pas de distinguer les groupes de patients (Figure 39C et D pour les composantes 1 et 2 ; non montré pour les autres dimensions). La distribution semble être moins homogène dans le groupe de patients non-asthmatiques en condition HILIC-ESI<sup>-</sup> (Figure 39D). En condition C18-ESI<sup>+</sup>, seul un échantillon (AS #11) semble avoir un profil différent des autres (Figure 39C).

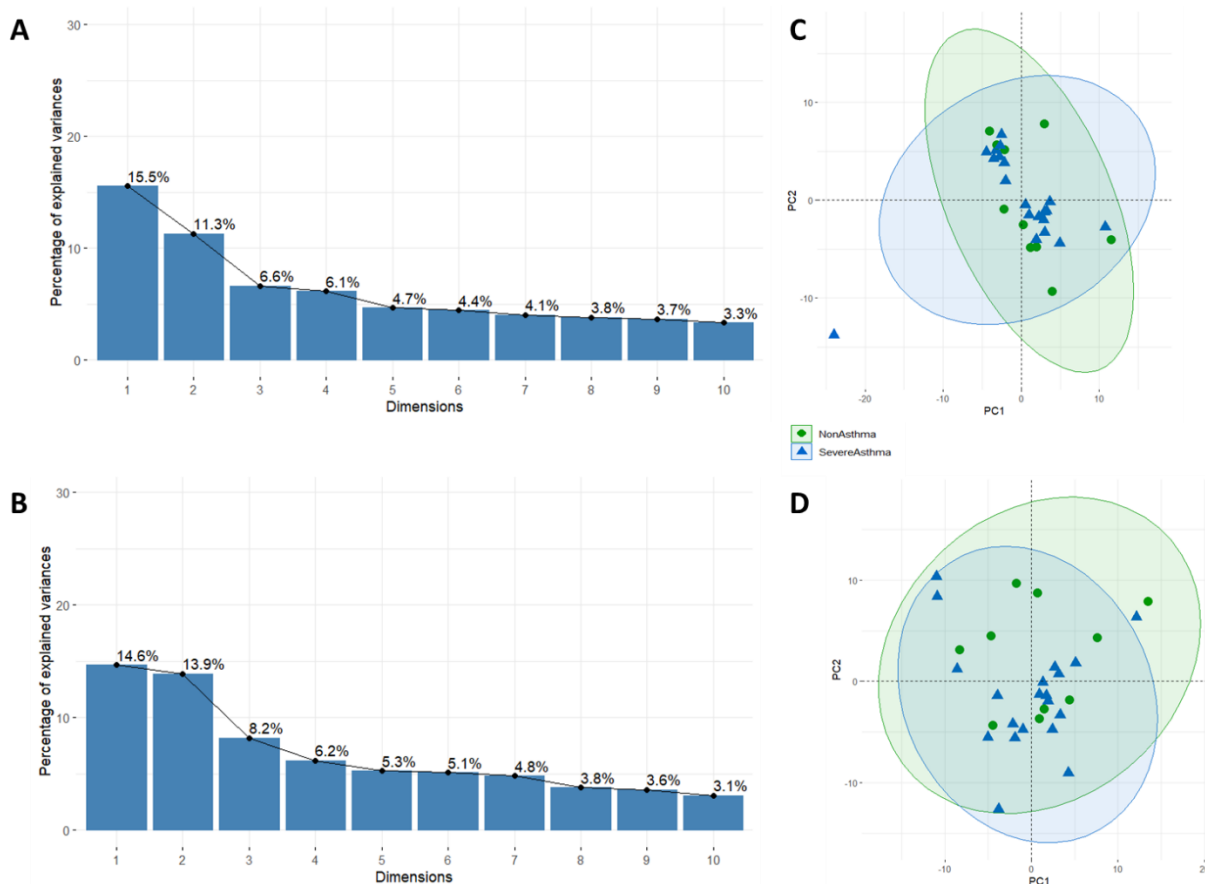


Figure 39 : Graphiques des valeurs propres des analyses en composantes principales (ACP) réalisées sur l'ensemble des variables extraites **A.** en condition C18-ESI<sup>+</sup> et **B.** en condition HILIC-ESI<sup>-</sup>. Graphiques des individus issus de ces mêmes ACP, **C.** en condition C18-ESI<sup>+</sup> et **D.** en condition HILIC-ESI<sup>-</sup>.

Les deux premières dimensions de l'ACP réalisées à l'aide de l'ensemble des métabolites annotés n'expliquent qu'un faible pourcentage de la variance (28.7% pour l'axe 1 et 2, Figure 40A). Les différentes composantes de l'ACP ne permettent pas de distinguer les groupes de patients (Figure 40B pour les composantes 1 et 2 ; non montré pour les autres dimensions). La distribution semble être homogène et ce quel que soit le groupe de patient. Le même



échantillon qu'identifié précédemment semble avoir un profil métabolomique différent des autres (Figure 40B ; AS #11).

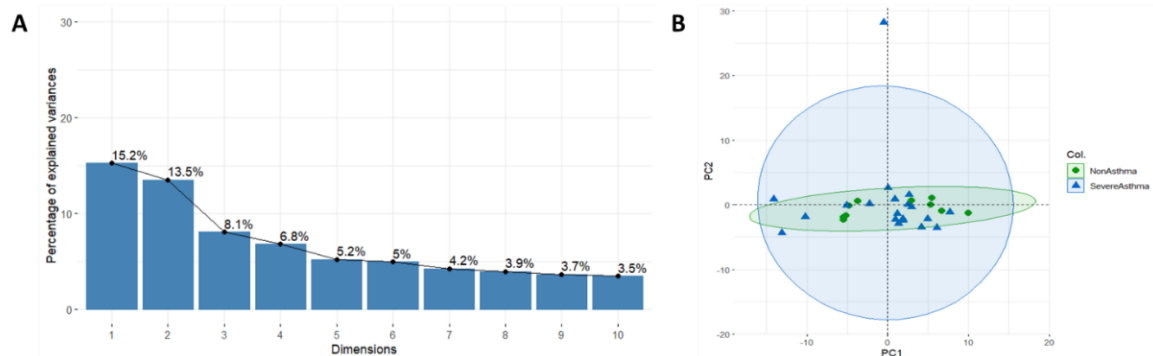


Figure 40 : **A.** Graphique des valeurs propres et **B.** graphique des individus issus de l'analyse en composantes principales sur les 214 variables annotées.

### c) Douze métabolites sont altérés en fonction du statut asthmatique

Les données de l'ensemble des variables obtenues après tris par des approches de métabolomique « classique » sur plasma ont été analysées par des tests univariés supervisés, dont les résultats sous forme de Volcano plot sont présentés Figure 41. En condition HILIC-ESI<sup>-</sup>, 206 métabolites étaient significativement différents entre les SA et les NA, (Figure 41A). En condition C18-ESI<sup>+</sup>, 102 métabolites étaient significativement différents entre les groupes, (Figure 41B).

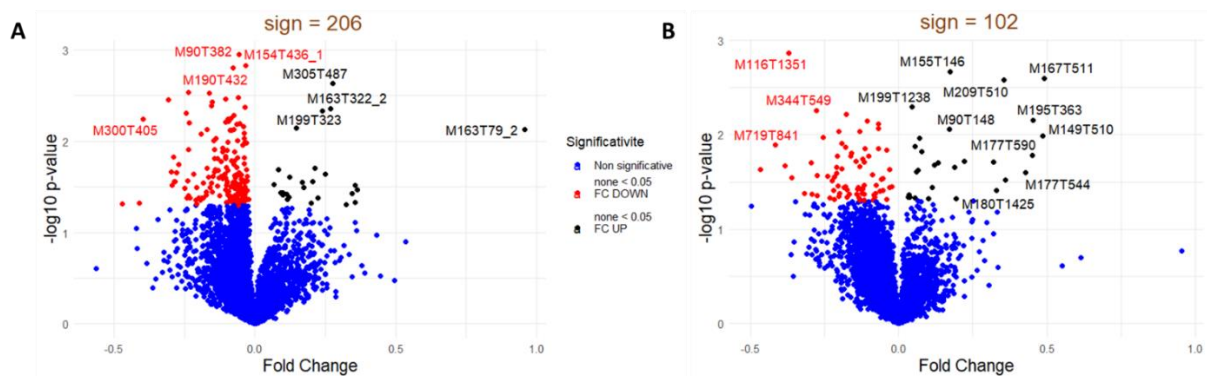


Figure 41 : Volcano plot sur l'ensemble des métabolites, obtenus après tris, **A.** en condition HILIC-ESI<sup>-</sup> et **B.** en condition C18-ESI<sup>+</sup>.

En rouge, sont représentées les variables dont les intensités sont diminuées chez les asthmatiques sévères par rapport aux contrôles et en noir, sont représentées les variables dont les intensités sont augmentées chez les asthmatiques sévères par rapport aux contrôles. En bleu, sont représentés les métabolites non significativement différents entre les deux groupes de patients.

Sur les 214 métabolites annotés dans le plasma et vérifiés en MS/MS, seuls 12 étaient significativement différents entre le groupe contrôle et le groupe AS (Figure 42A). Les intensités de la valine et de la phénylalanine étaient toutes deux diminuées chez les asthmatiques sévères par rapport aux contrôles (Figure 42B). Les intensités des dix autres métabolites (sulfate d'indoxyle, acide acétylneuraminique, acide aminobutyrique, dihydroxybenzoïque, aminophénol, méthyl-histidine, kynurénine, acide nicotinique, lactamide

et acide acétamidobutanoïque), étaient augmentés chez les patients AS par rapport aux contrôles (Figure 42C).

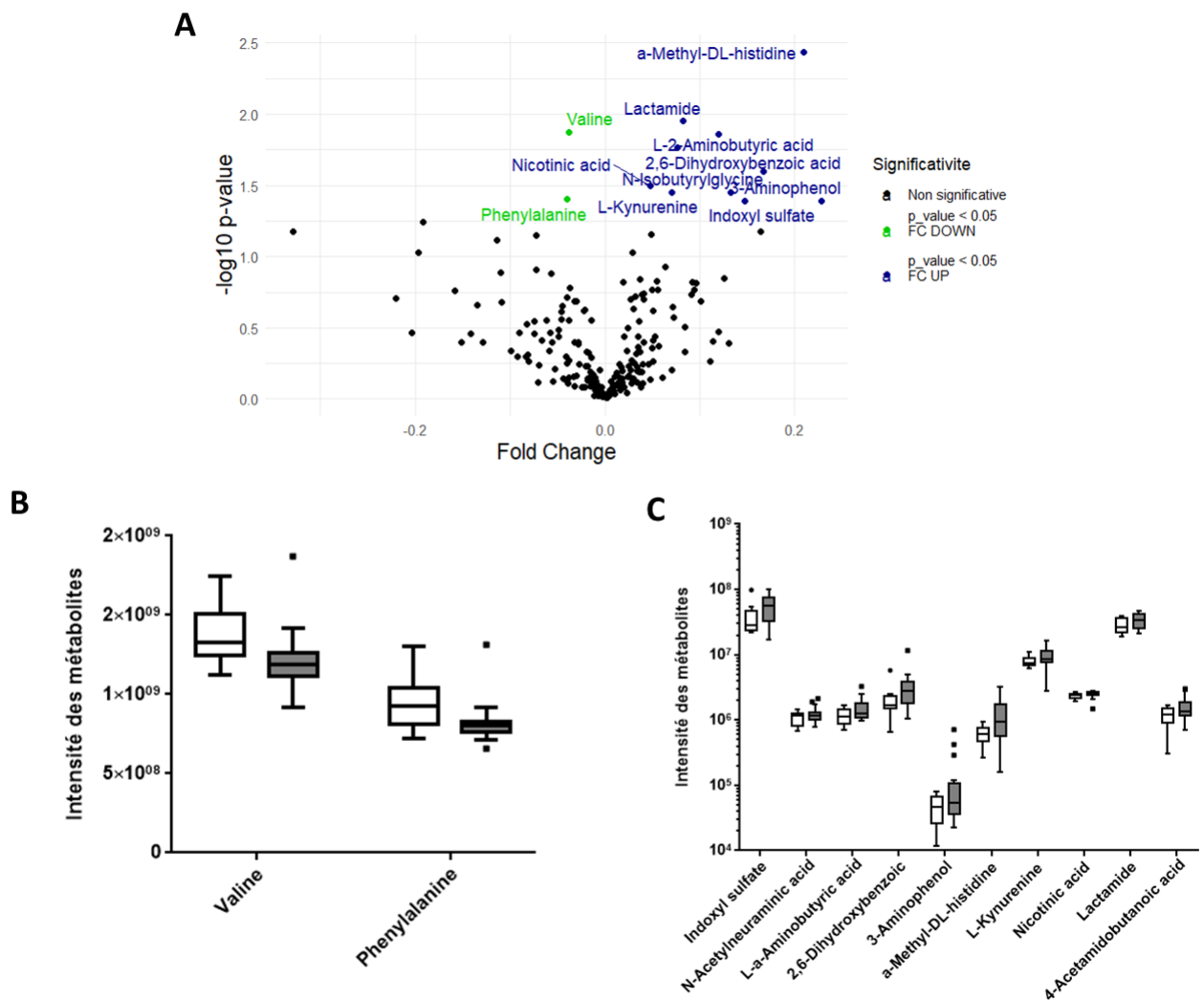


Figure 42 : Volcano plot représentant toutes les variables annotées et vérifiées par MS/MS (A). En vert, sont représentées les variables moins intenses chez les asthmatiques sévères que chez les contrôles et en bleu, est représenté le phénomène inverse. En noir sont présentés les métabolites non significativement différents entre les deux groupes. Box plot des intensités des métabolites significativement diminués (B) ou augmentés (C) chez les enfants asthmatiques sévères (en gris) par rapport aux non-asthmatiques (en blanc).

Par la suite, nous avons réalisé une analyse d'enrichissement de l'ensemble des métabolites (Figure 44) pour déterminer si des voies métaboliques étaient impactées par l'asthme sévère dans le plasma. Les résultats montrent que le métabolisme de l'histidine ainsi que le métabolisme des sucres aminés étaient les plus impactés (Figure 44A). Cependant, aucune des voies n'était significativement enrichie après correction FDR (Figure 44B).

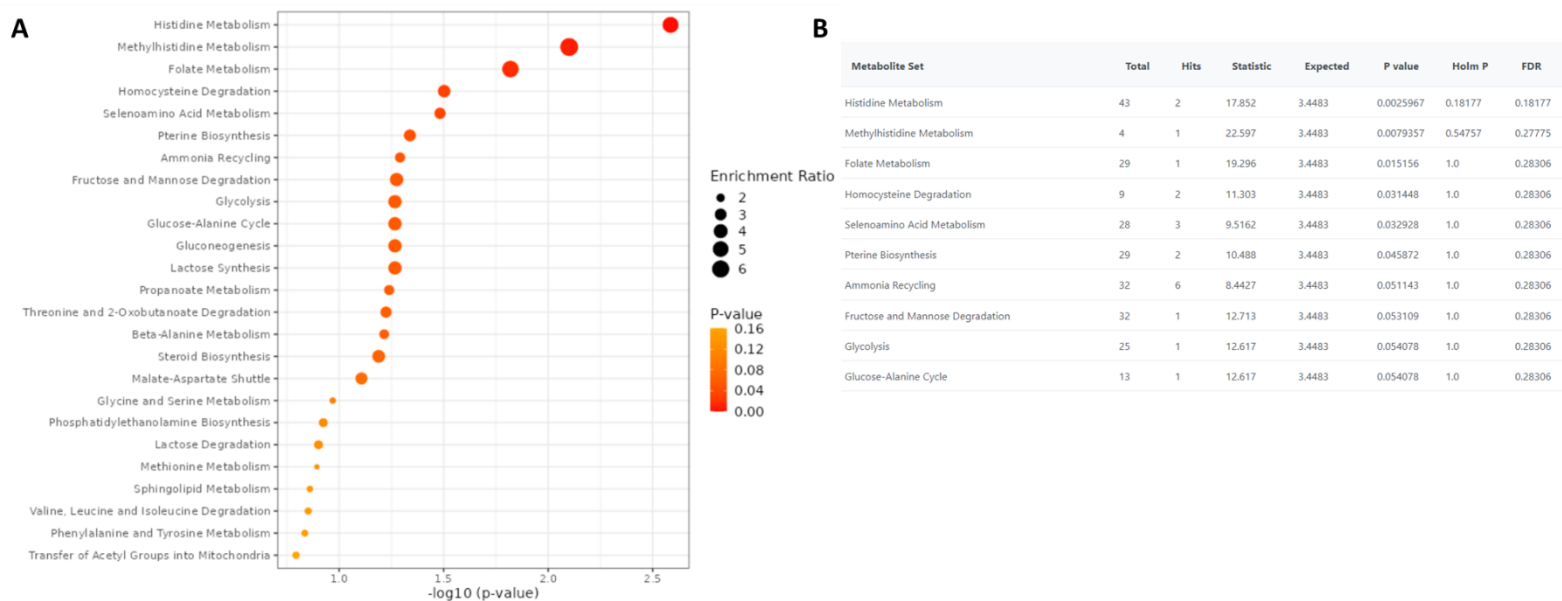


Figure 43 : **A.** Résultats de l'analyse d'enrichissement de l'ensemble de métabolites (top 25) à partir de l'analyse des métabolites, cartographiés dans les voies métaboliques humaines (KEGG) et significativement altérées par l'asthme sévère. La taille des cercles représente le taux d'enrichissement de la voie métabolique et la couleur représente la valeur p. **B.** Résultats de l'analyse d'enrichissement pour les 10 voies les plus impactées.

Les métabolites intervenant dans le métabolisme de l'histidine et dans le métabolisme des sucres aminés sont l'histidine et la méthyl-histidine (déjà décrite dans l'analyse différentielle) ainsi que l'acétylglucosamine, l'acide acétylneuraminique et la glutamine respectivement.

Nous avons ensuite effectué des analyses de corrélation entre les métabolites annotés et les paramètres démographiques et cliniques des patients. Nos résultats ont montré que le sexe féminin était associé positivement à la guanosine ( $\rho = 0,48$ ) et à l'inosine ( $\rho = 0,49$ ). L'acide oxobutyrique ( $\rho = -0,47$ ) et l'acide malique étaient négativement corrélés avec l'IMC alors que la 5-méthyl-désoxycytidine ( $\rho = -0,47$ ) était négativement corrélée avec l'âge. Le N-acétyl-tryptophane ( $\rho = 0,60$ ) et l'acide gamma-linolénique ( $\rho = 0,56$ , Figure 44B) étaient fortement corrélés à une bactériologie positive. Une virologie positive était quant à elle corrélée positivement avec l'intensité de l'acide orotique ( $\rho = 0,48$ ), de l'acétate d'indoxyle ( $\rho = 0,52$ ) et négativement corrélée aux intensités de la tyrosine ( $\rho = -0,47$ ), de l'acide benzoïque ( $\rho = -0,50$ ) et du phénol ( $\rho = -0,51$ ).

De la même façon, les analyses de corrélations entre les intensités des métabolites annotés dans le plasma et les données cliniques ont montré que la méthyl-histidine ( $\rho = 0,50$ ) et le sulfate d'androstérone ( $\rho = 0,55$ ) étaient positivement corrélés avec le score de contrôle de l'asthme (score ACT) (Figure 44A), alors que l'acide 5-hydroxyindoleacétique ( $\rho = -0,47$ ) et l'oxalate de diméthyle ( $\rho = -0,49$ ) étaient négativement corrélés à ce score. De plus, l'acétyl-ornithine ( $\rho = 0,50$ ) et l'acide mésaconique ( $\rho = 0,47$ ) étaient positivement corrélés avec le nombre d'exacerbations et l'acide 13(S)-Hydroxyoctadéca-9Z,11E-diénoïque ( $\rho = -0,54$ ) était



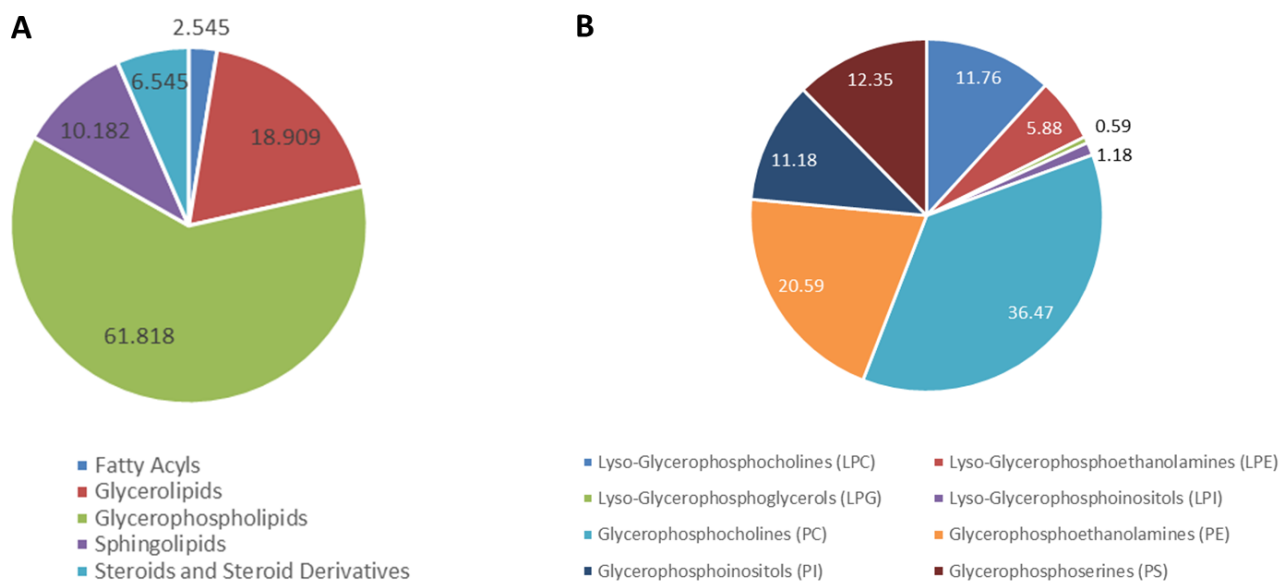


Figure 45 : Lipides identifiés dans le plasma par l'analyse lipidomique. **A.** Composition lipidique total des échantillons plasmatiques (%). **B.** Composition en glycérophospholipides de ces mêmes échantillons (%).

Par la suite, nous avons voulu déterminer quels lipides étaient corrélés à l'asthme sévère, par des approches univariées supervisées. Nous avons identifié deux lipides significativement diminués dans le plasma des enfants souffrant d'AS par rapport au groupe contrôle, tandis que douze lipides étaient significativement augmentés (Figure 46A). En effet, les intensités de l'ester de cholestérol 15:0 et de la carnitine C18:0 étaient significativement diminuées chez les enfants AS par rapport aux contrôles (Figure 46B). A l'inverse, les intensités des lyso-glycérophosphoéthanolamines (LPE) 18a:1 et 20a:4, de la lyso-glycérophosphocholine (LPC) 18a:2, des PE 34a:1, 36a:1, de la glycérophosphosérines (PS) 36a:3 et des TG 54:5, 54:4, 54:2, 56:4 et 56:3 étaient significativement augmentées chez les AS par rapport aux contrôles (Figure 46B).

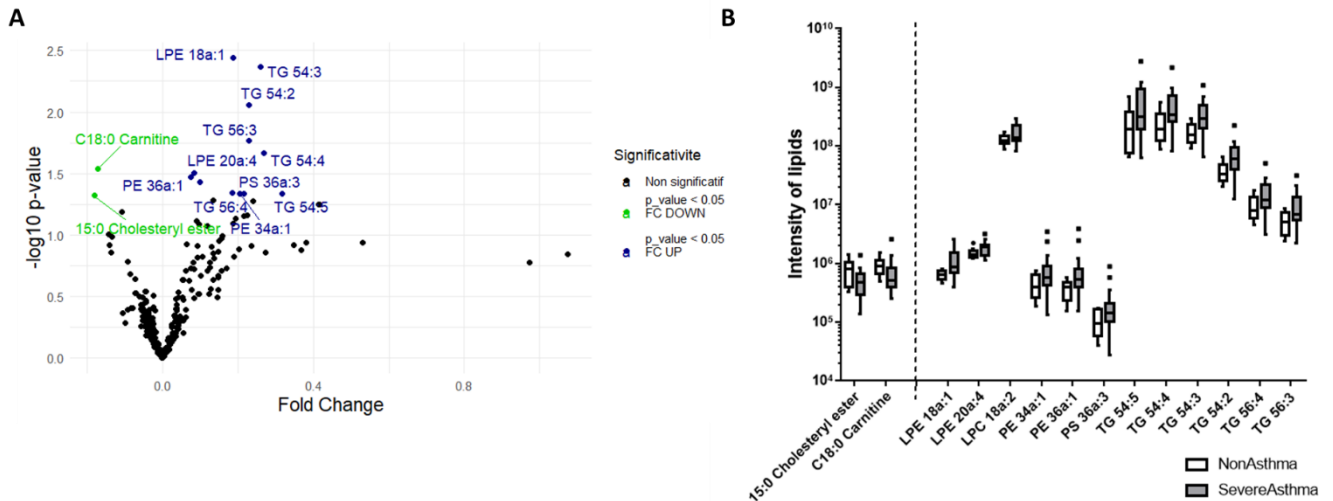


Figure 46 : **A.** Volcano plot des lipides identifiés et annotés par LC-MS. En vert, sont représentés les lipides dont les intensités sont plus faibles chez les asthmatiques sévères que chez les contrôles et en bleu, sont représentés les lipides dont les intensités sont plus élevées chez les asthmatiques sévères que chez les contrôles. En noir, sont représentés les métabolites non significativement différents entre les deux groupes. **B.** Boxplot des intensités des lipides significativement différents entre les asthmatiques sévères (en gris) et les non-asthmatiques (en blanc).

LPE : lyso-glycérophosphoéthanolamine ; LPC : lyso-glycérophosphocholine ; PE : glycérophosphoéthanolamine ; PS : glycérophosphosérines ; TG : triglycérides.

Nous avons aussi réalisé des analyses statistiques univariées en combinant les lipides par sous-classe de lipides (Tableau 9). Nos résultats montrent que seuls les triglycérides (ou triacylglycérols) étaient significativement augmentés chez les enfants asthmatiques sévères par rapport aux contrôles (avant correction par tests multiples).

Tableau 9 : Résultats des analyses univariées réalisées sur les lipides regroupés par sous-classes. Les p value sont données avec et sans correction pour les tests multiples.

Classes	Ecart-type	p value	p value Bonferroni
<b>Acides gras</b>			
Acides gras libres	0,16	5,24E-01	1,00E+00
Acylcarnitines	0,41	1,00E+00	1,00E+00
<b>Glycérolipides</b>			
Diacylglycérols	0,35	9,03E-02	1,00E+00
Triacylglycérols (TG)	0,26	4,53E-02	7,70E-01
<b>Glycérophospholipides</b>			
Lyso-glycérophosphocholines (LPC)	0,34	7,08E-01	1,00E+00
Lyso-glycérophosphoéthanolamines (LPE)	0,31	5,53E-01	1,00E+00
Lyso-glycérophosphoglycérols	0,20	3,44E-01	1,00E+00
Lyso-glycérophosphoinositols	0,54	4,68E-01	1,00E+00
Glycérophosphocholines	0,17	3,67E-01	1,00E+00
Glycérophosphoéthanolamines (PE)	0,22	9,47E-01	1,00E+00
Glycérophosphoinositols	0,20	5,53E-01	1,00E+00
Glycérophosphosérines (PS)	0,17	2,62E-01	1,00E+00
<b>Sphingolipides</b>			
Céramides	0,22	7,75E-01	1,00E+00
Gangliosides	0,31	8,09E-01	1,00E+00
Sphingomyélines	0,24	8,09E-01	1,00E+00
<b>Stéroïdes et dérivés de stéroïdes</b>			
Esters de cholestéryle	0,26	8,78E-01	1,00E+00
Stérols	0,20	8,43E-01	1,00E+00



### e) Analyse multi-omique au niveau plasmatique

Nous avons ensuite réalisé une analyse multi-omique non supervisée combinant les données de cytokines/anticorps préalablement obtenues, les métabolites et les lipides annotés. Cette analyse a permis d'obtenir 8 facteurs qui sont peu corrélés ensemble. La plus forte corrélation est observée entre les facteurs 3 et 4 (Figure 47A). Les données des lipides étaient les seules contribuant au facteur 1. L'ensemble des jeux de données contribuait néanmoins au facteur 2 (21.25 %, 6.73 % et 7.88 % de variance expliqués respectivement par les cytokines, les métabolites et les lipides, Figure 47B). Les données de lipidomique étaient les données qui expliquaient le plus la variance de l'ensemble des données (63.01 % de variance expliquée, Figure 47C).

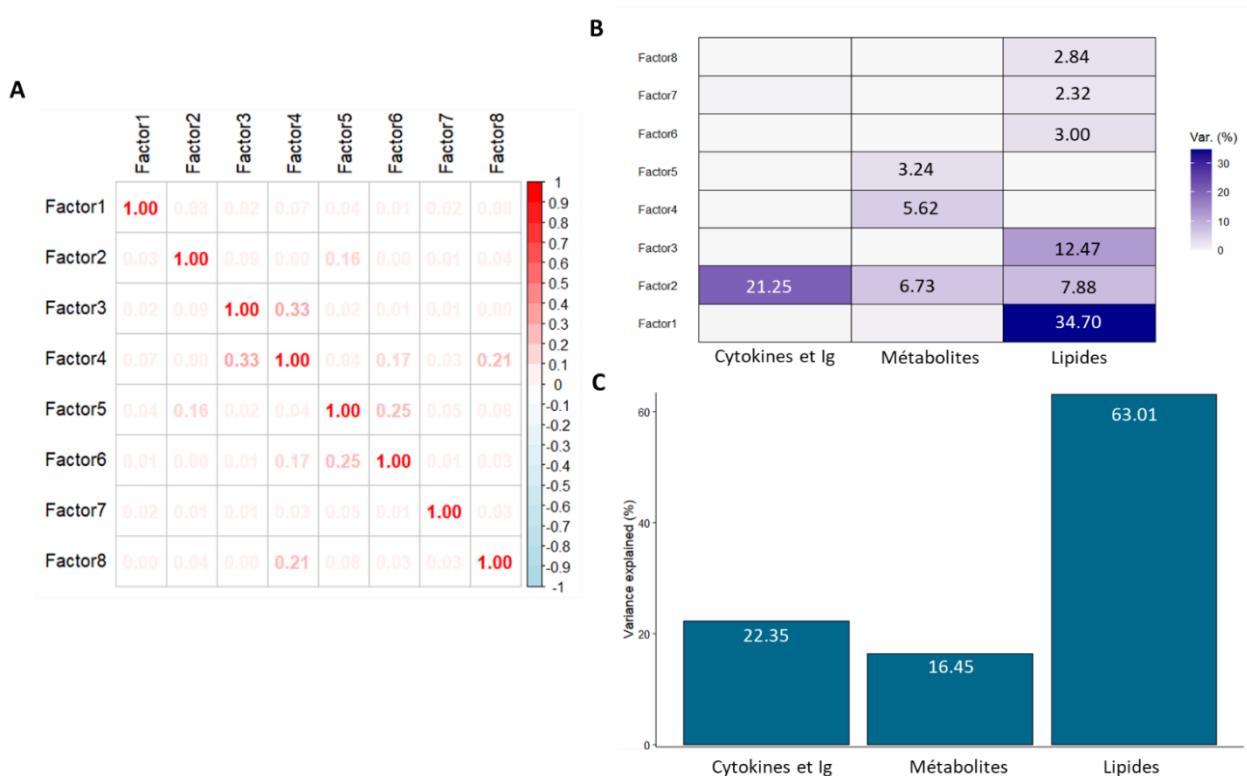


Figure 47 : Description des facteurs obtenus par l'analyse MOFA. **A.** Corrélation entre les facteurs. **B.** Variance expliquée de chaque facteur en fonction des jeux de données. **C.** Variance expliquée globale.

L'analyse de corrélation de ces facteurs avec les données cliniques et démographiques a montré que le facteur 1 était associé à l'âge et à l'IMC alors que le facteur 4 était associé avec le sexe féminin. Pour finir, le facteur 5 était corrélé à l'âge et le facteur 8 à l'IMC et à une bactériologie positive (Figure 48A). Cependant, aucun des facteurs n'était associé avec le statut asthmatique sévère (Figure 48A et B).

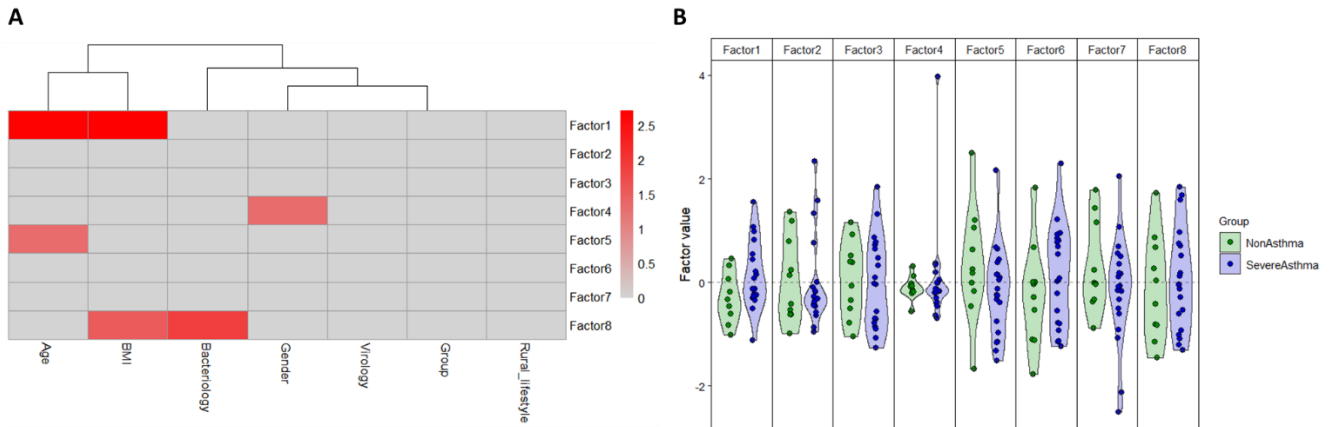


Figure 48 : **A.** Association entre les facteurs issus de l'analyse MOFA et les données démographiques et infectieuses. Le log10 de la valeur p ajustée est représenté. BMI : Indice de Masse Corporelle. **B.** Associations des 8 facteurs avec la pathologie de l'asthme. Les points verts représentent les non-asthmatiques et les points bleus les asthmatiques sévères.

Bien que chaque bloc de données permet de différencier les enfants AS des enfants NA lors des analyses supervisées, l'analyse multi-omique non supervisée n'a pas permis de trouver un facteur différenciant les deux groupes de patients ni d'identifier une signature systémique de l'AS.

### Conclusion et discussion

Nous avons précédemment montré, à l'aide d'une analyse complète et non ciblée des constituants immunitaires dans le sang, et à l'aide d'analyses supervisées, que la combinaison des concentrations plasmatiques en IgA, CCL26, IL-19, IL-26, CCL13, APRIL et Pentraxin-3 permettaient une bonne classification des enfants SA par rapport aux enfants témoins. Ces résultats soulignent que ces constituants immunitaires pourraient être utiles pour aider au diagnostic de ces enfants, et étaient déjà une preuve de concept qu'une signature de l'AS pouvait être identifiée en périphérie.

L'objectif de cette partie de notre étude était d'identifier des profils de métabolites et de lipides, en plus du profil immunitaire, pouvant caractériser les patients pédiatriques atteints d'asthme sévère.

Premièrement, nous avons observé peu de corrélations entre les intensités mesurées dans les LBA et dans le plasma pour un même métabolite, comme nous avons pu l'observer pour les facteurs immunitaires. Il apparait donc que la signature présente localement sera dissociée de celle éventuellement présente en périphérie. La première peut permettre de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la maladie, ou les dérégulations qui en dérivent directement. La seconde pourra permettre d'identifier une signature de la maladie en périphérie, permettant d'aider au diagnostic et au suivi du patient. Celle-ci sera le reflet de la réaction locale ou sa conséquence, mais sans en décrire ou en expliquer les acteurs locaux.



Les analyses non supervisées (ACP) réalisées avec les blocs de données des métabolites et des lipides ne permettent pas de distinguer nos deux groupes de patients. Cependant, comme pour les LBA, nous avons pu observer par des analyses univariées supervisées, que certains métabolites et certains lipides étaient significativement différents dans le plasma d'enfants asthmatiques sévères par rapport aux contrôles. Les métabolites significativement augmentés étaient le sulfate d'indoxyle, l'acide acétylneuraminique, l'acide aminobutyrique, l'acide dihydroxybenzoïque, l'aminophénol, la méthyl-histidine, la kynurénine, l'acide nicotinique, le lactamide et l'acide acétamidobutanoïque. Parmi ces métabolites, on note la présence de différents métabolites de la voie du tryptophane (kynurénine, acide dihydroxybenzoïque, sulfate d'indoxyle). Le tryptophane est un acide aminé essentiel qui peut être métabolisé par trois voies principales : la voie de la kynurénine (la voie principale, via l'action de l'indoleamine 2,3-dioxygénase-1 - IDO), la voie de la sérotonine, et la voie des indoles (dépendant du microbiote intestinal et produisant les ligands AhR)<sup>137</sup>. Les intermédiaires du métabolisme du tryptophane produits par la voie de la kynurénine et des indoles sont des médiateurs importants des réponses immunitaires<sup>174</sup>. L'activité de l'indoleamine 2,3-dioxygénase-1 (IDO) et les métabolites de la kynurénine, tout comme les dérivés indoles, montrent des propriétés anti-inflammatoires et tolérogènes, notamment en réduisant l'activation des cellules T via la réduction de la disponibilité du tryptophane, et en favorisant les cellules T régulatrices<sup>175,176</sup>. Des études chez l'homme soutiennent une réduction de l'activité de l'IDO dans l'asthme allergique infantile, en particulier chez les enfants présentant des taux élevés de FeNO<sup>177</sup>. Dans ce sens, une autre étude, a montré des niveaux inférieurs de kynurénine et d'acide quinolinique dans le condensat de l'air expiré d'adultes souffrant d'asthme allergique indiquant que l'activité pulmonaire de l'IDO était altérée chez ces patients<sup>178</sup>. Cependant, il a aussi été montré que les taux de tryptophane et de kynurénine étaient plus élevés chez les enfants souffrant d'asthme et de rhinite allergique<sup>179</sup>. De plus, il a été montré que des changements dans le microbiote intestinal s'avèrent être un facteur important contribuant à l'inflammation ainsi qu'au stress oxydatif en augmentant l'accumulation de toxines urémiques dérivées de l'intestin telles que le sulfate d'indoxyle<sup>180</sup>. Nos résultats vont dans le sens d'une augmentation de l'activité de l'IDO chez les enfants asthmatiques sévères.

Par ailleurs, une étude métabolomique ciblée des acides aminés sériques chez des patients asthmatiques a montré que les niveaux d'acide  $\gamma$ -amino-n-butyrique et de l-arginine étaient plus élevés chez les asthmatiques que chez les témoins, et que les niveaux plasmatiques de tryptophane étaient élevés chez les asthmatiques<sup>181,182</sup>. La méthyl-histidine est quant à elle un analogue de l'histidine que l'on trouve principalement dans les muscles squelettiques. L'histidine permet la synthèse de l'histamine qui induit la réponse inflammatoire et la contraction des muscles lisses des voies respiratoires chez les patients asthmatiques<sup>172,183</sup>.

L'acide nicotinique peut être utilisé pour traiter l'asthme<sup>184</sup>, ce qui peut expliquer que l'on ait retrouvé des niveaux plus élevés de ce métabolite chez les patients souffrant d'AS (reflet du traitement).

Nous avons aussi observé une diminution de l'intensité de la phénylalanine dans le plasma des enfants asthmatiques sévères par rapport aux contrôles. Les acides aminés sont des médiateurs des activités immunologiques dans l'asthme et ont des fonctions antioxydantes ; en particulier, la taurine, la glycine, la glutamine et le glutamate peuvent avoir des effets potentiellement protecteurs, tandis que la phénylalanine peut avoir des effets indésirables<sup>182,185</sup>. Il a été rapporté que la L-phénylalanine était lié à l'asthme<sup>186</sup>. Dans notre étude, nous observons le phénomène inverse, soit une diminution de ce métabolite dans l'asthme sévère.

De plus, nous avons pu observer que les intensités de plusieurs glycérophospholipides comme certains LPE, PE, LPC, PS et des glycérolipides, en particulier des TG étaient significativement augmentées chez les enfants atteints d'AS par rapport aux contrôles. Cependant, lorsque l'on regarde tous les lipides regroupés par sous-classe, seuls les triglycérides étaient significativement différents entre les groupes de patients. Peu d'études ont examiné la relation entre le profil lipidique sanguin et l'asthme. Il a été montré chez la souris que l'exposition directe à la LPC exogène augmentait l'hyperréactivité des voies respiratoires, l'inflammation et les cytokines Th2<sup>187</sup>. Une autre étude a montré que, dans le plasma de sujets adultes asthmatiques, les glycérophospholipides (y compris PE, PC et PS) étaient considérablement modifiés<sup>116</sup>. De plus, il a été montré que les niveaux de triglycérides plasmatiques étaient significativement élevés chez les patients adultes asthmatiques et obèses par rapport à des témoins obèses non-asthmatiques<sup>188</sup>. L'acide arachidonique est le principal acide gras  $\omega$ -6, qui peut favoriser l'asthme en induisant la dégranulation des éosinophiles et la production d'IgE par les cellules B, mais les acides gras  $\omega$ -6 peuvent aussi présenter des effets anti-inflammatoires partiels<sup>189</sup>. Les études de Crestani et al.<sup>190</sup>, et Ried et al.<sup>124</sup>, ont montré des associations positives de divers niveaux de phosphatidylcholine polyinsaturée dans le sérum de patients asthmatiques (adultes et enfants).

Malgré quelques différences en termes de métabolites et de lipides, l'analyse multi-omique non supervisée réalisée sur le plasma n'a pas permis de trouver un ensemble de métabolites, de cytokines et de lipides permettant de différencier les deux groupes de patients. Ces résultats suggèrent que l'asthme sévère n'induit pas de modifications majeures en périphérie.

Nous avons pu identifier des signatures dans le plasma, dont le potentiel prédictif devrait être testé sur une deuxième cohorte.

## Conclusion générale de la partie 1

L'asthme est une maladie hétérogène, ce qui signifie qu'il existe de nombreux types d'asthme différents. Ces différents types d'asthme, bien qu'ils produisent des symptômes similaires, sont susceptibles d'avoir des mécanismes sous-jacents différents. L'identification des caractéristiques individuelles de la maladie peut fournir des informations sur les mécanismes de celle-ci et peut être prédictive de la réponse d'un patient au traitement. L'objectif de notre étude était donc de caractériser la population pédiatrique d'asthme sévère en utilisant des approches omiques seules ou intégrées et ainsi d'identifier des biomarqueurs locaux et périphériques associés à la pathologie.

Nous avons, grâce à des analyses multi-omiques aux niveaux local et systémique, mis en évidence des signatures de l'asthme sévère. L'analyse au niveau local, nous a fourni des résultats intéressants, en mettant en exergue la complexité de l'AS, se traduisant ou résultant d'interactions complexes entre immunité et métabolisme. Même si l'intégration des données ne met pas en avant de fortes altérations ou des marqueurs liés au microbiote dans la pathologie, nous avons mis en évidence 6 genres bactériens significativement augmentés dans les LBA d'enfants asthmatiques sévères, qui montraient par ailleurs une diversité microbienne plus importante.

Nous avons observé une faible corrélation entre les marqueurs locaux et périphérique. Il est donc nécessaire de regarder localement pour expliquer la pathologie mais aussi d'identifier une signature en périphérie pour l'aide au diagnostic et au suivi des patients. Dans ce contexte, nous avons observé certaines modifications aux niveaux des intensités des métabolites et des lipides identifiés par LC-HRMS.

Les perspectives de ce travail permettront de vérifier les résultats préliminaires obtenus sur l'analyse des populations cellulaires<sup>79,80</sup>. Pour mieux décrire les endotypes de l'asthme sévère<sup>48</sup>, il peut être intéressant de classer les différentes sous-populations au sein des enfants asthmatiques sévères. En ce sens, la cohorte doit avoir un nombre de patients atteint d'AS assez important

Partie 2 : Etude du système immunitaire sur la cohorte  
SevAsthma et caractérisation des interactions  
microbiote/cellules épithéliales pulmonaires dans un  
contexte d'inflammation T2

# Chapitre 1 : Analyse des cellules immunitaires et des cytokines aux niveaux local et plasmatique

## Contexte

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires dans laquelle de nombreuses cellules des systèmes immunitaires interagissent avec les cellules épithéliales pour provoquer une hyperréactivité bronchique, la surproduction de mucus, le remodelage de la paroi des voies respiratoires et le rétrécissement des voies respiratoires<sup>191</sup>.

Les acteurs de l'immunité innée et adaptative sont recrutés dans l'asthme, avec un rôle notamment des lymphocytes T. L'asthme est considéré depuis plus de 2 décennies comme une maladie immunologique des voies respiratoires médiée par l'immunité adaptative et les cellules Th2. Cependant, différentes études suggèrent que d'autres types cellulaires peuvent être impliqués dans l'asthme comme les ILC ou les Treg. L'implication de ces cellules a été développée dans l'introduction.

Grâce à la cohorte CLASSE, nous avons récemment mis en évidence que les enfants atteints d'AS présentaient un profil mixte Th1/Th2 dans le LBA<sup>79</sup>. En allant plus loin, nous avons par la suite observé que les patients ayant des exacerbations fréquentes présentaient un phénotype mixte T2/T17 dans les LBA, alors que ceux avec des exacerbations moins fréquentes étaient caractérisés par un phénotype T1<sup>80</sup>.

L'objectif ici est de confirmer et étendre ces résultats, grâce aux échantillons collectés au sein de la cohorte SevAsthma. Pour cela, nous allons analyser différentes populations cellulaires notamment les ILC, les Th ainsi que les Treg. Il sera aussi prévu de réaliser des analyses des facteurs solubles par Bioplex. Dans cette partie sont présentées les différentes stratégies d'études des populations cellulaires.

## Matériels et méthodes

### a) Population d'étude

Les analyses des différentes sous-populations ont été réalisées sur les inclusions jusqu'au 29 mars 2023, soit 21 patients atteints d'asthme sévère et 11 patients contrôles non-asthmatiques.

### b) Préparation des cellules pour le marquage en cytométrie en flux

Les analyses des populations cellulaires ILC et Th ont été réalisées sur les LBA ainsi que sur les PBMC, alors que l'analyse des Treg a été réalisée uniquement sur les PBMC. Les premières étapes de traitement des échantillons sont présentées pages 66. Pour les

marquages sans restimulation,  $7,5 \times 10^6$  cellules ont été gardées soit environ  $2,5 \times 10^6$  cellules pour chaque panel lorsque cela est possible. Les cellules restantes ont été centrifugées (10 min,  $500 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ), et reprises dans 0,5 mL de plasma. Puis a été ajouté goutte à goutte 0,5 mL de plasma + 20 % DMSO froid en mélangeant doucement. Ensuite, les cellules ont été transférées en cryotube puis stockées en azote liquide avant d'être utilisées pour les restimulations *ex vivo*.

#### c) Protocole et panel d'anticorps pour le marquage cellulaire sur cellules « fraîches »

Le culot cellulaire des LBA repris en AIM-V + 1% plasma autologue a été filtré sur filtre de 40  $\mu\text{m}$  (Cell Strainer, Sigma-Aldrich). Les PBMC n'ont pas subi de traitement supplémentaire avant la numération cellulaire et la mesure de la viabilité. Les comptages cellulaires et les déterminations de viabilité ont été effectués à l'aide d'un cytomètre en flux NovoCyte (ACEA Biosciences, San Diego, États-Unis), après incubation d'un aliquot de la préparation cellulaire avec de la 7-aminoactinomycine D (7-AAD, Interchim, Montluçon, France), un composé fluorescent qui marquant les cellules mortes. Les cellules ont ensuite été centrifugées ( $1000 \times g$ , 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ). Après un nouveau lavage en PBS/EDTA 2 mM, elles ont été reprises en PBS/EDTA 5 mM et partagées pour l'étude des ILC et Th pour les LBA et des ILC, Th et Treg pour les PBMC.

En amont des marquages, un marqueur de viabilité (LD Viogreen, Miltenyi Biotec) a été ajouté et incubé 15 min à TA. Les cellules ont ensuite été lavées en PBS/EDTA 2 mM ( $500 \times g$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ) pour éliminer le marqueur en excès, puis reprises en PBS/BSA/EDTA 5 mM avec 10  $\mu\text{L}$  de Signal Enhancer (Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne) pour augmenter la spécificité de liaison des anticorps conjugués et diminuer les marquages non spécifiques. Après incubation (5 min, TA), les anticorps pour les marquages extracellulaires (Annexe 6A, Annexe 7A, Annexe 8) ont été ajoutés puis incubés 30 min à  $4^\circ\text{C}$  dans l'obscurité. Après un nouveau lavage en PBS/BSA/EDTA 2 mM (centrifugation  $500 \times g$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ), les cellules pour l'étude des ILC et des Th ont été reprises en tampon de fixation (CytoFix ; BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) puis gardées dans la glace dans l'obscurité jusqu'à leur analyse par cytométrie en flux.

Les cellules utilisées pour l'analyse des Treg, ont subi une étape de fixation et de perméabilisation pour le marquage intranucléaire, avec l'ajout de tampon de fixation / perméabilisation (Fix/Perm, Miltenyi Biotec) et une incubation de 30 min à  $4^\circ\text{C}$  dans l'obscurité. Après lavage des cellules en tampon de perméabilisation, les cellules ont été reprises dans ce même tampon. Les anticorps pour le marquage intranucléaire (facteurs de transcription foxp3 et HELIOS ; Annexe 8) ont ensuite été ajoutés et incubés 45 min ( $4^\circ\text{C}$ , dans l'obscurité). Les cellules ont enfin été lavées avec du tampon de perméabilisation (centrifugées  $500 \times g$ , 10 min,

4°C), reprises en tampon CytoFix puis gardées dans la glace dans l'obscurité jusqu'à leur analyse par cytométrie en flux.

#### d) Protocole et panel d'anticorps pour le marquage cellulaire sur cellules réactivées *ex vivo*

L'étude de l'activation des cellules, a été réalisée sur les PBMC décongelées, après une étape de stimulation non spécifique et l'analyse des cytokines produites par les différents sous-types de cellules T et d'ILC. Les cellules décongelées ont été transférées dans un tube de culture contenant 3 mL de milieu de culture (RPMI + 5% plasma, contenant 100 U.ml<sup>-1</sup> de pénicilline et de streptomycine, 2 mM de L-glutamine, et 10 U/mL de DNase (DNase I recombinante, Roche). Après une première centrifugation (5 min, 800xg), les cellules ont été reprises dans le même milieu de culture. Après une seconde étape de centrifugation, le culot cellulaire a été repris dans 1 mL de milieu de culture sans DNase. Les cellules ont été transférées sur plaque de 48 puits puis incubées (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) toute la nuit avant la stimulation. La plaque a ensuite été centrifugée (5 min, 800xg) et le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais. Après ajout de l'entérotoxine staphylococcique A (SEA, 50 ng/mL, Sigma), les cellules ont été incubées 18 à 20h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Un mélange contenant 50 µM de β-mercaptoéthanol (Gibco), 500 ng/mL de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA, Sigma-Aldrich), 1 µg/mL de ionomycine (Sigma) et 5 µg/mL de bréfeldin (Sigma-Aldrich) a alors été ajouté, et l'incubation poursuivie pendant 6h. Les cellules ont ensuite été transférées en tubes pour être marquées comme précédemment (Annexe 3B, Annexe 4B), combinant des marquages extracellulaires et intracellulaires. Un marquage sur cellules décongelées et non stimulées (PBMC stim-) a également été réalisé.

#### e) Acquisition des données de cytométrie

Les acquisitions ont été réalisées sur un appareil Attune NXT (ThermoFisher Scientific ; 4 lasers : émettant de la lumière polarisée dans le jaune (561 nm), le bleu (488 nm), le rouge (637 nm) et le violet (405 nm)), directement après les marquages. Chaque expérience contenait des échantillons non marqués et des échantillons marqués avec des anticorps de contrôle d'isotype. La compensation de fluorescence en cas de spill-over a été effectuée à l'aide d'UltraComp eBeads™ à coloration unique (Invitrogen, ThermoFisher Scientific).

#### f) Stratégie d'analyse des populations cellulaires

##### **Etude des cellules lymphoïdes innées (ILC)**

Les ILC, localisées au niveau des tissus, sont en contact avec le milieu extérieur et sont capables de produire des cytokines rapidement.

Les ILC sont identifiées comme des cellules CD45<sup>+</sup>, Lin<sup>-</sup> et CD127<sup>+</sup>. Les sous-types d'ILC (1, 2 et 3) sont différenciés par leur expression membranaire des marqueurs cKit et CRTH2 lorsque l'analyse est réalisée sur cellules non stimulées. Les ILC1 sont CRTH2<sup>-</sup> et cKit<sup>-</sup> alors que les ILC2 sont CRTH2<sup>+</sup>. Les ILC3 (cKit<sup>+</sup> et CRTH2<sup>-</sup>) peuvent être divisées en deux catégories, les ILC3 NCR<sup>-</sup> et NCR<sup>+</sup> en fonction de l'expression de NKp46 (Figure 49).

Après stimulation *ex vivo*, la détection intracellulaire de différentes cytokines (IFN $\gamma$ , IL-13 et IL-5, IL-22 et IL-17, dont la sécrétion est bloquée par le brefeldine), a été réalisée au sein de la population CD45<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>, permettant de connaître les proportions respectives des ILC1, ILC2 et ILC3 activées.

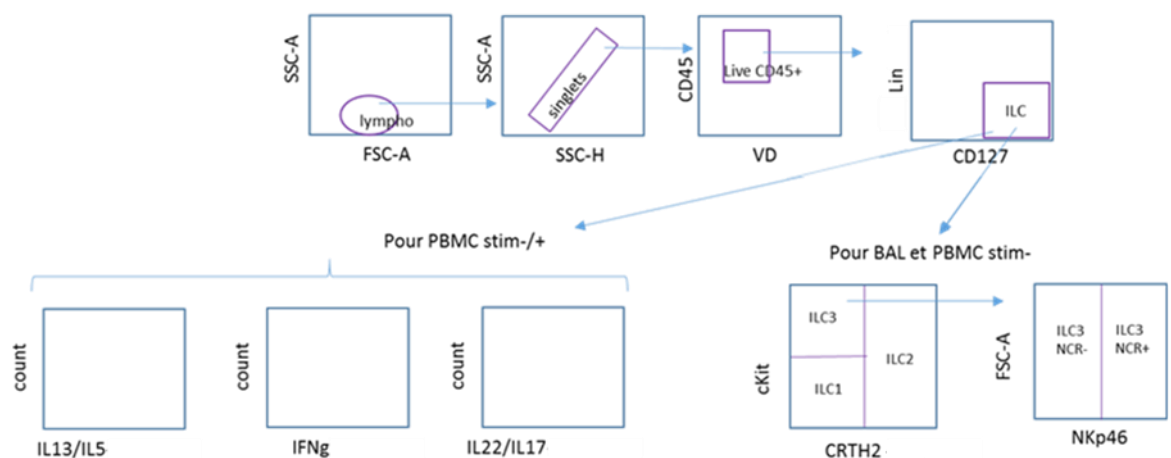


Figure 49 : Stratégie d'identification des différentes populations d'ILC et d'ILC activées.

### Etude des cellules T auxiliaires (Th)

Les cellules T auxiliaires (cellules Th) sont des cellules CD45<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>, qui jouent un rôle important dans le système immunitaire adaptatif. Pour définir quelles cellules T CD4<sup>+</sup> sont impliquées dans l'asthme sévère, nous avons analysé sur les LBA et les PBMC « frais » quatre sous-ensembles de lymphocytes Th, distingués par l'expression différentielle de récepteurs de chimiokines : Th1 (CCR6<sup>-</sup> CXCR3<sup>+</sup> CCR4<sup>-</sup>), Th2 (CCR6<sup>-</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>+</sup>), Th17 (CCR6<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR4<sup>+</sup>) et Th1 non conventionnel (CCR6<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> CCR4<sup>-</sup>, défini comme ncTh1) (Figure 50). Après stimulation non spécifiques *ex vivo* des PBMC, l'activation des différents sous-types de Th a été étudiée en fonction de la production de cytokines : IFN $\gamma$  (Th1), IL-13 et IL-5 (Th2) ou d'IL-17 et d'IL-22 (Th17) (Figure 50).



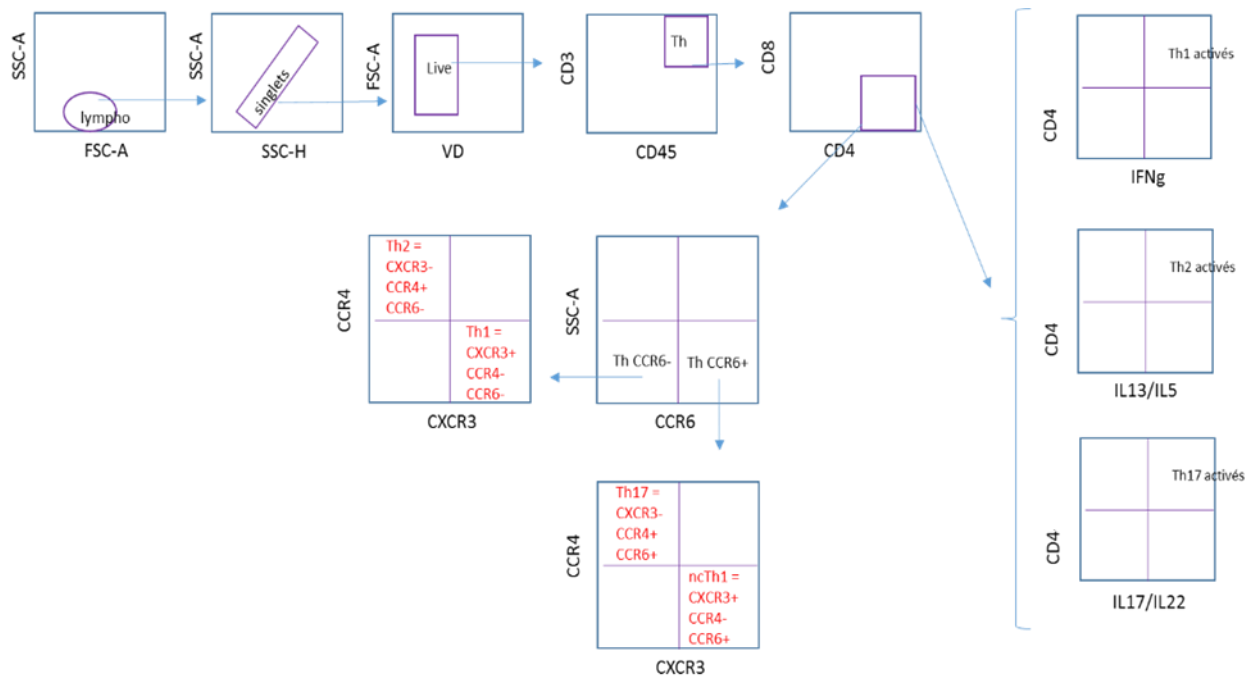


Figure 50 : Stratégie d'identification des différentes populations de cellules T auxiliaires (ou T helper, Th).

### Etude des lymphocytes T régulateurs (Treg)

Les lymphocytes T régulateurs sont une population spécifique de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, qui jouent un rôle important dans le contrôle des réactions immunitaires, dont la réaction inflammatoire asthmatique. Elles sont caractérisées par les marquages membranaires CD45<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> mais aussi comme CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> Foxp3<sup>+</sup> (Figure 51). Pour finir, le marqueur Helios permet de différencier les Treg induits dans le thymus (nTreg, n pour naturels) ou induits en périphérie (iTreg).

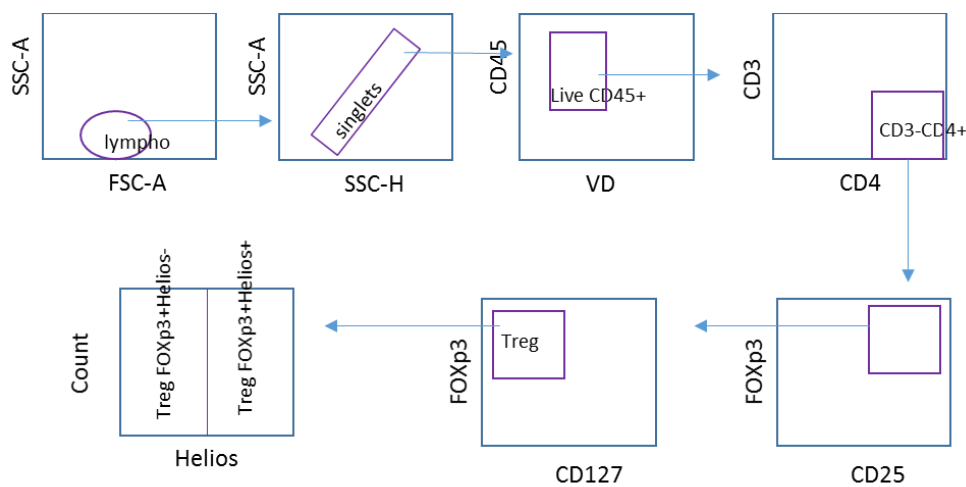


Figure 51 : Stratégie d'identification des lymphocytes T régulateurs.

### g) Analyses des données

Les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel FlowJo® (version 10, ACEA Biosciences, Inc.). Chaque échantillon a d'abord été représenté selon les paramètres taille x structure (FSCxSSC), permettant d'exclure les débris et les cellules granuleuses de grosse taille. Parmi les cellules sélectionnées, les cellules non-agrégées ont été sélectionnées sur un graphe SSC-A x SSC-H. Au sein de la population de cellules uniques, les cellules CD45<sup>+</sup> vivantes ont été sélectionnées, puis les stratégies d'identification présentées précédemment ont été appliquées. Les fréquences des cellules d'intérêt sont exprimées en pourcentage de cellules CD45<sup>+</sup> viables.

Une ACP a été réalisée sur l'ensemble des données obtenues sur les PBMC pour les panels Treg, Th et ILC (sans re-stimulation), en enlevant les observations contenant des données manquantes (soit sur 26 observations). De la même façon, une PLS-DA a été réalisée sur l'ensemble des données. Des test statistique non paramétrique, test de Mann-Whitney, ont aussi été réalisées L'ensemble des analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT (Addinsoft, 2022).

### Résultats sur les PBMC

Pour tenter d'identifier les deux groupes de patients, nous avons réalisé une ACP sur l'ensemble des fréquences des cellules étudiées. Les résultats sont présentés Figure 52.

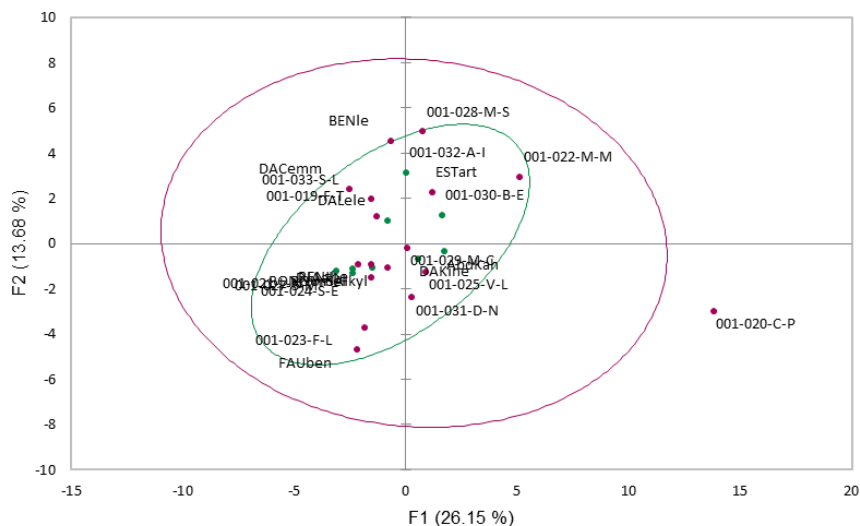


Figure 52 : Graphique des individus sur les deux premières dimensions de l'ACP construite avec l'ensemble des populations cellulaires, représentant 39.83 % de la variance totale. Les ellipses de confiance à 95 % sont représentées en violet pour les données relatives aux asthmatiques sévères et en vert pour les données relatives aux non-asthmatiques.

Les deux premières dimensions de l'ACP réalisées à l'aide de l'ensemble des populations cellulaires expliquent 39.83 % de la variance (26.15 % pour l'axe 1 et 13.68 % pour l'axe 2, Figure 52). Les différentes composantes de l'ACP ne permettent pas de distinguer les groupes de patients (Figure 52, pour les composantes 1 et 2 ; non montré pour les autres dimensions). La distribution semble être homogène et ce quel que soit le groupe de patient. Le patient 001-020-C-P semble avoir un profil différents des autres.

Pour aller plus loin, nous avons réalisé une analyse supervisées, soit une PLS-DA (Figure 53).

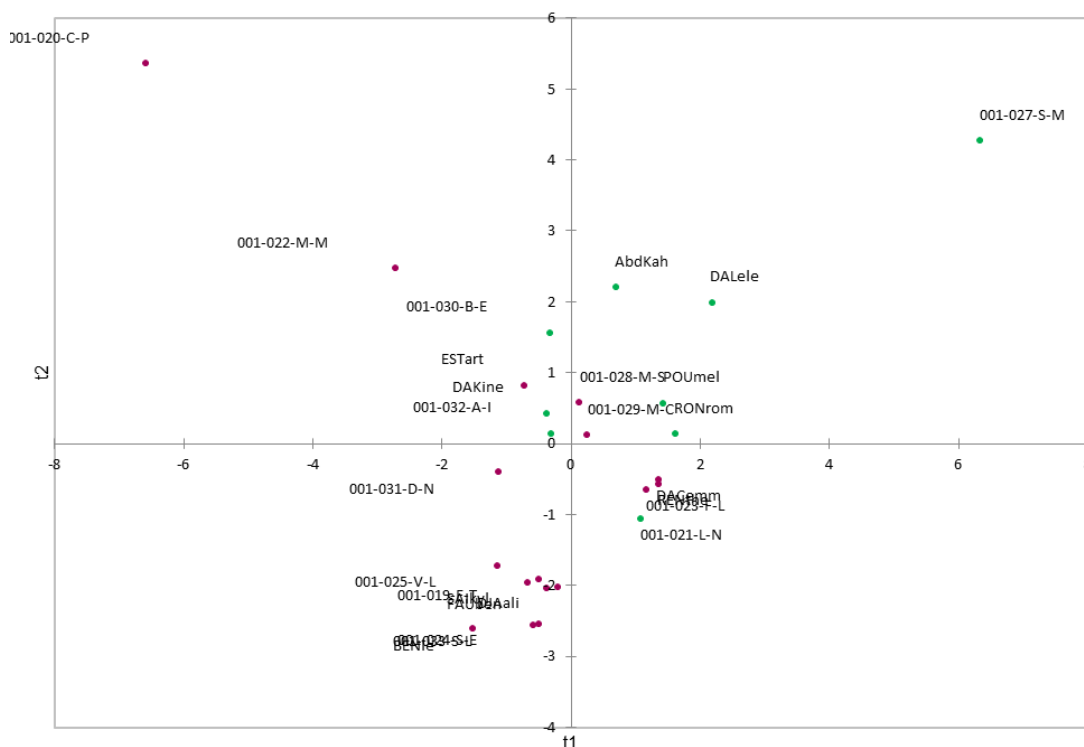


Figure 53 : Graphique des individus sur les deux premiers axes de l'analyse PLS-DA. Les patients atteints d'asthme sévère sont indiqués en violet et les patients non asthmatiques en vert.

Cette analyse, permet une meilleure distinction entre nos deux populations (Figure 53). Comme pour l'ACP, le patient 001-020-C-P semble avoir un profil différents des autres patients. La prédiction du modèle est de 100 % pour la classification des patients atteints d'AS alors qu'elle n'est que de 55,56 % pour les enfants non-asthmatiques (Tableau 10).

Tableau 10 : Matrice de confusion résumant l'information concernant la prédiction de classification des observations. Le pourcentage correct correspond au rapport du nombre d'observations bien classées, sur le nombre total d'observations.

de \ Vers	Non asthmatique	Asthmatique sévère	Total	% correct
Non asthmatique	5	4	9	55,56%
Asthmatique sévère	0	17	17	100,00%
Total	5	21	26	84,62%

Pour sélectionner les variables d'intérêt, nous avons ensuite croisé les valeurs des variables importantes dans la projection (VIP) obtenues par PLS-DA et les p\_value obtenues par test de Mann-Whitney (Figure 54). Plusieurs variables contribuent largement au modèle PLS-DA ( $VIP > 1$ , Figure 54). Cependant, ne pouvons pas observer de différence significative entre les deux groupes de patients et ceux pour les différentes populations étudiées (Figure 54).

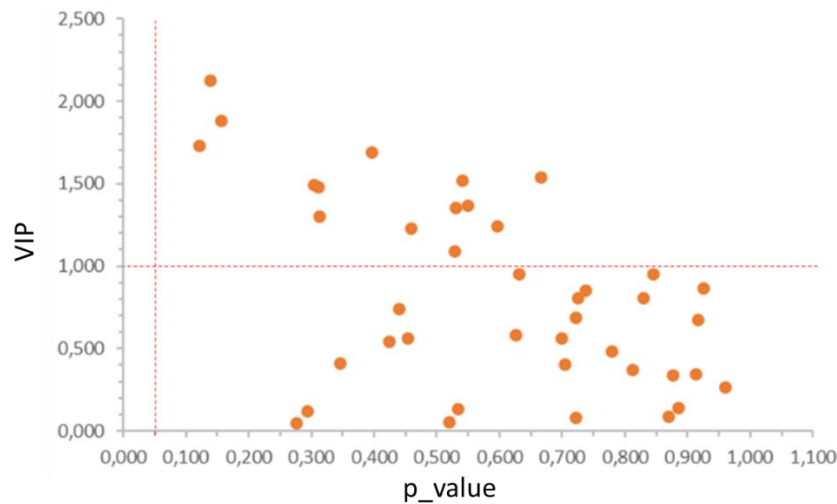


Figure 54 : Graphique des valeurs des variables importantes dans la projection (VIP) issues de la PLS-DA x p\_value issues du test de Mann-Whitney entre les groupes de patients pour toutes les populations cellulaires.

## Conclusion

Nous avons récemment montré qu'il était possible de discriminer les patients atteints d'asthme sévère des contrôles non-asthmatiques par leur composantes immunitaires<sup>79</sup>. Nous avons montré plus particulièrement que les enfants atteints d'AS présentaient un profil mixte Th1/Th2 dans le LBA<sup>79</sup>. Pour finir, cette étude ne montrait pas de corrélation entre les composantes immunitaires dans le plasma et dans les LBA.

Nous avons donc voulu confirmer ou non ces résultats. L'étude présentée ici, ne comporte actuellement que sur 26 patients alors que la précédente en comptait 30. A l'heure actuelle, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences entre les deux groupes de patients. La PLS-DA montre des résultats qui semblent être encourageants pour la discrimination entre les groupes. En effet, le taux de sensibilité est de 100 %. Le taux de spécificité de 55.56 % reste à améliorer.

La cohorte est toujours en cours d'inclusions et les analyses seront réévaluées à la fin de l'étude. De plus, les analyses seront aussi réalisées sur les LBA, permettant ainsi d'obtenir des données similaires à celles présentées pour la cohorte CLASSE<sup>79</sup>. Pour affiner les résultats, d'autres analyses seront aussi réalisées sur les populations cellulaires après restimulation.

## Chapitre 2 : Caractérisation des interactions microbiote/cellules épithéliales pulmonaires dans un contexte d'inflammation « T2 »

### Contexte

L'épithélium joue un rôle dans l'asthme puisque ce sont les lésions de la barrière endothéliale qui vont permettre la pénétration des allergènes. De plus, l'épithélium, en réponse à un stimulus va être capable de produire des alarmines. Pour finir, l'épithélium a aussi un rôle de protection, notamment avec la clairance mucociliaire qui assure l'homéostasie en empêchant d'éventuels irritants ou agents pathogènes d'accéder aux cellules épithéliales et par la sécrétion de divers peptides antimicrobiens qui empêchent les bactéries de coloniser les voies respiratoires. Dans l'asthme, ces deux protections basées sur les sécrétions sont généralement altérées.

Les mécanismes contribuant à la perte de la fonction de barrière épithéliale des voies respiratoires dans l'asthme n'ont pas été entièrement élucidés. Dans ce contexte, nous avons réalisé une banque de cellules épithéliales bronchiques et nasales issues d'enfants asthmatiques sévères et non-asthmatiques, afin d'en étudier les propriétés en situation inflammatoire. Ainsi, nous avons mis en place un modèle cellulaire d'inflammation de type 2 pouvant servir de base pour l'étude des interactions entre cellules épithéliales et des bactéries à potentielles immunomodulateurs.

Dans le contexte de tenter d'identifier de nouveaux probiotiques, nous avons aussi réalisé des banques de souches bactériennes. Les bactéries, isolées des LBA de patients asthmatiques sévères et non asthmatiques, ont ensuite été caractérisées.

### Banque de cellules épithéliales et de bactéries pulmonaires

#### Matériels et méthodes

##### **Banque de cellules épithéliales**

Les banques de cellules ont été réalisées à partir des cellules primaires issues des biopsies et des brossages nasaux des patients asthmatiques sévères et non-asthmatiques. Comme présenté dans la méthodologie générale, les cellules épithéliales primaires nasales et bronchiques humaines (respectivement PhNec et PhBec) ont été cultivées dans une flasque T25 dans un milieu commercial (PneumaCult™-Ex Plus, StemCell) et incubées (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) jusqu'à l'obtention d'un tapis cellulaire confluent (80% confluence, Figure 55). Les cellules ont ensuite été décollées de leur support et congelées à -80°C, permettant ainsi de réaliser la biobanque de cellules épithéliales nasales et bronchiques.

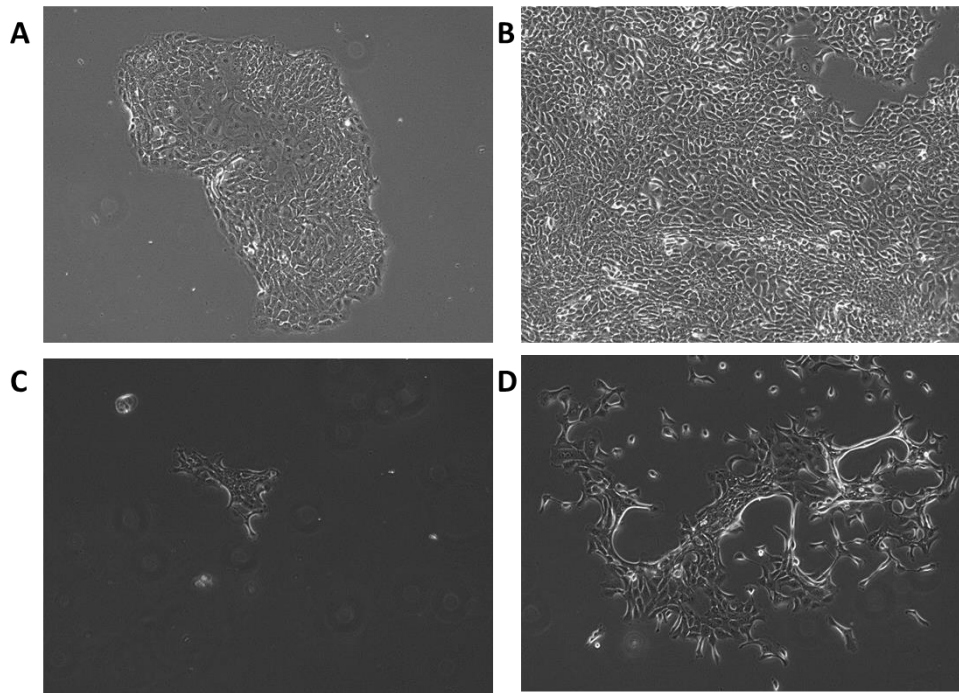


Figure 55 : Expansion des cellules épithéliales bronchiques et nasales isolées d'un patient non-asthmatique.

Croissance des cellules épithéliales primaires bronchiques humaines, au bout de 3 (A) et au bout de 6 jours (B) d'incubation. Croissance des cellules épithéliales primaires nasales humaines, du même patient, au bout de 3 (C) et 6 jours (D) d'incubation.

### Isolement de bactéries issues des lavages bronchoalvéolaires

Une banque de bactéries a été réalisée à partir des culots en glycérol issus de l'ultracentrifugation des LBA de 2 patients asthmatiques sévères et de 2 patients non-asthmatiques (Figure 20). Le culot a ensuite été étalé sur 8 boîtes de pétri contenant 4 milieux différents le gyhBHI (gélose Brain Heart Infusion, Tableau 11 + Hémine, extrait de levure + Agar, pH 7), le MRS (gélose de De Man, Rogosa et Sharpe, Tableau 12), le MSA (gélose au sel de mannitol, BD Biosciences, Tableau 13)<sup>29</sup> et le BEA (gélose à la bile, à l'esculine et à l'azide de sodium, BD Biosciences, Tableau 14). Le milieu MRS permet une croissance plus importante des souches de lactobacilles, le milieu MSA est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement, le dénombrement et la différenciation des *Staphylococcus*, et le BEA est un milieu sélectif pour l'isolement et le dénombrement des entérocoques. Les boîtes ont été ensuite incubées 24 heures, en conditions aérobie ou anaérobie (sachets AnaeroGen, TehrmoScientific), à 30°C pour les boîtes contenant du MRS et à 37°C pour les autres boîtes.

Les souches isolées ont à nouveau été étalées sur boîtes et incubées pendant 24 heures dans les mêmes conditions. Une fois que nous nous sommes assurés que les souches étaient bien isolées, une colonie a été prélevée et mise en culture liquide dans un volume de 5 mL de MRS (pour les souches issues des boîtes contenant le MRS) ou de BHIs (Bouillon Brain Heart Infusion contenant un extrait de levure, pour les autres souches). Les cultures liquides ont à

nouveaux été incubées pendant 24 heures à 37°C avant d'être congelées (1 mL de culture bactérienne + 250 µL de glycérol 80%).

Tableau 11 : Composition du milieu Brain Heart Infusion

Composition	Pour 1 litre
Cerveau de veau infusion	7,7 g
Cœur de bœuf	9,8 g
Protéose peptone	10 g
Dextrose	2 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate disodique	2.5 g

Tableau 12 : Composition du milieu de De Man, Rogosa et Sharpe (MRS)

Composition	Pour 1 litre
Extrait de levure	5 g
Extrait de bœuf	10 g
Protéose peptone	10 g
Dextrose	20 g
Polysorbate 80	1 g
Citrate d'ammonium	2 g
Acétate de sodium	5 g
Sulfate de magnésium	0.1 g
Sulfate de manganèse	0.05 g
Phosphate dipotassique	2 g

Tableau 13 : Composition de la gélose au sel de mannitol (MSA)

Composition	Pour 1 litre
Digest pancréatique de caséine	5 g
Digestion peptique de tissus animaux	5 g
Extrait de bœuf	1 g
Chlorure de sodium	75 g
D-Mannitol	10 g
Rouge phénol	0.025 g
Agar	15 g

Tableau 14 : Composition de la gélose à la bile, à l'esculine et à l'azide de sodium (BEA)

Composition	Pour 1 litre
Tryptone	17 g
Digest peptique de viande	3 g
Extrait de levure	5 g
Bile de bœuf bactériologique	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Esculine	1 g
Citrate d'ammonium ferrique	0.5 g
Azide de sodium	
Agar	

### Caractérisation des bactéries isolées des lavages bronchoalvéolaires

Nous avons ensuite caractérisé les souches précédemment isolées en établissant leur courbe de croissance, en évaluant leur résistance aux antibiotiques, et en déterminant leur activité



métabolique, notamment par la production d'acides gras à chaînes courtes (AGCC, Figure 56).

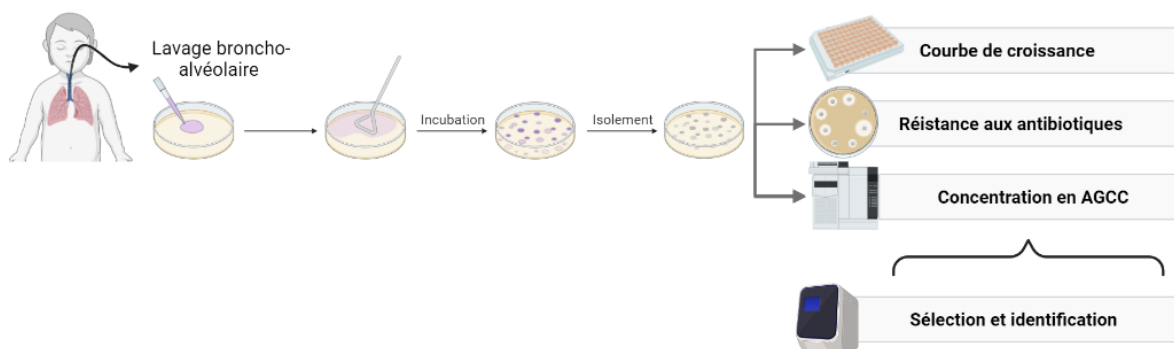


Figure 56 : Protocole de caractérisation des souches isolées des lavages bronchoalvéolaires. AGCC : acides gras à chaîne courte. Figure éditée avec Biorender.

Les courbes de croissance des différentes souches ont été réalisées à partir d'un glaçon (c'est-à-dire des souches précédemment congelées), resuspendu directement dans 10 mL de milieu BHIs ou MRS. Après incubation (24h, à 37°C), les pré-cultures ont été diluées pour obtenir une densité optique (DO), mesurée à  $\lambda=600$  nm, proche de 0.1. Ensuite, 200  $\mu$ L de chaque pré-culture ont été déposés en triplicat dans une plaque 96 puits, incluant 3 puits pour le témoin stérile MRS ou BHI. Pour les souches ayant été isolées en condition anaérobie, 2 gouttes d'huile de paraffine ont été ajoutées aux puits. La plaque a ensuite été lue par un lecteur de plaque ( $\lambda=600$  nm, Tecan, Life Sciences, Lyon, France), toutes les 30 min pendant 24 à 48 heures. Les données ont ensuite été récupérées sous format Excel puis analysées avec GraphPad Prism (version 7). La résistance à 5 antibiotiques (sous forme de disque) a été déterminée en respectant les recommandations de la Société Française de Microbiologie<sup>192</sup> (Tableau 15).

Tableau 15 : Disques d'antibiotique utilisés pour analyser la résistance aux antibiotiques des souches isolées des lavages bronchoalvéolaires. Les disques proviennent tous de chez BD Biosciences.

Antibiotique	Charge du disque ( $\mu$ g)
Chloramphénicol	30
Vancomycine	5
Kanamycine	30
Gentamycine	10
Streptomycine	10

A partir de colonies isolées sur gélose, une suspension bactérienne en solution salée (dans 2mL de solution physiologique stérile) a été réalisée pour atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland (BioMérieux, Craponne, France) d'après les recommandations de la Société Française de Microbiologie<sup>192</sup>. Ensuite, un écouvillon stérile (BioMérieux) est plongé dans la suspension pour étaler les bactéries, en stries dans trois directions, sur une gélose Mueller-Hinton (MH, BD Biosciences, Tableau 16). Une fois la



surface de l'agar sèche, les disques comprenant les antibiotiques ont été déposés sur la surface, à l'aide d'une pince stérile. Les boîtes ont ensuite été incubées en conditions aérobie ou anaérobie pendant 24 h à 37°C. A l'issue de l'incubation, la zone d'inhibition autour du disque a été mesurée. Celle-ci est directement liée à la concentration minimale inhibitrice vis-à-vis de l'antibiotique.

Tableau 16 : Composition du milieu Mueller-Hinton (MH)

Composition	Pour 1 litre
Poudre d'extrait de bœuf	2 g
Digest acide de caséine	3 g
Amidon	1.5 g
Agar	17 g

Avant l'analyse des AGCC, les bactéries ont été dénombrées par cytométrie en flux. Des pré-cultures ont été réalisées en BHIs pour toutes les souches, car le MRS contient 5 g/L d'acétate de sodium. Après 24 heures d'incubation, ces dernières ont été centrifugées, (5000xg, 10 min, TA) et les culots ont été repris dans 2 mL de PBS stérile et dilués en PBS. Dans une plaque 96 puits, ont été disposés, en alternance, 200 µL de PBS dans un puits, puis 200 µL de la suspension bactérienne diluée dans les deux puits suivants. Les acquisitions ont ensuite été réalisées sur un appareil Accuri C6 (BD Biosciences) avec pour paramètres, une limite d'exécution de 35 µL, un débit moyen (5000 évènements / sec) et un seuil sur le paramètre FSC-H inférieur à 6 000.

La teneur en AGCC (acétate, propionate et butyrate) a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse (GC, « Gas Chromatography », Nelson 1020, Perkin-Elmer, St Quentin en Yvelines, France)<sup>193</sup>. L'échantillon bactérien a été centrifugé (12000xg, 15 min à 4°C), puis 400 µL de surnageant ont été prélevés, auxquels ont été ajoutés 40 µL d'acide phosphotungstique (2.5 g/mL, Sigma). Après une incubation de 12h à 4°C, l'échantillon a été à nouveau centrifugé (12000xg, 15 min à 4°C). L'intégralité du surnageant a été récupéré et congelé à -20°C jusqu'au dosage. Après décongélation et centrifugation (12000xg, 15 min à 4°C). 40 µL du surnageant ont été transférés en tube de 2 mL avec un réducteur de volume (Agilent, Les Ulis, France). 10 µL de 2-ethyl butyrate (4 mM) en guise d'étalon interne (Sigma) ont été ajoutés. En début et fin de séquence, un standard contenant les AGCC à doser (Sigma, VOLATILE FREE ACID MIX, concentration finale de 5 mM dans lequel on a ajouté 10 µL d'étalon interne) est ajouté. Les échantillons ont été analysés en GC couplée à un détecteur à ionisation de flamme (Agilent 7890B, avec passeur 50 vials). La colonne (capillaire en silice fondue, 15 m x 0.53 mm x 0.5 µm, Supelco) a un débit à 10 mL/min constant. La température initiale du four était de 100°C pendant 10 min, puis elle était augmentée à 180°C à raison de 20°C/min, température finale à laquelle elle était maintenue pendant 2 min. Tous les échantillons ont été analysés en duplicats. Les données ont été collectées et les pics intégrés

à l'aide du logiciel OpenLab Chemsation (Agilent). Par la suite, la concentration en AGCC obtenue a été normalisée pour un nombre de bactéries identique pour chaque échantillon, soit  $10^9$  bactéries.

Les bactéries ayant une croissance rapide et produisant de fortes quantités d'acétate, ont été sélectionnées pour identification. Pour cela, les souches ont à nouveau été étalées sur boîtes de Pétri (à partir d'un glaçon), puis une colonie a été prélevée et diluée dans 10  $\mu$ L d'eau stérile. A l'aide d'amorces spécifiques des régions J4 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') et J7 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), le gène codant pour l'ARN ribosomal 16s a été amplifié par PCR. Pour cela, 1  $\mu$ L de la suspension a été mélangé avec un mix comprenant les deux amorces (10  $\mu$ M), les dNTPs (10 mM, Thermo Scientific™), de la dreamTaq (Thermo Scientific™) et du tampon (Green Buffer, Thermo Scientific™). Le mélange a ensuite été placé dans un thermocycleur pour suivre le programme suivant : 15 min à 95°C, 38 cycles composés de 30 sec à 95°C, 3 sec à 52°C et 90 sec à 72°C, 10 min à 72°C avant de revenir à 20°C. La taille du fragment de PCR obtenu a été vérifié sur gel d'agarose à 1%, le fragment attendu étant de 1500 pb (paire de bases). Un mélange contenant 15  $\mu$ L de produit de PCR (dilué au besoin) et 2  $\mu$ L d'amorce (un tube pour chaque amorce) a été envoyé chez un prestataire de service pour réaliser le séquençage (Eurofins). La séquence a ensuite été comparée à une base de données permettant l'identification de la souche (NCBI Blast). Enfin, les identifications obtenues avec chacune des amorces ont été croisées pour ainsi affiner l'identification.

## Résultats

### a) Banques de cellules et banques de bactéries

A ce jour (29 mars 2023), nous avons pu collecter et congeler les PhBec et les PhNec de 9 patients non-asthmatiques, les PhBec de 15 et les PhNec de 19 patients asthmatiques sévères. Malheureusement, les biopsies n'ont parfois pas pu être obtenues pour tous les patients, suite à des problèmes de manque de matériel lors de leur hospitalisation ou suite à des problèmes de désaturation et de bronchospasme de l'enfant, nécessitant une intubation.

Les souches bactériennes ont été isolées à partir de LBA de 2 patients asthmatiques sévères et de 2 patients non-asthmatiques, choisis de façon aléatoire. Au total, nous avons isolé 166 souches, tous patients et toutes conditions confondues (Tableau 17). Lorsque cela était possible, nous avons isolé un maximum de 8 souches par boîte pour chaque patient. Les bactéries sur BEA et sur MSA ont été les plus difficiles à obtenir. En effet, nous n'avons pas isolé de bactéries sur la gélose BEA pour les patients asthmatiques sévères en condition aérobie, et n'avons pu isoler que 6 souches sur gélose MSA en condition aérobie pour ces mêmes patients.

Tableau 17 : Nombres de souches isolées, des lavages bronchoalvéolaires de deux patients asthmatiques sévères et deux non-asthmatiques, sur 4 milieux en aérobie ou anaérobie non-stricte.

Patients	Milieux	Aérobie	Anaérobie
Non-asthmatiques	gyhBHI	16	14
	BEA	8	8
	MSA	8	13
	MRS	13	12
Asthmatiques sévères	gyhBHI	14	14
	BEA	0	6
	MSA	6	7
	MRS	14	13

### b) Caractérisation et identification de bactéries issues des LBA

Les 166 souches ont été caractérisées par leurs courbes de croissance. De nombreuses souches ont eu des difficultés à croître après décongélation, et nous n'avons donc pas pu obtenir de résultats pour 19 souches. Pour les autres souches, le profil de croissance était assez différent, comme exemplifié Figure 57. Certaines souches pouvaient atteindre une phase stationnaire avec une  $DO_{600nm}$  proche de 1 en 24 heures (Figure 57A), alors que certaines présentaient une phase de latence pouvant durer 24 heures, et nécessitaient 48 heures pour atteindre la phase stationnaire mais avec une  $DO_{600nm}$  faible (inférieure à 0.20) (Figure 57B). Pour finir, d'autres souches présentaient des courbes de croissance avec des DO faibles (Figure 57C).

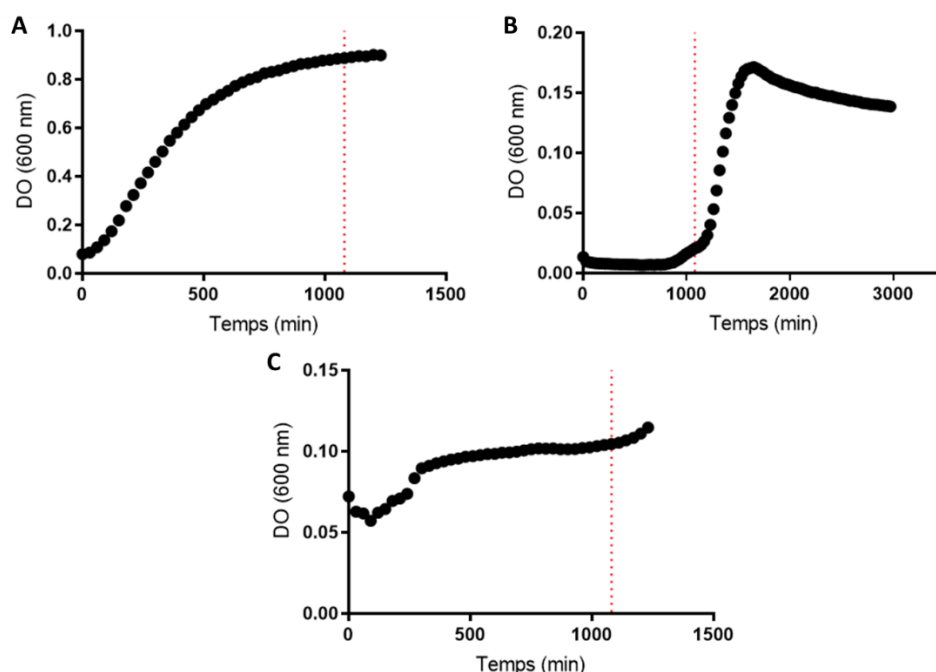


Figure 57 : Courbes de croissance de trois souches différentes, exemple des souches nommées **A.** MB0296 (provenant d'un patient asthmatique sévère, isolée en MRS en condition aérobie), **B.** MB0258 (provenant d'un patient non-asthmatique, isolée en MSA en condition anaérobie) et en **C.** MB0251 (provenant d'un patient non-asthmatique, isolée en gyhBHI en condition aérobie).

Le trait en pointillés rouge, représente un temps de 24 heures. DO : Densité optique.

L'antibiorésistance est le phénomène qui consiste, pour une bactérie, à devenir résistante aux antibiotiques. Les bactéries exposées aux antibiotiques évoluent et développent des mécanismes de défense qui leur permettent d'échapper à leur action bactéricide : les antibiotiques deviennent ainsi inefficaces. Il est donc important, dans une optique d'utilisation de souches bactériennes d'intérêt comme probiotiques, de sélectionner des souches non résistantes aux antibiotiques. Nous avons donc mesuré la concentration minimale inhibitrice vis-à-vis d'un antibiotique. Cette mesure n'a pour le moment été réalisé que sur 102 souches isolées. Cependant, certaines bactéries montraient une mauvaise croissance sur gélose MH : dans notre cas, 12 des 102 bactéries n'ont pas poussé. Pour chacune des autres bactéries, nous avons pu obtenir la concentration maximale inhibitrice pour les différents antibiotiques (Figure 58). A ce stade, toutes les souches ont été conservées.

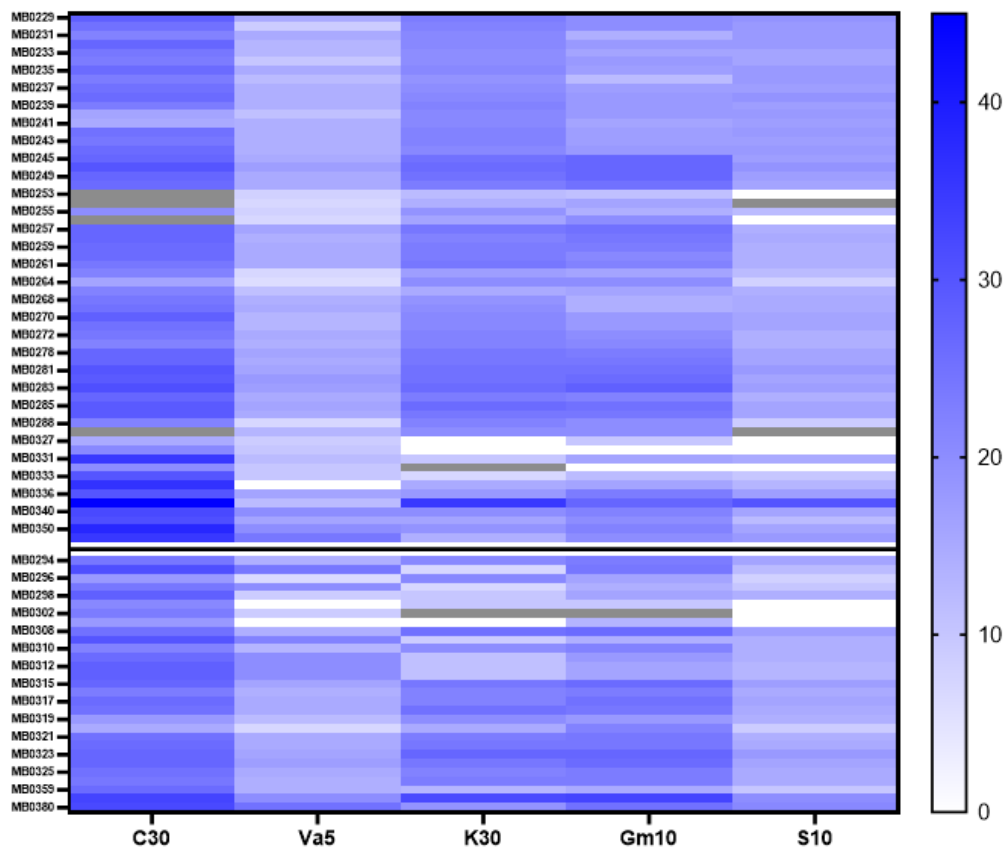


Figure 58 : Heatmap représentant les diamètres d'inhibition des souches par rapport à 5 antibiotiques (C : chloramphénicol ; Va : vancomycine ; K : kanamycine ; Gm : gentamycine ; S : streptomycine). Le chiffre après chaque antibiotique indique la charge du disque d'antibiotique (en  $\mu\text{g}$ ). Le premier groupe correspond aux souches issues des patients non-asthmatiques et le deuxième correspond aux souches issues des asthmatiques sévères. Plus le gradient de couleur est bleu, plus le diamètre d'inhibition est grand.

Pour poursuivre la caractérisation de nos souches, nous nous sommes ensuite intéressés à la concentration en AGCC produite par les souches isolées. Cette analyse a été réalisée sur l'ensemble des souches à l'exception de 16 souches, dont la croissance était insuffisante. Pour normaliser la concentration en AGCC, nous avons d'abord déterminé le nombre de

bactéries présentes dans chacune des cultures servant à l'analyse de ces molécules. Nous avons trouvé un nombre de bactéries maximal de  $1,5 \times 10^{10}$  bactéries/mL dans la culture de la souche MB0325 (provenant d'un patient asthmatique sévère, isolée en milieu MSA en condition anaérobie) et un nombre minimal de  $2,83 \times 10^6$  bactéries/mL pour celle de la souche MB0389 (provenant d'un patient asthmatique sévère, isolée en MRS en condition anaérobie). En moyenne, le nombre de bactéries dans les cultures était de  $3,68 \times 10^9$  bactéries/mL. La production d'acétate maximale était de 566,8  $\mu\text{g/mL}$  pour  $10^9$  bactéries de la souche MB0358 (provenant d'un patient non-asthmatique, isolée en MSA en anaérobie). Seulement 28 souches produisaient plus de 3  $\mu\text{g/mL}$  d'acétate (Figure 59). La concentration en acétate moyenne des autres souches était de 0,7  $\mu\text{g/mL}$ . De plus, seules les souches MB0363 (provenant d'un patient asthmatique sévère, isolée en gyhBHI en aérobie) et MB0358 produisaient du propionate (19,42  $\mu\text{g/mL}$  et 12,5  $\mu\text{g/mL}$  respectivement). Pour finir le butyrate n'était produit que par la souche MB0358 (21,51  $\mu\text{g/mL}$ ).

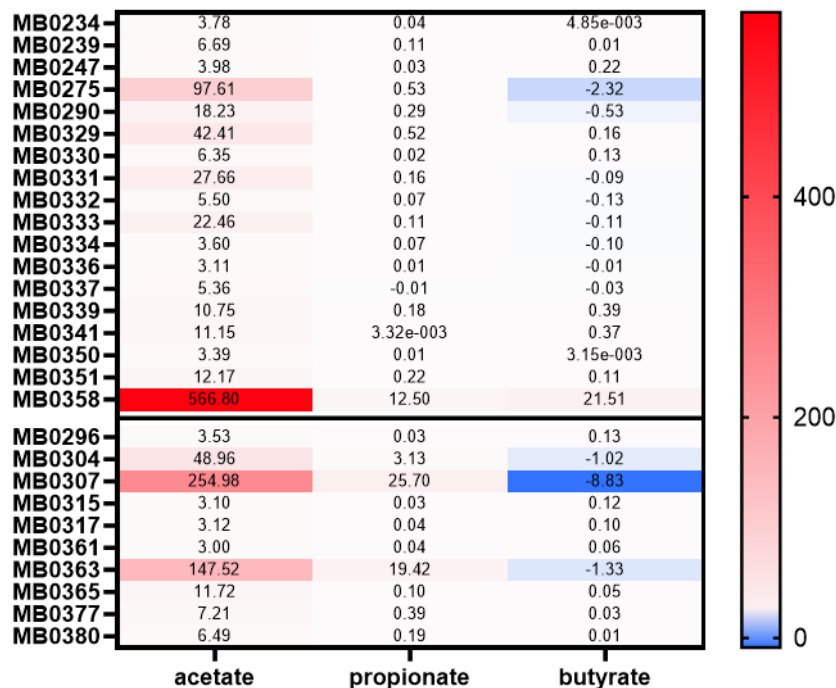


Figure 59 : Heatmap représentant la concentration en acétate, propionate et butyrate pour les 28 souches produisant plus de 3  $\mu\text{g/mL}$  d'acétate.

Le premier groupe correspond aux souches issues des patients non-asthmatiques et le deuxième correspond aux souches issues des asthmatiques sévères. Plus le gradient est rouge, plus la souche produit des acides gras à chaînes courtes

Nous avons par la suite sélectionné les souches qui produisaient plus de 3  $\mu\text{g/mL}$  d'acétate. Nous avons donc réalisé l'amplification d'un fragment du gène codant l'ARNr 16S de ces souches pour les identifier. Nous avons vérifié que le fragment à 1500 pb étaient bien présent dans tous les échantillons (Figure 60) afin de pouvoir séquencer correctement ces derniers.

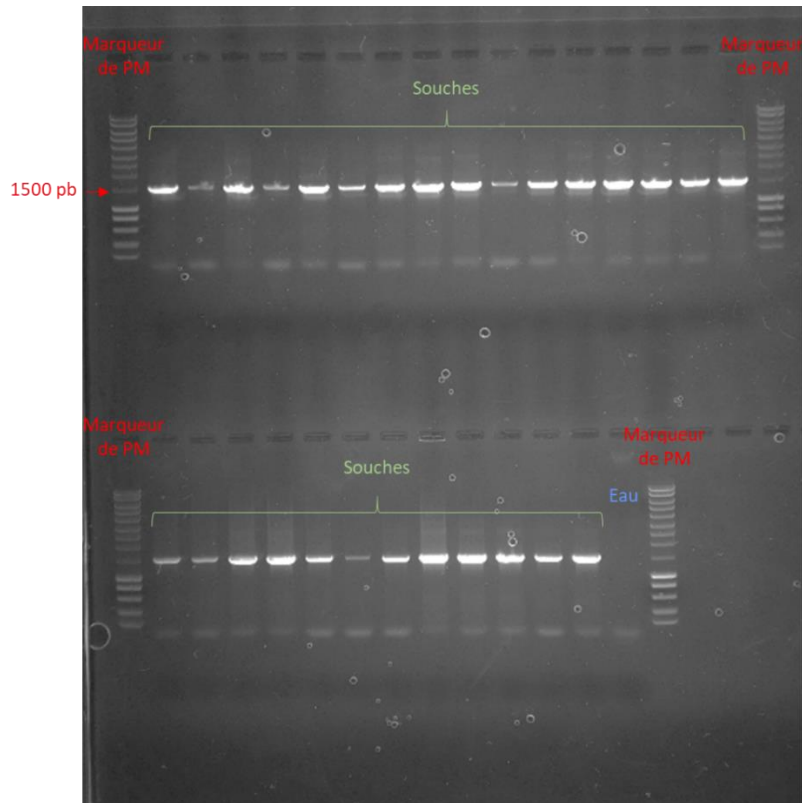


Figure 60 : Photographie du gel d'agarose 1%, permettant la vérification du poids moléculaire correct du fragment d'ADN amplifié par PCR.

PM : Poids moléculaire ; pb : paires de bases.

Ainsi, nous avons identifié majoritairement des *Streptococcus* (16/28), dont 15 sont multi-affiliés et 6 sont issus de patients asthmatiques sévères, ainsi qu'un *Streptococcus dysgalactiae* issu d'un patient non-asthmatique. Nous avons aussi identifié 5 *Staphylococcus*, 2 multi-affiliés (issus du même patient non-asthmatique), 2 *Staphylococcus aureus* (venant d'un même patient asthmatique sévère) et un *Staphylococcus epidermidis* (issu du deuxième patient asthmatique sévère). Pour finir, nous avons identifié 5 souches de *Neisseria*, provenant de tous les groupes de patients, une souche de *Rothia mucilaginosa*, issue d'un patient asthmatique sévère et une souche de *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, issue d'un patient non-asthmatique.

Ayant les identifications des souches, nous pouvons comparer les diamètres des zones d'inhibition obtenus par nos antibiogrammes avec les diamètres critiques référencés pour chaque genre bactérien et pour chaque antibiotique. Les valeurs de sensibilités dépendent des espèces et genres bactériens. Les valeurs en vert représentent les souches sensibles à l'antibiotique et en rouge les souches résistantes après comparaison des diamètres d'inhibition à ceux référencés<sup>192</sup>, les valeurs en noires correspondent aux diamètres d'inhibition non référencés<sup>192</sup>. Les souches MB0331, MB0332 et MB0333, correspondant toutes à des *Streptococcus*, étaient résistantes à la vancomycine (Tableau 18). La souche MB0296 était

résistante à la gentamycine. Les autres bactéries, pour lesquelles nous avons obtenus des diamètres d'inhibition, étaient sensibles aux différents antibiotiques.

Tableau 18 : Tableau récapitulatif reprenant l'identification des souches, et le diamètre des zones d'inhibition (en mm).

Les valeurs en vert représentent les souches sensibles à l'antibiotique et en rouge les souches résistantes après comparaison des diamètres d'inhibition à ceux référencés, les valeurs en noires correspondent aux diamètres d'inhibition non référencés (SFM,2022<sup>192</sup>). Des cases vides apparaissent pour les souches où l'antibiogramme n'a pas encore été réalisé. C30 : Chloramphénicol 30 µg, Va5 : Vancomycine 5 µg, K30 : Kanamycine 30 µg, Gm10 : Gentamycine 10 µg et S10 : Streptomycine 10 µg.

Souches	Identification	Diamètres des zones d'inhibition				
		C30	Va5	K30	Gm10	S10
MB0358	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>					
MB0247	<i>Neisseria</i>	Mauvaise croissance				
MB0330	<i>Neisseria</i>					
MB0334	<i>Neisseria</i>	36	0	15	16	13
MB0339	<i>Neisseria</i>	45	12	35	27	30
MB0341	<i>Neisseria</i>					
MB0307	<i>Rothia mucilaginosa</i>	Mauvaise croissance				
MB0234	<i>Staphylococcus</i>	23	10	20	18	16
MB0239	<i>Staphylococcus</i>	23	14	22	18	17
MB0296	<i>Staphylococcus aureus</i>	18	6.5	21	16	8
MB0315	<i>Staphylococcus aureus</i>	27	16	24	26	17
MB0361	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	33	20	32	33	20
MB0275	<i>Streptococcus</i>	Mauvaise croissance				
MB0290	<i>Streptococcus</i>	Mauvaise croissance				
MB0304	<i>Streptococcus</i>	Mauvaise croissance				
MB0317	<i>Streptococcus</i>	26	16	22	25	16
MB0329	<i>Streptococcus</i>					
MB0331	<i>Streptococcus</i>	35	12	10	16	15
MB0332	<i>Streptococcus</i>	20	10		0	0
MB0333	<i>Streptococcus</i>	30	10	7	12	10
MB0336	<i>Streptococcus</i>	30	16	18	23	17
MB0337	<i>Streptococcus</i>					
MB0350	<i>Streptococcus</i>	38	20	19	22	16
MB0363	<i>Streptococcus</i>					
MB0365	<i>Streptococcus</i>					
MB0377	<i>Streptococcus</i>					
MB0380	<i>Streptococcus</i>	32	25	19	25	21
MB0351	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	35	24	14	20	18



## Conclusion

Il est désormais admis que l'inflammation des voies respiratoires et les changements structurels des bronches sont des caractéristiques importantes liées à l'asthme. Les relations entre ces changements structurels et les anomalies cliniques et fonctionnelles méritent d'être étudiées plus en détail. Dans ce cadre, nous avons réalisé des banques de cellules épithéliales primaires humaines, nasales et bronchiques, provenant des prélèvements de, respectivement, 28 et 24 enfants. Ces cellules seront par la suite utilisées dans des modèles *in vitro* d'inflammation T2. En effet, les modèles *in vitro* utilisant des cellules des voies respiratoires suscitent de plus en plus d'intérêt pour des raisons éthiques concernant l'utilisation des animaux. Des études ont déjà été réalisées sur le tissu musculaire lisse des voies respiratoires de sujets asthmatiques, permettant d'étudier la contraction en relation avec l'hyperréactivité des voies respiratoires<sup>194</sup>.

Ces modèles d'expérimentation peuvent aussi permettre d'étudier de nouvelles thérapies visant à réguler l'inflammation. Dans l'optique de proposer de nouvelles approches thérapeutiques, ces modèles peuvent permettre d'étudier les effets potentiellement bénéfiques de bactéries. Nous avons donc réalisé en parallèle une banque de bactéries contenant 166 souches issues de LBA de patients asthmatiques sévères ou d'enfants non-asthmatiques. Ces souches ont toutes été caractérisées par leur courbe de croissance, leur résistance aux antibiotiques, et leur production d'AGCC (acétate, propionate et butyrate). Parmi ces bactéries, nous avons sélectionné celles qui produisaient le plus d'acétate. En effet, il a été rapporté que les AGCC avait un effet protecteur dans les modèles d'asthme, et l'acétate aurait des effets sur les cellules Treg par la modification épigénétique du promoteur Foxp3<sup>195</sup>. Cela nous a donc permis d'identifier 28 souches auxquelles nous avons associé le diamètre des zones d'inhibition aux diamètres critiques et ainsi défini la sensibilité ou la résistance à certains antibiotiques. Cependant, nous n'avons pas pu obtenir de valeur de diamètre d'inhibition pour certaines bactéries pour lesquelles la croissance était mauvaise sur gélose MH. Pour obtenir ces différentes valeurs manquantes, il serait possible de réaliser les antibiogrammes sur gélose MH additionnée de 5% de sang de cheval défibriné mécaniquement et de 20 mg/L de  $\beta$ -nicotinamide adénine dinucléotide<sup>192</sup>. Ce type de gélose est employée pour *Streptococcus spp.*, dont *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus spp.*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp.*, *Pasteurella sp.*, *Corynebacterium* et pour d'autres bactéries à croissance lente. Parmi les souches que nous avons identifiées, deux d'entre elles (*Corynebacterium pseudodiphtheriticum* et *Rothia mucilaginosa*) semblent être prometteuse dans la modulation de la pathologie asthmatique. En effet, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, nommé avant *Corynebacterium hofmannii*, fait partie du microbiote naturel des narines et de la gorge. *C. pseudodiphtheriticum* a été discuté comme candidat



pour une application en tant que probiotique nasal et pharyngé. Il a en effet été montré que cette bactérie pouvait entraîner l'élimination de *S.aureus* de la cavité nasale<sup>196</sup>. De plus, il a été montré, dans des modèles *in vitro* et *in vivo*, que des membres du genre *Rothia* et en particulier *Rothia mucilaginosa* avaient des propriétés anti-inflammatoires. En effet, cette étude suggère que la présence de *R. mucilaginosa* dans les voies respiratoires serait bénéfique car elle pourrait inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires induites par *P. aeruginosa*, mais aurait aussi un effet inhibiteur sur la réponse IL-8 induite par le LPS et par *S. aureus*<sup>197</sup>. Ces différentes recherches nous montrent le potentiel de ces bactéries dans les maladies inflammatoires des voies respiratoires telles que l'asthme. Il serait donc intéressant de tester ces deux bactéries dans un modèle cellulaire d'inflammation de type T2 après avoir vérifié leurs sensibilités aux antibiotiques.

Pour conclure, nous avons constitué des banques de cellules épithéliales nasales et bronchiques, ainsi que de bactéries isolées de LBA, caractérisées par la production d'acides gras à chaîne courte et la résistance aux antibiotiques. Ces différentes banques vont nous permettre d'établir un modèle d'inflammation de type T2 pour évaluer des bactéries à potentiel probiotique dans la pathologie de l'asthme.

### Matériels et méthodes

#### Mise en place d'un modèle cellulaire d'inflammation T2

Pour représenter au mieux l'épithélium des voies respiratoires, les cellules doivent être différenciées. Après décongélation des cellules et ajout de F12-K (Gibco, ThermoFisher Scientific), les cellules ont été centrifugées (600xg, 5 min, 4°C) puis les culots cellulaires ont été repris dans 1 mL de milieu PneumaCult™-Ex Plus. Après dénombrement en utilisant le bleu de trypan, environ 30000 cellules ont été déposées par insert de diamètre 6,5 mm (Transwell™, Costar™, recouverts de PureCol™) et 90000 par insert de diamètre 12 mm (recouverts de PureCol™). Durant les premiers jours de croissance, les cellules étaient en condition liquide-liquide, puis le milieu apical a été enlevé afin de les placer en interface air-liquide (Figure 61). Conjointement, le milieu basolatéral a été remplacé par du PneumaCult™-ALI (StemCell), permettant la différenciation cellulaire pour former un épithélium pseudostratifié. A partir du dixième jour de culture, nous pouvions observer les premières cellules ciliées. Il faut environ 1 mois pour obtenir un épithélium entièrement différencié.

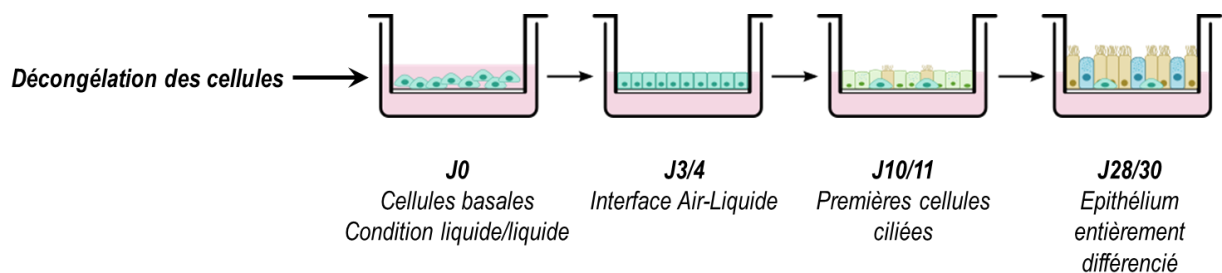


Figure 61 : Les différentes étapes de culture cellulaires avant d'obtenir un épithélium différencié. Image générée avec Biorender.

Une fois l'épithélium différencié, de l'IL-4 (Peprotech, Neuilly-sur-Seine) à une concentration de 0.5 ng/mL (dilué en PBS/BSA 5%) a été ajouté au milieu du côté basolatéral pendant 2 semaines (conditions inflammatoires T2). Cette concentration correspond à la concentration plasmatique moyenne d'IL-4 trouvée chez les patients de la cohorte CLASSE<sup>79,80</sup>. Pour évaluer le potentiel rôle des bactéries dans ce modèle d'inflammation T2, nous avons placé du côté apical, pendant 24h, une bactérie lactique déjà décrite comme ayant des effets immunomodulateurs dans les maladies pulmonaires (souche CNCM I-5314, disponible au laboratoire)<sup>198</sup>. Pour chaque analyse, un contrôle négatif de l'inflammation a été inclus, pour lequel était ajouté le tampon de dilution de l'IL-4 (PBS/BSA 5%).

## **Analyse de la sécrétion de cytokines**

Avant que les cellules ne soient analysées en chambre de Ussing, celles-ci ont été lavées et le liquide de lavage a été prélevé, centrifugé afin d'enlever les débris cellulaires (2 000xg, 10 min, 10°C) puis stocké à -80°C : ce dernier a permis d'analyser les différentes cytokines sécrétées. Les dosages de 13 cytokines ont été réalisés sur ces lavages apicaux grâce à deux kits commerciaux reposant sur la technologie xMAP® Luminex – permettant le dosage simultané, dans un même puits de plusieurs constituants (LegendPlex™, BioLegend, Paris, France). Le premier kit permettait l'analyse simultanée de l'IL-4, IL-6, IL-13 et IL-22, et le second de l'IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A et IL-23. Chaque jeu de billes est conjugué à un anticorps spécifique sur sa surface et sert de billes de capture. Les différentes billes de capture ont été mélangées et incubées avec les échantillons contenant les cytokines d'intérêts. Après lavage, un cocktail d'anticorps de détection biotinylés a été ajouté, pour que chaque anticorps de détection se lie de manière spécifique avec la cytokine capturée sur les billes. De la streptavidine-phycoérythrine (SA-PE) a ensuite été ajoutée, se liant aux anticorps de détection biotinylés et fournissant des intensités de signal fluorescent proportionnelles à la quantité de cytokines liées. L'analyse a été réalisée par cytométrie en flux : les différentes billes (correspondant à différents anticorps de capture, et donc déterminant le constituant analysé) ont été identifiées par leur fluorescence interne, et le signal fluorescent lié à la PE sur chacune de ces régions de billes a été quantifié. La concentration des cytokines a été déterminée à l'aide d'une gamme étalon générée dans le même dosage. Les graphiques ont été réalisés sous GraphPadPrism (version 7), en prenant la concentration moyenne des cytokines obtenue par patient et par condition.

## **Analyse des transports ioniques par chambre de Ussing**

Cette technique a été mise au point par Hans Ussing en 1951<sup>199</sup>. Le but initial était de mesurer les courants ioniques à travers un épithélium. Les inserts de diamètre 6,5 mm, contenant l'épithélium pseudo-stratifié, ont été montés entre deux demi-chambres, permettant la séparation des deux compartiments : apical et basolatéral. Ce dispositif permet la mesure des transports actifs d'ions en activant ou inhibant certains canaux ioniques au moyen de différentes molécules agonistes ou inhibitrices. La différence de potentiel ( $V_t$ ) existant entre les deux faces d'un épithélium est due aux mouvements d'ions se produisant au travers de ce dernier : elle est assimilée à un potentiel électrique (en mV). Ainsi, l'amplitude du courant électrique ( $I$ ) traduit le courant d'ions se produisant à travers l'épithélium. Chaque côté de l'épithélium disposé dans une demi-chambre, à 37°C, est immergé dans du tampon Krebs-Ringer modifié (NaCl : 115 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 2.4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0.4 mM, MgCl<sub>2</sub> : 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> : 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> : 25 mM) contenant 5 mM de glucose.

Une fois l'appareil de mesure (MC6, Physiologic instruments, San Diego, USA) paramétré et les niveaux basaux de  $V_t$  et de résistance ( $R_t$ ) stabilisés, le voltage est clampé à 0. Ainsi, la force motrice transépithéliale passive créée par le potentiel électrique spontané à travers l'épithélium a été éliminée avec un courant externe passé à travers l'épithélium. Ce courant est appelé courant de court-circuit ( $I_{sc}$ ), et reflète le mouvement électrogène des ions par transport actif<sup>200</sup>. Les molécules inhibitrices ou agonistes ont été ajoutées une à une dans chaque chambre (4 maximum en parallèle). Tout d'abord l'amiloride (10  $\mu$ M) a été ajouté du côté apical, pour inhiber le canal ENaC. Puis, la forskoline a été ajoutée (10  $\mu$ M), en bilatéral, pour activer l'enzyme adénylate-cyclase, et ainsi augmenter les niveaux intracellulaires d'AMP cyclique et pour activer le canal CFTR. Ceci va entraîner le passage rapide au travers de la membrane plasmique des ions chlorure ( $Cl^-$ ) et des ions bicarbonates ( $HCO_3^-$ ). Pour isoler le courant dû à CFTR d'autres canaux potentiellement activés par la forskoline, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de CFTR du côté apical (CFTR-Inh172 ou  $I_{172}$ , 20  $\mu$ M, Selleckchem). Pour finir, l'UTP (100  $\mu$ M) a été ajouté du côté apical entraînant le relargage d'ions  $Ca_2^+$  dans le cytosol ce qui va activer les canaux CaCC.

Une fois l'analyse en chambre de Ussing terminée, les cellules ont été fixées en paraformaldéhyde (PFA) pendant 20 min puis lavées en PBS (3x5 min) et conservées en PBS pour des analyses en immunofluorescence.

L'analyse des transports ioniques a été réalisée en 10 expériences indépendantes sur les cellules PhNec de 3 patients AS (3 expériences indépendantes ont été réalisées sur un patient, 5 expériences indépendantes au total) et 4 patients non-asthmatiques (2 expériences indépendantes pour un patient, 5 expériences indépendantes au total). Les effets des différents agonistes et inhibiteurs ont été mesurés en calculant le  $\Delta I_{sc}$  (variation du courant de court-circuit) en soustrayant le courant après l'ajout de la molécule au courant avant l'ajout de celle-ci. Les analyses statistiques (ANOVA) ainsi que les graphiques ont été réalisés sous GraphPadPrism (version 7).

### **Mise au point du protocole d'immunofluorescence**

La mise au point du protocole d'immunofluorescence a été réalisée sur une série de 3 inserts (cellules n'ayant pas reçu d'IL-4, cellules + IL-4 et cellules + IL-4 + bactéries) fixées en PFA après analyse en chambre de Ussing. Tout d'abord, les cellules ont été perméabilisées (PBS + 0.04% Triton 100X, Sigma-Aldrich) pendant 3 min à température ambiante. Puis, après lavage en PBS (3x5 min), les sites non spécifiques ont été bloqués pendant une heure avec ajout de PBS/BSA 10% des deux côtés des inserts. Après lavage, les inserts contenant les cellules ont été coupés en deux. Chaque morceau a servi à deux marquages différents (Tableau 19). Tout d'abord, les anticorps primaires ont été ajoutés au-dessus des cellules,

pendant 24 heures à 4°C. Après lavage des cellules, les anticorps secondaires ont été ajoutés, pendant 1 heure à température ambiante puis du colorant Hoechst (Invitrogen) a été ajouté (10 min, température ambiante). Enfin, après deux derniers lavages (2x15 min), les demi-inserts ont été déposés sur lames puis une solution de ProLong™ Gold avec DAPI (ThermoFisher Scientific) a été ajoutée avant de déposer la lamelle.

Tableau 19 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour le marquage de chaque moitié des inserts contenant les cellules.

Les anticorps sont dilués en PBS/BSA 5%. AF : Alexa Fluor

	Marquage 1	Marquage 2
Anticorps primaires	Tubuline $\alpha$ (rabbit, Cell Signaling Technology, au 1/800 <sup>ème</sup> ) + MUC5AC (mouse monoclonal, abcam, au 1/67 <sup>ème</sup> )	MUC5B (mouse monoclonal, abcam, 0.4 $\mu$ L) + IL-33 (monoclonal goat, R&D Systems, 5 $\mu$ L)
Anticorps secondaires	AF488 goat, anti-rabbit IgG (Invitrogen, 5 $\mu$ g/mL) + AF555 donkey, anti-mouse IgG (Invitrogen, 2 $\mu$ g/mL)	AF555 donkey, anti-mouse IgG (Invitrogen, 2 $\mu$ g/mL) + AF647 donkey, anti-goat IgG (Invitrogen, 5 $\mu$ g/mL)

Les résultats sont actuellement en cours d'analyse.

### Analyse de l'expression des mucines et des alarmines

L'analyse de l'expression des mucines a été réalisée par qPCR (PCR quantitative) sur les PhNec de 3 patients non-asthmatiques et de 1 patient AS. Pour cela, après avoir obtenu un épithélium totalement différencié sur insert de 12 mm de diamètre, et après avoir induit l'inflammation de type T2, les cellules ont été congelées à -80°C dans du tampon de lyse contenant (0.14 M) du  $\beta$ -mercaptoéthanol. L'extraction de l'ARN des cellules a ensuite été réalisée à l'aide d'un kit commercial (RNeasy mini kit, Qiagen, Courtabœuf, France) en suivant les recommandations du fournisseur. Tout d'abord les cellules ont été décollées de l'insert en grattant l'insert avec un cône de pipette et le lysat a été transféré dans un tube de 2mL. Le même volume d'éthanol 70% a été ajouté aux lysats récupérés (~350  $\mu$ L), et le tout a été transféré sur colonne. Après une étape de digestion par la désoxyribonucléase, l'ARN total se lie à la membrane de la colonne. Les contaminants ont été éliminés par lavages successifs puis l'ARN a été élué dans de l'eau sans ribonucléase. Toutes les étapes de liaison, de lavage et d'élué ont été réalisées par centrifugation (30 sec à 1 min, 14000xg, TA).

Les concentrations en ARN de chaque échantillon ont été mesurées au NanoDrop ( $\lambda = 260$  nm, Thermo Scientific) et leur pureté vérifiée par la mesure des rapports d'absorbances mesurées à 260/280 nm et 260/230 nm. L'ADN complémentaire (ADNc) a ensuite été synthétisé par transcription inverse (RT-PCR) à partir de 500 ng d'ARN, en présence de tampon de réaction (1X), des amorces aléatoires (random primers à 1X), des dNTP (4 mM) et de l'enzyme transcriptase inverse MultiScribe™ (5U/réaction ; Kit haute capacité de transcription inverse

d'ADNc, ThermoFisher Scientific). Le mélange a ensuite été placé dans un thermocycleur et la réaction s'est déroulée selon le programme suivant : 10 min à 25°C, 120 min à 37°C, 5 min à 85°C puis les échantillons ont été maintenus à 4°C puis stockés à -20°C jusqu'à analyse par qPCR.

Les ADNc obtenus ont ensuite été analysés par qPCR. Pour cela, 1.5 µL d'ADNc dilué au 1/10<sup>ème</sup> ont été mélangés avec un mix comprenant les amorces directes (forward primer, 10 µM) et inverses (reverse primer, 10 µM) pour chaque gène d'intérêt et gène de ménage (Tableau 20), le Sybr (Takyon™ ROX SYBR 2X MasterMix dTTP blue) et de l'eau sans RNase. L'intensité de fluorescence émise à chaque cycle PCR a été mesurée sur l'appareil StepOne™ et la mesure du seuil d'un cycle (Ct) a été prise dans la phase exponentielle. Plus le Ct est élevé, moins l'ARNm détecté est présent, car il faut plus de cycles PCR pour pouvoir détecter l'amplification fluorescente. Pour normaliser les résultats, trois gènes de ménage ont été incorporés à l'analyse. L'expression relative des niveaux d'ARNm de ces gènes d'intérêt a été calculée avec la méthode du  $\Delta Ct^{201}$ .

Tableau 20 : Séquences des amorces directes et inverse pour l'étude de différents gènes par qPCR. Les amorces ont toutes été fournies par Eurofins

Gènes	Amorce directe	Amorce inverse	Référence
<i>MUC5AC</i>	CAGCCACGTCCCCTTCAATA	ACCGCATTGGGCATCC	Kim et al., 2011 <sup>202</sup>
<i>MUC5B</i>	GCAACACCCTCCTCTAGCAC	AGGTGTTGCCCTGGAGTTG	Sepper et al., 2012 <sup>203</sup>
<i>IL-25</i>	CAGGTGGTTGCATTCTTGGC	GCTGTTGAGGGGTCCATCTT	Déterminées au laboratoire
<i>MUC4</i>	GCCCAAGCTACAGTGTGACTCA	ATGGTGCCGTTGTAATTTGTTGT	Wang et al., 2014 <sup>204</sup>
<i>TSLP</i>	CCCAGGCTATTCGGAAACTCAG	CGCCACAATCCTTGTAATTGTG	Wu et al., 2010 <sup>205</sup>
<i>IL-33</i>	GAAAATCCCAACAGAAGGCCA	GCCTTTTGGTGGTTTCTCTCCT	Thierry et al., 2014 <sup>206</sup>
<i>GAPDH</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	Déterminées au laboratoire
<i>ACTB</i>	AGGCACCAGGGCGTGAT	GCCACATAGGAATCCTTCTGAC	
<i>Tff3</i>	TTTCTGTCCCTTTGCTCCCG	CAGGCACGAAGAAGTGTCTCT	

Nous n'avons pas réalisé de test statistique vis-à-vis de l'expression relative de l'ARNm des différents composés d'intérêt car le nombre de répliques biologiques était trop faible. De plus, suite à des problèmes lors des cultures épithéliales (apparition de trous dans le tapis cellulaire amenant à la mort des cellules), nous n'avons pu obtenir les résultats que pour un patient AS. Les résultats sont présentés sur les graphiques mais ne sont pas analysés statistiquement.

## Résultats

### a) Une inflammation de type T2 induite par l'IL-4 semble avoir un effet sur le canal CFTR dans un modèle cellulaire

Premièrement, nous avons analysé l'effet d'un traitement par l'IL-4 sur la résistance électrique transépithéliale (TEER) d'épithéliums obtenus à partir de cellules issues de patients asthmatiques sévères et non-asthmatiques. L'IL-4 semble diminuer la TEER des cellules issues de patients asthmatiques sévères (Figure 62) alors qu'elle ne semble pas avoir d'effet sur la TEER des cellules de patients non-asthmatique.

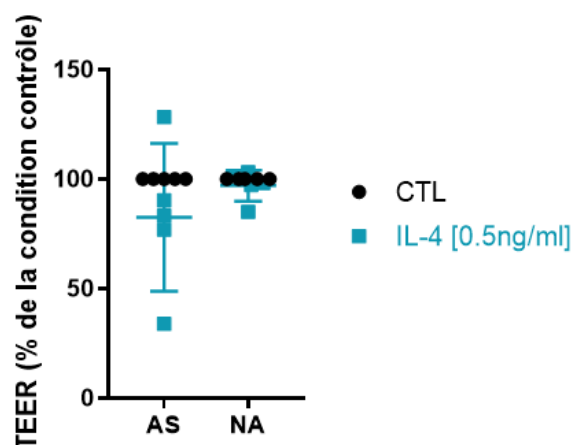


Figure 62 : Effet de l'ajout d'IL-4 (en bleu) sur la résistance électrique transépithéliale (TEER), exprimée en pourcentage de la condition contrôlée (en noire), mesurée sur des cellules nasales de patients asthmatiques sévères (AS) et sur des cellules de patients non-asthmatiques (NA).

Les canaux ENaC, CFTR, et CaCC sont des composants essentiels de la clairance mucociliaire. Nous avons voulu évaluer comment ces différents canaux étaient impactés dans un modèle cellulaire d'inflammation de type 2. Pour cela, nous avons mesuré le courant de court-circuit ( $I_{sc}$ ) lors d'ajouts séquentiels d'amiloride, de forskoline, d'inhibiteur de CFTR  $I_{172}$  et d'UTP (Figure 63A), sur des cellules épithéliales nasales isolées de patients et cultivées en présence d'IL-4, et en présence ou non d'une souche de probiotique.

Nous pouvons observer que l'IL-4 tend à diminuer l'activité du canal ENaC (pour 3 AS sur 5 et pour 3 non-asthmatique sur 5, non significatif en ANOVA, Figure 63B). L'ajout de la bactérie n'atténue pas cet effet. De plus, l'IL-4 tend à augmenter l'activité de CFTR (4 AS /5 et 2 contrôles /5, non significatif en ANOVA, Figure 63C et D). Contrairement à ce qui passe pour le canal ENaC, la bactérie semble rétablir au moins partiellement l'activité de CFTR (Figure 63C et D). Pour finir, il semble y avoir une augmentation de l'activité du canal CaCC avec l'IL-4 (3 AS / 5 et 4 contrôles /5, Figure 63E). Cependant, l'ajout du lactobacille ne semble pas avoir d'effet sur l'activité de ce canal (Figure 63E).

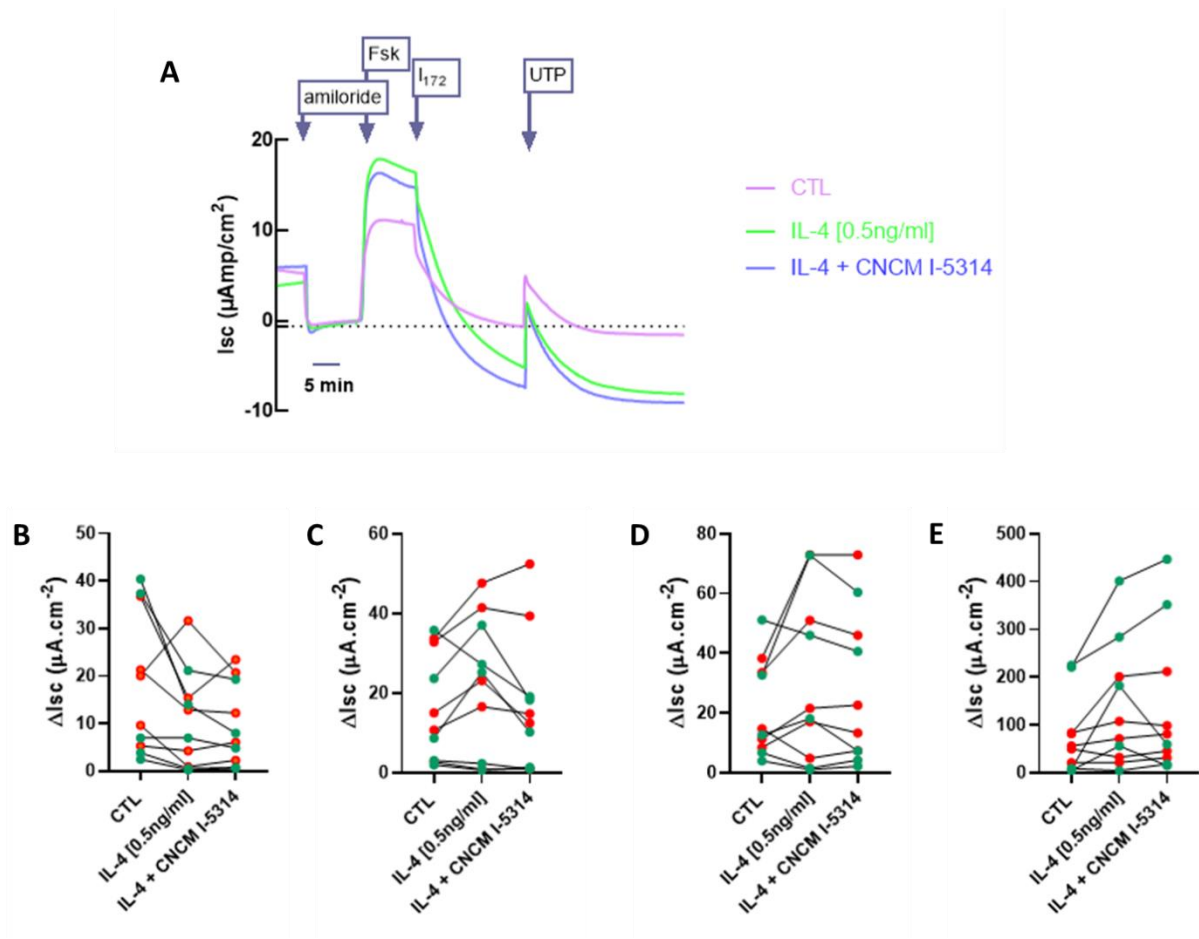


Figure 63 : **A.** Mesures du courant de court-circuit ( $I_{sc}$ ) lors d'ajouts séquentiels d'amiloride ( $10 \mu\text{M}$ , apical), de forskoline ( $10 \mu\text{M}$ , bilatéral), d'inhibiteur  $I_{172}$  ( $20 \mu\text{M}$ , apical) et d'UTP ( $100 \mu\text{M}$ , apical) dans les trois conditions de culture des cellules épithéliales nasales humaines primaires (exemple du patient n°8, asthmatique sévère). Graphiques représentant le changement d' $I_{sc}$ , pour chaque condition de cultures (CTL : contrôle, ajout d'IL-4, ajout d'IL-4 puis de la bactérie CNCM I-5314), soit la variation du courant de court-circuit par rapport à la ligne de base après l'ajout **B.** d'amiloride (inhibition d'ENaC), **C.** de forskoline (activation de CFTR), **D.** d'inhibiteur  $I_{172}$  (inhibition de CFTR) et **E.** d'UTP (activation des CaCC). Les points rouges correspondent aux patients asthmatiques sévères et les points verts aux patients non-asthmatiques.

**b) La concentration cytokinique dans les lavages apicaux ne semble pas être modifiée dans un modèle cellulaire d'inflammation T2**

La production de cytokines par les cellules épithéliales dans notre modèle cellulaire a été évaluée par dosage multiplexé dans les lavages apicaux. Les résultats obtenus sont inférieurs à la limite de détection pour la majorité des cytokines, tandis que les concentrations obtenues pour l'IL-8 sont toutes supérieures à  $11000 \text{ pg/mL}$  (au-dessus du plus haut point de la gamme étalon). Ainsi, nous n'avons pu obtenir la concentration en cytokines que pour l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-6. Nous pouvons remarquer qu'au niveau basal, il y a une forte hétérogénéité dans la production des différentes cytokines en fonction des patients, sans que cela soit corrélé au statut asthmatique (Figure 64). Il ne semble pas y avoir d'effet de l'IL-4 ni de la bactérie sur la concentration en IFN- $\gamma$  et en IL-6 (Figure 64A et B). A l'inverse, la concentration en TNF- $\alpha$  est



fortement impactée par l'ajout d'IL-4 pour un des patients non-asthmatiques uniquement (Figure 64C) avec une diminution de cette concentration après ajout de la bactérie.

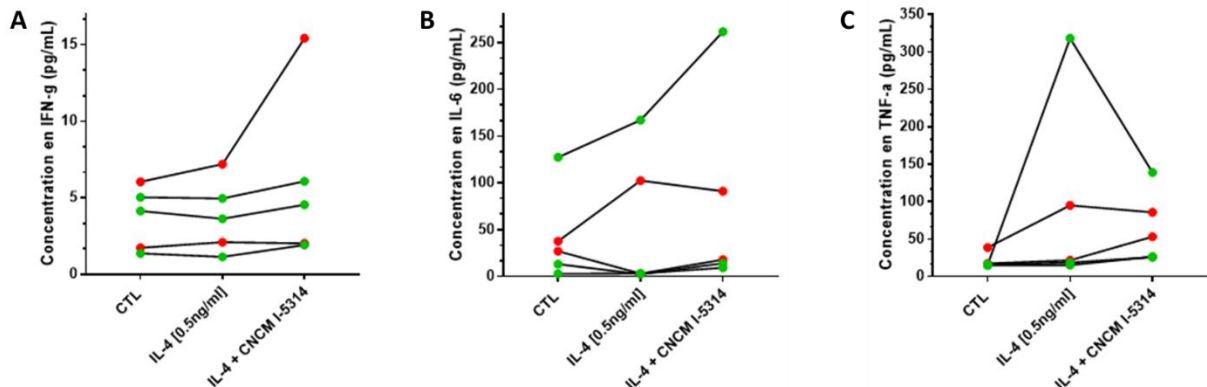


Figure 64 : Concentrations en **A.** IFN- $\gamma$ , **B.** IL-6 et **C.** TNF- $\alpha$  dans les lavages apicaux des cellules épithéliales nasales humaines primaires (PhNec) contrôles (CTL), des cellules ayant reçu de l'IL-4 et des cellules ayant reçu de l'IL-4 et la bactérie CNCM 1-5314.

En rouge sont représentées les PhNec issues des patients asthmatiques sévères et en vert des patients non-asthmatiques.

#### c) Les expressions relatives des mucines MUC5AC et MUC5B semblent être altérées dans un modèle cellulaire d'inflammation T2

Il a été montré que, chez les patients asthmatiques, MUC5AC serait essentiellement produit alors que la production de MUC5B serait diminuée. De plus, les alarmines (IL-25, IL-33 et TSLP) interviennent dans la réponse de type 2 dans l'asthme notamment, en activant les ILC de type 2. Nous avons donc voulu établir si ces caractéristiques étaient retrouvées dans le modèle cellulaire d'inflammation de type 2 que nous avons mis en place. Pour cela, nous avons mesuré l'expression de l'ARN messager (ARNm) de ces différents composants (mucines et alarmines).

Chez les non-asthmatiques, l'expression relative de l'ARNm de MUC5AC semble être augmentée après ajout d'IL-4 (Figure 65A) alors que celles de MUC5B et de MUC4 semble être légèrement diminuées (Figure 65B et C). La présence de la bactérie semble amplifier l'augmentation des niveaux d'ARNm de MUC5AC par rapport à l'ajout d'IL-4 seul (Figure 65A), alors qu'elle ne semble avoir aucun effet sur l'expression relative de l'ARNm MUC5B (Figure 65B). De manière intéressante, en condition contrôle (sans IL-4/bactérie) il semble que les niveaux de MUC5AC soient augmentés et les niveaux de MUC5B diminués dans les cellules AS par rapport aux cellules NA. D'autre part, l'expression de l'ARNm de l'IL-25 semble diminuée par le traitement à l'IL-4 dans les cellules NA (Figure 65D) alors que les expressions relatives des ARNm de la TSLP et de l'IL-33 semblent être peu impactées par l'ajout d'IL-4

sauf pour les cellules d'un patient NA (Figure 65E et F). La bactérie ne semble pas avoir d'effet sur ces dernières.

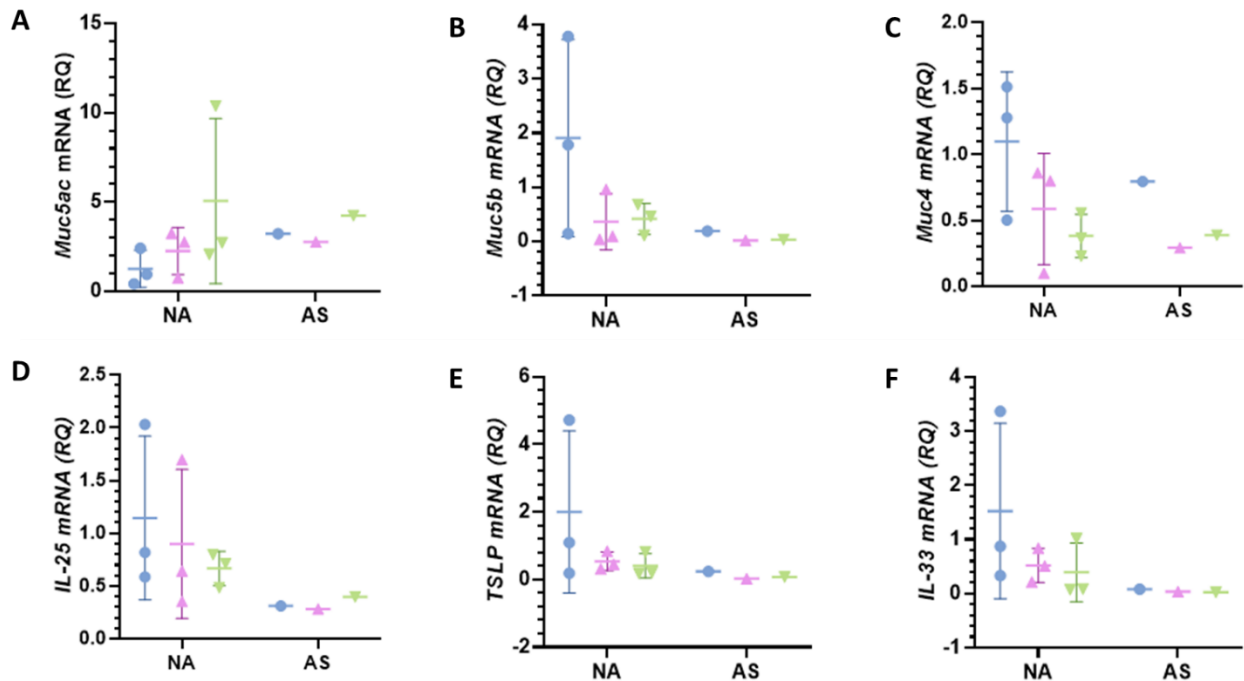


Figure 65 : Expressions relatives des ARN messagers (mRNA) de **A.** MUC5AC, **B.** MUC5B, **C.** MUC4, **D.** l'IL-25, **E.** TSLP et **F.** l'IL-33 dans les cellules épithéliales nasales humaines primaires issues de patients non-asthmatiques (NA) et asthmatiques sévères (AS) et mises en culture en présence de PBS/BSA 5% (en bleu, contrôle), d'IL-4 (en rose) ou d'IL-4 et de la bactérie CNCM I-5314 (vert).

## Conclusion

Au niveau pulmonaire, la première ligne de défense contre les agressions est la barrière constituée par l'épithélium respiratoire. Les cellules épithéliales ciliées et les cellules sécrétrices de mucus assurent la clairance mucociliaire permettant l'élimination mécanique de la majorité des particules inhalées et des pathogènes pulmonaires<sup>51</sup>. Les canaux ENaC, CFTR et CaCC agissent ensemble pour réguler la composition de la couche périciliaire dans laquelle les cils des cellules sous-jacentes peuvent battre. Le développement de traitements agissant sur le mucus n'a été que très peu étudié dans l'asthme. Les médicaments pour traiter le dysfonctionnement dans la production/composition du mucus des voies respiratoires, y compris la guaifénésine, ne sont pas recommandés pour le traitement de l'asthme<sup>207</sup>. De plus, les cellules épithéliales sont aussi capables de sécréter des médiateurs inflammatoires comme des cytokines pro-inflammatoires mais aussi des chimiokines qui vont permettre le recrutement de cellules immunitaires sur le site de l'infection<sup>51</sup>. Notre étude a visé à mieux comprendre les mécanismes contribuant à la perte de fonction de la barrière épithéliale des voies respiratoires dans l'asthme sévère.

Nous avons montré, dans un modèle cellulaire d'inflammation T2, que l'IL-4 semble diminuer l'activité du canal ENaC et augmenter l'activité du canal CFTR et celle des canaux CaCC, tendant ainsi vers le développement d'un épithélium à phénotype pro-sécrétoire. Le traitement par l'IL-4 semble aussi impacter la barrière épithéliale en diminuant la résistance transépithéliale du tissu, seulement sur les cellules provenant des patients atteints d'AS. De manière intéressante, la bactérie probiotique CNCM I-5314 semble rétablir l'activité contrôlée de CFTR. Nos résultats sont en accord avec les données disponibles dans la littérature scientifique. En effet, il a été démontré, dès 2002, par Danahay et al.<sup>208</sup>, qu'une exposition, même courte (pendant 48h), à l'IL-4 (10 ng/mL), entraînait des changements marqués des propriétés de transport ionique transépithélial, particulièrement la diminution de l'absorption de Na<sup>+</sup> via ENaC ainsi qu'une augmentation des courants liés à CFTR et aux CaCC. D'autres études, du même groupe et d'autres équipes de recherche, ont, plus tard, confirmé et approfondi ces résultats en montrant que les effets de l'IL-4 sur ENaC et CFTR étaient notés dès une concentration de 0.1 ng/mL alors que 1 ng/mL était nécessaire pour induire l'augmentation de l'activité des CaCC<sup>209</sup>. De manière intéressante l'étude de Gorrieri et al.<sup>210</sup> a montré que l'IL-4 (10 ng/mL) régula l'expression génique de multiples canaux et transporteurs d'ions, dont faisaient partie CFTR et TMEM16A, un CaCC. L'originalité de notre travail repose sur le fait (i) qu'on ait utilisé des cellules provenant de patients atteints d'asthme sévère et de patients contrôles, malgré l'absence de différence d'activité des canaux ioniques étudiés et (ii) que la concentration d'IL-4 utilisée était pertinente avec les mesures effectuées dans les plasma d'enfants atteints d'asthme sévère, en dehors des périodes de crise d'asthme, contrairement aux concentrations généralement utilisées dans la littérature (10 ng/mL). Il serait intéressant de connaître et de tester des concentrations de cette cytokine, retrouvées au niveau systémique, lors de périodes d'exacerbations et d'examiner plus en détail la plus grande sensibilité des cellules épithéliales provenant des patients AS, au traitement par l'IL-4.

De plus, nous avons montré que l'expression relative de l'ARNm de *MUC5AC* semble être augmentée, alors que celles de *MUC5B* et *MUC4* semblent être diminuées, après induction de l'inflammation par l'IL-4. Cependant, il n'y a pas d'effet visible de la bactérie sur ces niveaux d'expressions relatives. *MUC5B* a été décrit comme essentiel pour le bon fonctionnement de la clairance mucociliaire, en contrôlant les défenses médiées par les macrophages et les infections bactériennes<sup>55,211,212</sup>. À l'inverse, *MUC5AC* jouerait un rôle important dans l'obstruction des voies aériennes et dans l'hyperréactivité allergique<sup>56,211</sup>. *MUC5B* est la mucine prédominante dans le mucus des voies respiratoires saines, et l'asthme est caractérisé par une diminution de *MUC5B* par rapport à *MUC5AC*<sup>213</sup>. Notre modèle cellulaire d'inflammation T2 semble confirmer l'implication de la modification de la balance *MUC5AC* / *MUC5B* vers une augmentation de *MUC5AC* en condition T2 et est en accord avec les

données de la littérature. Nos résultats devront être approfondis, particulièrement, il sera important d'évaluer si les cellules provenant des patients atteints d'AS répondent à l'IL-4, par exemple en produisant plus de mucines que les cellules provenant des patients témoins.

A l'inverse, l'expression relative des gènes de la TSLP et de l'IL-33 semble diminuer dans notre modèle d'inflammation T2 même s'il est nécessaire de rester prudent vis-à-vis de ces résultats au vu de la grande variabilité observée en condition contrôle. Les alarmines, TSLP, IL-33 et l'IL-25 sont des médiateurs dérivés des cellules épithéliales qui contribuent à la pathobiologie et à la physiopathologie de l'asthme<sup>214</sup>. En réponse à des signaux de danger exogènes ou endogènes, les cellules épithéliales ainsi que les cellules immunitaires sécrètent de la TSLP. Les dommages causés aux cellules épithéliales bronchiques associées aux allergènes, polluants et agents pathogènes viraux et fongiques entraînent également une libération d'IL-33<sup>214</sup>. Nos résultats ont été obtenus sur un effectif faible et méritent d'être reproduits. Il sera aussi intéressant de tester l'impact des alarmines sur les productions de cytokines de l'inflammation T2 comme l'IL-4 ou l'IL-13. Les cellules immunitaires innées et les cellules immunitaires adaptatives sont également capables de libérer des alarmines.<sup>214</sup> Cependant, nous n'avons pas montré de différence entre les concentrations en cytokines, dans les lavages apicaux, des cellules ayant reçu de l'IL-4 par rapport aux contrôles. Cependant, comme précédemment, les résultats obtenus nécessitent d'être confirmés par un nombre de répétitions plus élevé. Pour finir, il a été étonnant de retrouver une forte concentration d'IL-8 dans toutes les conditions. L'IL-8 est un facteur inflammatoire impliqué dans la pathogenèse de l'asthme. En effet, l'IL-8 peut être détectée dans le sérum de patients souffrant d'asthme sévère et ses niveaux sont en corrélation avec l'activité de la maladie<sup>215</sup>.

Nous avons mis en place un modèle cellulaire d'inflammation T2 pour caractériser la perte de fonction de l'épithélium. Pour cela, nous avons mis en place différentes analyses permettant de montrer l'impact de l'inflammation sur les canaux ioniques ainsi que sur l'expression relative de différents constituants du mucus et sur les alarmines. Notre modèle pourra, dans le futur, être optimisé, par exemple par l'étude de l'effet des alarmines sur ces différents paramètres. Il sera aussi crucial de comparer précisément les réponses des cellules provenant des enfants atteints d'AS avec celles des patients témoins afin de déterminer si des caractéristiques intrinsèques à ces cellules engendrent des réponses différentes aux différents stimuli servant à mimer la pathologie asthmatique. Nous avons aussi essayé de moduler ces effets grâce à une bactérie, décrite comme ayant des effets immunomodulateurs sur l'inflammation. Nous avons montré que ce *Lactobacille* pouvait avoir des effets sur l'activité du canal CFTR, contrecarrant l'effet de l'IL-4 et permettant le retour à un niveau d'activité basal. Ainsi, notre modèle épithélial *in vitro* d'inflammation de type T2, sur les cellules épithéliales nasales

humaines primaires a permis d'établir les bases de tests fonctionnels qui permettront l'évaluation de bactéries à potentiel probiotique dans la pathologie de l'asthme.

## Conclusion du chapitre 2

Dans cette étude, nous avons cherché à comprendre les mécanismes contribuant à la perte de fonction de la barrière épithéliale des voies respiratoires dans l'AS. Pour cela, nous avons constitué des banques de cellules épithéliales nasales et bronchiques, et de bactéries isolées des LBA. Ces banques de cellules, notamment les PhNec, ont permis de mettre en place un modèle cellulaire d'inflammation de type T2 en présence d'IL-4. Ce modèle nous a permis d'analyser différentes fonctions de défense de l'épithélium, comme le transport ionique, l'expression des mucines, des alarmines et des cytokines. Les résultats préliminaires sur les cellules PhNeC de patient AS et non-asthmatiques semblent indiquer que l'IL-4 diminue l'activité du canal ENaC et augmente l'activité du canal CFTR. Il serait intéressant de confirmer ces résultats en transposant le modèle utilisant les cellules PhNec aux cellules PhBec et en les comparant entre elles pour un même patient, la maladie asthmatique atteignant principalement les bronches.

Dans l'optique de proposer de nouvelles approches thérapeutiques, nous avons caractérisé les bactéries isolées des LBA par leurs courbes de croissance, leurs diamètres d'inhibition pour cinq antibiotiques et leur production d'AGCC. En parallèle, nous avons étudié l'impact d'une bactérie lactique (CNCM I-5314), décrite comme ayant des effets immunomodulateurs dans certaines maladies pulmonaires, dans le modèle d'inflammation de type T2. Cette dernière semble rétablir l'activité du canal CFTR mais n'a aucun effet sur les autres canaux. Par la suite, il serait intéressant de tester les bactéries isolées des LBA de notre cohorte SevAsthma et de caractériser, notamment, les effets de *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* et *Rothia mucilaginosa*, sur notre modèle cellulaire d'inflammation T2.

Notre modèle épithélial *in vitro* d'inflammation de type T2 permet de mieux comprendre les mécanismes impliqués au niveau de la barrière épithéliale, via une surexpression de MUC5AC et une diminution de l'expression de MUC5B, mais aussi via une modification de l'activité des canaux ENaC, CFTR et CaCC. Ce modèle nous permet d'établir les bases de tests fonctionnels qui permettront l'évaluation de bactéries à potentiel probiotique dans la pathologie de l'asthme

## Conclusion générale et perspectives

L'asthme sévère est défini comme un asthme qui n'est pas contrôlé malgré l'observance d'un traitement optimisé à haute dose de corticostéroïde inhalé associé à un  $\beta_2$ -agoniste à longue durée d'action et la prise en charge des facteurs contributifs, ou qui s'aggrave lorsque le traitement à haute dose est diminué<sup>7</sup>. Cette pathologie multifactorielle est caractérisée par plusieurs phénotypes cliniques présentant des symptômes similaires. Les endotypes de l'asthme, c'est-à-dire les mécanismes physiopathologiques sous-jacents à un même phénotype clinique, n'ont pas complètement été décrits.

L'asthme résulte d'une réponse immunitaire inflammatoire excessive, mal contrôlée, au niveau de la muqueuse respiratoire. Elle implique l'immunité innée, qui constitue la première ligne de défense face à une infection, mais également la fonction barrière des voies respiratoires, qui est assurée notamment par la présence de mucus, de liquide de surface et d'un microbiote<sup>61</sup>. Cette réponse inflammatoire implique aussi l'immunité adaptative : les deux endotypes d'asthme les mieux caractérisés sont d'une part l'asthme T2, associé à une réponse Th2<sup>50</sup> comme l'asthme allergique ou l'asthme à éosinophiles et d'autre part, l'asthme non-T2 comme l'asthme lié à l'obésité. L'asthme non-T2 n'a encore été que très peu étudié et serait lié à l'activation d'autres types cellulaires comme les Th1 ou les Th17<sup>50</sup>.

La compréhension de l'asthme sévère reste limitée du fait de l'hétérogénéité de la maladie et de la difficulté d'accéder au site de la pathologie, les poumons. Ainsi, dans l'objectif de mieux caractériser l'asthme sévère au niveau local, nous avons réalisé des analyses sans a priori du métabolome et du microbiote pulmonaire, grâce à des échantillons de lavages bronchoalvéolaires collectés chez des enfants souffrant d'asthme sévère et comparés à des contrôles. Nous avons mis en regard ces données avec les données cliniques et démographiques, puis nous les avons ensuite intégrées avec les données immunologiques préalablement obtenues sur ces mêmes échantillons (approches intégrée « multi-omics »). En parallèle, pour tenter d'identifier des biomarqueurs de l'asthme sévère en périphérie, des analyses métabolomiques et lipidomiques ont été réalisées sur le plasma des mêmes enfants. De la même façon, ces données ont été reliées aux métadonnées cliniques et démographiques puis intégrées avec les données immunologiques plasmatiques disponibles. Pour finir, nous avons réalisé des biobanques de cellules épithéliales et de bactéries, isolées à partir de biopsies pulmonaires et de brossages nasaux. Ces biobanques permettront le développement de modèles *in vitro* pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de l'asthme sévère au niveau épithélial, mais aussi pour tester de nouvelles approches thérapeutiques.

Une première partie de ma thèse a donc porté sur l'exploration du métabolome dans les lavages bronchoalvéolaires (LBA). Cette analyse a été réalisée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse de haute résolution (LC-HRMS) non ciblée. Les LBA

n'avaient jamais été étudiés au laboratoire, et il a donc fallu optimiser et valider en amont les étapes de préparation de l'échantillon, ainsi que sa normalisation, avant d'analyser nos échantillons cliniques. L'ensemble du processus analytique a ensuite été appliqué à une cohorte de 30 échantillons de LBA issus de la cohorte CLASSE établie à l'hôpital Necker (Paris), cohorte comprenant 20 enfants asthmatiques sévères (AS) et 10 enfants non-asthmatiques (NA) du même âge. Nous avons pu identifier 88 métabolites, annotés avec le plus haut niveau de confiance. L'analyse multivariée non supervisée (analyse en composante principale, ACP) sur l'intensité de ces métabolites a montré que la population asthmatique sévère était plus homogène que la population non-asthmatique, mais n'a pas permis de distinguer les deux groupes de patients. Des analyses supervisées univariées ont cependant mis en évidence des intensités différentes de certains métabolites entre les deux groupes d'enfants. Des analyses d'enrichissement des voies métaboliques ont ensuite mis en évidence 5 voies métaboliques significativement enrichies chez les asthmatiques sévères. En particulier, nous avons démontré la dérégulation de la voie de synthèse des polyamines, avec une augmentation significative des intensités de la spermine et de la spermidine dans les LBA des patients asthmatiques sévères par rapport aux contrôles.

Nous avons ensuite réalisé des analyses du microbiote sur les mêmes échantillons, permettant de détecter 514 OTU. L'analyse en composante principale, réalisée sur l'abondance relative de ces OTU, n'a pas permis de différencier nos deux groupes de patients. Contrairement à ce que nous avons obtenu en métabolomique, la composition du microbiote dans les LBA des enfants non-asthmatiques semblait être plus homogène que celle des asthmatiques sévères. De plus, nous avons observé que les LBA des asthmatiques sévères présentaient une diversité alpha augmentée par rapport aux non-asthmatiques. De façon intéressante, les analyses univariées supervisées ont permis de mettre en évidence une abondance relative d'*Haemophilus* plus faible et des abondances relatives de *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Dolosigranulum*, *Prevotella*, *Tropheryma* et *Moraxella* plus élevées dans les LBA d'enfants AS par rapport aux contrôles.

L'intégration multi-omique de ces deux jeux de données et de celui des facteurs immunitaires solubles préalablement quantifiés sur ces mêmes échantillons (données déjà publiées<sup>79,80</sup>) a permis d'identifier pour la première fois une signature locale de l'asthme sévère chez l'enfant. Cette signature est caractérisée par des facteurs immunitaires (IL-8, APRIL, MMP2, CCL-20) et des métabolites (glycyl-L-leucine, N-acétyl-ornithine, N6-acétyl-L-lysine...). Ces résultats font l'objet d'une publication pour laquelle je suis première auteur.

Il est à noter que les résultats de l'analyse métabolomique sur les lavages bronchoalvéolaires n'ont été obtenus que dans une condition analytique (condition C18-ESI<sup>+</sup>). Pour obtenir plus



d'informations et validées celles obtenues, il pourrait être intéressant d'envisager d'utiliser une autre colonne comme par exemple la colonne PFPP, qui est une alternative à la colonne C18 ou de réaliser les analyses en condition C18-ESI<sup>-</sup>. Par ailleurs, les métabolites ont été annotés grâce à une base de données internes, qui contient pour majorité des métabolites endogènes – ce qui peut expliquer la faible corrélation avec les données du microbiote.

Dans un second temps, nous avons effectué des analyses de métabolomique, « classique » mais aussi de lipidomique, sur le plasma des mêmes enfants AS et NA, en appliquant des protocoles préétablis au laboratoire. Ainsi, nous avons pu annoter au plus haut niveau de confiance 214 métabolites dans les plasmas. Comme précédemment, l'analyse multivariée non supervisée en composantes principales n'a pas permis de différencier les deux groupes de patients. Cependant, les analyses univariées supervisées ont révélé que les intensités de douze métabolites étaient altérées par le statut asthmatique. En particulier, les intensités de la valine et de la phénylalanine étaient diminuées dans les plasmas des enfants asthmatiques sévères par rapport aux contrôles, tandis que les intensités du sulfate d'indoxyle, de l'acide acétylneuraminique, de l'acide aminobutyrique, de l'acide dihydroxybenzoïque, de l'aminophénol, de la méthyl-histidine, de la kynurénine, de l'acide nicotinique, du lactamide et de l'acide acétamidobutanoïque étaient augmentées chez ces patients. En parallèle, l'analyse lipidomique a permis de mettre en évidence 12 lipides dont l'intensité était significativement augmentée chez les asthmatiques sévères. Cependant, l'analyse intégrée non supervisée des données de métabolites, de cytokines et de lipides n'a pas permis d'identifier une signature multi-omique dans le plasma des enfants souffrant d'asthme sévère. Des analyses supervisées pourraient être conduites pour identifier une telle signature.

Ainsi, dans cette première partie, grâce à la combinaison d'approches « omiques » complémentaires, nous avons pu mettre en évidence des caractérisations de l'asthme sévère chez l'enfant au niveau pulmonaire et plasmatique (Figure 66). Ces signatures vont pouvoir donner de nouvelles pistes pour, respectivement, mieux comprendre les mécanismes en place localement dans l'AS, et aider au diagnostic et au suivi de ces patients.

## Asthme sévère

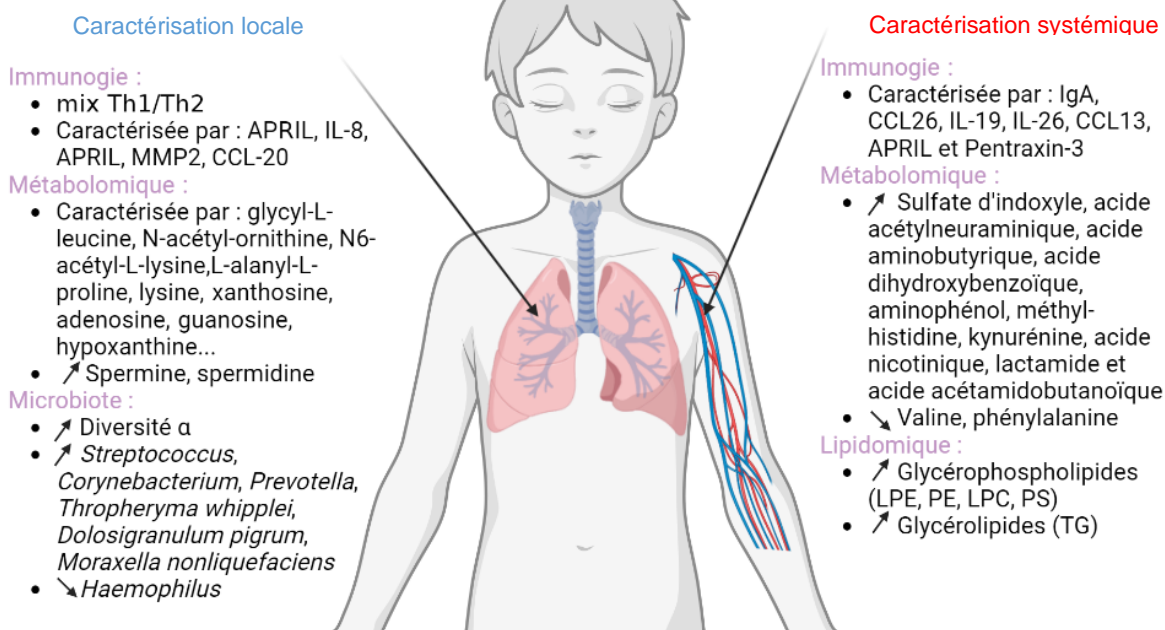


Figure 66 : Caractérisations locale et systémique de l'asthme sévère pédiatrique. Figure éditée avec Biorender.

Dans une seconde partie, nous avons cherché à mettre en place des outils pour investiguer les mécanismes impliqués au niveau de l'épithélium des voies respiratoires des patients atteints d'AS, et permettant d'envisager de nouvelles voies thérapeutiques.

Pour cela, nous avons isolé des cellules épithéliales issues des brossages nasaux et des biopsies recrutées au sein d'une seconde cohorte, la cohorte SevAsthma. Un modèle *in vitro* d'inflammation T2, par ajout d'IL-4, a été mis en place grâce aux cellules issues des brossages nasaux. Dans un contexte thérapeutique, une bactérie lactique préalablement caractérisée (souche CNCM I-5314) a été utilisée en co-culture dans ce même modèle cellulaire pour évaluer son effet immunomodulateur. Nous avons mis en évidence que l'IL-4 diminuait l'activité du canal ENaC et augmentait l'activité du canal CFTR et celle du canal CaCC, quelle que soit l'origine (AS ou NA) des cellules. De plus, l'expression relative de *MUC5AC* tendait à être augmentée par l'IL-4, alors que celles de *MUC5B* et *MUC4* semblaient être diminuées. De manière intéressante, la bactérie CNCM I-5314 tendait à rétablir l'activité de CFTR.

Pour réaliser ce modèle *in vitro*, nous avons utilisé uniquement des cellules issues des brossages nasaux. Bien qu'il ait été montré par plusieurs études que ces cellules sont de bons substituts aux cellules bronchiques et plus facile d'accès<sup>216,217</sup>, il sera important de transférer ce modèle sur des cellules issues de biopsies bronchiques, puisque l'asthme est une maladie chronique des bronches. De plus, nous sommes conscients que le nombre de répétitions sur ces expériences était assez faible. Il est donc nécessaire d'augmenter le nombre

d'expériences pour consolider les résultats. Enfin, en plus des travaux réalisés, il serait intéressant d'investiguer les effets des polyamines (notamment la spermine et de la spermidine) sur la barrière épithéliale, ces composés ayant été identifiés comme augmentés dans les LBA des enfants AS par nos analyses métabolomiques. Pour cela, nous pourrions envisager d'incuber les cellules avec une de ces molécules puis de regarder les différents effets sur l'expression relative des différentes mucines et des alarmines mais aussi de regarder le possible effet sur la sécrétion de cytokines et sur les canaux ioniques. Nos résultats ont néanmoins permis la validation de tests fonctionnels pour l'étude de bactéries potentiellement probiotiques.

En parallèle, des bactéries ont été isolées de lavages bronchoalvéolaires de 2 patients AS et de 2 patients NA de la cohorte SevAsthma et caractérisées en fonction de leur croissance, leur résistance aux antibiotiques et leur production d'AGCC. Parmi les 166 souches isolées, deux semblent présenter un potentiel intéressant, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* et *Rothia mucilaginosa*, car elles produisent une quantité importante d'acétate, un AGCC aux fonctions immunomodulatrices, et elles ont été préalablement décrites comme souches candidates pour une potentielle utilisation thérapeutique (*Corynebacterium pseudodiphtheriticum* : isolée de sujets sains et *Rothia mucilaginosa* : isolée de poumons de patients ayant la mucoviscidose). L'une d'entre elles permet notamment l'élimination de *S.aureus* de la cavité nasale et l'autre possède des propriétés anti-inflammatoires. Dans un but de nouvelles approches thérapeutiques, il serait donc intéressant de tester l'effet de ces bactéries sur la modulation de l'inflammation T2 dans notre modèle, et d'évaluer le rôle, en particulier, des concentrations élevées d'acétate qu'elles produisent.

Par l'analyse du microbiote, du métabolome et des composants immunitaires solubles au niveau pulmonaire et/ou sanguin, notre étude a donc permis la mise en évidence de signatures locales et systémiques de l'asthme sévère de l'enfant. Nous avons aussi développé un modèle *in vitro* d'épithélium des voies respiratoires qui pourra être utilisé pour tester à haut débit des candidats probiotiques dans le cadre d'une approche thérapeutique, et nous avons isolé plus de 150 souches bactériennes des voies respiratoires d'enfants AS ou contrôles (Figure 67).

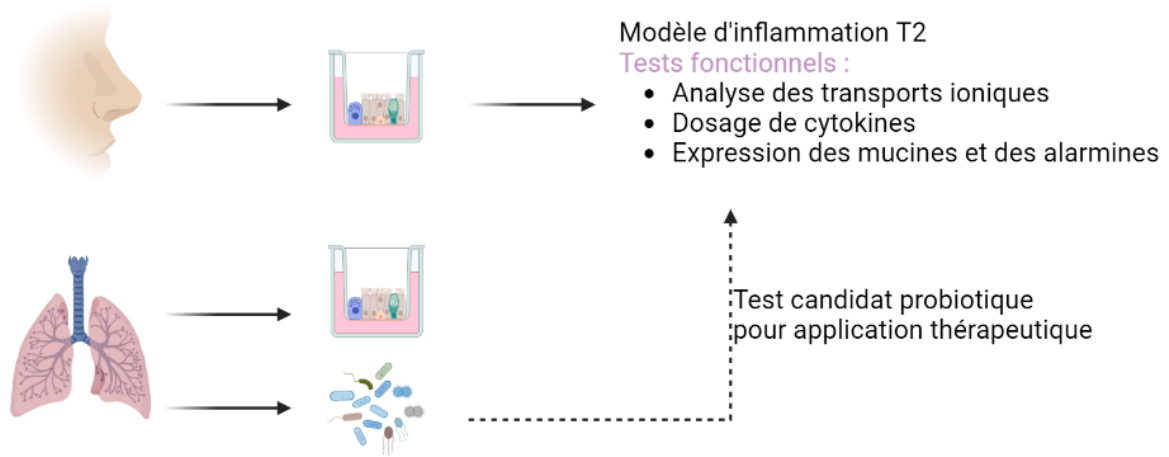


Figure 67 : Mise en place d'un modèle *in vitro* d'épithélium pour tester des candidats probiotiques. Image générée par Biorender.

Mon projet de thèse s'intègre dans un projet plus vaste qui a pour objectif de caractériser les endotypes de l'asthme sévère chez l'enfant. Pour répondre à cet objectif final, il sera nécessaire d'appliquer les différentes stratégies d'analyse mises en place sur la cohorte CLASSE, sur une cohorte indépendante et plus conséquente (cohorte SevAsthma, en cours de construction).

## Bibliographie

1. Dutau G, Lavaud F. La révision 2019 du GINA (Global Initiative for Asthma) chez les enfants âgés de plus de 5 ans et les adolescents. *Revue Française d'Allergologie*. 2020;60(6-7):547-549.
2. Delmas MC, Guignon N, Leynaert B, et al. Évolution de la prévalence de l'asthme chez l'enfant en France : enquêtes nationales de santé en milieu scolaire 2003-2008. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*. 2014;20:360-365.
3. To T, Stanojevic S, Moores G, et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health*. 2012;12:204.
4. Ferrante G, La Grutta S. The Burden of Pediatric Asthma. *Front Pediatr*. 2018;6:186.
5. Network GA. The Global Asthma Report. 2018.
6. Bousquet J, Bousquet PJ, Godard P, Daures JP. The public health implications of asthma. *Bulletin of the World Health Organization*. 2005;83(7):548-554.
7. GINA. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. 2022.
8. Olaguibel JM, Quirce S, Juliá B, et al. Measurement of asthma control according to global initiative for asthma guidelines: a comparison with the asthma control questionnaire. *Respiratory Research*. 2012;13:50.
9. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J*. 2008;31(1):143-178.
10. Pollart S, Elward K. Overview of Changes to Asthma Guidelines : Diagnosis and Screening. *American Academy of Family Physicians*. 2009;79(9):761-767.
11. Papaioannou AI, Kostikas K, Zervas E, Kolilekas L, Papiris S, Gaga M. Control of asthma in real life: still a valuable goal? *Eur Respir Rev*. 2015;24(136):361-369.
12. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J*. 2014;43(2):343-373.
13. Brigham EP, West NE. Diagnosis of asthma: diagnostic testing. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2015;5 Suppl 1:S27-30.
14. Lejeune S, Deschildre A, Le Rouzic O, et al. Childhood asthma heterogeneity at the era of precision medicine: Modulating the immune response or the microbiota for the management of asthma attack. *Biochem Pharmacol*. 2020;179:114046.
15. Cave AJ, Atkinson LL. Asthma in preschool children: a review of the diagnostic challenges. *J Am Board Fam Med*. 2014;27(4):538-548.
16. Pedersen SE, Hurd SS, Lemanske RF, Jr., et al. Global strategy for the diagnosis and management of asthma in children 5 years and younger. *Pediatr Pulmonol*. 2011;46(1):1-17.
17. Asthme. 2019; <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-et-infections-respiratoires/asthme>. Accessed 24/03/20.
18. Brusselle GG, Koppelman GH. Biologic Therapies for Severe Asthma. *N Engl J Med*. 2022;386(2):157-171.
19. Huang L, Guo J, Li W, et al. Probiotics, prebiotics, and synbiotics for the treatment of asthma. *Medicine*. 2019;98.
20. FAO/WHO. *Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. 2001.
21. Liu A, Ma T, Xu N, et al. Adjunctive Probiotics Alleviates Asthmatic Symptoms via Modulating the Gut Microbiome and Serum Metabolome. *Microbiol Spectr*. 2021;9(2):e0085921.

22. Arrieta MC, Arevalo A, Stiemsma L, et al. Associations between infant fungal and bacterial dysbiosis and childhood atopic wheeze in a nonindustrialized setting. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142(2):424-434 e410.
23. Arrieta MC, Stiemsma L, Dimitriu P, et al. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci Transl Med*. 2015;30:307.
24. Wu Z, Mehrabi Nasab E, Arora P, Athari SS. Study effect of probiotics and prebiotics on treatment of OVA-LPS-induced of allergic asthma inflammation and pneumonia by regulating the TLR4/NF-kB signaling pathway. *J Transl Med*. 2022;20(1):130.
25. Feleszko W, Jaworska J, Rha RD, et al. Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2007;37(4):498-505.
26. Simpson MR, Dotterud CK, Storro O, Johnsen R, Oien T. Perinatal probiotic supplementation in the prevention of allergy related disease: 6 year follow up of a randomised controlled trial. *BMC Dermatol*. 2015;15:13.
27. Kukkonen K, Savilahti E, Haahtela T, et al. Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(1):192-198.
28. Spacova I, Petrova MI, Fremau A, et al. Intranasal administration of probiotic *Lactobacillus rhamnosus GG* prevents birch pollen-induced allergic asthma in a murine model. *Allergy*. 2019;74(1):100-110.
29. Remot A, Descamps D, Noordine ML, et al. Bacteria isolated from lung modulate asthma susceptibility in mice. *ISME J*. 2017;11(5):1061-1074.
30. Kuruvilla ME, Vanijcharoenkarn K, Shih JA, Lee FE. Epidemiology and risk factors for asthma. *Respir Med*. 2019;149:16-22.
31. Toskala E, Kennedy DW. Asthma risk factors. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2015;5 Suppl 1(Suppl 1):S11-16.
32. van Tilburg Bernardes E, Arrieta MC. Hygiene Hypothesis in Asthma Development: Is Hygiene to Blame? *Arch Med Res*. 2017;48(8):717-726.
33. Beasley R, Semprini A, Mitchell EA. Risk factors for asthma: is prevention possible? *The Lancet*. 2015;386(9998):1075-1085.
34. Oddy WH. Breastfeeding, Childhood Asthma, and Allergic Disease. *Ann Nutr Metab*. 2017;70 Suppl 2:26-36.
35. Castro-Rodriguez JA, Forno E, Rodriguez-Martinez CE, Celedon JC. Risk and Protective Factors for Childhood Asthma: What Is the Evidence? *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2016;4(6):1111-1122.
36. Xepapadaki P, Manios Y, Liarigkovinos T, et al. Association of passive exposure of pregnant women to environmental tobacco smoke with asthma symptoms in children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2009;20(5):423-429.
37. Magnus MC, Haberg SE, Karlstad O, Nafstad P, London SJ, Nystad W. Grandmother's smoking when pregnant with the mother and asthma in the grandchild: the Norwegian Mother and Child Cohort Study. *Thorax*. 2015;70(3):237-243.
38. Stern J, Pier J, Litonjua AA. Asthma epidemiology and risk factors. *Semin Immunopathol*. 2020;42(1):5-15.
39. Chowdhury NU, Guntur VP, Newcomb DC, Wechsler ME. Sex and gender in asthma. *Eur Respir Rev*. 2021;30(162).
40. Jolliffe DA, Greenberg L, Hooper RL, et al. Vitamin D supplementation to prevent asthma exacerbations: a systematic review and meta-analysis of individual participant data. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2017;5(11):881-890.
41. Wenzel S. Mechanisms of severe asthma. *Clin Exp Allergy*. 2003;33:1622-1628.

42. Agache I. Severe asthma phenotypes and endotypes. *Semin Immunol.* 2019;46:101301.
43. Kuruvilla ME, Lee FE, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2019;56(2):219-233.
44. Asthma Gf. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2019.
45. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178(3):218-224.
46. Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *The Lancet.* 2008;372(9643):1107-1119.
47. Agache I, Akdis CA. Endotypes of allergic diseases and asthma: An important step in building blocks for the future of precision medicine. *Allergol Int.* 2016;65(3):243-252.
48. Ray A, Das J, Wenzel SE. Determining asthma endotypes and outcomes: Complementing existing clinical practice with modern machine learning. *Cell Rep Med.* 2022;3(12):100857.
49. Wenzel S. Severe asthma: from characteristics to phenotypes to endotypes. *Clin Exp Allergy.* 2012;42(5):650-658.
50. Ricciardolo FLM, Sprio AE, Baroso A, et al. Characterization of T2-Low and T2-High Asthma Phenotypes in Real-Life. *Biomedicines.* 2021;9(11).
51. Calven J, Ax E, Radinger M. The Airway Epithelium-A Central Player in Asthma Pathogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23).
52. Duchesne M, Okoye I, Lacy P. Epithelial cell alarmin cytokines: Frontline mediators of the asthma inflammatory response. *Front Immunol.* 2022;13:975914.
53. Matalon S, Bartoszewski R, Collawn JF. Role of epithelial sodium channels in the regulation of lung fluid homeostasis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;309(11):L1229-1238.
54. Syabbalo N. The Role of Airway Remodeling in the Pathophysiology and Treatment of Severe Asthma. *Journal of Online Medicine and Biology.* 2021;1(1):7-21.
55. Ha EV, Rogers DF. Novel Therapies to Inhibit Mucus Synthesis and Secretion in Airway Hypersecretory Diseases. *Pharmacology.* 2016;97(1-2):84-100.
56. Bonser LR, Erle DJ. Airway Mucus and Asthma: The Role of MUC5AC and MUC5B. *J Clin Med.* 2017;6(12).
57. Bara I, Ozier A, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *Eur Respir J.* 2010;36(5):1174-1184.
58. Davies DE. The role of the epithelium in airway remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc.* 2009;6(8):678-682.
59. Leino MS, Loxham M, Blume C, et al. Barrier disrupting effects of alternaria alternata extract on bronchial epithelium from asthmatic donors. *PLoS One.* 2013;8(8):e71278.
60. Dardalhon V, Korn T, Kuchroo VK, Anderson AC. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J Autoimmun.* 2008;31(3):252-256.
61. Akdis CA. Does the epithelial barrier hypothesis explain the increase in allergy, autoimmunity and other chronic conditions? *Nat Rev Immunol.* 2021;21(11):739-751.
62. Parker D, Prince A. Innate immunity in the respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45(2):189-201.
63. Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J.* 2004;23(2):327-333.
64. Schleimer RP, Kato A, Kern R, Kuperman D, Avila PC. Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(6):1279-1284.
65. Hewitt RJ, Lloyd CM. Regulation of immune responses by the airway epithelial cell landscape. *Nat Rev Immunol.* 2021;21(6):347-362.

66. Masuda S, Fujisawa T, Katsumata H, Atsuta J, Iguchi K. High prevalence and young onset of allergic rhinitis in children with bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol.* 2008;19(6):517-522.
67. Habib N, Pasha MA, Tang DD. Current Understanding of Asthma Pathogenesis and Biomarkers. *Cells.* 2022;11(17).
68. Leon B, Ballesteros-Tato A. Modulating Th2 Cell Immunity for the Treatment of Asthma. *Front Immunol.* 2021;12:637948.
69. Nagakumar P, Puttur F, Gregory LG, et al. Pulmonary type-2 innate lymphoid cells in paediatric severe asthma: phenotype and response to steroids. *Eur Respir J.* 2019;54(2).
70. Nagakumar P, Denney L, Fleming L, Bush A, Lloyd CM, Saglani S. Type 2 innate lymphoid cells in induced sputum from children with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(2):624-626 e626.
71. Bossley CJ, Fleming L, Gupta A, et al. Pediatric severe asthma is characterized by eosinophilia and remodeling without T(H)2 cytokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(4):974-982 e913.
72. Lezmi G, Galmiche-Rolland L, Rioux S, et al. Mast cells are associated with exacerbations and eosinophilia in children with severe asthma. *Eur Respir J.* 2016;48(5):1320-1328.
73. Wisniewski JA, Muehling LM, Eccles JD, et al. T(H)1 signatures are present in the lower airways of children with severe asthma, regardless of allergic status. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(6):2048-2060 e2013.
74. Niessen NM, Gibson PG, Baines KJ, et al. Sputum TNF markers are increased in neutrophilic and severe asthma and are reduced by azithromycin treatment. *Allergy.* 2021;76(7):2090-2101.
75. Létuvé S, Taillé C. Physiopathologie de la réponse inflammatoire dans l'asthme de l'adulte. *EMC - Pneumologie.* 2013;10(2):1-8.
76. Agache I, Ciobanu C, Agache C, Anghel M. Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma. *Respir Med.* 2010;104(8):1131-1137.
77. Ricciardolo FLM, Sorbello V, Folino A, et al. Identification of IL-17F/frequent exacerbator endotype in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(2):395-406.
78. Lezmi G, Abou Taam R, Dietrich C, Chatenoud L, de Blic J, Leite-de-Moraes M. Circulating IL-17-producing mucosal-associated invariant T cells (MAIT) are associated with symptoms in children with asthma. *Clin Immunol.* 2018;188:7-11.
79. Adel-Patient K, Grauso M, Abou-Taam R, et al. A Comprehensive Analysis of Immune Constituents in Blood and Bronchoalveolar Lavage Allows Identification of an Immune Signature of Severe Asthma in Children. *Front Immunol.* 2021;12:700521.
80. Adel-Patient K, Grauso M, Abou Taam R, et al. Immune signatures distinguish frequent from non-frequent exacerbators among children with severe asthma. *Allergy.* 2021;1-3.
81. Nandakumar S, Miller CW, Kumaraguru U. T regulatory cells: an overview and intervention techniques to modulate allergy outcome. *Clin Mol Allergy.* 2009;7:5.
82. Yüksek ME, Funda, Güloğlu D, Doğu F, Elhan AH, Babacan E, İkinçioğulları A. Regulatory T cell levels in children with asthma. *The turkish journal of Pediatrics.* 2011;53(5):532-536.
83. Hartl D, Koller B, Mehlhorn AT, et al. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(5):1258-1266.
84. Provoost S, Maes T, Van Durme YM, et al. Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma. *Allergy.* 2009;64(10):1539-1546.
85. Geginat J, Larghi P, Paroni M, et al. The light and the dark sides of Interleukin-10 in immune-mediated diseases and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;30:87-93.



86. Habener A, Happle C, Grychtol R, et al. Regulatory B cells control airway hyperreactivity and lung remodeling in a murine asthma model. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;147(6):2281-2294 e2287.
87. Bennett D, Waters MD. Applying Biomarker Research. *Environmental Health Perspectives.* 2000;108(9):907-910.
88. Popovic-Grle S, Stajduhar A, Lampalo M, Rnjak D. Biomarkers in Different Asthma Phenotypes. *Genes (Basel).* 2021;12(6).
89. Tiotiu A. Biomarkers in asthma: state of the art. *Asthma Res Pract.* 2018;4:10.
90. Courant F, Antignac JP, Dervilly-Pinel G, Le Bizec B. Basics of mass spectrometry based metabolomics. *Proteomics.* 2014;14(21-22):2369-2388.
91. Fiehn O, Kopka J, Dormann P, Altma, , T., Trethewey RN, Willmitzer L. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology.* 2000;18:1157-1161.
92. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica.* 1999;29(11):1181-1189.
93. Hasin Y, Seldin M, Lusic A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol.* 2017;18(1):83.
94. Bui H, Keshawarz A, Hwang SJ, et al. A genomic approach identifies sRAGE as a putatively causal protein for asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2022;149(6):1992-1997 e1912.
95. Lee HW, Baek MG, Choi S, et al. Peripheral blood transcriptomic clusters uncovered immune phenotypes of asthma. *Respir Res.* 2022;23(1):237.
96. Xu P, Wang L, Chen D, et al. The application of proteomics in the diagnosis and treatment of bronchial asthma. *Ann Transl Med.* 2020;8(4):132.
97. Cao C, Li W, Hua W, et al. Proteomic analysis of sputum reveals novel biomarkers for various presentations of asthma. *J Transl Med.* 2017;15(1):171.
98. Turi KN, Romick-Rosendale L, Ryckman KK, Hartert TV. A review of metabolomics approaches and their application in identifying causal pathways of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(4):1191-1201.
99. Heintz D. Le profilage métabolique: quels outils et quelles applications pour l'humain? In: *Metabolomics*; 2013.
100. Adamski J. Introduction to metabolomics. In: *Metabolomics for Biomedical Research.* 2020:1-15.
101. Alves S, Paris A, Rathahao-Paris E. Mass spectrometry-based metabolomics for an in-depth questioning of human health. In: 2020:147-191.
102. Nagana Gowda GA, Raftery D. Can NMR solve some significant challenges in metabolomics? *J Magn Reson.* 2015;260:144-160.
103. Nicholson JK, Wilson ID. High resolution proton magnetic resonance spectroscopy of biological fluids. *Progress in NMR Spectroscopy.* 1989;21(4-5):449-501.
104. Theodoridis GA, Gika HG, Want EJ, Wilson ID. Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: a review. *Anal Chim Acta.* 2012;711:7-16.
105. Beale DJ, Pinu FR, Kouremenos KA, et al. Review of recent developments in GC-MS approaches to metabolomics-based research. *Metabolomics.* 2018;14(11):152.
106. Junot C, Fenaille F, Colsch B, Becher F. High resolution mass spectrometry based techniques at the crossroads of metabolic pathways. *Mass Spectrom Rev.* 2014;33(6):471-500.
107. Reinke SN, Gallart-Ayala H, Gomez C, et al. Metabolomics analysis identifies different metabolotypes of asthma severity. *Eur Respir J.* 2017;49(3).

108. Comhair SA, McDunn J, Bennett C, Fettig J, Erzurum SC, Kalhan SC. Metabolomic Endotype of Asthma. *J Immunol.* 2015;195(2):643-650.
109. Checkley W, Deza MP, Klawitter J, et al. Identifying biomarkers for asthma diagnosis using targeted metabolomics approaches. *Respir Med.* 2016;121:59-66.
110. Loureiro CC, Oliveira AS, Santos M, et al. Urinary metabolomic profiling of asthmatics can be related to clinical characteristics. *Allergy.* 2016;71(9):1362-1365.
111. Loureiro CC, Duarte IF, Gomes J, et al. Urinary metabolomic changes as a predictive biomarker of asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(1):261-263 e261-265.
112. Mattarucchi E, Baraldi E, Guillou C. Metabolomics applied to urine samples in childhood asthma; differentiation between asthma phenotypes and identification of relevant metabolites. *Biomed Chromatogr.* 2012;26(1):89-94.
113. Carraro S, Giordano G, Reniero F, et al. Asthma severity in childhood and metabolomic profiling of breath condensate. *Allergy.* 2013;68(1):110-117.
114. Hofford JM, Milakofsky L, Pell S, et al. Levels of amino acids and related compounds in bronchoalveolar lavage fluids of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155(2):432-435.
115. Liang L, Hu M, Chen Y, et al. Metabolomics of bronchoalveolar lavage in children with persistent wheezing. *Respir Res.* 2022;23(1):161.
116. Wang S, Tang K, Lu Y, et al. Revealing the role of glycerophospholipid metabolism in asthma through plasma lipidomics. *Clin Chim Acta.* 2021;513:34-42.
117. Jiang T, Dai L, Li P, et al. Lipid metabolism and identification of biomarkers in asthma by lipidomic analysis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2021;1866(2):158853.
118. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, et al. A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res.* 2005;46(5):839-861.
119. Liebisch G, Fahy E, Aoki J, et al. Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. *J Lipid Res.* 2020;61(12):1539-1555.
120. Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl(Suppl):S9-14.
121. Colsch B, Seyer A, Boudah S, Junot C. Lipidomic analysis of cerebrospinal fluid by mass spectrometry-based methods. *J Inherit Metab Dis.* 2015;38(1):53-64.
122. Bolte G, Kompauer I, Fobker M, et al. Fatty acids in serum cholesteryl esters in relation to asthma and lung function in children. *Clin Exp Allergy.* 2006;36(3):293-302.
123. Calder PC. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol.* 2013;75(3):645-662.
124. Ried JS, Baurecht H, Stuckler F, et al. Integrative genetic and metabolite profiling analysis suggests altered phosphatidylcholine metabolism in asthma. *Allergy.* 2013;68(5):629-636.
125. Ghurye JS, Cepeda-Espinoza V, Pop M. Metagenomic Assembly: Overview, Challenges and Applications. *YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE.* 2016;89:353-362.
126. Sharpton TJ. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Front Plant Sci.* 2014;5:209.
127. Hilty M, Burke C, Pedro H, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One.* 2010;5(1):e8578.
128. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108 Suppl 1(Suppl 1):4578-4585.

129. Man WH, de Steenhuijsen Piters WA, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(5):259-270.
130. Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. The role of the bacterial microbiome in lung disease. *Expert Rev Respir Med.* 2013;7(3):245-257.
131. Invernizzi R, Lloyd CM, Molyneaux PL. Respiratory microbiome and epithelial interactions shape immunity in the lungs. *Immunology.* 2020;160(2):171-182.
132. Stricker S, Hain T, Chao CM, Rudloff S. Respiratory and Intestinal Microbiota in Pediatric Lung Diseases-Current Evidence of the Gut-Lung Axis. *Int J Mol Sci.* 2022;23(12).
133. Mathieu E, Escribano-Vazquez U, Descamps D, et al. Paradigms of Lung Microbiota Functions in Health and Disease, Particularly, in Asthma. *Front Physiol.* 2018;9:1168.
134. Arrieta MC, Sadarangani M, Brown EM, et al. A humanized microbiota mouse model of ovalbumin-induced lung inflammation. *Gut Microbes.* 2016;7(4):342-352.
135. Cait A, Hughes MR, Antignano F, et al. Microbiome-driven allergic lung inflammation is ameliorated by short-chain fatty acids. *Mucosal Immunol.* 2018;11(3):785-795.
136. Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med.* 2014;20(2):159-166.
137. Dickson RP, Erb-Downward JR, Martinez FJ, Huffnagle GB. The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annu Rev Physiol.* 2016;78:481-504.
138. Barcik W, Boutin RCT, Sokolowska M, Finlay BB. The Role of Lung and Gut Microbiota in the Pathology of Asthma. *Immunity.* 2020;52(2):241-255.
139. Barnig C, Martin C. Asthme et microbiome. *Rev Mal Respir.* 2018;35(2):103-115.
140. Zhang Q, Cox M, Liang Z, et al. Airway Microbiota in Severe Asthma and Relationship to Asthma Severity and Phenotypes. *PLoS One.* 2016;11(4):e0152724.
141. Marri PR, Stern DA, Wright AL, Billheimer D, Martinez FD. Asthma-associated differences in microbial composition of induced sputum. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(2):346-352 e341-343.
142. Huang YJ, Nelson CE, Brodie EL, et al. Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(2):372-381 e371-373.
143. Huang YJ, Nariya S, Harris JM, et al. The airway microbiome in patients with severe asthma: Associations with disease features and severity. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(4):874-884.
144. Goldman DL, Chen Z, Shankar V, Tyberg M, Vicencio A, Burk R. Lower airway microbiota and mycobacteria in children with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(2):808-811 e807.
145. Chun Y, Do A, Grishina G, et al. Integrative study of the upper and lower airway microbiome and transcriptome in asthma. *JCI Insight.* 2020;5(5).
146. Donovan BM, Bastarache L, Turi KN, Zutter MM, Hartert TV. The current state of omics technologies in the clinical management of asthma and allergic diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2019;123:550-557.
147. Tyler SR, Bunyavanich S. Leveraging -omics for asthma endotyping. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;144(1):13-23.
148. Raita Y, Camargo CA, Jr., Bochkov YA, et al. Integrated-omics endotyping of infants with rhinovirus bronchiolitis and risk of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;147(6):2108-2117.
149. Makrinioti H, Morita H, Nastouli E, Jartti T. Editorial: Bridging the gap between immunology, virology, genetics, and epigenetics in bronchiolitis: The multiomics pathway to asthma development. *Front Immunol.* 2023;14:1154121.

150. Boudah S, Olivier MF, Aros-Calt S, et al. Annotation of the human serum metabolome by coupling three liquid chromatography methods to high-resolution mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2014;966:34-47.
151. Imbert A, Rompais M, Selloum M, et al. ProMetIS, deep phenotyping of mouse models by combined proteomics and metabolomics analysis. *Scientific Data.* 2021;8(1).
152. Roux A, Xu Y, Heilier JF, et al. Annotation of the human adult urinary metabolome and metabolite identification using ultra high performance liquid chromatography coupled to a linear quadrupole ion trap-Orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem.* 2012;84(15):6429-6437.
153. Evans CR, Karnovsky A, Kovach MA, Standiford TJ, Burant CF, Stringer KA. Untargeted LC-MS metabolomics of bronchoalveolar lavage fluid differentiates acute respiratory distress syndrome from health. *J Proteome Res.* 2014;13(2):640-649.
154. Pocino K, Minucci A, Manieri R, Conti G, De Luca D, Capoluongo ED. Description of an Automated Method for Urea Nitrogen Determination in Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) of Neonates and Infants. *J Lab Autom.* 2015;20(6):636-641.
155. Rennard SI, Basset G, Lecossier D, et al. Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution. *J Appl Physiol.* 1986;60(2):532-538.
156. Dargaville PA, South M, Vervaart P, McDougall P. Validity of Markers of Dilution in Small Volume Lung Lavage. *AM J RESPIR CRIT CARE MED.* 1999;160(3):778-784.
157. Jones KP, Edwards JH, Reynolds SP, Peters TJ, Davies BH. A comparison of albumin and urea as reference markers in bronchoalveolar lavage fluid from patients with interstitial lung disease. *Eur Respir J.* 1990;3(2):152-156.
158. Ward C, Effros RM, Walters EH. Assessment of epithelial lining fluid dilution during bronchoalveolar lavage.pdf>. *Eur Respir Rev.* 1999;9(66):32-37.
159. Ward C, Duddridge M, Fenwick J, et al. Evaluation of albumin as a reference marker of dilution in bal from asthmatic and control subjects. *Thorax.* 1993;48(5):518-522.
160. Taylor AE, Guyton AC, Bishop VS. Permeability of the alveolar membrane to solutes. *Circulation Research.* 1965;16(4):353-362.
161. Wattiez R, Hermans C, Cruyt C, Bernard A, Falmagne P. Human bronchoalveolar lavage fluid proteintwo-dimensional database: Study of interstitiallung diseases. 2000;21:2703-2712.
162. Zhang J, Zhou L, Zhang Y. Diagnostic Values of Blood Urea Nitrogen (BUN), Creatinine (Cr), and the Ratio of BUN to Cr for Distinguishing Heart Failure from Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Comput Math Methods Med.* 2022;2022:4586458.
163. Sabouchi-Schutt F, Astrom J, Hellman U, Eklund A, Grunewald J. Changes in bronchoalveolar lavage fluid proteins in sarcoidosis: a proteomics approach. *Eur Respir J.* 2003;21(3):414-420.
164. Okutucu B, Dincer A, Habib O, Zihnioglu F. Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration. *J Biochem Biophys Methods.* 2007;70(5):709-711.
165. Kummer F, Kurdowska AK, Leuenberger P, et al. Guidelines for measurement of acellular components and recommendations for standardization of bronchoalveolar lavage (BAL). *European Respiratory Review.* 1999;9(66).
166. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology.* 1959;37(8):911-917.
167. Rinaudo P, Boudah S, Junot C, Thevenot EA. biosigner: A New Method for the Discovery of Significant Molecular Signatures from Omics Data. *Front Mol Biosci.* 2016;3:26.

168. Guilleminault L. Du phénotype clinique aux mécanismes traitables dans les maladies allergiques/atopiques : asthme et rhinite. *Revue Française d'Allergologie*. 2020;60(8):8S3-8S9.
169. Svenningsen S, Nair P. Asthma Endotypes and an Overview of Targeted Therapy for Asthma. *Front Med (Lausanne)*. 2017;4:158.
170. Szeffler SJ, Chipps B. Challenges in the treatment of asthma in children and adolescents. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2018;120(4):382-388.
171. McGeachie MJ, Dahlin A, Qiu W, et al. The metabolomics of asthma control: a promising link between genetics and disease. *Immun Inflamm Dis*. 2015;3(3):224-238.
172. Jung J, Kim SH, Lee HS, et al. Serum metabolomics reveals pathways and biomarkers associated with asthma pathogenesis. *Clin Exp Allergy*. 2013;43(4):425-433.
173. Kelly RS, Sordillo JE, Lasky-Su J, et al. Plasma metabolite profiles in children with current asthma. *Clin Exp Allergy*. 2018;48(10):1297-1304.
174. Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host Microbe*. 2018;23(6):716-724.
175. Kolodziej L. Systemic metabolism of tryptophan and its catabolites, kynurenine and 3-HAA, in mice with inflammatory arthritis. *Gene*. 2013;512(1):23-27.
176. Lee-Sarwar KA, Lasky-Su J, Kelly RS, Litonjua AA, Weiss ST. Gut Microbial-Derived Metabolomics of Asthma. *Metabolites*. 2020;10(3).
177. Hu Y, Chen Z, Jin L, Wang M, Liao W. Decreased expression of indolamine 2,3-dioxygenase in childhood allergic asthma and its inverse correlation with fractional concentration of exhaled nitric oxide. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2017;119(5):429-434.
178. van der Sluijs KF, van de Pol MA, Kulik W, et al. Systemic tryptophan and kynurenine catabolite levels relate to severity of rhinovirus-induced asthma exacerbation: a prospective study with a parallel-group design. *Thorax*. 2013;68(12):1122-1130.
179. Unuvar S, Erge D, Kilicarslan B, et al. Neopterin Levels and Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity as Biomarkers of Immune System Activation and Childhood Allergic Diseases. *Ann Lab Med*. 2019;39(3):284-290.
180. Mafra D, Lobo JC, Barros AF, Koppe L, Vaziri ND, Fouque D. Role of altered intestinal microbiota in systemic inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Future Microbiol*. 2014;9(3):399-410.
181. Wang C, Jiang S, Zhang S, Ouyang Z, Wang G, Wang F. Research Progress of Metabolomics in Asthma. *Metabolites*. 2021;11(9).
182. Matysiak J, Klupczynska A, Packi K, et al. Alterations in Serum-Free Amino Acid Profiles in Childhood Asthma. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(13).
183. White MV. The role of histamine in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 1990;86:599-605.
184. Melton G. TREATMENT OF ASTHMA BY NICOTINIC ACID. *British Medical Journal*. 1943;1:600-601.
185. Kelly RS, Dahlin A, McGeachie MJ, et al. Asthma Metabolomics and the Potential for Integrative Omics in Research and the Clinic. *Chest*. 2017;151(2):262-277.
186. Maniscalco M, Fuschillo S, Paris D, Cutigano A, Sanduzzi A, Motta A. Chapter Five - Clinical metabolomics of exhaled breath condensate in chronic respiratory diseases. *Advances in Clinical Chemistry*. 2019;88:121-149.
187. Bansal P, Gaur SN, Arora N. Lysophosphatidylcholine plays critical role in allergic airway disease manifestation. *Sci Rep*. 2016;6:27430.
188. van Zelst CM, de Boer GM, Turk Y, et al. Association between elevated serum triglycerides and asthma in patients with obesity: An explorative study. *Allergy Asthma Proc*. 2021;42(3):e71-e76.

189. Li WJ, Zhao Y, Gao Y, et al. Lipid metabolism in asthma: Immune regulation and potential therapeutic target. *Cell Immunol.* 2021;364:104341.
190. Crestani E, Harb H, Charbonnier LM, et al. Untargeted metabolomic profiling identifies disease-specific signatures in food allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;145(3):897-906.
191. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nat Immunol.* 2015;16(1):45-56.
192. SFM. *Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2022.* 2022.
193. Cherbuy C, Bellet D, Robert V, Mayeur C, Schwiertz A, Langella P. Modulation of the Caecal Gut Microbiota of Mice by Dietary Supplement Containing Resistant Starch: Impact Is Donor-Dependent. *Front Microbiol.* 2019;10:1234.
194. Meurs H, Gosens R, Zaagsma J. Airway hyperresponsiveness in asthma: lessons from in vitro model systems and animal models. *Eur Respir J.* 2008;32(2):487-502.
195. Thorburn AN, McKenzie CI, Shen S, et al. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nat Commun.* 2015;6:7320.
196. Kiryukhina NV, Melnikov VG, Suvorov AV, Morozova YA, Ilyin VK. Use of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* for elimination of *Staphylococcus aureus* from the nasal cavity in volunteers exposed to abnormal microclimate and altered gaseous environment. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2013;5(4):233-238.
197. Rigauts C, Aizawa J, Taylor SL, et al. *Rothia mucilaginosa* is an anti-inflammatory bacterium in the respiratory tract of patients with chronic lung disease. *Eur Respir J.* 2022;59(5).
198. Bernard-Raichon L, Colom A, Monard SC, et al. A Pulmonary *Lactobacillus murinus* Strain Induces Th17 and ROR $\gamma$ mat(+) Regulatory T Cells and Reduces Lung Inflammation in Tuberculosis. *J Immunol.* 2021;207(7):1857-1870.
199. Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand.* 1951;23(2-3):110-127.
200. Clarke LL. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;296(6):G1151-1166.
201. Taylor SC, Nadeau K, Abbasi M, Lachance C, Nguyen M, Fenrich J. The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends Biotechnol.* 2019;37(7):761-774.
202. Kim YO, Jung MJ, Choi JK, Ahn do W, Song KS. Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* increases MUC5AC gene expression via RSK1-CREB pathway in human airway epithelial cells. *Mol Cells.* 2011;32(4):359-365.
203. Sepper R, Prikk K, Metsis M, et al. Mucin5B expression by lung alveolar macrophages is increased in long-term smokers. *J Leukoc Biol.* 2012;92(2):319-324.
204. Wang WH, Chen J, Zhao F, et al. MiR-150-5p suppresses colorectal cancer cell migration and invasion through targeting MUC4. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(15):6269-6273.
205. Wu HX, Guo PF, Jin LP, Liang SS, Li DJ. Functional regulation of thymic stromal lymphopoietin on proliferation and invasion of trophoblasts in human first-trimester pregnancy. *Hum Reprod.* 2010;25(5):1146-1152.
206. Thierry A, Giraud S, Robin A, et al. The alarmin concept applied to human renal transplantation: evidence for a differential implication of HMGB1 and IL-33. *PLoS One.* 2014;9(2):e88742.
207. Fahy JV, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med.* 2010;363(23):2233-2247.

208. Danahay H, Atherton H, Jones G, Bridges R, Poll C. Interleukin-13 induces a hypersecretory ion transport phenotype in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282:226-236.
209. Galiotta LJ, Pagesy P, Folli C, et al. IL-4 is a potent modulator of ion transport in the human bronchial epithelium in vitro. *J Immunol*. 2002;168(2):839-845.
210. Gorrieri G, Scudieri P, Caci E, et al. Goblet Cell Hyperplasia Requires High Bicarbonate Transport To Support Mucin Release. *Sci Rep*. 2016;6:36016.
211. Evans CM, Raclawska DS, Ttofali F, et al. The polymeric mucin Muc5ac is required for allergic airway hyperreactivity. *Nat Commun*. 2015;6:6281.
212. Ridley C, Thornton DJ. Mucins: the frontline defence of the lung. *Biochem Soc Trans*. 2018;46(5):1099-1106.
213. Lachowicz-Scroggins ME, Yuan S, Kerr SC, et al. Abnormalities in MUC5AC and MUC5B Protein in Airway Mucus in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194(10):1296-1299.
214. Gauvreau GM, Bergeron C, Boulet LP, et al. Sounding the alarmins-The role of alarmin cytokines in asthma. *Allergy*. 2023;78(2):402-417.
215. Pease JE, Sabroe I. The Role of Interleukin-8 and its Receptors in Inflammatory Lung Disease. *Am J Respir Med*. 2002;1(1):19-25.
216. Thavagnanam S, Parker JC, McBrien ME, Skibinski G, Shields MD, Heaney LG. Nasal epithelial cells can act as a physiological surrogate for paediatric asthma studies. *PLoS One*. 2014;9(1):e85802.
217. McDougall CM, Blaylock MG, Douglas JG, Brooker RJ, Helms PJ, Walsh GM. Nasal epithelial cells as surrogates for bronchial epithelial cells in airway inflammation studies. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008;39(5):560-568.

# Table des annexes

Annexe 1 : Liste des étalons utilisés pour l'analyse en LC-HRMS .....	228
Annexe 2 : <b>A.</b> Carte de tous les signaux détectés dans les données brutes obtenues en LC-MS, sur colonne HILIC. Le m/z est représenté en fonction du temps de rétention (en min, intervalle de 5 min) d'un échantillon de QC. <b>B.</b> Chromatogramme représentant l'intensité maximum en fonction du temps de rétention (min). <b>C.</b> Chromatogramme représentant l'intensité maximum en fonction du temps de rétention des 1000 pics les plus intenses. <b>D, E et F.</b> Mêmes types de graphique mais appliqué aux signaux provenant des ions ayant une masse commune à la base de données interne des métabolites. ....	229
Annexe 3 : Chromatogrammes d'ions extraits de m/z 94.98 dans tous les échantillons et QC, pouvant correspondre à l'acide méthane-sulfonique d'après la base de données interne. En rouge est présenté une extinction du signal.....	230
Annexe 4 : Confirmation de soumission de l'article.....	231
Annexe 5 : Liste des métabolites annotés, avec leur m/z, leur temps de rétention et leur numéro Kegg, identifiés dans le plasma par LC-HRMS en conditions C18-ESI <sup>+</sup> et HILIC-ESI <sup>-</sup> . NA : donnée manquante. ....	232
Annexe 6 : Tableaux récapitulatifs des marqueurs, de leur référence et des PMT associés, ainsi que du volume (en $\mu\text{L}$ pour $10^6$ cellules), utilisés, pour l'étude <b>A.</b> des ILC et <b>B.</b> des ILC et des cytokines sécrétées après stimulation. <b>C.</b> Anticorps compris dans le mélange LIN. M : Miltenyi Biotec ; O : Ozyme. ....	237
Annexe 7 : Tableaux récapitulatifs des marqueurs, de leur référence et des PMT associés, ainsi que du volume (en $\mu\text{L}$ pour $10^6$ cellules), utilisés, pour l'étude <b>A.</b> des Th et <b>B.</b> des Th et des cytokines sécrétées après stimulation. M : Miltenyi Biotec ; O : Ozyme. ....	238
Annexe 8 : Tableau récapitulatifs des marqueurs, de leur référence et des PMT associés, ainsi que du volume (en $\mu\text{L}$ pour $10^6$ cellules), utilisés, pour l'étude des cellules T régulatrices. M : Miltenyi Biotec ; O : Ozyme. ....	239

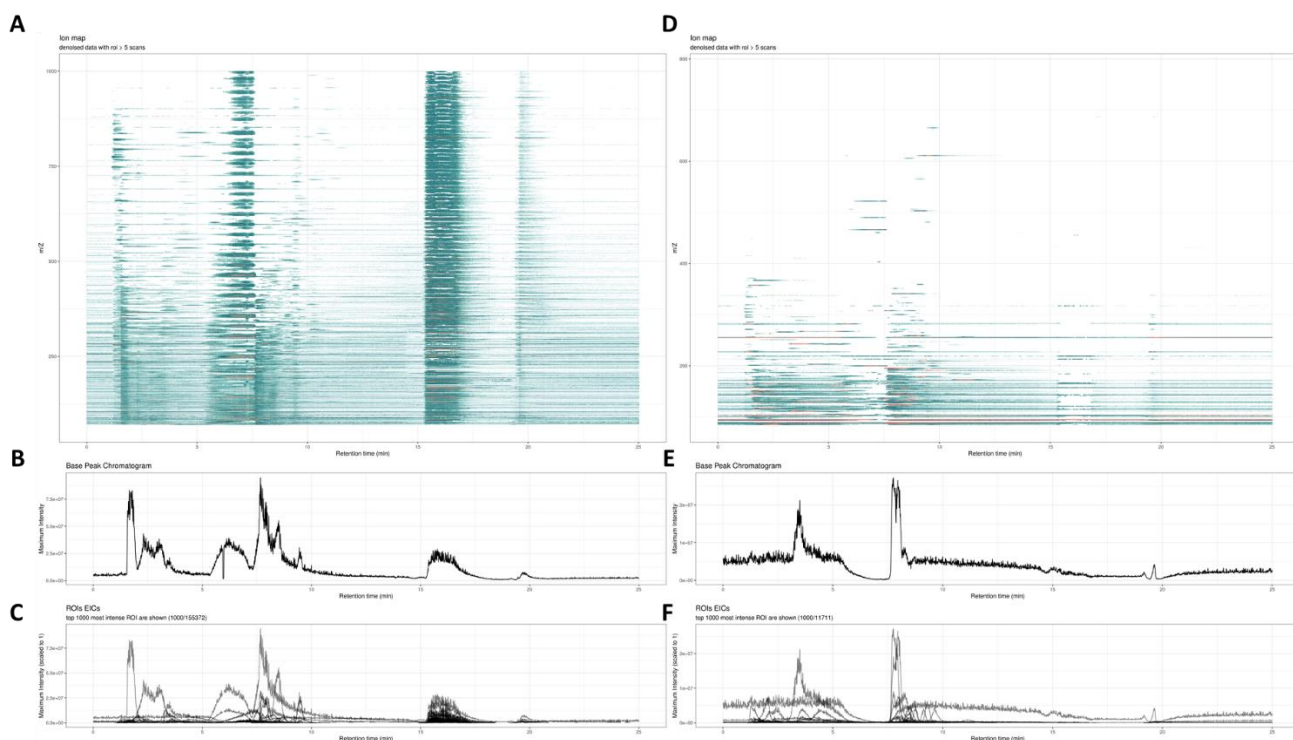


# Annexes

Annexe 1 : Liste des étalons utilisés pour l'analyse en LC-HRMS

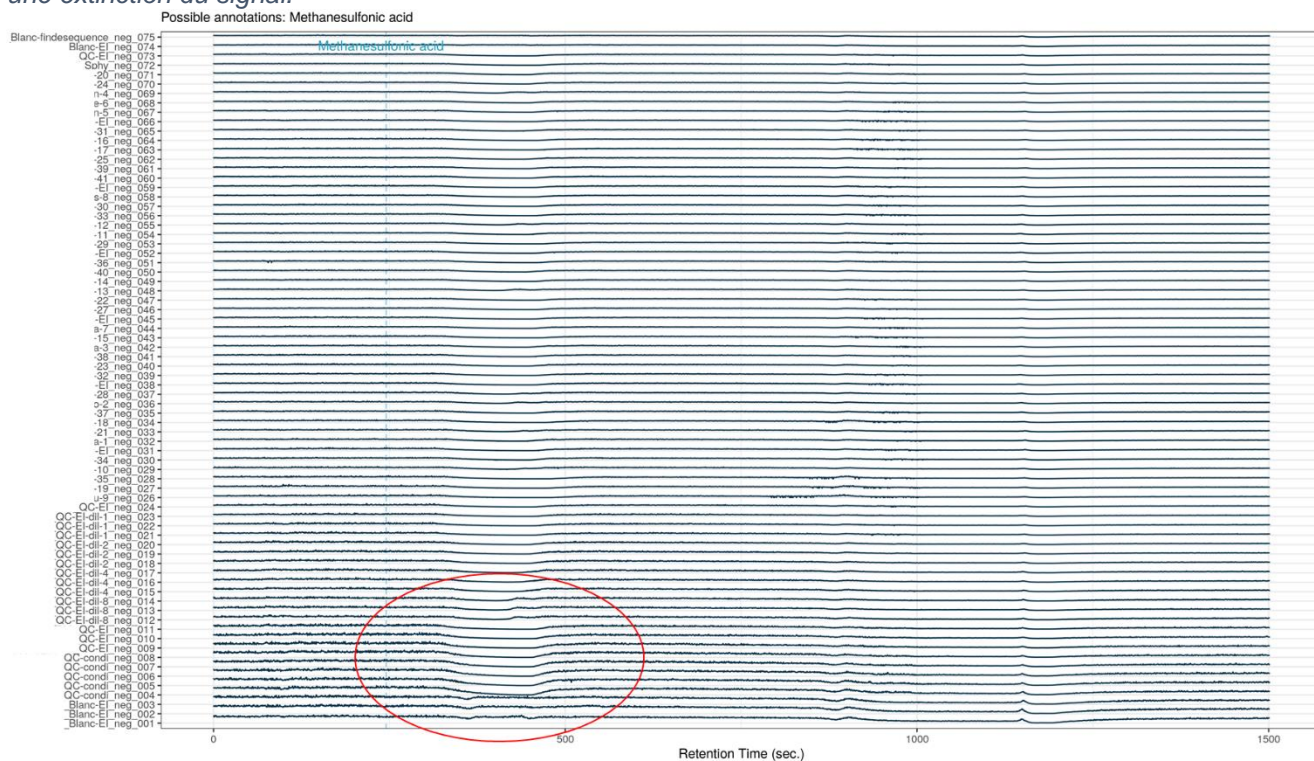
Composés	Concentration
Alanine <sup>13</sup> C	20µg/mL
Metformin	1µg/mL
Ethylmalonic acid	3µg/mL
Aspartate <sup>15</sup> N	20µg/mL
Glucose <sup>13</sup> C	20µg/mL
2-Aminoanthracene	1µg/mL
Amiloride	10µg/mL
Imipramine	0.5µg/mL
Atropine	1µg/mL
Prednisone	1µg/mL
Colchicine	0.5µg/mL
Dihydrostreptomycin	20µg/mL
Roxithromycin (fragment)	20µg/mL

Annexe 2 : **A.** Carte de tous les signaux détectés dans les données brutes obtenues en LC-MS, sur colonne HILIC. Le  $m/z$  est représenté en fonction du temps de rétention (en min, intervalle de 5 min) d'un échantillon de QC. **B.** Chromatogramme représentant l'intensité maximum en fonction du temps de rétention (min). **C.** Chromatogramme représentant l'intensité maximum en fonction du temps de rétention des 1000 pics les plus intenses. **D, E et F.** Mêmes types de graphique mais appliqué aux signaux provenant des ions ayant une masse commune à la base de données interne des métabolites.



Ces analyses nous montrent qu'il y a beaucoup de bruit de fond (Annexe 2A). De plus, il y a plusieurs gros massifs qui peuvent masquer des métabolites d'intérêts (Annexe 2B). Certains de ces pics ne posent pas problème car ne correspondent pas à des  $m/z$  appartenant à la base de données (Annexe 2E). Le problème vient surtout du pic présent entre 5 et 8 min qui semble masquer les signaux issus de la base de données (Annexe 2E, diminution de l'intensité maximale en dessous de la ligne basale).

Annexe 3 : Chromatogrammes d'ions extraits de  $m/z$  94.98 dans tous les échantillons et QC, pouvant correspondre à l'acide méthane-sulfonique d'après la base de données interne. En rouge est présenté une extinction du signal.



Nous pouvons observer que certains signaux présentent une extinction qui serait possiblement due aux massifs que nous avons vu en Annexe 2B.

Ces deux figures, nous montrent qu'il est difficile d'exploiter les signaux obtenus en LC-MS, sur colonne HILIC.

*Annexe 4 : Confirmation de soumission de l'article*

**BRIARD Melanie**

---

**De:** Respiratory Research <angela.loro.1@springernature.com>  
**Envoyé:** mercredi 7 juin 2023 13:29  
**À:** BRIARD Melanie  
**Objet:** Respiratory Research - Receipt of Manuscript 'Cytokines and metabolites...'

Ref: Submission ID 0a526e71-2639-43ef-b658-81726cd68d28

Dear Dr Briard,

Please note that you are listed as a co-author on the manuscript "Cytokines and metabolites are the main descriptors of severe asthma in children when performing multi-omics analysis of bronchoalveolar lavages", which was submitted to Respiratory Research on 07 June 2023 UTC.

If you have any queries related to this manuscript please contact the corresponding author, who is solely responsible for communicating with the journal.

Kind regards,

Editorial Assistant  
Respiratory Research

Annexe 5 : Liste des métabolites annotés, avec leur m/z, leur temps de rétention et leur numéro Kegg, identifiés dans le plasma par LC-HRMS en conditions C18-ESI<sup>+</sup> et HILIC-ESI<sup>-</sup>. NA : donnée manquante.

Annotations	m/z	rt (min)	Kegg
Creatinine	112.05206	3.2655	C00791
4-Pyridoxic acid	182.046	1.56133333	C00847
Indoleacrylic acid	186.05654	2.67483333	NA
Azelaic acid	187.09749	6.44633333	C08261
N acetyl DL glutamic acid	188.05651	7.71383333	C00624
N-Acetyl-L-methionine	190.05446	1.8255	C02712
Citric acid	191.01987	9.5705	C00158
2-Methylhippuric acid	192.06666	1.996	C01586
3-Methylhippuric acid	192.06672	1.65	NA
Aminohippuric acid	193.062	2.41383333	D06890
D-Glucuronic acid	193.03564	8.6125	NA
1-Methylhydantoin	113.03583	2.9485	C02565
Galactonic acid	195.051	7.608	C00880
L-Cysteine S-sulfate	199.96951	9.22216667	C05824
Capryloylglycine	200.12915	1.44216667	NA
DL-Tryptophan	203.08294	4.235	C00806
D-Saccharic acid	209.0306	9.16433333	C00818
(±)-Jasmonic acid	209.11852	1.3575	C08491
2-Oxovaleric acid	115.04025	1.84866667	C06255
Indoxyl sulfate	212.00254	2.45066667	NA
Tridecanoic acid	213.1863	1.30216667	C17076
Isovaleric acid	101.06111	2.083	C08262
N-a-acetyl-L-arginine	215.11491	9.40183333	NA
DL-beta-Hydroxylauric acid	215.1653	1.32266667	NA
Fumaric acid	115.00389	8.09583333	C00122
N-Acetyl-D-glucosamine	220.08288	5.59466667	C00140
Maleic acid	115.00376	8.4875	C01384
2-Oxobutyric acid	101.02477	2.23166667	C00109
Indole	116.04992	2.14	C00463
Valine	116.07185	5.46833333	C00183
L-Cystine	239.0171	8.44366667	C00491
Guanidineacetic acid	116.04657	8.08833333	C00581
5-Methyldeoxycytidine	240.09689	2.26883333	C03592
N-acetyl-DL-tryptophan	245.09362	2.16533333	NA
Oxalic acid monoethyl ester	117.01932	2.19183333	NA
Muramic acid	250.09389	7.30783333	C06470
2-Hydroxypentanoic acid	117.05578	2.21166667	NA
Dimethyl oxalate	117.01929	2.61783333	NA
Methylmalonic acid	117.01951	8.1275	C02170
Threonine	118.05107	7.195	C00188
2-Hydroxyhexadecanoic acid	271.22929	1.28133333	NA
Guanosine	282.08497	5.841	C00387
Argininosuccinic acid	289.1167	8.917	C03406

13(S)-Hydroxyoctadeca-9Z,11E-dienoic acid	295.22786	1.23716667	NA
cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid	301.21745	1.25166667	C06428
N-Acetyl-Asp-Glu	303.08426	8.90233333	NA
L-Cysteine	120.01248	8.44883333	NA
(-)-N-Acetylneuraminic acid	308.09871	7.36333333	C19910
Nicotinamide	121.04066	2.162	C00153
D-Threitol	121.05063	5.12066667	C16884
3-Ethylphenol	121.06588	1.53066667	NA
Sucrose	341.10868	7.918	C00089
Lactulose	341.10981	8.64616667	C07064
3-Methylcatechol	123.04521	1.49483333	NA
GMP	362.05187	8.982	C00144
Taurine	124.00769	7.51166667	C00245
Dehydroisoandrosterone 3-sulfate	367.15839	1.2735	C04555
Androsterone sulphate	369.17405	1.27833333	NA
5-hydroxymethylfurfural	125.02471	1.79916667	C11101
Thymine	125.03614	2.18766667	C00178
Folic acid	440.13399	9.06116667	C00504
D-Pyroglutamic acid	128.0348	4.45916667	C02237
Mesaconic acid	129.02013	9.42466667	C01732
Maltotriose	503.16302	9.13583333	C01835
Creatine	130.06282	7.47316667	C00300
2-hydroxycaproic acid	131.07218	1.77633333	NA
L-2-Aminobutyric acid	102.05642	5.42833333	C02356
Asparagine	131.04694	7.58866667	C00152
Maltotetraose	665.21715	9.7565	C02052
DL-3-Aminoisobutyric acid	102.05617	8.08433333	C05145
Ornithine	131.08314	7.9685	C00077
5-Hydroxyindole	132.04542	1.68666667	NA
L-Aspartic acid	132.03039	8.10416667	C00049
Malic acid	133.01451	8.52883333	C00711
2'-Aminoacetophenone	134.06119	1.75833333	NA
Isobutyric acid	87.04506	2.44116667	C02632
Adenine	134.04774	2.84383333	C00147
D-Lactic acid	89.02433	3.85833333	C00256
Glyceraldehyde	89.02441	7.55266667	C02154
Oxalic acid	88.98815	9.17283333	C00209
o-Toluic acid	135.04592	1.683	C07215
N-Methylnicotinamide	135.05638	1.6855	NA
Hypoxanthine	135.03162	3.95033333	C00262
L-Threonic acid	135.03039	6.922	NA
2-Aminopyridine-3-carboxylic acid	137.03624	2.39866667	NA
2,5-Dihydroxybenzaldehyde	137.0251	1.65	C05585
O-Phosphorylethanolamine	140.01188	8.61216667	C00346
cis,cis-Muconic acid	141.01946	9.0525	C02480
4-Guanidinobutyric acid	144.07787	7.77733333	C01035

L-Glutamine	145.06137	7.55816667	C00064
O-Acetyl-L-serine	146.04582	4.90266667	00979
N-Acetyl-DL-serine	146.04579	5.3035	C00979
N-Methyl-D-aspartic acid (NMDA)	146.04556	8.0865	C12269
D-(+)-Ribonic acid-gamma-lactone	147.03061	2.24516667	NA
Mevalonic acid	147.06637	2.4615	C00418
D-2-Hydroxyglutaric acid	147.02989	7.99766667	C01087
Serine	104.03555	7.7555	C00065
Methionine	148.04395	4.17883333	C00073
L-Xylulose	149.04609	4.1985	C00312
L(+)-arabinose	149.04591	7.543	C00259
L-(+)-Tartaric acid	149.00923	9.09	C00898
2-Hydroxyphenylacetic acid	151.03993	1.77116667	C05852
Xanthine	151.0261	5.47133333	C00385
Adonitol	151.06113	6.22116667	C00474
3-Aminosalicylic acid	152.03529	2.32233333	NA
2,6-Dihydroxybenzoic acid	153.01916	1.5075	NA
Histidine	154.06216	7.25916667	C00135
DL-Dihydroorotic acid	157.02536	5.32	C00337
D-Glyceric acid	105.01932	6.60783333	C00258
N-acetyl-DL-Valine	158.08222	1.7835	NA
N-Isovaleroylglycine	158.08216	2.08516667	NA
Alpha-D-Aminoadipic acid	160.06138	8.171	C00956
1,5-Anhydro-D-sorbitol	163.06098	5.37933333	C07326
trans-3-Hydroxycinnamic acid	163.03973	5.75383333	C12621
Eugenol	163.07634	1.38533333	C10453
Phenylpyruvic acid	163.04005	1.55483333	C00166
Phenylalanine	164.07127	3.0945	C00079
3-Aminophenol	108.04552	1.79766667	NA
Methionine sulfoxide	164.03889	6.77383333	NA
Phenyllactic acid	165.0557	2.34466667	C01479
3-Methylxanthine	165.04047	2.77366667	C16357
Terephthalic acid	165.01927	8.48916667	C06337
3-Phenoxypropionic acid	165.05571	1.53	NA
Quinolinic acid	166.01438	8.07933333	C03722
Pyridoxamine	167.08252	1.65883333	C00534
5-Methoxysalicylic acid	167.03487	1.698	NA
Pyridoxine	168.06652	2.74516667	C00314
L-Cysteic acid	167.99725	8.492	C00506
Glycerol 3-phosphate	171.00634	7.726	C00093
Hexanoyl glycine	172.0979	1.98266667	NA
Quinaldic acid	172.0404	2.06616667	C06325
Na-Acetyl-L-asparagine	173.05662	5.4165	NA
N-Acetyl-ornithine	173.09313	6.771	NA
Suberic acid	173.08166	6.85333333	C08278
Dehydroascorbic acid	173.00831	8.39683333	C00425

Arginine	173.1037	10.8915	C00062
N-Acetyl-L-aspartic acid	174.04083	7.88216667	C01042
L-Citrulline	174.08837	7.99116667	C00327
Guanidosuccinic acid	174.05204	8.307	C03139
3-succinoylpyridine	178.05116	2.1005	C19569
Glucose	179.05516	7.55333333	C00031
D-Galactose	179.05584	9.05483333	C00984
3-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanoic	180.0658	5.738	NA
2-Aminoisobutyric acid	104.07072	0.92233333	C03665
Indole-2-carboxylic acid	162.0551	4.94066667	NA
Indole-3-carboxylic acid	162.05509	6.34933333	C19837
1-methyl guanine	166.07242	1.0395	C04152
a-Methyl-DL-histidine	170.0925	0.83216667	C01152
Norepinephrine	170.08123	1.11183333	C00547
N-Acetyl-L-leucine	174.11264	5.582	C02710
Indoxyl acetate	176.0708	5.123	NA
Indoleacetic acid	176.07075	6.677	C00954
Hippuric acid	180.06569	4.94333333	C01586
Theobromine	181.07215	2.67683333	C07480
Theophylline	181.07221	3.99516667	C07130
4-Phenoxybutyric acid	181.08603	8.14983333	NA
o-Tyrosine	182.08122	1.24916667	NA
DL-p-Hydroxyphenyllactic acid	183.06537	4.27166667	C03672
Glycyl-L-leucine	189.12348	3.08716667	C02155
N6-Acetyl-L-lysine	189.1235	1.06	C02727
Kynurenic acid	190.05004	4.6085	C01717
Indole-3-propionic acid	190.08636	7.33316667	NA
N-Acetyl-D-penicillamine	192.06896	4.3635	NA
5-Hydroxyindoleacetic acid	192.06566	4.7555	C05635
Phenylacetylglycine	194.08148	5.58866667	C05598
Caffeine	195.08792	4.80683333	C07481
alpha-Hydroxyhippuric acid	196.06062	3.14583333	NA
o-Hydroxyhippuric acid	196.06072	5.75516667	C07588
Indolelactic acid	206.08136	6.153	C02043
N-Acetyl-L-phenylalanine	208.09707	5.9315	C03519
L-Kynurenine	209.09213	2.255	C00328
Pantothenic acid	220.11817	2.6905	C00864
Uracil	113.03464	1.159	C00106
N-Acetyl-L-tyrosine	224.09201	4.3555	C01657
7,8-Dihydro-L-biopterin	240.10944	0.90683333	C02953
Dihydrouracil	115.05034	1.0715	C00429
Phenylacetyl-L-glutamine	265.11842	5.0405	C04148
Thiamine	265.11178	0.887	C00378
Adenosine	268.10397	1.179	C00212
Inosine	269.08809	1.30816667	C00294
gamma-Linolenic acid	279.232	10.844	C06426



Proline	116.07074	0.92116667	C00148
Atropine	290.17518	5.39316667	C01479
Isopentyl nitrite	118.08627	1.00566667	C07457
13Z-erucamide	338.34181	14.9123333	NA
Ampicillin	350.11706	5.04883333	C06574
Indomethacin	358.08443	9.76333333	C01926
Prednisone	359.18558	7.15016667	C07370
Riboflavin	377.14593	5.115	C00255
Sphingosine 1-phosphate	380.25644	10.0338333	C06124
Benzoic acid	123.04416	1.24866667	C00180
glycochenodeoxycholic acid	450.32184	8.88983333	C05466
Glycocholic acid	466.31643	7.98183333	C01921
Nicotinic acid	124.03942	1.055	C00253
Bilirubin	585.27099	14.0271667	C00486
Dihydrothymine	129.06597	0.91	C00906
Glycine	76.03933	0.90166667	C00037
Metformin	130.10887	0.90366667	C07151
Pipecolic acid	130.08639	1.03116667	C00408
2,3-Butanedione	87.04407	2.08516667	C00741
Putrescine	89.1074	0.773	C00134
Lactamide	90.05501	0.89916667	NA
Phenol	95.04916	1.24816667	C00146
4-Hydroxypyridine	96.04441	1.05433333	NA
N-Acetyl-L-alanine	132.06564	0.911	NA
Leucine	132.10192	1.42916667	C00123
Ehtylmalonic acid	133.04968	3.02583333	NA
1-Aminocyclohexanecarboxylic acid	144.10203	0.93533333	NA
4-Acetamidobutanoic acid	146.08123	2.09816667	C02946
N-Isobutyrylglycine	146.08132	1.21366667	NA
Lysine	147.11294	0.79383333	C00047
Succinic semialdehyde	103.039	1.37066667	C00232
Acetaminophen (4-Acetamidophenol)	152.07083	2.5055	NA
Orotic acid	157.0239	0.89633333	C00295

Annexe 6 : Tableaux récapitulatifs des marqueurs, de leur référence et des PMT associés, ainsi que du volume (en  $\mu\text{L}$  pour  $10^6$  cellules), utilisés, pour l'étude **A.** des ILC et **B.** des ILC et des cytokines sécrétées après stimulation. **C.** Anticorps compris dans le mélange LIN. M : Miltenyi Biotec ; O : Ozyme.

**A**

Marquage extracellulaires	Reference	PMT	ul/ $10^6$ cellules
LD Viogreen	M#130-110-206	V2-370	10 (du 1 :10)
LIN-FITC		B1-350	25
CD45-APCvio770	M# 130-110-635	R3-420	2
CD127-BV711	O#BLE351328	V5-450	1.25
CD294 (CRTH2)- PE	M#130-113-602	Y1-340	2
CD117 (cKit)- APC	M#130-116-610	R1-390	2
NKp46-PEvio770	M#130-112-123	V1-420	2

**B**

Marquage extracellulaires	Reference	PMT	ul/ $10^6$ cellules
LD Viogreen	M#130-110-206	V2-370	10 (1 :10)
LIN- FITC		B1-350	25
CD45-APCvio770	M#130-110-635	R3-420	2
CD127-BV711	O#BLE356114	V5-450	1.25
Marquage intracellulaires			
IL5-PE	M#130-117-204	Y1-340	2
IL13-PE	M#130-116-865	Y1-340	2
IL17A-APC	M#130-118-244	R1-470	2
IFNg-Vioblue	M#130-119-577	V1-320	2

**C**

Ac LIN	Reference	ul/test
CD3-FITC	M#130-113-138	2
CD4-FITC	M#130-114-531	2
CD8a-FITC	M#130-110-677	2
CD14-FITC	M#130-110-518	2
CD15-FITC	O#BLE301904	2.5
CD16-FITC	M#130-113-392	2
CD19-FITC	M#130-113-645	2
CD20-FITC	M#130-111-337	2
CD33-FITC	M#130-111-018	2
CD34-FITC	M#130-120-517	2
CD203c-FITC	O#BLE324614	2.5
FcεR1a-FITC	M#130-110-726	2

Annexe 7 : Tableaux récapitulatifs des marqueurs, de leur référence et des PMT associés, ainsi que du volume (en  $\mu\text{L}$  pour  $10^6$  cellules), utilisés, pour l'étude **A.** des Th et **B.** des Th et des cytokines sécrétées après stimulation. M : Miltenyi Biotec ; O : Ozyme.

### A

Marquage extracellulaires	Reference	PMT	ul/ $10^6$ cellules
LD Viogreen	M# 130-110-206	V2-370	10 (du 1 :10)
CD3-FITC	M#130-113-138	B1-350	2
CD45-APCvio770	M# 130-110-635	R3-420	2
CD4-PEvio770	M# 130-113-227	Y3-480	2
CD8a-PerCP	O#BLE300922	B2-430	2.5
CCR6-BV421	O#BLE353408	V1-270	5
CCR4-PE	M#130-120-456	Y1-340	2
CXCR3- APC	M#130-120-450	R1-420	2

### B

Marquage extracellulaires	Reference	PMT	ul/ $10^6$ cellules
LD Viogreen	M#130-110-206	V2-370	10 (1 :10)
CD3-FITC	M#130-113-138	B1-350	2
CD45-APCvio770	M#130-110-635	R3-420	2
CD4-PEvio770	M#130-113-227	Y3-480	2
CD8a-PerCP	O#BLE300922	B2-430	2.5
<b>Marquage intracellulaires</b>			
IL5-PE	M#130-117-204	Y1-340	2
IL13-PE	M#130-116-865	Y1-340	2
IL17A-APC	M#130-118-244	R1-470	2
IFNg-Vioblue	M#130-119-577	V1-320	2
CD4-PEvio770	M#130-113-227	Y3-480	2

Annexe 8 : Tableau récapitulatifs des marqueurs, de leur référence et des PMT associés, ainsi que du volume (en  $\mu\text{L}$  pour  $10^6$  cellules), utilisés, pour l'étude des cellules T régulatrices. M : Miltenyi Biotec ; O : Ozyme.

<b>Marquage extracellulaires</b>	<b>Reference</b>	<b>PMT</b>	<b>ul/10<sup>6</sup> cellules</b>
LD Viogreen	M#130-110-206	V2-370	1
CD3-FITC	M#130-113-138	B1-350	2
CD45-APCvio770	M#130-110-635	R3-420	2
CD4-PEvio770	M#130-113-227	Y3-480	2
CD25-BV421	O#BLE356114	V1-320	2.5
CD127-BV711	O#BLE351328	V5-450	1.25
<b>Marquage nucléaire</b>			
Foxp3-PE	M#130-125-579	Y1-380	2
Helios-APC	M#130-112-631	R1-470	2



# Liste des communications

Communication affichée (poster) :

- Mélanie Briard, Blanche Guillon, Eric Venot, Marta Grauso, François Fenaille, Florence Castelli, Guillaume Lezmi, Maria Leite-de-Moraes, Vinciane Saint-Criq, Karine Adel-Patient, **Analyse du métabolome pulmonaire chez les enfants asthmatiques sévères**, 18<sup>ème</sup> Congrès Francophone d'Allergologie, 2023.

Communications orales :

- Mélanie Briard, Vinciane Saint-Criq, Karine Adel-Patient, **Definition of severe asthma endotypes in children through an integrated approach**, journée de l'école doctorale MTCl, 2023
- Mélanie Briard, Blanche Guillon, Eric Venot, Marta Grauso, François Fenaille, Florence Castelli, Guillaume Lezmi, Maria Leite-de-Moraes, Vinciane Saint-Criq, Karine Adel-Patient, **Analyse du métabolome pulmonaire chez les enfants asthmatiques sévères**, 18<sup>ème</sup> Congrès Francophone d'Allergologie, 2023. Sélection top 15 posters.
- Mélanie Briard, Blanche Guillon, Eric Venot, Marta Grauso, François Fenaille, Florence Castelli, Guillaume Lezmi, Maria Leite-de-Moraes, Vinciane Saint-Criq, Karine Adel-Patient, **Metabolomic analysis of bronchoalveolar lavages from severe asthmatic children**, European Academy of Allergy & Clinical Immunology - EAACI Congress, 2023.

Cours sur la cytométrie en flux (2 x 1h de cours + préparation 10h), UE haute technologie – mini module #6 :

- Master Development of Drugs and Health Products
- Master Biotechnologies Pharmaceutiques et Thérapies Innovantes

## Liste des formations

- Utilisation du cytomètre Attune NxT (14h)
- Analyse Multiparamétrique par Cytométrie en Flux (14h)
- Utilisation avancée du logiciel R pour les statistiques (21h)
- Envisager les enjeux d'intégrité scientifique et de plagiat (7h)
- Module de l'école doctorale du MNHN : R applications (21h)
- Analyse de données de Metabarcoding (28h)
- Rédaction en Anglais pour la recherche (20h)

## Publications





# A Comprehensive Analysis of Immune Constituents in Blood and Bronchoalveolar Lavage Allows Identification of an Immune Signature of Severe Asthma in Children

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Iolanda Fátima Lopes Calvo Tibério,  
University of São Paulo, Brazil

### Reviewed by:

Jorg Hermann Fritz,  
McGill University, Canada  
Marion Russier,  
Max Planck Institute of Biochemistry,  
Germany

### \*Correspondence:

Karine Adel-Patient  
karine.adel-patient@cea.fr  
Guillaume Lezmi  
guillaume.lezmi@aphp.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Immunological Tolerance  
and Regulation,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 26 April 2021

**Accepted:** 28 June 2021

**Published:** 19 July 2021

### Citation:

Adel-Patient K, Grauso M, Abou-Taam R, Guillon B, Dietrich C, Machavoine F, Briard M, Garcelon N, Faour H, Neuraz A, Delacourt C, Molina TJ, Leite-de-Moraes M and Lezmi G (2021) A Comprehensive Analysis of Immune Constituents in Blood and Bronchoalveolar Lavage Allows Identification of an Immune Signature of Severe Asthma in Children. *Front. Immunol.* 12:700521. doi: 10.3389/fimmu.2021.700521

**Karine Adel-Patient**<sup>1\*</sup>, **Marta Grauso**<sup>1</sup>, **Rola Abou-Taam**<sup>2</sup>, **Blanche Guillon**<sup>1</sup>, **Céline Dietrich**<sup>3</sup>, **François Machavoine**<sup>3</sup>, **Mélanie Briard**<sup>1</sup>, **Nicolas Garcelon**<sup>4,5</sup>, **Hassan Faour**<sup>4,5</sup>, **Antoine Neuraz**<sup>4,5</sup>, **Christophe Delacourt**<sup>2</sup>, **Thierry Jo Molina**<sup>4,6</sup>, **Maria Leite-de-Moraes**<sup>3</sup> and **Guillaume Lezmi**<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, Laboratoire d'Immuno-Allergie Alimentaire, Gif-sur-Yvette, France, <sup>2</sup> AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades, Service de Pneumologie et Allergologie Pédiatriques, Paris, France, <sup>3</sup> Université de Paris, Institut Necker Enfants Malades, Equipe Immunorégulation et Immunopathologie, Inserm UMR1151, CNRS UMR8253, Paris, France, <sup>4</sup> Université de Paris, UMRS 1138, INSERM, Sorbonne Paris-Cité, Paris, France, <sup>5</sup> AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades, Service Informatique médicale, Paris, France, <sup>6</sup> AP-HP, Centre-Université de Paris, hôpital Necker-Enfant-Malades, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Paris, France

**Background:** Targeted approaches may not account for the complexity of inflammation involved in children with severe asthma (SA), highlighting the need to consider more global analyses. We aimed to identify sets of immune constituents that distinguish children with SA from disease-control subjects through a comprehensive analysis of cells and immune constituents measured in bronchoalveolar lavage (BAL) and blood.

**Methods:** Twenty children with SA and 10 age-matched control subjects with chronic respiratory disorders other than asthma were included. Paired blood and BAL samples were collected and analyzed for a large set of cellular (eosinophils, neutrophils, and subsets of lymphocytes and innate lymphoid cells) and soluble (chemokines, cytokines, and total antibodies) immune constituents. First, correlations of all immune constituents between BAL and blood and with demographic and clinical data were assessed (Spearman correlations). Then, all data were modelled using supervised multivariate analyses (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) to identify immune constituents that significantly discriminate between SA and control subjects. Univariate analyses were performed (Mann-Whitney tests) and then PLS-DA and univariate analyses were combined to identify the most discriminative and significant constituents.

**Results:** Concentrations of soluble immune constituents poorly correlated between BAL and blood. Certain constituents correlated with age or body mass index and, in asthmatics, with clinical symptoms, such as the number of exacerbations in the

previous year, asthma control test score, or forced expiratory volume. Multivariate supervised analysis allowed construction of a model capable of distinguishing children with SA from control subjects with 80% specificity and 100% sensitivity. All immune constituents contributed to the model but some, identified by variable-important-in-projection values  $> 1$  and  $p < 0.1$ , contributed more strongly, including BAL Th1 and Th2 cells and eosinophilia, CCL26 (Eotaxin 3), IgA and IL-19 concentrations in blood. Blood concentrations of IL-26, CCL13, APRIL, and Pentraxin-3 may also help in the characterization of SA.

**Conclusions:** The analysis of a large set of immune constituents may allow the identification of a biological immune signature of SA. Such an approach may provide new leads for delineating the pathogenesis of SA in children and identifying new targets for its diagnosis, prediction, and personalized treatment.

**Keywords:** children, severe asthma, pathogenesis, immune signature, precision medicine

## INTRODUCTION

Asthma encompasses multiple phenotypes characterized by common symptoms and variable degrees of airflow limitation (1, 2). In most children, asthma is controlled with mild-to-moderate doses of inhaled corticosteroids (ICS). However, approximately 5% of children suffering from severe asthma (SA) remain symptomatic, despite high doses of ICS with other controllers and the control of aggravating factors (3, 4). Children with SA have frequent severe exacerbations, a reduced quality of life, and may account for approximately half of all pediatric asthma-related healthcare costs (5).

Asthma in children has long been considered to be a type 2 (T2) disorder, as it involves Th2 cells, eosinophils, and other innate immune cells, such as mast cells or type 2 innate lymphoid cells (ILC2) (6–9). However, recent studies have shown that bronchoalveolar lavage (BAL) from children with SA may instead display a dominant Th1 signature, with Th17 and Th2 cells in a mixed cytokine milieu and rare ILC2 (10). Other non-T2 cells or cytokines, such as mucosal associated invariant T cells (MAIT), IL-6, IL-9, IL-17, and IL-33, have also been shown to be involved in the pathogenesis of SA (11–15). Recently, we found that children with SA with higher levels of IL-17A secreting MAIT cells (MAIT-17) in BAL experienced more frequent severe exacerbations in the previous year than those with fewer MAIT-17 (16). Moreover, we also recently evidenced that children with SA and frequent exacerbations exhibited a mixed T2/T17 phenotype, whereas those with less frequent exacerbations were characterized by a more pronounced T1 phenotype (17). Overall, this suggests that different asthma phenotypes may result from various pathophysiological mechanisms, i.e. various

endotypes, which may involve several cells and markers of T1, T2, and/or T17 inflammation.

To date, few studies have characterized the immune signature of children with SA relative to that of non-asthmatic (NA) children. Most studies on SA have focused on only one type of immune cell or cytokine, with sometimes conflicting results. Although very instructive, such approaches cannot account for the complexity of inflammation in SA. A better understanding of airway and blood inflammation requires expanding beyond the classical paradigms and considering a global approach rather than a targeted one (10, 18). Continuing from our previous work (17), we aimed to identify sets of immune constituents that can distinguish children with SA from age-matched control children using comprehensive, non-targeted, high-dimensional analysis of data on a large set of cytokines and immune cells in blood and BAL.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

Children with SA, regularly followed in the department of pediatric pulmonology and allergy of Necker Hospital, were recruited as previously described (16). Institutional ethical approval and written informed consent were obtained.

SA was defined, according to guidelines, as persistent despite the use of high-dose ICS and another controller medication (3, 16). Before the diagnosis of SA was made, good adherence and inhalation technique were confirmed by physicians and underlying modifiable factors and environmental factors were controlled. Children who remained symptomatic underwent investigations, including flexible endoscopy with BAL collection to assess airway inflammation and exclude differential diagnoses (19). Children with severe chronic respiratory disorders other than asthma and requiring flexible bronchial endoscopy for clinical purposes were recruited as age-matched disease-control subjects.

### Bronchoalveolar Lavage (BAL)

Flexible endoscopy was performed at least four weeks after an infection or asthma exacerbation. Cytology, bacterial cultures,

**Abbreviations:** ACT, asthma control test; BAL, bronchoalveolar lavage; BMI, body mass index; FEV1, forced expiratory volume in 1 second; FVC, forced vital capacity; ICS, inhaled corticosteroids; MW, Mann Whitney test; NA, non-asthmatic; PLS-DA, partial least square – discriminant analysis; PCA, principal component analysis; SA, severe asthma; FE, SA with frequent exacerbations; nFE, SA with non-frequent exacerbations.

and immunofluorescence testing for common viruses were performed (19). After centrifugation, BAL supernatants were collected, aliquoted, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until cytokine and antibody analysis. Cell pellets were maintained in AIM-V<sup>®</sup> Medium (ThermoFisher Scientific, Waltham, UK) on ice until labelling (see below).

## Blood Collection and PBMC and Plasma Separation

Blood samples were collected the same day as BAL. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and plasma were obtained after Histopaque<sup>®</sup>-1077 (Sigma Aldrich, St Louis, USA) separation. PBMCs were maintained in AIM-V<sup>®</sup> Medium on ice until labelling. No PBMC stimulation was performed to retain a view of the cell frequency and activation at baseline. The plasma was aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for antibody and cytokine analysis.

## Flow Cytometry Analysis

Cell counts and viability determinations were performed using a NovoCyte Flow Cytometer (ACEA Biosciences, San Diego, USA) with 7-Aminoactinomycin D (7-AAD, Interchim, Montluçon, France). PBMCs and BAL were centrifuged ( $400 \times g$ , 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) and suspended in labelling buffer (PBS, 2 mM EDTA, 2% inactivated fetal calf serum) containing FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec GmbH, Germany). Extracellular and intracellular labelling of T helper (Th) and innate lymphoid cells (ILC) was performed using a pre-optimized antibody panel for which the spill fluorescence compensation was performed using single-stained UltraComp eBeads<sup>™</sup> (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Cell staining was performed using the following antibodies: lineage (lin: anti-human CD3-, CD11c-, CD14-, CD16-, CD19-, CD56-, FcεRIα-, CD1a-, and CD123-APC-Vio770<sup>™</sup>), anti-human CD127 (IL-7Rα)-PE-Vio615<sup>™</sup>, CD4-VioGreen<sup>®</sup>, CD45-PerCP-Vio700<sup>™</sup>, Tbet-PE, RORγt-APC, and GATA3-FITC from Miltenyi Biotec GmbH; anti-human IL-13-BV711 and IFNγ-BV605 from BD Biosciences; and anti-human IL-22-eFluor 450 from eBiosciences (Affymetrix, USA). The Fixable Yellow Dead Cell Stain kit (Thermo Fisher Scientific) was used to exclude dead cells. Intracellular labelling was performed after fixation/permeabilization using the Foxp3 Staining Buffer Set (Miltenyi Biotec GmbH, Germany), following the manufacturer's recommendations. Finally, stained cells were suspended in CytoFix (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and analyzed using a NovoCyte flow cytometer within 24 h. Analyses were performed using FlowJo<sup>®</sup> (Version 10, ACEA Biosciences, Inc.). Each experiment contained unlabeled samples and samples labeled with isotype control antibodies. Each acquired sample was first gated on FSC<sup>low</sup>-SSC<sup>low</sup> cells to select the lymphocyte population and doublet/aggregated cells were unselected using a SSC-A x SSC-H plot. Within the singlet cell population, live CD45<sup>+</sup> cells were selected. Within this selected population, Lin<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (identified as Th) and Lin<sup>-</sup> cells were gated. Lin<sup>-</sup> cells were further analyzed for CD127 (IL-7Rα) expression, and ILC identified as Lin<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup> populations.

Th1, Th2, and Th17 subpopulations and their ILC analogues ILC1, ILC2, and ILC3, were then identified using intracellular Tbet, GATA3, and RORγt expression, respectively. Th and ILC populations were expressed as the percentage of live CD45<sup>+</sup> cells to allow comparison. The number of cells was too low to perform a relevant analysis of intracellular cytokines within the BAL. Unlabeled, single-stained, and fluorescence-minus-one (FMO) labelled PMBCs, and PBMCs stimulated for 4 h with phorbol 12-myristate 13-acetate/Ionomycin/Brefeldin were used to validate the gating strategy (not shown).

## Cytokine and Antibody Assays in Plasma and BAL

Cytokines were analyzed using xMAP<sup>®</sup> Luminex technology and the associated apparatus (Bioplex<sup>®</sup>200, Biorad, Marnes-la-Coquette, France). IL-5 and IL-13 were not detectable or below the limit of quantification in most samples in preliminary experiments (not shown). Then, 40 chemokines (Bio-Plex Pro<sup>™</sup> Human chemokine assays, 40-plex; BioRad) and 37 inflammation markers (Bio-Plex Pro<sup>™</sup> Human Inflammation Panel 1, 37-plex; BioRad) were analyzed in all BAL and plasma samples following the manufacturer's recommendations. Samples were incubated with the beads for 18 h at  $+4^{\circ}\text{C}$  to increase sensitivity. Due to a small level of redundancy between the kits, 73 immune soluble constituents were analyzed for each sample: APRIL/TNFSF13, BAFF/TNFSF13B, sCD30/TNFRSF8, sCD163, Chitinase 3-like 1, CCL21 (6Ckine), CXCL13 (BCA-1), CCL27 (CTACK), CXCL25 (ENA-78), CCL11 (Eotaxin), CCL24 (Eotaxin-2), CCL26 (Eotaxin-3), CX3CL1 (Fractalkine), CXCL6 (GCP-2), GM-CSF, CXCL1 (Gro-α), CXCL2 (Gro-β), CCL1 (I-309), gp130/sIL-6Rβ, sIL-6Rα, IFNα2, IFNβ, IFNγ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-10, IL-11, IL-12p40, IL-12p70, IL-16, IL-19, IL-20, IL-22, IL-26, IL-27 (p28), IL-28A (IFN-2λ), IL-29 (IFN-λ1), IL-32, IL-34, IL-35, CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC), CCL2 (MCP-1), CCL8 (MCP-2), CCL7 (MCP-3), CCL13 (MCP4), CCL22 (MDC), MIF, CXCL9 (MIG), CCL3 (MIP-1α), CCL15 (MIP-1δ), CCL20 (MIP-3α), CCL19 (MIP-3β), CCL23 (MIP-1), CXCL16 (SCYB16), CXCL12 (SDF-1α+β), CCL17 (TARC), CCL25 (TECK), LIGHT/TNFSF14, MMP-1, MMP-2, MMP-3, Osteocalcin, Osteopontin (OPN), Pentraxin-3, sTNF-R1, sTNF-R2, TLSP, TNFα, and TWEAK/TNFSF12. Total IgG and IgA were also analyzed using the Bio-Plex Pro<sup>™</sup> Human isotyping panel (BioRad) and total IgE using in-house specific immunoassays (20). Thus, we analyzed 76 immune soluble components both in BAL and plasma for each individual.

## Statistical Analysis

The sample size was opportunistic, depending on definitive diagnoses and parental consent. Patient demographic and clinical characteristic were compared using the Mann-Whitney (MW) test for quantitative variables and the Fisher exact test for qualitative variables.

Cytokine concentrations and flow cytometry data (acquisition and analysis) were determined blindly and the code was broken only for final statistical analysis. The data for cytokines and cells were not normally distributed. We first assessed correlations

between immune constituents measured in BAL and plasma and their correlation with demographic data independently of asthmatic status by calculating Spearman correlations. Among children with SA, we also tested for correlations between immune constituents and clinical data. Correlations with  $p < 0.05$  were considered significant and are provided in the results.

We then performed a descriptive analysis (principal component analysis, PCA) of all immune constituents measured to have an overview of the variables and individuals and identify potential outliers. None were identified and all patients and immune constituents were further used for modelling by supervised partial least square-discriminant analysis (PLS-DA), with the asthmatic status (SA vs control subjects) as the explicative variable. Successful construction of the models indicates that it is possible to classify the patients based on all measured immune constituents. The robustness of the models is evaluated based on  $R^2X$  (explained variance) and  $R^2Y$  (capability of prediction) scores. Such models allow the identification of “discriminant variables”, that is to say, a set of immune constituents that mostly participated in constructing the models and then mostly supported the differences between the patient groups. These constituents are identified based on model-calculated variable-important-in-projection values (VIP,  $>1$ ). In parallel, we performed pairwise univariate comparisons of each immune constituent using the non-parametric MW test and the corresponding P values were obtained. We did not adjust for multiple testing; instead, as a final step, the measured immune constituents showing a VIP  $> 1$  and a P value  $< 0.05$  were selected to identify the sets of immune constituents that discriminate the most significantly between children with SA and controls. Such an approach has been proposed for the analysis of metabolomics

data, i.e., when the number of variables is (far) greater than the number of individuals (21). Corresponding variables were then represented in univariate graphs to visualize the differences between groups (e.g., extent of increase/decrease, inter-individual variability).

Statistical analyses were performed using R (version 3.6.0; Rcmdr and FactoMineR packages) and XLSTAT® (Addinsoft, Paris, France) software. Graphs were plotted using GraphPad Software, LLC (Prism 8, San Diego, CA, USA). The heatmap was produced using R (ggplot2 package).

## RESULTS

### Patient Characteristics

Twenty children with SA and 10 control subjects were included. General characteristics of the children are summarized in **Table 1**. Children with SA used higher doses of ICS and had a higher post-bronchodilator FEV1/FVC and higher blood eosinophil counts than control subjects. Control subjects had severe chronic respiratory disorders, including ciliary dyskinesia ( $n = 2$ ), viral pulmonary sequelae ( $n = 3$ ), or non-cystic fibrosis bronchiectasis ( $n = 5$ ). Although certain control subjects were being treated with ICS at the time of inclusion, the diagnosis of asthma was excluded based on history, response to bronchodilators, spirometry, and nasal nitric oxide testing or tomodesitometry. The general characteristics of the control subjects receiving or not ICS treatment did not differ (not shown). Control subjects had a higher number of neutrophils in their BAL than children with SA. Virology and bacterial analysis of the BAL did not differ between children with SA

**TABLE 1** | Demographic and clinical characteristics of the children with SA and the non-asthmatic disease controls (chronic pulmonary inflammation, NA).

Study participants, n	Severe Asthma (SA)		Non-Asthmatic (NA)		p value NA vs SA
	20		10		
Age (years)	10.5 (7.7-12.4)		10.7 (7.7-12)		0.82
Gender (female:male)	7:15		4:6		1*
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	17.6 (15.5-23.1)		17.7 (16.2-19.8)		0.98
Atopy history, n	17/20		6/10		0.18*
Post-BD FEV1 (%)	109 (97-116)		92 (86-102; n=9)		0.14
Post-BD FEV1/FVC (%)	87.5 (81.2-90.5)		76 (73-86; n=9)		<b>0.057</b>
ACT score	17.5 (13-21.2)		19 (15-21; n=5)		0.78
Number of bursts	5 (2-9)		1 (0-2; n=5)		0.15
ICS (µg/day eq. fluticasone)	500 (500-562.5)		300 (250-500)		<b>0.007</b>
Circulating Total IgE (UI/ml)	218 (136.8-671)		43.57 (36.9-281.9)		0.15
Blood leucocytes (x10 <sup>3</sup> /µl)	6.7 (5.1-7.4)		7.05 (6.3-10.2)		0.24
Blood eosinophils (x10 <sup>3</sup> /µl)	0.5 (0.3-0.9)		0.2 (0.17-0.32)		<b>0.008</b>
Blood neutrophils (x10 <sup>3</sup> /µl)	2.7 (1.9-3.4)		3.8 (2-6.8)		0.21
Blood lymphocytes (x10 <sup>3</sup> /µl)	2.5 (1.9-2.9)		2.65 (2.5-2.8)		0.65
BAL eosinophils %	0 (0-0)		0 (0-0)		0.35
BAL neutrophils %	2 (1-4)		38 (15-84)		<b>0.001</b>
BAL lymphocytes %	6 (5-8)		4 (3-5)		<b>0.059</b>
Positive BAL bacteriology, n	5/20		5/10		0.23*
Positive BAL virology, n	4/20		1/10		0.64*

BMI, body mass index; BD, bronchodilator; FEV1, forced expiratory volume (1 s); FVC, forced vital capacity; ACT, asthma control test. Post-BD FEV1, ACT, and the number of bursts were not available for all controls (number indicated within brackets). Median values (and inter-quartile ranges) are provided for quantitative values.

Statistical analysis: groups were compared using the MW test (1,000 Monte Carlo simulations) or Fisher's exact test (indicated by an \*). Bold values are statistically significant ( $P < 0.05$ ). Trends are indicated by italics.



and the control subjects. Among children with SA, bacterial cultures were positive for five children (3 for *Haemophilus influenzae*, 1 for *Streptococcus pyogenes*, and 1 for *Staphylococcus aureus*) and viruses were found in four children (2 with rhinovirus, 1 with both adenovirus and parainfluenza virus, and 1 with syncytial respiratory virus). In control subjects, bacterial cultures were positive for five children (3 for *Haemophilus influenzae*, 1 for *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*, and 1 for *Staphylococcus aureus*) and viruses were found in one child (non SARS-CoV2 coronavirus).

## Age and BMI Correlate With the Level of Certain Blood and BAL Cytokines

Spearman correlations performed on the entire population showed age to be positively associated with blood IgE concentrations ( $\rho = 0.387$ ) and negatively associated with blood concentrations of sCD30, IFN $\alpha$ 2, IFN $\gamma$ , IL-2, IL-11, IL-12p40, IL-19, IL-20, IFN $\lambda$ 1, IFN $\lambda$ 2, IL-32, IL-34, IL-35, MMP1, Pentraxin-3, TSLP, CXCL13, CCL11, and CXCL9 ( $\rho$  ranging from -0.376 to -0.666). Age was negatively associated with BAL concentrations of sIL-16Rb, IFN $\gamma$ , IL-6, IL-26, MMP3, sTNFR2, CXCL6, GM-CSF, CCL1, CCL7, CCL20, CXCL1, CX3CL1, and CXCL12 ( $\rho$  ranging from -0.372 to -0.498).

BMI was positively associated with blood concentrations of total IgE and APRIL ( $\rho = 0.474$  and  $\rho = 0.437$ , respectively) and negatively with sCD30, IFN $\alpha$ 2, IL-2, IL-11, IL-20, IL-27p28, IFN $\lambda$ 2, IL-32, IL-34, MMP1, and TSLP ( $\rho$  ranging from -0.372 to -0.513). BMI was also negatively associated with BAL

concentrations of sCD163, sIL-16Rb, IL-26, IL-34, and TWEAK ( $\rho$  ranging from -0.387 to -0.515).

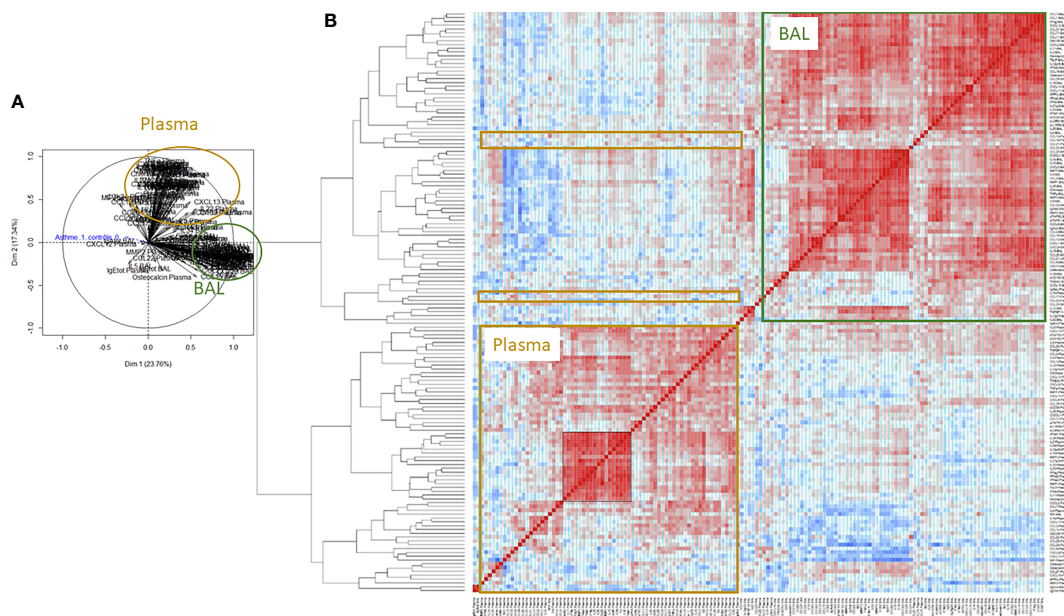
## Correlation of Soluble Immune Constituents Between BAL and Plasma

No correlation between BAL and blood concentrations of any soluble constituents was observed, except for total IgE, total IgA, IL-12p70, MIF, MMP2, TNF $\alpha$ , and TNFSF14, for which the concentrations in BAL and plasma correlated positively.

Moreover, PCA (**Figure 1A**) and a correlation heat map (**Figure 1B**) for all cytokines and antibodies showed only a few correlations between BAL and plasma. Within BAL, most of the constituents positively correlated with each other. Within plasma, a particular core of cytokines was more highly correlated among themselves (comprising IFN $\alpha$ 2, IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , IFN $\lambda$ 1, IFN $\lambda$ 2, IL-2, IL-11, IL-12p28, IL-12p40, IL-19, IL-20, IL-32, IL-34, IL-35, TSLP, MMP1, MMP3, and Pentraxin-3, indicated by the black square in **Figure 1B**).

## Correlations of Blood and BAL Immune Constituents With Symptoms of SA Children

Among children with SA, blood concentrations of Pentraxin-3 negatively correlated with the ICS dose ( $\rho = 0.502$ ) and the blood TSLP concentration correlated positively with the number of crises in the previous year ( $\rho = 0.450$ ). Blood concentrations of sIL16RA ( $\rho = -0.530$ ), sTNFR1 ( $\rho = -0.490$ ), and CXCL16 ( $\rho = -0.529$ ) negatively correlated with the ACT score. Various BAL constituents (IgG, BAFF, IL-2, IL-8, IL-12p40, osteocalcin,



**FIGURE 1** | Non-supervised Principal component analysis (PCA, **A**) and heatmap of Spearman correlations (**B**) for all soluble components analyzed in BAL and plasma from SA and NA ( $n = 30$ ). Positive correlations are shown in red, the absence of a correlation in white, and negative correlations in blue. The intensity of the color indicates the intensity of the correlation. The black square indicates a core of plasma cytokines that more highly correlated between themselves (comprising IFN $\alpha$ 2, IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , IFN $\lambda$ 1, IFN $\lambda$ 2, IL-2, IL-11, IL-12p28, IL-12p40, IL-19, IL-20, IL-32, IL-34, IL-35, TSLP, MMP1, MMP3, and Pentraxin-3).

Pentraxin-3, CXCL13, CXCL2, CCL1, CCL3, CCL22, CCL26, and GM-CSF) negatively correlated with post-BD FEV1/FVC, whereas blood concentrations of CCL8 and CXCL6 positively correlated with post-BD FEV1/FVC.

Immune cells analyzed in the BAL or blood did not correlate with ICS dose, the number of crises, or ACT score. Conversely, ILC counts and the frequency of ILC2 cells in BAL positively correlated with post-BD FEV1 ( $\rho = 0.669$  and  $\rho = 0.669$ , respectively) and the frequency of ILC3 and Th1-IFN $\gamma^+$  cells in blood negatively correlated with post-BD FEV1/FVC ( $\rho = -0.685$  and  $\rho = -0.573$ , respectively).

## A Biological Immune Signature Distinguishes Children With SA From Control Subjects

We performed a supervised multivariate analysis (PLS-DA) that included all immune constituents (both soluble and cellular) measured in blood and BAL, with asthmatic status as the explanatory variable. Despite the relative heterogeneity of the control subjects, a two-axis model was successfully built (Figure 2A), with a good predictive value ( $R^2Y = 0.735$ ), 80% specificity, and 100% sensitivity (Figure 2B). The VIP values calculated by PLS-DA modelling for all immune constituents are presented in Table 2. The variables with a VIP > 1 contributed the most to discriminate between children with SA and controls, and most were measured in BAL.

A pairwise univariate analysis was independently performed to compare all immune constituents between children with SA and control subjects (p values provided in Table 2). The VIP values for each constituent were plotted as a function of the p value (Figure 2C). Although the PLS-DA model was implemented using all data and all were necessary to discriminate between SA and controls with high precision, 19 immune constituents demonstrating a VIP > 1 (discriminant variables) and  $p < 0.05$  (significant difference) were identified as

being particularly relevant (constituents within the red rectangle in Figure 1C; the corresponding constituents are indicated in bold in Table 2). Eleven additional variables were also considered to be potentially relevant based on both their VIP and p-value (VIP > 1 with  $0.05 < p < 0.1$ , constituents underlined in Table 2).

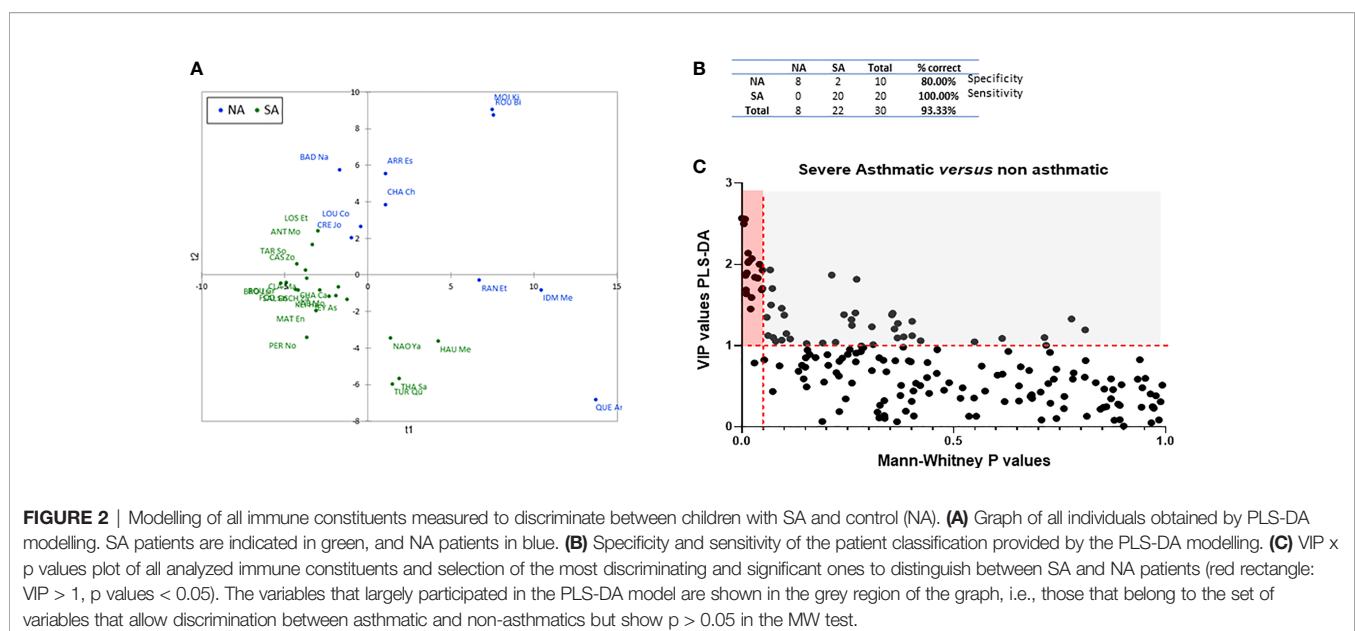
Statistically significant immune constituents discriminating between SA and NA were then plotted. Children with SA demonstrated higher percentages of Th1 cells in BAL and a higher number of eosinophils in blood than control subjects (Figure 3A). The Th2 cell frequency tended to be higher in BAL from children with SA than NA, although the difference was not significant (Figure 3A). There were no differences in the percentage of blood or BAL ILCs between children with SA and control subjects (not shown).

In addition to their neutrophilic profile (Figure 3A), control subjects had higher levels of total IgG and various inflammatory cytokines (IL-8, TNF $\alpha$ , sTNFR1, sTNFR2, TNFSF14, MMP2, BAFF, IL-10, IL-22, CCL2, CCL3, CCL20, and CCL22) in BAL than children with SA (Figure 3B).

Among the soluble components analyzed in plasma, only two significantly differed between children with SA and the control subjects: IgA, which was lower in children with SA, and CCL26, which was higher in children with SA (Figure 3C). We also observed a tendency towards lower concentrations of IL-19 in plasma of children with SA was (Figure 3C).

## Preliminary Analysis to Identify Blood Signature of SA in Children

Although our results were not validated in an independent cohort, we performed preliminary analysis to define a set of “easily measurable” blood variables (to be less invasive than those obtained from BAL) that may distinguish children with SA from NA. We focused on variables measurable in clinical practice in a hospital laboratory and thus excluded data obtained by flow

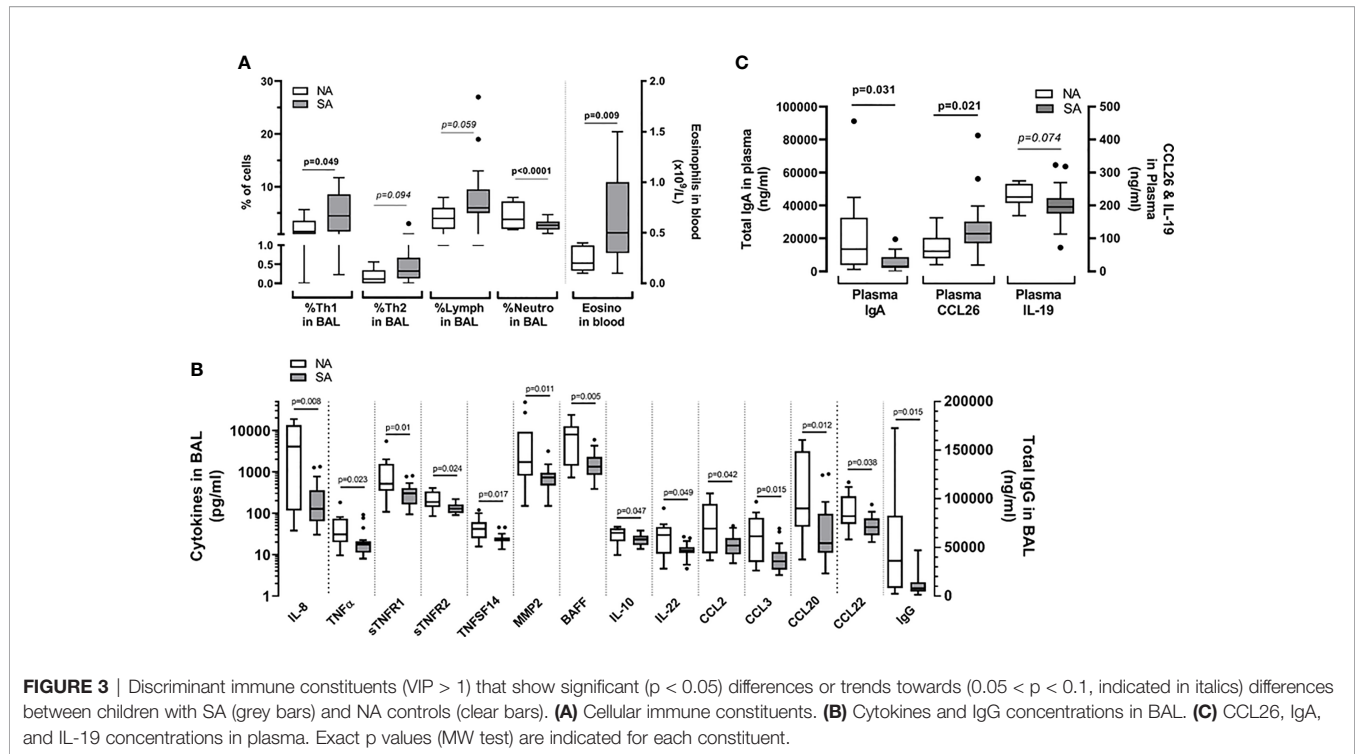


**TABLE 2 |** VIP values (PLS-DA) and p values (Mann Whitney) for all measured immune constituents for comparisons between children with SA and controls.

Variable	VIP	p value	Variable	VIP	p value	Variable	VIP	p value
<b>Neutrophils in BAL (%)</b>	<b>2.568</b>	<b>&lt;0.0001</b>	ILC2 in BAL (%)	0.976	0.287	CXCL9-BAL	0.509	0.421
<b>IL8-BAL</b>	<b>2.558</b>	<b>0.008</b>	MMP3-BAL	0.952	0.255	CCL25-BAL	0.505	0.654
<b>BAFF-BAL</b>	<b>2.499</b>	<b>0.005</b>	TSLP-BAL	0.950	0.461	CCL27-Plasma	0.492	0.153
<b>IgGtot-BAL</b>	<b>2.138</b>	<b>0.015</b>	IL22-Plasma	0.946	0.155	IgEtot-BAL	0.482	0.945
<b>sTNFR2-BAL</b>	<b>2.072</b>	<b>0.024</b>	CXCL9-Plasma	0.928	0.629	CX3CL1-Plasma	0.482	0.521
<b>TNFSF14-BAL</b>	<b>2.038</b>	<b>0.017</b>	ILC within PBMC (%)	0.927	0.281	ILC2 IL-13 <sup>+</sup> with. PBMC (%)	0.465	0.855
<b>CCL3-BAL</b>	<b>2.022</b>	<b>0.015</b>	IL2-BAL	0.917	0.727	IL1b-Plasma	0.459	0.876
<b>CCL2-BAL</b>	<b>2.001</b>	<b>0.042</b>	IL34-BAL	0.907	0.270	CCL26-BAL	0.451	0.477
<u>IL6-BAL</u>	<b>1.933</b>	<i>0.067</i>	ILC2 PBMC	0.893	0.250	sTNFR2-Plasma	0.442	0.405
<b>IL22-BAL</b>	<b>1.930</b>	<b>0.049</b>	CCL24-Plasma	0.891	0.160	CCL19-Plasma	0.440	0.574
<b>CCL20-BAL</b>	<b>1.896</b>	<b>0.012</b>	IFN $\beta$ -Plasma	0.889	0.202	IL8-Plasma	0.436	<b>0.073</b>
Neutrophils in blood (nb)	<b>1.868</b>	0.212	IL34-Plasma	0.854	0.174	CXCL10-BAL	0.428	0.705
<b>Eosinophils in blood (nb)</b>	<b>1.865</b>	<b>0.009</b>	MMP1-Plasma	0.850	0.151	CCL8-Plasma	0.413	0.442
<b>IgAtot-Plasma</b>	<b>1.841</b>	<b>0.031</b>	CCL1-BAL	0.850	0.324	MMP3-Plasma	0.405	0.964
<b>CCL22-BAL</b>	<b>1.830</b>	<b>0.038</b>	CCL22-Plasma	0.846	0.237	CCL13-BAL	0.395	0.684
Nb of cell in BAL	<b>1.817</b>	0.271	IL12p40-BAL	0.826	0.939	CXCL16-BAL	0.387	0.683
<b>Th1 in BAL (%)</b>	<b>1.704</b>	<b>0.049</b>	MIF-BAL	0.825	0.053	ILC1 BAL	0.385	0.374
<u>CXCL5-BAL</u>	<b>1.703</b>	<i>0.072</i>	TNFSF14-Plasma	0.820	0.334	sIL6RA-Plasma	0.382	0.977
<b>IL10-BAL</b>	<b>1.687</b>	<b>0.047</b>	IL11-BAL	0.816	0.811	CCL19-BAL	0.375	0.761
<b>sTNFR1-BAL</b>	<b>1.685</b>	<b>0.010</b>	TSLP-Plasma	0.814	0.362	IL10-Plasma	0.373	0.681
<b>MMP2-BAL</b>	<b>1.636</b>	<b>0.011</b>	sCD163-Plasma	0.813	0.394	ILC in BAL (%)	0.355	0.548
<b>TNfa-BAL</b>	<b>1.593</b>	<b>0.023</b>	CXCL11-Plasma	0.806	0.230	CCL3-Plasma	0.351	0.516
<u>IL1b-BAL</u>	<b>1.501</b>	<i>0.069</i>	IgEtot-Plasma	0.802	0.399	CCL21-Plasma	0.350	0.685
<u>CX3CL1-BAL</u>	<b>1.498</b>	<i>0.070</i>	sCD163-BAL	0.801	0.269	CCL23-Plasma	0.346	0.871
<u>IL35-BAL</u>	<b>1.459</b>	<i>0.094</i>	CXCL6-BAL	0.791	0.438	IL2-Plasma	0.344	0.245
<b>CCL26-Plasma</b>	<b>1.452</b>	<b>0.021</b>	CXCL13-Plasma	0.786	0.030	MMP2-Plasma	0.323	0.336
CXCL2-BAL	<b>1.403</b>	0.268	IL27p28-Plasma	0.758	0.204	Blood Lymphocytes (nb)	0.318	0.654
CXC13-BAL	<b>1.399</b>	0.356	IL35-Plasma	0.757	0.142	Th2 IL13 <sup>+</sup> within PBMC (%)	0.314	0.401
IgAtot-BAL	<b>1.382</b>	0.241	IL12p40-Plasma	0.752	0.089	CXCL5-Plasma	0.311	0.620
Osteocalcin-BAL	<b>1.380</b>	0.354	IL4-Plasma	0.749	0.566	CXCL10-Plasma	0.309	0.988
<u>IL32-BAL</u>	<b>1.376</b>	<i>0.100</i>	CXCL12-Plasma	0.739	0.658	sIL16Rb-Plasma	0.290	0.728
<u>Lymphocytes in BAL (%)</u>	<b>1.348</b>	<i>0.059</i>	IgEtot-Plasma	0.734	0.150	IL11-Plasma	0.280	0.888
ILC3 in BAL (%)	<b>1.329</b>	0.778	GMCSF-Plasma	0.711	0.742	IFN $\delta$ 1-Plasma	0.266	0.326
Total Leucoc in blood (nb)	<b>1.321</b>	0.259	CCL11-BAL	0.693	0.678	IL16-Plasma	0.265	0.892
IL20-BAL	<b>1.299</b>	0.402	CCL15-BAL	0.692	0.307	Chitinase3 like1-Plasma	0.248	0.860
CCL7-BAL	<b>1.273</b>	0.368	CCL24-BAL	0.685	0.134	CCL27-BAL	0.248	0.969
IL26-BAL	<b>1.249</b>	0.260	Eosino in BAL (%)	0.678	0.341	ILC1 within PBMC (%)	0.242	0.943
CXCL12-BAL	<b>1.232</b>	0.307	ILC3 within PBMC (%)	0.667	0.223	Th2 within PBMC (%)	0.241	0.853
GMCSF-BAL	<b>1.204</b>	0.360	CCL11-Plasma	0.664	0.783	ILC3 IL22 <sup>+</sup> within PBMC (%)	0.230	0.972
CCL23-BAL	<b>1.194</b>	0.810	sIL16Rb-BAL	0.658	0.460	sTNFR1-Plasma	0.225	0.760
ILC1 IFN $\gamma$ <sup>+</sup> within PBMC (%)	<b>1.149</b>	0.105	Osteopontin-BAL	0.649	0.615	IL27p28-BAL	0.217	0.846
<u>Chitinase 3 like 1 - BAL</u>	<b>1.124</b>	<i>0.062</i>	BAFF-Plasma	0.637	0.603	IFN $\delta$ 1-BAL	0.193	0.387
IFN $\gamma$ -BAL	<b>1.122</b>	0.402	sCD30-BAL	0.627	0.229	CCL7-Plasma	0.188	0.230
IL12p70-BAL	<b>1.108</b>	0.382	IL19-BAL	0.611	0.809	IFN $\beta$ -BAL	0.181	0.320
CCL21-LBA	<b>1.100</b>	0.714	IL4-BAL	0.607	0.437	Th17 PBMC	0.140	0.336
<u>IL19-Plasma</u>	<b>1.100</b>	<i>0.074</i>	CXCL2-Plasma	0.598	0.952	IFN $\alpha$ 2-BAL	0.133	0.406
CCL13-Plasma	<b>1.095</b>	0.367	IL12p70-Plasma	0.591	0.146	CXCL11-BAL	0.131	0.814
CCL8-BAL	<b>1.089</b>	0.614	Th17 in BAL	0.591	0.871	Th17 IL22 <sup>+</sup> within PBMC (%)	0.131	0.553
IL26-Plasma	<b>1.082</b>	0.114	TWEAK-BAL	0.589	0.781	IL20-Plasma	0.130	0.536
<u>Th2 in BAL (%)</u>	<b>1.067</b>	<i>0.094</i>	TNfa-Plasma	0.587	0.736	IFN $\delta$ 2-Plasma	0.111	0.324
IL16-BAL	<b>1.060</b>	0.422	CCL1-Plasma	0.587	0.934	CCL15-Plasma	0.105	0.337
<u>sIL6RA-BAL</u>	<b>1.053</b>	<b>0.080</b>	CCL25-Plasma	0.551	0.194	sCD30-Plasma	0.103	0.742
Pentraxin3-BAL	<b>1.048</b>	0.549	IL6-Plasma	0.544	0.835	Osteopontin-Plasma	0.087	0.892
MMP1-BAL	<b>1.041</b>	0.221	CCL20-Plasma	0.544	0.489	CXCL1-BAL	0.085	0.984
APRIL-Plasma	<b>1.032</b>	0.191	IL32-Plasma	0.539	0.260	MIF-Plasma	0.085	0.707
Pentraxin3-Plasma	<b>1.026</b>	0.153	CXCL6-Plasma	0.536	0.411	Osteocalcin-Plasma	0.081	0.879
Th1 IFN $\gamma$ <sup>+</sup> within PBMC (%)	<b>1.012</b>	0.310	CXCL16-Plasma	0.533	0.723	IFN $\gamma$ -Plasma	0.066	0.190
CCL17-Plasma	<b>1.003</b>	0.718	CCL17-BAL	0.520	0.896	APRIL-BAL	0.064	0.366
Th1 within PBMC (%)	0.997	0.282	CXCL1-Plasma	0.514	0.992	TWEAK-Plasma	0.050	0.966
IFN $\alpha$ 2-Plasma	0.981	0.381	CCL2-Plasma	0.511	0.376	IFN $\delta$ 2-BAL	0.010	0.901

Immune constituents showing a VIP > 1 and a trend in the MW test (0.05 < p < 0.1, shown in italics), are underlined. Immune constituents are ranked by decreasing VIP values to highlight the most discriminant immune constituents, which were mostly consistent with those that were significant (MW p values).

Immune constituents showing a VIP > 1 and p < 0.05 are shown in bold.



cytometry, which is time-consuming and requires more expertise. Modelling of the most contributive variables identified in blood (IgA, CCL26, IL-19, total leucocytes counts, and number of eosinophils and neutrophils; see **Table 2**) did not provide a good predictive model of the asthmatic status ( $R^2Y = 0.35$ , classification characteristics: specificity 30%, sensitivity 100%, AUC = 0.68). However, the addition of other blood components with a VIP > 1, i.e., IL-26, CCL13, APRIL, and Pentraxin-3, allowed construction of a model with good predictive value (AUC = 0.945, specificity 70%, and sensitivity 95%) (**Figure 4**).

## DISCUSSION

In this study, a comprehensive and non-targeted analysis of immune constituents both in BAL and blood, combined with high-dimensional analytical approaches, made it possible to distinguish children with SA from control subjects with chronic respiratory disorders other than asthma with relatively high precision. The supervised models were implemented using all measured immune constituents and all constituents were necessary to discriminate between the populations. This reinforces the strength of non-targeted comprehensive analysis to finely characterize clinical phenotypes.

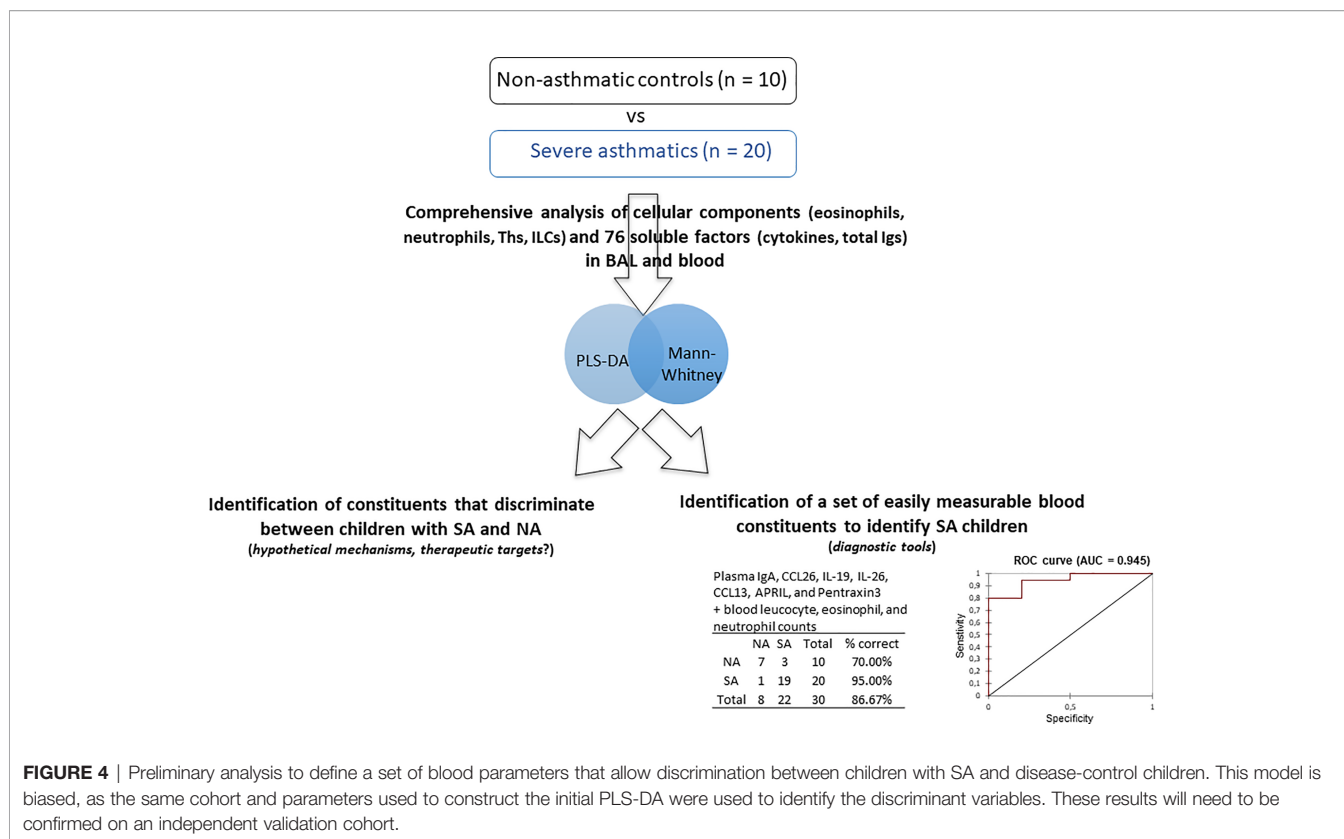
A large set of variables, including cytokines, chemokines, immune cells, and immunoglobulins, were analyzed both in the periphery and in BAL. This point is crucial because i) the levels of many variables in the airways and blood did not correlate with each other in children with SA, as previously demonstrated for eosinophils (22) and Th17 (16) and as shown here when

assessing the correlation between blood and BAL cytokines and antibodies, and ii) there may be a substantial overlap between different phenotypes for many of the parameters analyzed (19). It is therefore necessary to multiply the points of view to better characterize the phenotypes of the patients. On the other hand, this confirms that invasive analyses performed in BAL are necessary for a better understanding of the local actors and mechanisms responsible for SA. This is highlighted by the overrepresentation of constituents with a VIP > 1 in BAL.

Endoscopy was performed at least four weeks after any respiratory infection and no children had fever or signs of active respiratory infection at the time of the endoscopy. Despite this precaution, it is a common observation that certain children show positive BAL virology or bacteriology, which may reflect a past infection or chronic colonisation. Among children with SA, those with positive bacteriological cultures had similar counts of BAL neutrophils as those with negative cultures ( $p = 0.495$ ). They also had similar BAL concentrations of other immune constituents, except for sCD30, chitinase-3-like-1, IL-12p40, IL-26, IFN $\lambda$ 1, IL-35, MMP3, sTNFR1, sTNFR2, and TSLP, which were higher in BAL from children with a positive culture. However, the concentrations of these constituents did not differ between children with SA and control subjects. It is therefore unlikely that the presence of pathogens in BAL affected the analyses.

The analysis of immune constituents that strongly discriminate between children with SA and control subjects shows that children with SA display a mixed Th1/Th2 profile in BAL in a non-neutrophilic environment that is clearly distinguishable from that of control subjects. Our results are consistent with those showing that children with SA display a





**FIGURE 4** | Preliminary analysis to define a set of blood parameters that allow discrimination between children with SA and disease-control children. This model is biased, as the same cohort and parameters used to construct the initial PLS-DA were used to identify the discriminant variables. These results will need to be confirmed on an independent validation cohort.

dominant Th1 signature in BAL, independently of their allergic status (10). In aforementioned study, as in ours, Th17 and Th2 cells were also found in the BAL, whereas ILC2 were scarce. However, we found that the BAL ILC2 frequency correlated with clinical symptoms of children with SA, such as post-BD FEV1, and we cannot exclude an elevated ILC2 frequency in the bronchial mucosa of children with SA.

Conversely, children with SA did not show higher concentrations of cytokines in BAL than control subjects. This confirms the low levels of Th2 cytokines previously observed in BAL from children with severe therapy-resistant asthma (6), although higher concentrations of IL-13 were found in BAL from children with moderate-to-severe vs healthy adults (12). Overall, children with SA showed low levels of all cytokines in BAL, which may result from i) the use of high doses of inhaled steroids; ii) the fact that BAL were collected outside of any asthma exacerbations, and/or iii) a reduced capacity to secrete inflammatory mediators.

Although all data participated in building of the model, we identified the stronger contributors. The fact that certain variables identified to be relevant in our non-targeted analysis were previously identified in other studies using targeted approaches reinforces our results. For example an inverse relationship between plasma IgA concentrations and asthma symptoms has also been shown in adults (23). These observations support possible defective epithelial barrier immunity in children with SA. In addition, the finding that CCL26 strongly contributed to discriminating between children

with SA and control subjects is also consistent with data showing that CCL26 is a potent chemoattractant for eosinophils (24, 25) and that elevated concentrations of CCL26 in plasma are related to mucosal counts of eosinophils and the severity of eosinophilic disorders, such as atopic dermatitis (26), chronic rhinosinusitis (27), and eosinophilic esophagitis (28). Moreover, the VIP values and the fact that preliminary modelling integrating the plasma markers IgA, CCL26, IL-19, IL-26, CCL13, APRIL, and Pentraxin-3 allowed good classification of SA versus control children further highlights that these immune constituents may all be useful in characterizing the phenotype of SA. However, this preliminary modelling was biased, as the same cohort and parameters used to construct the initial PLS-DA were used to identify the discriminant variables; these results need to be confirmed using an independent validation cohort.

Our study had several limitations. We are aware that our sample size was small and future studies performed on independent cohorts are required to confirm our results. In addition, age and BMI correlated with certain components. However, age and BMI were comparable between the children with SA and the control subjects. It is therefore unlikely that such associations would have affected our results. The children with SA formed a relatively homogeneous population compared to the non-asthmatic control subjects. The ideal design would have been to recruit healthy children without any respiratory disorders, but this was not feasible for ethical reasons. However, the inclusion of control subjects was critical for identifying the potential distinctive pathological features of SA

compared to children suffering from non-asthmatic severe chronic respiratory disorders. The children with SA included here were carefully phenotyped and were all under high doses of ICS. ICS probably affected the levels of both cells and cytokines and thus our results are not transposable to children with non-SA. Furthermore, the biological components were associated with past symptoms and thus the follow-up of the children will be useful to determine the potential predictive interest of the identified immune signatures, or of others not identified in our models.

Our study highlights the complexity of immunological profiles of SA in children and the interest of high-dimensional non-targeted multivariate analysis to provide new leads for delineating the pathogenesis of SA in children and identifying new targets in plasma for diagnosis, prediction, and personalized treatment. Confirming the validity of the models is crucial to determining their pertinence and the potential application of such a global approach in clinical practice.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Comité de Protection des Personnes Ile de France 2.

## REFERENCES

- Lezmi G, de Blic J. Assessment of Airway Inflammation and Remodeling in Children With Severe Asthma: The Next Challenge. *Pediatr Pulmonol* (2018) 53(9):1171–3. doi: 10.1002/ppul.24051
- Kuruvilla ME, Lee FE, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin Rev Allergy Immunol* (2019) 56(2):219–33. doi: 10.1007/s12016-018-8712-1
- Chung KF, Wenzel S. From the Authors: International European Respiratory Society/American Thoracic Society Guidelines on Severe Asthma. *Eur Respir J* (2014) 44(5):1378–9. doi: 10.1183/09031936.00120714
- Holguin F, Cardet JC, Chung KF, Diver S, Ferreira DS, Fitzpatrick A, et al. Management of Severe Asthma: A European Respiratory Society/American Thoracic Society Guideline. *Eur Respir J* (2020) 55(1). doi: 10.1183/13993003.00588-2019
- Fleming L, Murray C, Bansal AT, Hashimoto S, Bisgaard H, Bush A, et al. The Burden of Severe Asthma in Childhood and Adolescence: Results From the Paediatric U-BIOPRED Cohorts. *Eur Respir J* (2015) 46(5):1322–33. doi: 10.1183/13993003.00780-2015
- Bossley CJ, Fleming L, Gupta A, Regamey R, Frith J, Oates T, et al. Pediatric Severe Asthma Is Characterized by Eosinophilia and Remodeling Without T (H)2 Cytokines. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 129(4):974–82.e913. doi: 10.1016/j.jaci.2012.01.059
- Lezmi G, Galmiche-Rolland L, Rioux S, Jaubert F, Tillie-Leblond I, Scheinmann P, et al. Mast Cells Are Associated With Exacerbations and Eosinophilia in Children With Severe Asthma. *Eur Respir J* (2016) 48(5):1320–8. doi: 10.1183/13993003.00947-2016
- Nagakumar P, Denney L, Fleming L, Bush A, Lloyd CM, Saglani S. Type 2 Innate Lymphoid Cells in Induced Sputum From Children With Severe

Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

GL, KA-P, and ML-d-M: designed the research. KA-P, MG, BG, CDi, TM, MB, and FM: performed the research. GL, RA-T, NG, HF, AN, and CD: were responsible for patient recruitment or establishing the patient database. KA-P and GL: analyzed the data. KA-P, GL, and ML-d-M: wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

This work was supported by the INRAE-AlimH Department, a legs Poix grant from the Chancellerie des Universities, Paris, France, and a grant from the ANR (SevAsthma-children, grant no. ANR-18-CE14-0011-01, Paris, France).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the patients involved in the study and their parents, Naima Cortes-Perez (Université Paris Saclay, CEA, INRAE; DMTS/SPI/LIAA, Gif-sur-Yvette, France) for her help in the flow cytometry experiments, and Pr. Pierre Scheinmann and Pr. Jacques de Blic AP-HP (Hôpital Necker-Enfants Malades, Service de Pneumologie et Allergologie Pédiatriques, Paris, France) for their invaluable advice.

- Asthma. *J Allergy Clin Immunol* (2016) 137(2):624–6.e626. doi: 10.1016/j.jaci.2015.06.038
- Nagakumar P, Puttur F, Gregory LG, Denney L, Fleming L, Bush A, et al. Pulmonary Type-2 Innate Lymphoid Cells in Paediatric Severe Asthma: Phenotype and Response to Steroids. *Eur Respir J* (2019) 54(2). doi: 10.1183/13993003.01809-2018
- Wisniewski JA, Muehling LM, Eccles JD, Capaldo BJ, Agrawal R, Shirley DA, et al. TH1 Signatures Are Present in the Lower Airways of Children With Severe Asthma, Regardless of Allergic Status. *J Allergy Clin Immunol* (2018) 141(6):2048–60.e2013. doi: 10.1016/j.jaci.2017.08.020
- Lezmi G, Abou Taam R, Dietrich C, Chatenoud L, de Blic J, Leite-de-Moraes M. Circulating IL-17-Producing Mucosal-Associated Invariant T Cells (MAIT) Are Associated With Symptoms in Children With Asthma. *Clin Immunol (Orlando Fla)* (2018) 188:7–11. doi: 10.1016/j.clim.2017.11.009
- Fitzpatrick AM, Higgins M, Holguin F, Brown LA, Teague WG. National Institutes of Health/National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. The Molecular Phenotype of Severe Asthma in Children. *J Allergy Clin Immunol* (2010) 125(4):851–7.e818. doi: 10.1016/j.jaci.2010.01.048
- Saglani S, Lui S, Ullmann N, Campbell GA, Sherburn RT, Mathie SA, et al. IL-33 Promotes Airway Remodeling in Pediatric Patients With Severe Steroid-Resistant Asthma. *J Allergy Clin Immunol* (2013) 132(3):676–85.e613. doi: 10.1016/j.jaci.2013.04.012
- Hinks TS, Zhou X, Staples KJ, Dimitrov BD, Manta A, Petrossian T, et al. Innate and Adaptive T Cells in Asthmatic Patients: Relationship to Severity and Disease Mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* (2015) 136(2):323–33. doi: 10.1016/j.jaci.2015.01.014
- Lambrech BN, Hammad H, Fahy JV. The Cytokines of Asthma. *Immunity* (2019) 50(4):975–91. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.018

16. Lezmi G, Abou-Taam R, Garcelon N, Dietrich C, Machavoine F, Delacourt C, et al. Evidence for a MAIT-17-High Phenotype in Children With Severe Asthma. *J Allergy Clin Immunol* (2019) 144(6):1714–6.e1716. doi: 10.1016/j.jaci.2019.08.003
  17. Adel-Patient K, Grauso M, Abou-Taam R, Guillon B, Dietrich C, Machavoine F, et al. Immune Signatures Distinguish Frequent From Non-Frequent Exacerbators Among Children With Severe Asthma. *Allergy* (2021) 76(7):2261–4. doi: 10.1111/all.14759
  18. Paul AGA, Muehling LM, Eccles JD, Woodfolk JA. T cells in severe childhood asthma. *Clin Exp Allergy* (2019) 49(5):564–81. doi: 10.1111/cea.13374
  19. Lezmi G, Gosset P, Deschildre A, Abou-Taam R, Mahut B, Beydon N, et al. Airway Remodeling in Preschool Children With Severe Recurrent Wheeze. *Am J Respir Crit Care Med* (2015) 192(2):164–71. doi: 10.1164/rccm.201411-1958OC
  20. Grassi J, Didierlaurent A, Stadler BM. Quantitative Determination of Total and Specific Human IgE With the Use of Monoclonal Antibodies. *J Allergy Clin Immunol* (1986) 77(6):808–22. doi: 10.1016/0091-6749(86)90378-7
  21. Chiu CY, Lin G, Cheng ML, Tsai MH, Su KW, Hua MC, et al. Longitudinal Urinary Metabolomic Profiling Reveals Metabolites for Asthma Development in Early Childhood. *Pediatr Allergy Immunol* (2018) 29(5):496–503. doi: 10.1111/pai.12909
  22. Ullmann N, Bossley CJ, Fleming L, Silvestri M, Bush A, Saglani S. Blood Eosinophil Counts Rarely Reflect Airway Eosinophilia in Children With Severe Asthma. *Allergy* (2013) 68(3):402–6. doi: 10.1111/all.12101
  23. Balzar S, Strand M, Nakano T, Wenzel SE. Subtle Immunodeficiency in Severe Asthma: IgA and IgG2 Correlate With Lung Function and Symptoms. *Int Arch Allergy Immunol* (2006) 140(2):96–102. doi: 10.1159/000092252
  24. Larose MC, Chakir J, Archambault AS, Joubert P, Provost V, Laviolette M, et al. Correlation Between CCL26 Production by Human Bronchial Epithelial Cells and Airway Eosinophils: Involvement in Patients With Severe Eosinophilic Asthma. *J Allergy Clin Immunol* (2015) 136(4):904–13. doi: 10.1016/j.jaci.2015.02.039
  25. Provost V, Larose MC, Langlois A, Rola-Pleszczynski M, Flamand N, Laviolette M. CCL26/Eotaxin-3 Is More Effective to Induce the Migration of Eosinophils of Asthmatics Than CCL11/eotaxin-1 and CCL24/Eotaxin-2. *J Leukoc Biol* (2013) 94(2):213–22. doi: 10.1189/jlb.0212074
  26. Kagami S, Kakinuma T, Saeki H, Tsunemi Y, Fujita H, Nakamura K, et al. Significant Elevation of Serum Levels of Eotaxin-3/CCL26, But Not of eotaxin-2/CCL24, in Patients With Atopic Dermatitis: Serum eotaxin-3/CCL26 Levels Reflect the Disease Activity of Atopic Dermatitis. *Clin Exp Immunol* (2003) 134(2):309–13. doi: 10.1046/j.1365-2249.2003.02273.x
  27. Yamada T, Miyabe Y, Ueki S, Fujieda S, Tokunaga T, Sakashita M, et al. Eotaxin-3 as a Plasma Biomarker for Mucosal Eosinophil Infiltration in Chronic Rhinosinusitis. *Front Immunol* (2019) 10:74. doi: 10.3389/fimmu.2019.00074
  28. Konikoff MR, Blanchard C, Kirby C, Buckmeier BK, Cohen MB, Heubi JE, et al. Potential of Blood Eosinophils, Eosinophil-Derived Neurotoxin, and Eotaxin-3 as Biomarkers of Eosinophilic Esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* (2006) 4(11):1328–36. doi: 10.1016/j.cgh.2006.08.013
- Conflict of Interest:** GL reports personal fees from novartis pharma, personal fees from Astra zeneca, personal fees from YSSUP research, during the conduct of the study; personal fees from DBV technologies, personal fees from Aimune therapeutics, outside the submitted work.
- The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Copyright © 2021 Adel-Patient, Grauso, Abou-Taam, Guillon, Dietrich, Machavoine, Briard, Garcelon, Faour, Neuraz, Delacourt, Molina, Leite-de-Moraes and Lezmi. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Immune signatures distinguish frequent from non-frequent exacerbators among children with severe asthma

Karine Adel-Patient, Marta Grauso, Rola Abou Taam, Blanche Guillon, Céline Dietrich, François Machavoine, Nicolas Garcelon, Mélanie Briard, Hassan Faour, Antoine Neuraz, et al.

► **To cite this version:**

Karine Adel-Patient, Marta Grauso, Rola Abou Taam, Blanche Guillon, Céline Dietrich, et al.. Immune signatures distinguish frequent from non-frequent exacerbators among children with severe asthma. Allergy, Wiley, 2021, 10.1111/all.14759 . hal-03133856

**HAL Id: hal-03133856**

**<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03133856>**

Submitted on 7 Feb 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



1 **Immune signatures distinguish frequent from non-frequent exacerbators among children with**  
2 **severe asthma.**

3

4 **To the editor,**

5

6 Asthma is a heterogeneous condition with multiple phenotypes.<sup>1,2</sup> Almost 5% of children with severe  
7 asthma (SA) remain symptomatic despite high doses of inhaled corticosteroids (ICS) and other  
8 controllers.<sup>3</sup> Asthma has long been regarded as a type-2 (T2) disorder, but a dominant Th1 signature,  
9 with Th17 and Th2 cells in a mixed cytokine milieu, was recently described in bronchoalveolar lavages  
10 (BAL) from children with SA.<sup>4</sup> Moreover, among children with SA, cellular components such as IL-17-  
11 producing mucosal-associated invariant T cells may distinguish frequent (FE) from non-frequent  
12 exacerbators (nFE).<sup>5</sup> The inflammatory profiles of children with SA thus appear to be highly complex.  
13 We aimed to provide preliminary results to identify immune signatures associated with clinical  
14 phenotypes of SA.

15 Twenty children with SA were included (**supplementary material & table 1**) and their blood and BAL  
16 collected. FE (n=13) were defined as children with at least three severe exacerbations (SE) in the  
17 previous year and nFE (n=7) as those having one or two.<sup>5</sup> The two groups did not differ, except for the  
18 number of steroid bursts. Samples were also collected from control subjects with non-asthmatic (NA)  
19 severe respiratory conditions (n=10). Preliminary analysis i) confirmed a mixed T1/T2-type cellular  
20 profile in BAL (**figure 1A**), associated with blood eosinophilia (**table 1**), in children with SA relative to  
21 NA, and ii) showed the immune profile of FE to differ from that of nFE (T2 *versus* T1 phenotype;  
22 respectively, **figure 1B&C**). We then performed a comprehensive non-targeted analysis of cytokines  
23 and cells in blood and BAL from children with SA (**supplementary material**) and then constructed a  
24 model to distinguish FE from nFE through supervised analysis (PLS-DA) (**figure 2A**). The model classified  
25 patients with a good predictive value ( $R^2Y=0.799$ ), with both sensitivity and specificity of 100%.  
26 Although all data were used to construct the model, we identified a set of constituents that mostly  
27 supported the differences between the patient groups (**supplementary table 2**, VIP>1). In parallel, we  
28 performed univariate comparisons of each constituent (**supplementary table 2**). Finally, we identified  
29 11 immune constituents to be the most discriminative (PxVIP plotting, VIP>1 and  $p<0.1$ , **figure 2B**). A  
30 higher frequency of ILC1 and Th1-associated chemokines in BAL (CCL2/8, CXCL9-11, **figure 2C&D**)  
31 confirmed the more pronounced T1 phenotype in nFE. Conversely, the local T2 phenotype of FE was  
32 associated with a higher frequency of activated Th17 (IL22<sup>+</sup>) cells in the blood (**figure 2C**) that tended  
33 to correlate with the number of exacerbations ( $\rho=0.41$ ,  $p=0.08$ ). Previous studies found that the  
34 number of circulating Th17 cells was higher in children with moderate-to-severe than mild asthma,<sup>6</sup>

35 that these cells may be steroid resistant,<sup>7</sup> and that PBMC IL-17 secretion was induced by  
36 dexamethasone.<sup>8</sup> Th17 IL-22<sup>+</sup> cells may therefore emerge after repeated systemic steroid  
37 administration received to treat exacerbations, leading to a mixed T2/T17 phenotype. FE also exhibited  
38 lower concentrations of total IgA and higher concentrations of TWEAK, TNFSF14, and TSLP in plasma  
39 (**figure 2E**), and TSLP levels significantly correlated with the number of exacerbations ( $\rho=0.45$ ,  
40  $p=0.045$ ). This is consistent with previous studies showing the involvement of these individual  
41 constituents in the pathogenesis and severity of asthma in children. Plasma constituents, such as  
42 sTNFR1, CCL26, Pentraxin3, CXCL10, IL-32, and sIL16RB, were also highly discriminant, despite high p-  
43 values. All these constituents thus contributed to characterize the FE phenotype and univariate  
44 analysis alone would not have allowed their identification. For example, the T2 chemokine CCL26  
45 tended to be higher in FE and significantly correlated with blood eosinophil counts ( $\rho=0.432$ ,  $p=0.025$ ).  
46 CCL26 is a potent chemoattractant for eosinophils and elevated concentrations of CCL26 in plasma  
47 have been shown to be related to mucosal eosinophilia and the severity of various eosinophilic  
48 disorders (e.g.<sup>9</sup>), which may suggest tissue eosinophilia in FE.

49 In conclusion, despite a small sample size and ICS that may affect the immune response, our study  
50 shows the potential interest of high-dimensional/non-targeted multivariate analysis to identify specific  
51 biological signatures of children with different clinical phenotypes of SA. Although confirmation in an  
52 independent cohort is needed, our study provides new leads for delineating asthma pathogenesis and  
53 identifying new set of targets for diagnosis and personalized treatment.

54

#### 55 **Authors:**

56 Karine Adel-Patient<sup>1</sup>, PhD, Marta Grauso<sup>1</sup>, PhD, Rola Abou-Taam<sup>2</sup>, MD, Blanche Guillon<sup>1</sup>, MSc, Céline  
57 Dietrich<sup>3</sup>, MSc, François Machavoine<sup>3</sup>, MSc, Nicolas Garcelon<sup>4,5</sup>, PhD, Mélanie Briard<sup>1</sup>, Hassan Faour<sup>4,5</sup>,  
58 MSc, Antoine Neuraz<sup>4,5</sup>, MD, PhD, Christophe Delacourt<sup>2</sup>, MD, PhD, MSc, Thierry Jo Molina<sup>4,6</sup>, MD, PhD,  
59 Maria Leite-de-Moraes<sup>3</sup>, PhD, and Guillaume Lezmi<sup>2,3</sup>, MD, PhD

60

61 <sup>1</sup> Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé  
62 (DMTS), SPI, Laboratoire d'Immuno-Allergie Alimentaire, F-91191, Gif-sur-Yvette, France

63 <sup>2</sup> AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades, Service de Pneumologie et Allergologie Pédiatriques, F-  
64 75015, Paris, France.

65 <sup>3</sup> Université de Paris, Institut Necker Enfants Malades, Equipe Immunorégulation et  
66 Immunopathologie, Inserm UMR1151, CNRS UMR8253, F-75015, Paris, France.

67 <sup>4</sup> Université de Paris, UMRS 1138, INSERM, Sorbonne Paris-Cité, F-75006 Paris, France

68 <sup>5</sup>AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades, Service Informatique Médicale, F-75015 Paris, France

69 <sup>6</sup> AP-HP, Centre-Université de Paris, Hôpital Necker-Enfant-Malades, Service d'Anatomie et Cytologie  
70 Pathologiques, F-75015 Paris, France

71

72 **Corresponding authors:**

73 Karine Adel-Patient:

74 DRF/Institut Joliot/DMTS/SPI/Laboratoire d'Immuno-Allergie Alimentaire

75 CEA de Saclay, Bat 136

76 91191 Gif-sur-Yvette, France

77 [karine.adel-patient@cea.fr](mailto:karine.adel-patient@cea.fr)

78

79 Guillaume Lezmi:

80 Institut Necker-Enfants Malades, Laboratory of Immunoregulation and Immunopathology, CNRS

81 UMR8253 and INSERM UMR1151, Paris, France

82 [guillaume.lezmi@aphp.fr](mailto:guillaume.lezmi@aphp.fr)

83

84 **Author contributions:**

85 GL, KAP, and MLM: designed the research.

86 KAP, MG, BG, CDi, TM, MB, and FM: performed the research.

87 GL, RAT, NG, HF, AN, and CD: were responsible for patient recruitment or establishing the patient  
88 database.

89 KAP and GL: analyzed the data.

90 KAP, GL, and MLM: wrote the manuscript.

91

92 **Abbreviations:** BAL: bronchoalveolar lavage fluids, ICS: inhaled corticosteroids, NA: non-asthmatic,  
93 PLS-DA: partial least squares-discriminant analysis, SA: severe asthma, FE: frequent exacerbators, nFE:  
94 non-frequent exacerbators.

95

## 96 **Acknowledgements**

97 We thank Naima Cortes-Perez for her help in the experiments and all the patients involved in the study  
98 and their parents.

99

## 100 **Financial support**

101 This work was supported by the INRAE-AlimH Department and grants from the Legs Poix, Chancellerie  
102 des Universities, Paris, France, and ANR-18-CE14-0011-01 SevAsthma-children, Paris, France.

103

## 104 **Conflict of interests**

105 The authors have no conflict of interests to declare.

106

107

## 108 **Figure legends**

109

110 **Figure 1. Complex immune profile of children with different SA phenotypes. A.** Higher frequency of  
111 Th1 cells (trend for Th2) in BAL from children with SA (grey bars) than in that from non-asthmatic  
112 children with severe respiratory disorders (NA, white bars). **B.** The higher frequency of Th1 cells in BAL  
113 of children with SA relative to that in NA children (white bars) was significant only in non-frequent  
114 exacerbators (nFE, n=7; light grey). Conversely, the higher number of Th2 cells in BAL (**B**) and  
115 eosinophils in blood (**C**) was significant only in frequent exacerbators (FE, n=13; dark grey). Data are  
116 shown as box and Tukey whisker plots. P values were obtained using the Kruskal-Wallis test comparing  
117 all groups together.

118

119 **Figure 2. Identification of immune constituents that discriminate between SA children with frequent**  
120 **(FE) and non-frequent (nFE) exacerbations. A.** Graph of the individuals provided by PLS-DA modelling.  
121 **B.** VIP x p values plot of all measured immune constituents and selection of the most discriminating  
122 and significant (red rectangle: VIP>1 and p<0.1; because of the small number of patients in each group,  
123 we tolerated p<0.1 as a cut-off). Identified discriminant immune constituents within cellular (**C**) or  
124 soluble constituents in BAL (**D**) or plasma (**E**), represented as box and Tukey whisker plots. Exact p  
125 values (Mann Whitney test) are indicated.

126

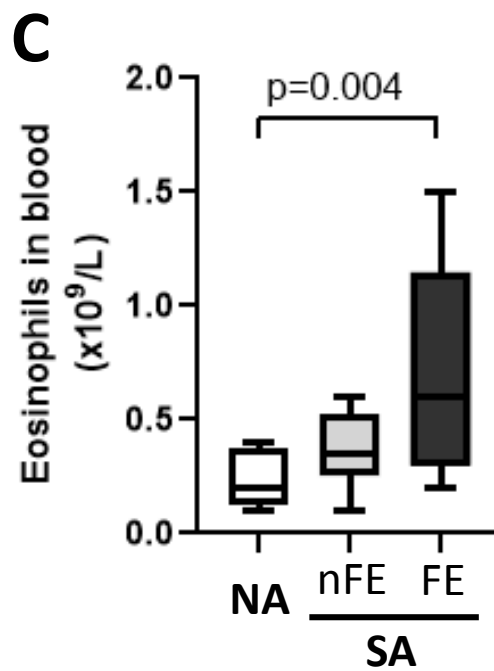
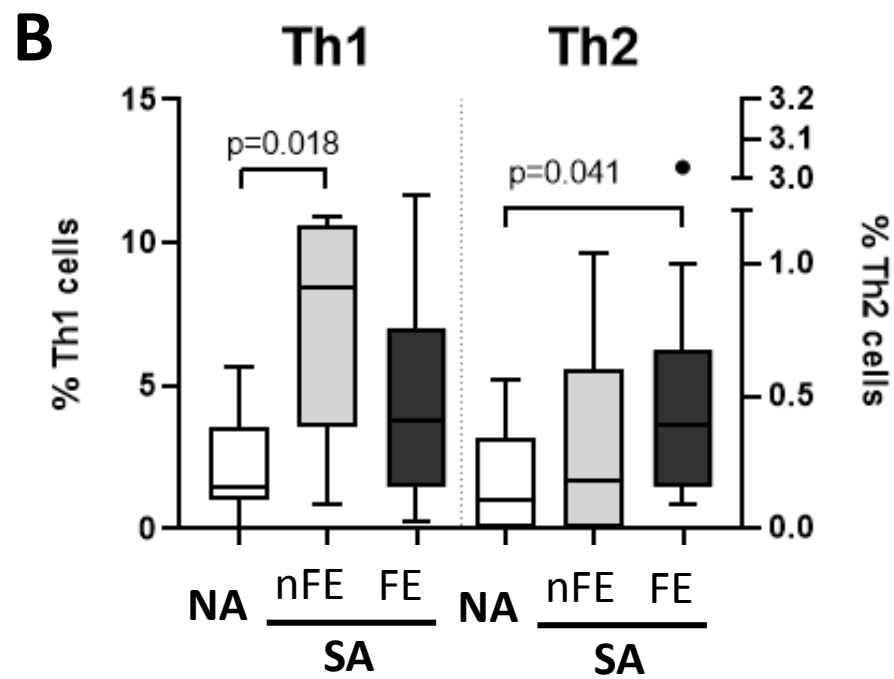
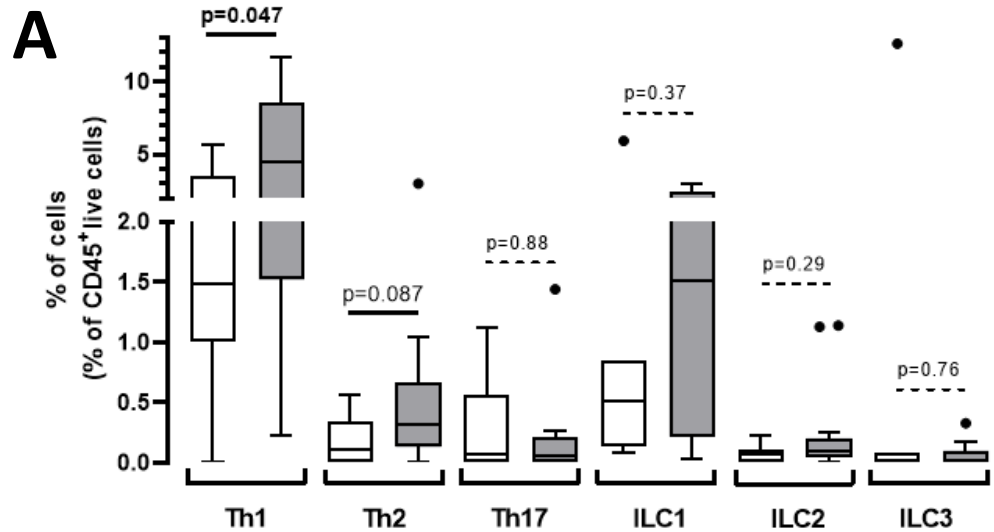
127



128 **References**

129

- 130 1. Lezmi G, de Blic J. Assessment of airway inflammation and remodeling in children with severe  
131 asthma: The next challenge. *Pediatric pulmonology*. 2018;53(9):1171-1173.
- 132 2. Kuruvilla ME, Lee FE, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms  
133 of Disease. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2019;56(2):219-233.
- 134 3. Chung KF, Wenzel S. From the authors: International European Respiratory Society/American  
135 Thoracic Society guidelines on severe asthma. *Eur Respir J*. 2014;44(5):1378-1379.
- 136 4. Wisniewski JA, Muehling LM, Eccles JD, et al. TH1 signatures are present in the lower airways  
137 of children with severe asthma, regardless of allergic status. *J Allergy Clin Immunol*.  
138 2018;141(6):2048-2060 e2013.
- 139 5. Lezmi G, Abou-Taam R, Garcelon N, et al. Evidence for a MAIT-17-high phenotype in children  
140 with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;144(6):1714-1716 e1716.
- 141 6. Chien JW, Lin CY, Yang KD, Lin CH, Kao JK, Tsai YG. Increased IL-17A secreting CD4+ T cells,  
142 serum IL-17 levels and exhaled nitric oxide are correlated with childhood asthma severity. *Clin*  
143 *Exp Allergy*. 2013;43(9):1018-1026.
- 144 7. Nagakumar P, Puttur F, Gregory LG, et al. Pulmonary type-2 innate lymphoid cells in paediatric  
145 severe asthma: phenotype and response to steroids. *Eur Respir J*. 2019;54(2).
- 146 8. Gupta A, Dimeloe S, Richards DF, et al. Defective IL-10 expression and in vitro steroid-induced  
147 IL-17A in paediatric severe therapy-resistant asthma. *Thorax*. 2014;69(6):508-515.
- 148 9. Yamada T, Miyabe Y, Ueki S, et al. Eotaxin-3 as a Plasma Biomarker for Mucosal Eosinophil  
149 Infiltration in Chronic Rhinosinusitis. *Front Immunol*. 2019;10:74.
- 150



# Figure 2

