



**HAL**  
open science

# Étude des microbiotes endogènes et exogènes de patients atteints de maladie respiratoire chronique

Louise-Eva Vandenberght

► **To cite this version:**

Louise-Eva Vandenberght. Étude des microbiotes endogènes et exogènes de patients atteints de maladie respiratoire chronique. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0410 . tel-03112231

**HAL Id: tel-03112231**

**<https://theses.hal.science/tel-03112231>**

Submitted on 16 Jan 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.

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE**

**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

SPÉCIALITÉ : MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

Par Louise-Eva VANDENBORGHT

---

**ÉTUDE DES MICROBIOTES ENDOGENES ET EXOGENES DE PATIENTS ATTEINTS DE  
MALADIE RESPIRATOIRE CHRONIQUE**

---

Sous la direction du Professeur Laurence DELHAES  
& l'encadrement du Docteur Stéphanie FERREIRA

Soutenue le 13 décembre 2019

Membres du jury :

M. BOUCHARA, Jean-Philippe	Professeur,	Université de Rennes	Président
Mme. BOTTEREL, Françoise	Professeur,	Université de Créteil	Rapporteur
Mme. MILLON, Laurence	Professeur,	Université de Franche-Comté	Rapporteur
Mme. FERREIRA, Stéphanie	Docteur,	Société GenoScreen, Lille	Invitée/Encadrante
M. BERGER, Patrick	Professeur,	Université de Bordeaux	Invité
Mme. DELHAES, Laurence	Professeur,	Université de Bordeaux	Directrice

## ETUDE DES MICROBIOTES ENDOGENES ET EXOGENES DE PATIENTS ATTEINTS DE MALADIE RESPIRATOIRE CHRONIQUE

Du pôle nord au fin fond des océans jusque dans l'atmosphère, des microorganismes, qui nous ont précédé pour certains il y a des milliards d'années, ont été identifiés. L'avènement des technologies de séquençage haut débit (NGS) a facilité la découverte et l'étude de ces communautés microbiennes issues de divers milieux, dont le corps humain. Ainsi, le corps humain apparaît composé de dix fois plus de microorganismes que de ses propres cellules. Le microbiote intestinal, de biomasse importante, est l'un des plus étudiés. En revanche, les études portant sur le microbiote pulmonaire n'en sont qu'à leurs prémices, en particuliers dans le cadre de maladies respiratoires chroniques (MRC). Alors que les poumons étaient jusque très récemment considérés comme stériles, ils s'avèrent être composés d'une communauté polymicrobienne constituée de bactéries, de virus, de phages et de micromycètes. Dans le cas des MRC, comme l'asthme et la mucoviscidose étudiés dans ce travail, la composition du microbiote pulmonaire déterminée par NGS semble corrélée à l'évolution clinique des patients.

Dans la mucoviscidose (maladie génétique la plus fréquente dans la population caucasienne) comme dans l'asthme (une pathologie multifactorielle attribuée à des facteurs environnementaux associés à une prédisposition génétique qui connaît une prévalence en constante augmentation), les modifications en abondance et diversité (ou dysbiose) des communautés bactériennes (microbiote endogène) sont bien documentées. Cependant, l'étude du mycobiote endogène (des communautés de micromycètes au niveau pulmonaire) reste beaucoup moins réalisée. En effet, cette étude du mycobiote présente des défis méthodologiques inhérents à sa très faible biomasse, mais aussi à la structure même de la paroi des champignons. De plus, peu d'informations existent sur les relations entre ce microbiote pulmonaire endogène et celui de l'environnement immédiat des patients (microbiote exogène ou exposome), alors que cet exposome microbien en particulier fongique représente un facteur de risque connu de développement d'une MRC. L'étude de l'exposome microbien présente un challenge méthodologique, en termes d'échantillonnage et de caractérisation des communautés microbiennes qui sont aussi de faible biomasse.

L'objectif de ce travail était dans un premier temps d'optimiser l'analyse du mycobiote, à partir de communautés artificielles de micromycètes depuis l'étape d'extraction jusqu'à la sélection des cibles les plus efficaces pour une approche de métagénomique ciblée appliquée à l'étude du mycobiote dans la mucoviscidose et l'asthme. Concernant l'étude de l'exposome microbien, l'évaluation d'un dispositif de recueil des microorganismes présents dans l'environnement intérieur des patients a fait l'objet d'un développement durant ce travail de thèse ; ceci afin de mettre à disposition de la communauté scientifique un outil optimisé et standardisé. Dans un second temps, les microbiotes et mycobiotes endogènes de patients atteints de mucoviscidose, caractérisés par NGS ont été analysés en prenant en compte l'état clinique des patients, notamment l'existence d'une exacerbation pulmonaire. En s'intéressant aux interactions interrègnes entre les bactéries et les micromycètes identifiés chez ces patients, des corrélations impliquant des genres fongiques connus comme pathogènes et pouvant être responsable de colonisation et/ou infections tel qu'*Aspergillus*, *Scedosporium* et *Candida* ont été mises en évidence. Ceci a permis pour la première fois de confirmer (à partir de nos données expérimentales) la place du mycobiome endogène dans le modèle écologique « *Climax/Attack* » adapté à la mucoviscidose. Dans un troisième temps, notre travail s'est concentré sur la composante microbienne de l'exposome de l'air intérieur de patients asthmatiques (myco-microbiote exogène, exposome microbien). Cette étude nous a permis d'associer les profils environnementaux analysés par NGS à l'état clinique des patients et à leurs myco-microbiote endogènes (obtenus à partir d'expectorations induites). Le recueil de l'exposome microbien et l'analyse méthodologique ont été effectués grâce au dépôt d'un piège à poussière durant 10 semaines, selon les protocoles publiés. La diversité et la composition du myco-microbiote de l'exposome de patients asthmatiques ont été associées à leur état inflammatoire (notamment à leur taux de FeNo). Cette étude a aussi révélé une proportion plus importante de taxons communs entre les mycobiotes endogènes et exogènes chez les patients en cours d'exacerbation au moment du recueil de l'expectoration. Ces résultats illustrent l'importance de considérer l'exposition microbienne dans la prise en charge tant préventive que curative des patients asthmatiques. Ainsi, l'ensemble de ces résultats permet une meilleure compréhension des communautés microbiennes au niveau pulmonaire et de leurs modulations dans un contexte de MRC. En prenant en considération les interactions bactéries-micromycètes ainsi que l'impact de l'exposome microbien sur l'état clinique des patients, nous avons contribué à mieux décrire les conditions physiopathologiques existantes chez ces patients, sensibles aux colonisations et/ou infections microbiennes.

**Mots clefs :** Microbiote, Mycobiote, Séquençage Haut-débit, Asthme, Air intérieur, Mucoviscidose

## ASSESSMENT OF ENDOGENOUS AND EXOGENOUS MICROBIOTAS OF PATIENTS WITH CHRONIC RESPIRATORY DISEASE

The microorganisms, some of which preceded us billions of years ago, have been identified from the North Pole to the bottom of the ocean until in the atmosphere. The advent of High Throughput Sequencing (HTS) technologies has facilitated the discovery and study of these microbial communities, including the human body. Thus, the human body appears to be composed of ten times more microorganisms than its own cells. Notably, the intestinal microbiota is one of the most investigated; it is composed of a significant biomass. In contrast, studies on the pulmonary microbiota are only in their early stages, particularly in the context of chronic respiratory diseases (CRD). While until recently lungs were considered as sterile organs, they are now found to be composed of a poly-microbial community of bacteria, viruses, phages and fungi. In the case of CRD, such as asthma and cystic fibrosis studied in this PhD work, the composition of the pulmonary microbiota determined by NGS appears to correlate with the clinical course of the patients.

In cystic fibrosis (the most common genetic disease in the Caucasian population) and asthma (a multifactorial disease attributed to environmental factors associated with a genetic predisposition which knows a constantly increasing prevalence), changes in abundance and diversity (known as dysbiosis) of bacterial communities (endogenous microbiota) are well documented. However, the study of endogenous mycobiota (fungal community that resides into the lungs) remains much less investigated. Indeed, it presents methodological challenges inherent to its very low biomass, but also to the structure of fungi wall. In addition, very few information exists on the relationship between the endogenous pulmonary microbiota of patients and the corresponding indoor environment (or exogenous microbiota), whereas this specific fungal exposure represents a known risk factor for the development of a CRD. The study of such microbial exposome also presents methodological challenges, in terms of sampling and characterization of the microbial communities that are also of low biomass.

The main objective of this work was initially to optimize mycobiota analysis, using an artificial fungal community from the extraction steps to the selection of the most efficient fungal targets to perform targeted metagenomics in cystic fibrosis and asthma context. Concerning the study of the microbial exposome, the evaluation of a device for the collection of microorganisms present in the patient's indoor environment was developed during this work in order to provide an optimized, standardized, and scientifically relevant tool.

Secondly, the NGS characterization of endogenous microbiota and mycobiota of cystic fibrosis patients was investigated by taking into account their clinical state, in particular the existence of a pulmonary exacerbation. Correlations involving fungal genera known to be medically relevant such as *Aspergillus*, *Scedosporium* and *Candida* have been identified by focusing on the inter-kingdom network between bacteria and fungi identified in patients. It allowed us to confirm (from our experimental data) the role of the endogenous mycobiota in the ecological model "Climax / Attack" adapted to cystic fibrosis.

Finally, our work focused on the microbial component of microbial exposure of indoor air in asthmatic patients (exogenous myco-microbiota, microbial exposure). This study allowed us to associate the environmental NGS profiles with the clinical state of patients and their endogenous myco-microbiota (obtained from induced sputum). The sampling of the environmental exposome was carried out thanks to the deposit of an electrostatic dust collector during 10 weeks according to the published protocols. The diversity and composition of the myco-microbiota exposomes of asthmatic patients has been associated with their inflammatory states (including FeNo levels). This study also revealed a higher proportion of common taxon between endogenous and exogenous mycobiotas in the patients undergoing exacerbation at the time of sputum sampling. These results illustrate the importance of considering microbial exposure in both preventive and curative management of asthmatic patients. Overall, these results provide a better understanding of the microbial communities at the respiratory site and their modulations in a CRD context.

Taking into account the inter-kingdom network as well as the impact of the microbial exposome, we have contributed to a better understanding of the physio-pathological lung conditions of these patients with CRD, which are susceptible to colonization and/or microbial infections.

**Key words:** Microbiota, Mycobiota, Deep-sequencing, Asthma, Indoor air, Cystic fibrosis

*A Pierre Gavin,*

# Remerciements

Mes premiers remerciements vont à mes deux encadrantes de thèse Laurence Delhaes et Stéphanie Ferreira qui m'ont soutenue et fait confiance tout au long de ce travail. Laurence était toujours réactive et disponible et m'a beaucoup appris sur le plan organisationnel et rédactionnel. Mes séjours à Bordeaux n'auraient pas été aussi agréables sans son hospitalité et ses chaleureux dîners. Stéphanie m'avait déjà encadrée lors de mon stage de fin de master, puis m'a permis d'intégrer son équipe de R&D depuis déjà quelques années. Nos interactions ont toujours été propices à la rigueur professionnelle, mais aussi à l'accomplissement personnel. Je lui en suis infiniment reconnaissante.

Je remercie également la société GenoScreen, son directeur André Tordeux pour m'avoir accompagnée dans cet engagement de trois ans, ainsi que pour sa confiance et ses encouragements. Les conditions qui m'ont été données durant ces trois années ont été propices à l'accomplissement de ce travail, je lui en suis reconnaissante.

Je remercie Patrick Berger de m'avoir accueillie au sein de son équipe INSERM U1045, et pour nos riches échanges.

Je remercie les membres du jury à mi-parcours, Laurence Millon et Thierry Schaefferbeke pour leurs précieux conseils, ainsi que Françoise Botterel, Laurence Millon et Jean-Philippe Bouchara pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Ce travail n'aurait pas été aussi agréable si je n'avais pas pu échanger avec Noémie Coron et Raphaël Enaud sur nos travaux réalisés ensemble.

Je remercie David Robil qui a effectué son stage de fin de master à GenoScreen, et sans qui le contenu de cette thèse aurait été moins complet. C'est un plaisir pour moi de continuer ensemble nos travaux en cours. Je remercie Alix Simon, en stage aussi cette année à GenoScreen, qui a pu m'aider à me simplifier les statistiques sous R.

Je remercie l'équipe de l'ISPED de Bordeaux, Marta Avalos, Perrine Soret et Thibaud Alin pour le travail réalisé ensemble ; Thibaud, pour avoir effectué ce travail considérable qui révèle des pistes fort intéressantes pour la suite de nos projets.

Je remercie le professeur Jean-Pierre Gangneux, le professeur Françoise Botterel et le docteur Cécile Angebault pour les projets collaboratifs qui ont grandement contribué à ce travail de thèse.

Je remercie les personnes du Centre d'Investigation Clinique Plurithématique de l'unité de pneumologie de l'Hôpital Haut-Lévêque de Bordeaux concernées par le recueil des données cliniques des patients de la cohorte COBRA pour leur contribution.

Je tiens à remercier vivement l'ensemble de mes collègues de GenoScreen :

Charlotte Urien avec qui je partage mon bureau, mes humeurs, ses imitations, son humour, ses précieux conseils et ses relectures ; Céline Wahl pour son aide et son écoute depuis toutes ces années; Audrey Serra qui a su m'aider dans mon travail à de multiples reprises ; Stéphane Nion et Geoffrey Vauvy pour les pauses distrayantes ; Alexia Houzet pour l'organisation des déplacements et plein d'autres choses ; Nicole Lambelin, Nathalie Adèle-dit-Renseville, Marie Clément, Alice Ferré, Eloïse Defevère, Frédérique De Matos, Antoine Destombes, Agathe Jouet et Gaël Bisch.

Merci à tous les autres GenoScreeniens (passés et présents) qui ont fait de mon quotidien des moments très agréables.

Je remercie l'ensemble des membres des équipes du CRCTB pour leur accueil : Juliette, Hannah, Laure-Anne, Renaud, Alexis, Edmée, Ophélie, Fabien, Pauline, Florence, Paul, Elise, Isabelle, Thomas, Armelle, Céline et Marilyne.

Merci Juliette pour la découverte des pizzas des frères, la VM, tes conseils, ton aide et les très bons moments passés à Bordeaux. Merci Hannah pour ta bonne humeur et les dîners très sympathiques.

Un grand merci à mes amis :

Margot et Etienne, nos moments bordelais seront de très bons souvenirs.

Elo, Andy, Camille, Fabrice, Babeth, Julie, Madou, Louison, Aude, Quentin, Emilie, Simon, Geoffrey, Antho, Arnaud, Romain, Maud, Marion, Thomas, Benjamin et les autres.

La Saint Eloi's family : notre rencontre est un cadeau, nos apéros un eldorado.

Un grand merci à mes familles :

Delahousse, Rameau et Vandendorgh : Quelle joie de grandir avec vous.

Merci Pierre pour nos aventures passées, et à venir.

# SOMMAIRE



<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>4</b>
<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES FIGURES &amp; TABLEAUX.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>13</b>
<b>VALORISATIONS SCIENTIFIQUES &amp; FORMATIONS.....</b>	<b>15</b>
<b>CONTEXTE.....</b>	<b>19</b>
<b>CHAPITRE 1 – INTRODUCTION &amp; GENERALITES.....</b>	<b>21</b>
<b>I. Les maladies respiratoires chroniques (MRC).....</b>	<b>22</b>
1. Généralités et Epidémiologie .....	22
A. Mucoviscidose .....	22
B. Asthme .....	24
2. Symptômes, diagnostics et prise en charge thérapeutique .....	25
A. Mucoviscidose : symptômes, diagnostic et traitement .....	25
B. Asthme : symptômes, diagnostic et traitement.....	26
3. Le mycobiotte et microbiote respiratoire dit « endogène » .....	30
A. Méthodologie d’analyse : de l’échantillonnage au séquençage .....	31
B. Microbiote et mycobiotte pulmonaire de l’individu sain .....	36
C. Microbiote et mycobiotte dans les MRC .....	38
<b>II. L’exposome microbien de l’environnement intérieur .....</b>	<b>44</b>
1. L’exposome microbien de l’air intérieur .....	45
A. Méthodologie d’analyse : de l’échantillonnage à l’analyse NGS.....	45
B. Le myco-microbiote de l’air intérieur dit « exogène » .....	47
2. L’impact de l’exposome microbien sur l’état de santé de patients atteints de MRC .....	50
A. Mucoviscidose .....	52
B. Asthme .....	52
<b>III. Revue : “From culturomics to metagenomics : Clinical relevance of the mycobiome” L-E.Vandenborgh and al. 2019 .....</b>	<b>55</b>
1. Résumé : .....	55
2. Plan du chapitre.....	55
<b>HYPOTHESE DE TRAVAIL.....</b>	<b>56</b>
<b>CHAPITRE 2 - MATERIELS &amp; METHODES.....</b>	<b>58</b>
<b>I. Optimisation du protocole d’extraction .....</b>	<b>59</b>
1. Création d’un mock à partir de spores de champignons .....	59

A.	Culture des souches fongiques.....	59
B.	Préparation d'un mock fongique.....	60
1.	Extraction à partir de kits de références et tampon de lyse GenoScreen.....	60
A.	Kits de références.....	61
B.	Tampon de lyse GenoScreen.....	61
C.	Différents protocoles de lyses avec le tampon GenoScreen.....	62
<b>II.</b>	<b>Sélections de la cible fongique .....</b>	<b>63</b>
1.	Les couples d'amorces ITS2.....	63
2.	Mock et échantillons biologiques.....	63
<b>III.</b>	<b>Séquençage NGS et analyse .....</b>	<b>64</b>
1.	Dosage des ADN extraits .....	64
2.	Préparation des bibliothèques de séquençage .....	64
3.	Séquençage NGS.....	64
4.	Analyse bio-informatique des données NGS.....	65
A.	Pre-processing.....	65
B.	Processing.....	65
C.	L' $\alpha$ -diversité.....	65
D.	La $\beta$ -diversité .....	65
E.	Analyses statistiques .....	66
<b>IV.</b>	<b>Développement d'un dispositif de recueil de l'exposome microbien .....</b>	<b>67</b>
1.	Le dispositif de recueil de l'exposome microbien .....	67
A.	Version publiée.....	67
B.	Développement du prototype (lingette et capotage).....	68
2.	Analyse de l'exposome microbien.....	70
A.	Du culottage à l'extraction .....	70
B.	Séquençage et analyse .....	71
C.	Quantification de la biomasse fongique.....	71
<b>CHAPITRE 3 - RESULTATS.....</b>		<b>72</b>
<b>I.</b>	<b>Optimisation de l'analyse du mycobiote et développement d'un dispositif de recueil de l'exposome microbien .....</b>	<b>73</b>
1.	Contexte .....	73
2.	Principaux résultats .....	75
A.	Analyse du mycobiote : Optimisation de l'étape d'extraction et comparaison de différents couples d'amorces.....	75
B.	Dispositif de recueil de l'exposome microbien .....	81
<b>II.</b>	<b>Le mycobiote et microbiote endogène dans la mucoviscidose .....</b>	<b>87</b>

1.	Contexte .....	87
2.	Principaux résultats .....	88
3.	Article .....	89
<b>III.</b>	<b>Les mycobiotés et microbiotes endogènes et exogènes de patients asthmatiques .....</b>	<b>90</b>
1.	Contexte .....	90
2.	Principaux résultats .....	91
3.	Article .....	92

#### **CHAPITRE 4 - DISCUSSION GENERALE..... 93**

<b>I.</b>	<b>Positionnement des choix méthodologiques au vu des données de la littérature.....</b>	<b>94</b>
<b>II.</b>	<b>Mycobioté et microbiote respiratoire des patients atteints de MRC et évolution clinique</b>	<b>97</b>
<b>III.</b>	<b>Relation entre exposome microbien, mycobioté-microbiote respiratoire et hôte.....</b>	<b>100</b>

#### **CHAPITRE 5 - CONCLUSION & PERSPECTIVES.....103**

#### **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....106**

#### **ANNEXES.....116**

Annexe 1.....	117
Annexe 2.....	118
Annexe 3.....	119
Annexe 4.....	120

**Annexe 1** : Poster du projet "Biota-in-ATCF" "*A metagenomic and whole genome sequencing comparative approach to study the impact of azole therapy on chronic colonization with *Aspergillus fumigatus* during cystic fibrosis*". Gangneux J-P, Vandenborgh L-E, Belleguic H, Guegan H, Bouchara J-P, Cuomo C, Delhaes L, Papon N.

**Annexe 2** : Publication "*A European ECMM-ESCMID survey on goals and practices for mycobiota characterization using Next Generation Sequencing*". Gangneux J-P., Guegan H., Vandenborgh L-E., Buffet-Bataillon S., Enaud R., Delhaes L.; for the ECMM-ESCMID NGS study group. *Mycoses*, 9 septembre 2019, <https://doi.org/10.1111/myc.12999>.

**Annexe 3** : Poster « Caractéristique du mycobioté et du microbiote respiratoire dans la mucoviscidose : Importance du dialogue interrègne lors d'un phénomène d'exacerbation ». Vandenborgh L-E., Soret P., Coron N., Enaud R., Francis F., Schaeverbeke T., Berger P., Fayon M., Thiebaut R., Delhaes L.

**Annexe 4** : Poster "*Long-term monitoring of indoor air microbiome in dwellings: can we predict asthma exacerbation?*" Vandenborgh L-E., Coron N., Enaud R., Urien C., Girodet P-O., Berger P., Ferreira S., Delhaes L.

**LISTE DES FIGURES**

**&**

**TABLEAUX**

## Liste des figures

Figure 1: Carte géographique de l'incidence de la mucoviscidose d'après l'OMS .....	23
Figure 2: Prévalence de l'asthme au niveau mondial.....	24
Figure 3 : Voies inflammatoires de Th2 dans l'asthme.. .....	28
Figure 4 : Volumes pulmonaires mesurables par spirométrie et pléthysmographie.....	29
Figure 5 : Organisation structurale de la paroi de six espèces de champignons pathogènes.....	32
Figure 6 : Représentation schématique de l'opéron d'ARNr. ....	33
Figure 7 : Représentation schématique du séquençage Illumina. . . . .	35
Figure 8 : (A) Les connexions anatomiques entre les poumons, l'estomac et les cavités orales et nasales permettent le mouvement des microorganismes entre ces différents sites. (B) Implémentation du modèle écologique de dispersion neutre pour l'analyse des communautés microbiennes. ....	37
Figure 9 : Le microbiote pulmonaire chez le sujet sain versus sujet malade.....	39
Figure 10 : Modèle « Climax-Attack » appliqué au myco-microbiote pulmonaire dans la mucoviscidose.....	41
Figure 11 : Caractérisation de l'exposome.....	44
Figure 12 : Analyse en composante principale (ACP) des communautés bactériennes (A) et des communautés fongiques (B) de l'air intérieur (bleu) et de l'air extérieur (rouge) de 5 garderies (sites A à E, rond) et 5 école élémentaires (sites F à J, triangle) à Séoul en Corée du Sud.....	49
Figure 13 : Sources de l'exposome bactérien de l'air intérieur.....	50
Figure 14 : Dépôt pulmonaire de particules inhalées et mode de séparation dans les poumons d'un individu sain.....	51
Figure 15 : Plan expérimental des comparaisons des kits d'extraction fournisseurs, du tampon de lyse GenoScreen et de l'impact des différentes méthodes de lyse à partir d'aliquots de mock fongiques... ..	62
Figure 16 : Version publiée et utilisée comme référence du capteur électrostatique de poussières en position fermée .....	67
Figure 17 : Plan expérimental des comparaisons des différents textiles en fonction des temps d'exposition, de l'autoclave, et de deux contrôles : positifs où les lingettes ont été inoculées à partir d'un mock fongique et négatifs où les lingettes autoclavées n'ont pas été exposées.....	69
Figure 18 : Prototype de capotage imaginé par le cabinet de design pour le dispositif de recueil de l'exposome microbien. ....	70
Figure 19 : Résultats de l'enquête internationale réalisée sur les études mycobiote en s'intéressant (A) aux sites ciblés et (B) aux types d'échantillons analysés.....	74
Figure 20 : Représentation en histogramme des proportions théoriques de chaque souche fongique à l'espèce (A), et au genre (B) de la communauté artificielle fongique (mock fongique).....	75
Figure 21 : Rendement de la PCR sur les communautés artificielles de micromycètes en fonction des amorces spécifiques.....	76
Figure 22 : Box plot de l'indice de Shannon (A) en fonction des différents protocoles d'extraction (où chaque condition compile les résultats à partir des 8 couples d'amorces ITS2), (B) et en fonction des neuf couples	

d'amorces ITS2 (où pour chaque couple d'amorce a été cumulé les données des différents protocoles d'extraction. ....	77
Figure 23 : Heatmap des abondances relatives des genres du mock fongique en fonction des différents protocoles d'extraction et de la communauté fongique théorique.....	78
Figure 24 : Représentation en histogramme des abondances relatives des affiliations « basses » (s'arrêtant au règne ou au phylum) des échantillons biologiques (de selle, à gauche ; de sol, à droite) amplifiés à partir des 8 couples d'amorces. ....	79
Figure 25 : Représentation en dendrogramme des indices de Bray-Curtis (BC) de l'échantillon de selle (en haut) et de l'échantillon de sol (en bas) à partir des six couples d'amorces comparés (C1 à C6).. ....	80
Figure 26 : Représentation en histogramme des proportions de séquences humaines pour les couples d'amorce 1 et 3 pour l'ensemble des échantillons du projet « Biota-in-ATCF ». ....	80
Figure 27 : Représentation de la biomasse fongique (A), de la diversité $\alpha$ (B) et $\beta$ (C) des contrôles négatifs et des textiles exposés.....	82
Figure 28 : Représentation des différents temps d'exposition (4, 7 et 10 semaines).....	84
Figure 29 : Représentation par ACP de la diversité $\beta$ (l'indice de Bray-Curtis) des textiles exposés 4, 7 et 10 semaines.....	84
Figure 30 : Représentation de la diversité $\alpha$ (A) et de la diversité $\beta$ (B) des textiles exposés 10 semaines autoclavés ou non-autoclavés.....	85
Figure 31 : Représentation des différents textiles (réfèrent et nouveaux) en fonction de leur biomasse fongique (A) de la diversité $\alpha$ (B), et $\beta$ (C). ....	86
Figure 32 : Adaptation du modèle « Climax-Attack » décrit chez les patients atteints de mucoviscidose à partir de nos résultats .....	99
Figure 33 : Schéma récapitulatif inspiré de la revue Vandenberg et al.2019 (traduction en français). ....	101

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des souches fongiques cultivées, de leurs milieux de culture et concentration de leurs inocula préparés à partir des cultures.....	60
Tableau 2 : Dix couples ITS2 formés à partir de 5 amorces forward et 2 amorces reverse .....	63/76

**LISTE  
DES  
ABREVIATIONS**

ABPA	Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique
ADNg/ADNc	Acide Désoxyribonucléique génomique / complémentaire
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
BPCO	Bronchopneumopathie Chronique Obstructive
CETI	Centre Européen des Textiles Innovants
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
COBRA	The COhort of BRonchial obstruction and Asthma
CPT	Capacité Pulmonaire Totale
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
DTT	Dithiothréitol
ECMM	<i>European Confederation of Medical Mycology</i>
EDC	<i>Electrostatic Dust Collector</i>
EDTA	Ethylènediaminetétraacétique
EFR	Exploration Fonctionnelle Respiratoire
ERS	European Respiratory Society
ESCMID	<i>European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i>
FeNO	Fraction exhalée du NO
GINA	Global Initiative for Asthma
IgE	Immunoglobuline E
IL	Interleukine
IS	Inocula de spores
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
KAMYRE	Kit d'Analyse du MYcobiote /microbiote Respiratoire et Environnemental
LBA	Lavage Bronchoalvéolaire
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight</i>
MDS	<i>Multidimensional scaling</i>
MRC	Maladie Respiratoire Chronique
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NMDS	<i>Non-metric multidimensional scaling</i>
NO	Monoxyde d'azote
OMS/WHO	Organisation Mondiale de la Santé / <i>World Health Organization</i>
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i>
PAMPS	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PCA	Analyse en composante principale
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
qPCR	Quantitative <i>Polymerase Chain Reaction</i>
SATT	Sociétés d'Accélération du transfert de Technologies
TSLP	<i>Thymic Stromal Lymphopoietin</i>
VEMS	Volume Expiratoire Maximal par Seconde
VR	Volume Résiduel

°C : degré Celsius	mmol/L : milli-mol par litre
cm : centimètre	pb : paire de base
g : Force relative de centrifugation	pg : pico-gramme
Hz : Hertz	ppb : <i>part per billion</i>
m <sup>2</sup> : mètre carré	rpm : <i>revolution per minute</i>
min : minute	µl : micro-litre
mL : milli-litre	µm : micro-mètre



**VALORISATIONS  
SCIENTIFIQUES  
&  
FORMATIONS**

## VALORISATIONS SCIENTIFIQUES

### Publications

#### Articles :

- ✓ “Respiratory mycobiome and suggestion of inter-kingdom network during acute pulmonary exacerbation in cystic fibrosis”. **Vandenborgh L-E.**, Soret P., Francis F., Coron N., Enaud R., Avalos M., Schaeverbeke T., Berger P., Fayon M., Thiebaut R., Delhaes L. Scientific Reports. **Accepté dans Scientific Reports** (reference SREP-18-47814C)
- ✓ “Patients with type 2 severe asthma are exposed to different indoor mycobiota and microbiota”. **Vandenborgh L-E.**, Enaud R., Urien C., Coron N., Girodet P-O., Ferreira S., Berger P., Delhaes L.  
**En finalisation de rédaction**
- ✓ “A European ECMM-ESCMID survey on goals and practices for mycobiota characterization using Next Generation Sequencing”. Gangneux J-P., Guegan H., **Vandenborgh L-E.**, Buffet-Bataillon S., Enaud R., Delhaes L.; for the ECMM-ESCMID NGS study group. Mycoses, 9 septembre 2019, <https://doi.org/10.1111/myc.12999>.

#### Revues :

- ✓ “From culturomics to metagenomics: clinical relevance of the mycobiome”. **Vandenborgh L-E.**, Enaud R., Coron N., Denning D., Delhaes L. Chapter 6. The Lung Microbiome. Michael J. Cox, Markus J. Ege, et Erika von Mutius, The Lung Microbiome, vol. 83 (European Respiratory Society, 2019, <https://doi.org/10.1183/2312508X.erm8319>).
- ✓ “The Mycobiome: A Neglected Component in the Microbiota-Gut-Brain Axis”. Enaud R., **Vandenborgh L-E.**, Coron N., Bazin T., Prevel R., Schaeverbeke T., Berger P., Fayon M., Lamireau T., Delhaes L. Microorganisms 6, no 1 (9 mars 2018), <https://doi.org/10.3390/microorganisms6010022>.

### Congrès

#### Nationaux :

- ✓ Adebitech : La QAI enjeu majeure de santé publique, Romainville 27 et 28 juin 2017.
- ✓ Congrès annuel des Sociétés Françaises de Mycologie Médicale et Parasitologie (SFMM/SFP), Nice du 16 au 19 mai 2018. **POSTER** « Caractéristique du mycobiotte et du microbiote respiratoire dans la mucoviscidose : Importance du dialogue interrègne lors d'un phénomène d'exacerbation. » Vandenborgh L-E., Soret P., Coron N., Enaud R., Francis F., Schaeverbeke T., Berger P., Fayon M., Thiebaut R., Delhaes L.

- ✓ AdebioTech : Les microbiotes et la santé humaine, animale et environnementale : Prévention et traitements du futur, Romainville 19 et 20 juin 2018. **PRESENTATION ORALE** flash poster 5 min « Caractéristiques du mycobiotote et microbiote respiratoire dans la mucoviscidose : Importance du dialogue interrègne lors d'un phénomène d'exacerbation » Vandeborghht L-E., Soret P., Coron N., Enaud R., Francis F., Schaeveerbeke T., Berger P., Fayon M., Thiebaut R., Delhaes L.

#### Internationaux :

- ✓ ISM (International Society of Microbiota), Porto, Portugal du 28 au 30 octobre 2018. **POSTER** "Characterization of the respiratory mycobiotome and microbiome in cystic fibrosis: first evidence for inter-kingdom network" **Vandeborghht L-E.**, Soret P., Coron N., Enaud R., Ferreira S., Delhaes L.
- ✓ ECCMID (29<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease), Amsterdam, Pays-Bas du 13 au 16 Avril 2019.  
**POSTER 1** : "Assessment of Endogenous (pulmonary) and Exogenous (indoor exposure) Microbiota in Asthma" **Vandeborghht L-E.**, Coron N., Enaud R., Urien C., Girodet P-O., Berger P., Ferreira S., Delhaes L.  
**POSTER 2** : "An ECMM-ESCMID survey on goals and practices for mycobiotota characterization using Next Generation Sequencing in European laboratories" JP Gangneux, H Guegan, **LE Vandeborghht**, S Buffet-Bataillon, R Enaud, L Delhaes for the ESGHAMI-EFISG (ESCMID) and ECMM NGS study group.
- ✓ FEMS (8<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists), Glasgow, Ecosse du 7 au 11 Juillet 2019.  
**POSTER** "Long-term monitoring of indoor air microbiome in dwellings: can we predict asthma exacerbation?" **Vandeborghht L-E.**, Coron N., Enaud R., Urien C., Girodet P-O., Berger P., Ferreira S., Delhaes L.

#### Autres évènements :

- ✓ Myco-Microbiome Lab Meeting & club BnB (Hôpital Pellegrin) Bordeaux le 3 et 12 avril 2018. **PRESENTATION ORALE** « Approche NGS dans l'exploration des flores fongiques et bactériennes pulmonaire. Exemple de la mucoviscidose » Vandeborghht L-E., Delhaes L.
- ✓ Journée de l'école doctorale de Bordeaux (18<sup>th</sup> doctoral school of Health and Life Sciences Day), Talence 18 avril 2018. **POSTER** « Caractéristique du mycobiotote et du microbiote respiratoire dans la mucoviscidose : Importance du dialogue interrègne lors d'un phénomène d'exacerbation. » Vandeborghht L-E., Soret P., Coron N., Enaud R., Francis F., Schaeveerbeke T., Berger P., Fayon M., Thiebaut R., Delhaes L.
- ✓ Journée thématique des étudiants de l'Ecole Santé Sciences : Le microbiote, Bordeaux le 2 mars 2019. **PRESENTATION ORALE en anglais** "The Role of the Exposome in Asthma Exogenous (indoor air) and Endogenous (pulmonary) Microbiota" Vandeborghht L-E., Delhaes L.

## FORMATIONS

- ✓ Gérer facilement ses références bibliographiques avec Zotero, 26 Janvier 2018, URFIST de Bordeaux
- ✓ Analyse statistique et création de graphiques avec Stat R : initiation, 29 et 30 Janvier 2018, URFIST de Bordeaux
- ✓ Formation en communication en anglais (Ecsplcrite) – 20h, Septembre 2018 à Mai 2019, par téléphone

# CONTEXTE

Jusqu'à très récemment, les voies aériennes inférieures étaient considérées comme stériles, mais l'avènement des techniques de séquençage haut-débit (NGS) a permis de mettre en évidence une flore poly-microbienne bactérienne, fongique et/ou virale constituant le microbiome, mycobiome, ou virome respiratoires.

En parallèle, la fonction respiratoire représente un enjeu majeur en matière de santé publique. En effet, les troubles respiratoires sont le 1<sup>er</sup> motif de consultation dans le monde. La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) représentera la 4<sup>ème</sup> cause de décès dans le monde en 2030 (selon les données de l'Organisation Mondiale de la Santé ou OMS). La prévalence de l'asthme est en constante augmentation et la mucoviscidose reste la maladie génétique la plus fréquente dans la population caucasienne. Or cette flore poly-microbienne semble jouer un rôle dans la genèse et l'évolution de ces maladies respiratoires chroniques (ou MRC). C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressées à caractériser par NGS les mycobiotés et microbiotes endogènes et exogènes (de l'environnement immédiat) des patients atteints de mucoviscidose ou d'asthme.

# **CHAPITRE 1**

## **INTRODUCTION ET GENERALITES**

# I. LES MALADIES RESPIRATOIRES CHRONIQUES (MRC)

Les voies respiratoires sont la principale voie d'entrée de l'air dans l'organisme, de l'extérieur du corps jusqu'aux poumons. On distingue les voies respiratoires supérieures (extra-thoraciques) des voies respiratoires inférieures (intra-thoraciques). Les voies supérieures sont constituées des fosses nasales, de la bouche, du pharynx et du larynx. Elles ont le rôle de conduction en permettant l'humidification, la filtration, le réglage de la température de l'air inspiré et le transport de l'oxygène vers les poumons. Elles sont aussi le siège de l'olfaction et de la phonation. Les voies inférieures sont quant à elles une zone de conduction (composée de la trachée, des bronches et bronchioles), associée à une zone d'échanges gazeux, des poumons aux alvéoles pulmonaires.

Aujourd'hui, des centaines de millions de personnes dans le monde souffrent d'atteintes chroniques des voies respiratoires. En France, une maladie chronique est définie par le ministère en charge de la santé comme « une maladie de longue durée, évolutive, souvent associée à une invalidité et à la menace de complications graves par la durée et l'évolution de la pathologie ». D'après l'OMS, les maladies chroniques (cardiopathies, accidents vasculaires cérébraux, affections respiratoires chroniques...) sont la toute première cause de mortalité dans le monde (« WHO | Integrated chronic disease prevention and control »).

Parmi les affections respiratoires chroniques, on trouve l'asthme, les BPCO, les pneumopathies professionnelles et la mucoviscidose. L'asthme et la mucoviscidose sont au cœur des études effectuées durant mon travail de thèse, et font donc l'objet d'une plus ample description ci-dessous, en terme épidémiologique, physiopathologique et thérapeutique.

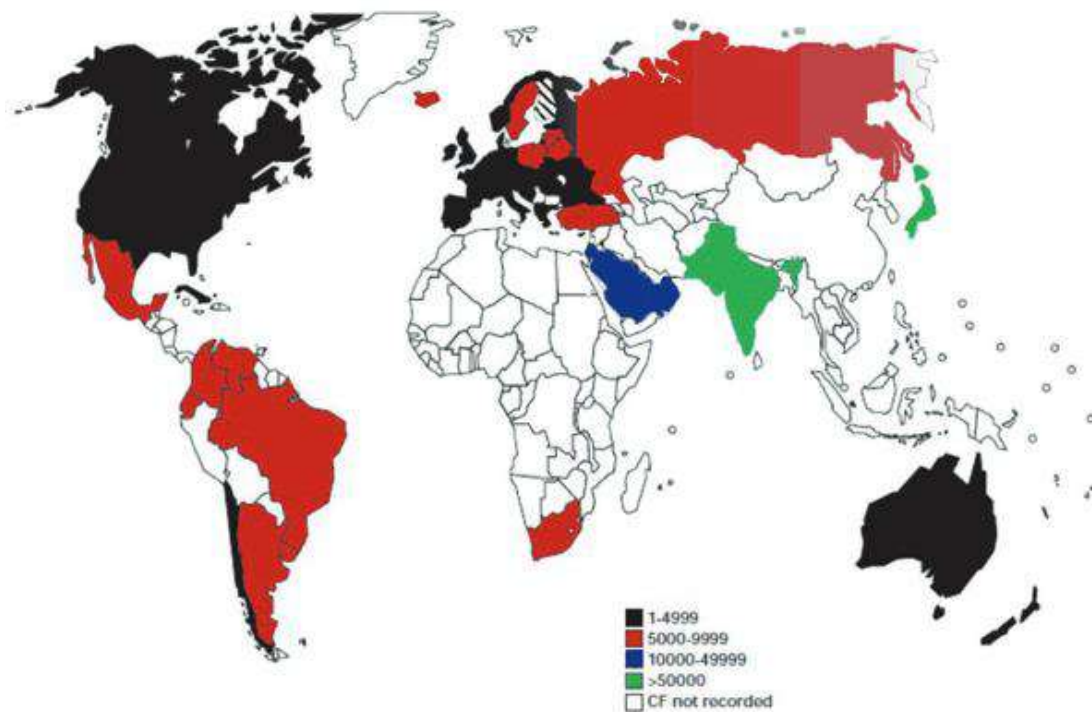
## 1. Généralités et Epidémiologie

### A. Mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie génétique autosomique récessive, la plus fréquente dans la population caucasienne. Elle touche 1 nouveau-né parmi 3000 à 4000 naissances dans cette population et approximativement entre 1/25 à 1/30 des caucasiens sont porteurs de mutation(s) à l'origine de cette pathologie (Sanders et Fink 2016). A l'échelle mondiale, une grande disparité des prévalences est observée. D'après les données de l'OMS, l'Asie est le continent qui présente le taux le plus bas de patients atteints de mucoviscidose (Figure 1). Ceci peut s'expliquer toutefois par l'absence de recensement au niveau national des patients atteints de mucoviscidose. De même, la situation



géographique et géopolitique du continent africain contribue également à l'absence de données sur le sujet dans de nombreux pays africains. Au contraire, l'Europe est le continent qui présente le plus haut niveau de prévalence de la mucoviscidose. Même si le système d'enregistrement très organisé de l'Europe y participe, l'origine ethnique reste la principale raison. En Europe, la prévalence est de 8 à 12 cas pour 100 000 habitants. Ceci est aussi illustré par l'Amérique du Nord, où 30 000 patients sont recensés pour une estimation de 70 000 cas dans le monde entier, d'après la « *Cystic Fibrosis Foundation*, 2017 (« 2017 Patient Registry Annual Data Report » 2017). La population caucasienne, moins génétiquement brassée que d'autres ethnies, pourrait être plus enclin à développer la mucoviscidose de par le mode récessif autosomique de la transmission de cette maladie (Mirtajani, Farnia, et Hassanzad 2017).

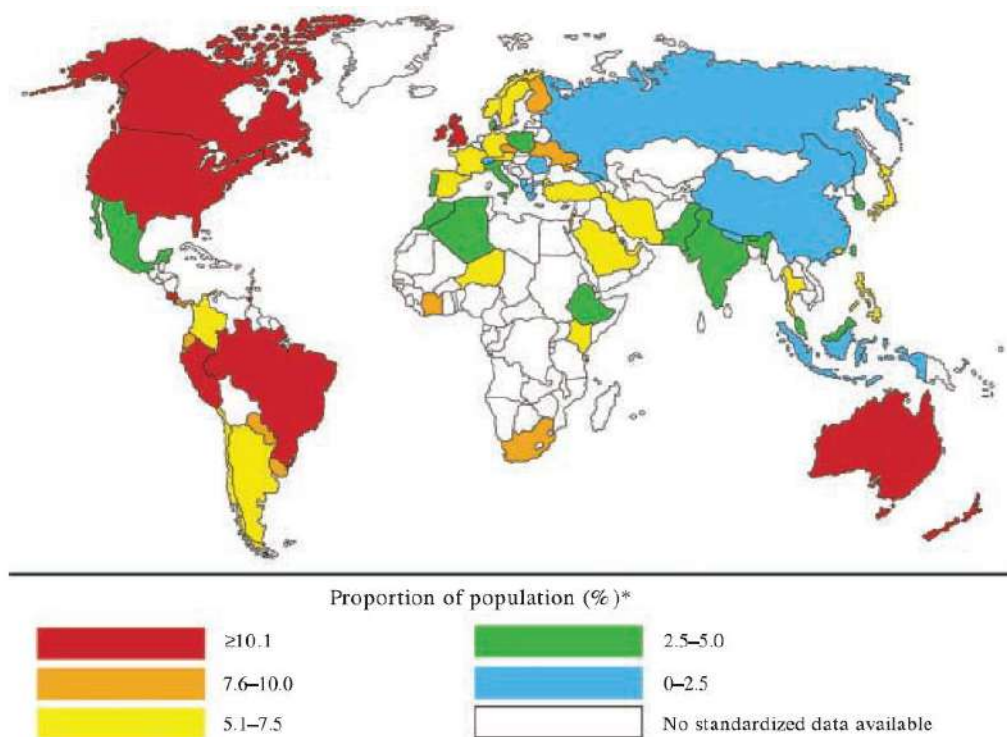


**Figure 1: Carte géographique de l'incidence de la mucoviscidose d'après l'OMS (Mirtajani, Farnia, et Hassanzad 2017)**

L'espérance de vie des patients n'a cessé de s'améliorer : la survie ne dépassait pas 5 ans dans les années 1960, et atteint aujourd'hui une médiane de 40 ans. A l'origine une maladie plutôt pédiatrique, la population adulte est devenue aujourd'hui plus importante dans la mucoviscidose (Netgen 2011). En France, le registre de la mucoviscidose, publié par « vaincre la mucoviscidose » et l'institut national d'études démographiques recense 6931 patients en 2017, et environ 200 enfants sont diagnostiqués à la naissance chaque année.

## B. Asthme

L'asthme est une maladie respiratoire chronique qui se caractérise par l'inflammation chronique des voies respiratoires. Il est défini par l'OMS comme une « Maladie non transmissible de première importance » car il concerne 300 millions de personnes dans le monde. Sa prévalence tend à augmenter dans les pays qui adoptent des modes de vie occidentaux et qui ont une urbanisation croissante. Avec l'augmentation de la population urbaine, le taux de patients asthmatiques pourrait atteindre 400 millions de personnes d'ici 2025 (Masoli et al. 2004). D'après le dernier rapport GINA de 2019 (« Reports GINA » 2019) la prévalence mondiale de l'asthme varie de 1 à 18% selon les pays (Figure 2), mais les données recensées sont insuffisantes pour déterminer les causes des variations des prévalences au sein d'une population et entre les populations. En effet, malgré des centaines de rapport sur la prévalence de l'asthme dans les différents pays du monde, l'absence de définition universelle de l'asthme ne permet pas une comparaison fiable de ces données.



**Figure 2: Prévalence de l'asthme au niveau mondial (Masoli et al. 2004)**

En France, 4 millions de personnes sont concernées par l'asthme avec une prévalence plus faible chez les adultes (approximativement 6,7% pour 10 à 16% chez les enfants). Ceci place cette maladie comme la maladie respiratoire chronique la plus courante chez l'enfant (« WHO | Integrated chronic disease prevention and control »).

## 2. Symptômes, diagnostics et prise en charge thérapeutique

### A. Mucoviscidose : symptômes, diagnostic et traitement

La mucoviscidose est causée par une mutation sur le gène CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*), situé sur le bras long (q) du chromosome 7 (locus q31.2). Les 1900 mutations identifiées aujourd'hui ont été organisées en 6 classes, la « F508del » étant la plus fréquente en France : elle représente 70% des mutations diagnostiquées (Rafeeq et Murad 2017). Selon la mutation, des mécanismes inhibiteurs ou activateurs vont induire la production d'une protéine CFTR non fonctionnelle. Cette protéine est un canal ionique permettant le transport et la régulation des ions chlorure à travers les épithéliums. Elle est exprimée à la membrane apicale des épithéliums sécrétoires de plusieurs organes (glandes salivaires, poumons, tube digestif, thyroïde, glandes pancréatiques, canaux déférents...).

La dérégulation des transports ioniques, en particulier des ions chlorure et sodium, entraîne un déséquilibre des flux hydroélectrolytiques qui aboutit à la concentration et l'accumulation de sécrétions telle que le mucus. Celui-ci devenant plus visqueux et plus abondant, il diminue la capacité d'élimination des microorganismes par le système muco-ciliaire des voies aériennes. Ceci participe à l'inflammation des voies respiratoires et entraîne une obstruction bronchique, qui progressivement épuise les capacités respiratoires du patient et favorise la survenue d'autres complications telles que des atélectasies (affaiblissement ou rétractation des alvéoles pulmonaires), ou des pneumothorax (affection de la plèvre). L'accumulation de mucus dans les bronches crée aussi un milieu propice aux infections bactériennes, fongiques et virales et, au niveau intestinal, cela se traduit par une malabsorption des graisses. Les symptômes tels que la toux chronique, les expectorations et la dyspnée composent le tableau pneumologique de la mucoviscidose. Ainsi, les atteintes respiratoires mais aussi la malabsorption intestinale sont les symptômes les plus fréquents de cette pathologie.

L'établissement du diagnostic est dans la majorité des cas relativement simple, avec en plus des atteintes respiratoire et digestive, un taux de chlorure dans la sueur supérieur à 60 mmol/L. En France, le test de dépistage néonatal pour la mucoviscidose, effectué durant les premiers jours de vie est systématique depuis 2002. Il consiste en un dosage de la trypsine « immunoréactive » anormalement élevée dans le sang des nourrissons atteints de mucoviscidose, chez qui le trypsinogène ne peut pas atteindre l'intestin à cause du mucus trop épais. Ce test ne permet pas d'affirmer le diagnostic, mais initie une prise en charge spécifique par des centres de références de la mucoviscidose (De Boeck, Vermeulen, et Dupont 2017).

Bien que récemment bouleversés par le développement de thérapies protéiques résumées ci-dessous (Connett 2019), les traitements de la mucoviscidose sont encore principalement symptomatiques,

basés sur une approche holistique. En effet, l'objectif pluridisciplinaire de prise en charge des patients implique différents spécialistes, entre autres : pédiatre, kinésithérapeute, diététicien etc.

Brièvement, l'obstruction bronchique peut être limitée par la prescription de fluidifiants bronchiques en aérosols, ainsi que de bronchodilatateurs permettant d'augmenter le diamètre des bronches. Un traitement antibiotique est prescrit pour limiter l'installation d'infections bactériennes. Ces traitements médicamenteux sont accompagnés de kinésithérapie, dès le diagnostic confirmé, dans l'objectif de désencombrer régulièrement les voies respiratoires pour éviter les surinfections, mais aussi pour maintenir l'élasticité du thorax et participer au renforcement musculaire. Enfin, pour limiter la malabsorption des graisses au niveau intestinal, une prise en charge nutritionnelle avec un apport en vitamine et un régime hypercalorique accompagnés d'une hydratation contrôlée représente une part importante du suivi d'un patient atteint de mucoviscidose. Finalement, en dernier recours, la greffe pulmonaire est envisagée quand la capacité respiratoire devient trop diminuée.

Ces dernières années, de nouvelles stratégies thérapeutiques ont été explorées. Elles peuvent être classées en deux approches distinctes : la première consiste à utiliser un oligonucléotide pour intervenir directement au niveau du gène par l'utilisation d'un ADNc du gène CFTR normal. Il s'agit de thérapie génique qui consiste à réparer le gène CFTR ou l'ARNm anormal, ce qui permet la production d'une protéine CFTR fonctionnelle. Cette méthode n'a pas encore fait ses preuves mais fait l'objet de recherches actives. La deuxième approche vise à identifier de petites molécules capables de corriger la protéine CFTR anormale. Depuis 2012, deux types de molécules (correcteurs et potentiateurs) sont commercialisées, mais la fonction des canaux ioniques n'est toujours pas optimale. Cependant, la stratégie utilisée semble prometteuse car elle a déjà amélioré significativement la prise en charge de nombreux patients et pourrait s'améliorer encore dans un avenir proche (Fajac et De Boeck 2017).

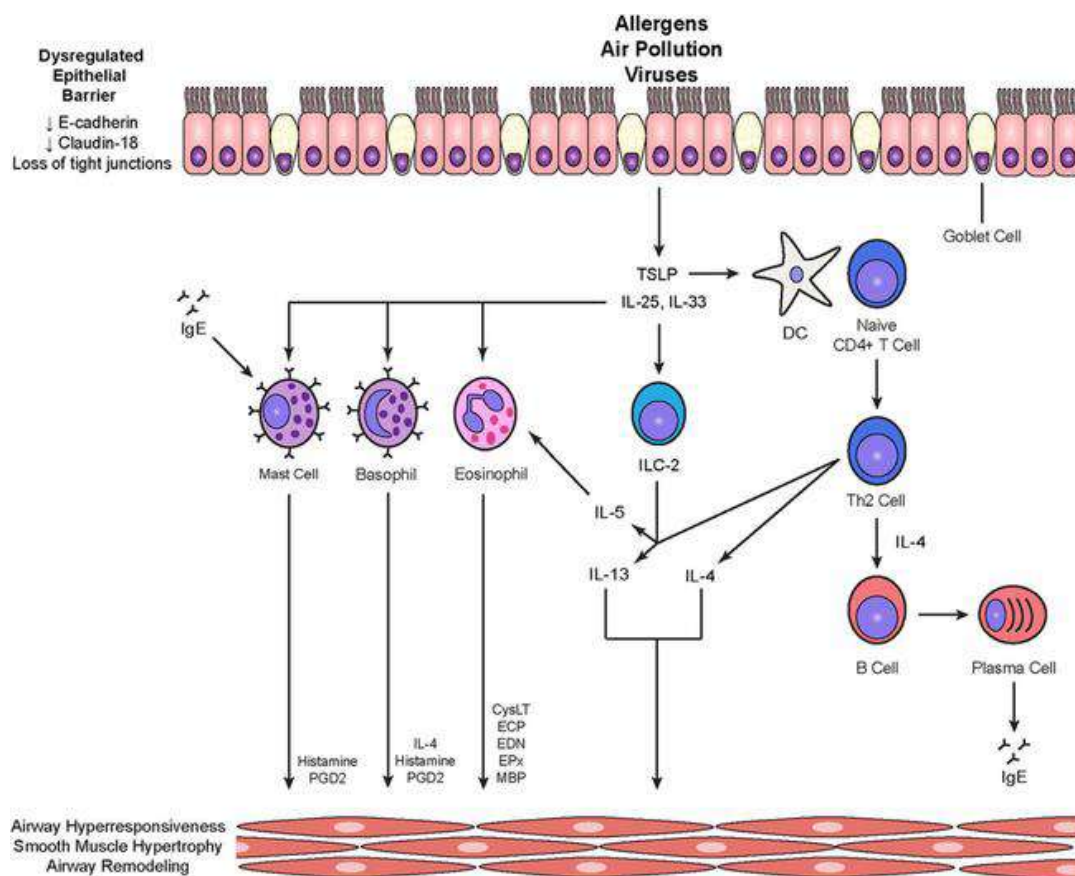
## B. Asthme : symptômes, diagnostic et traitement

Etymologiquement, le terme latin « asthma » signifie « respiration difficile ». Le dernier rapport GINA de juin 2019 (GINA annual report, 2019) et la commission *Lancet* (Pavord et al. 2018) définissent l'asthme par les symptômes de respiration sifflante, d'essoufflement, d'oppression thoracique et parfois de toux qui peuvent varier dans le temps et en intensité. Ces symptômes peuvent devenir persistants dans le temps. L'asthme se caractérise par l'inflammation chronique des voies respiratoires, une bronchoconstriction à laquelle vient s'ajouter un remodelage bronchique. Si les symptômes de l'asthme sont bien connus, ses causes ne sont pas totalement élucidées mais semblent être l'association d'une prédisposition génétique et de facteurs environnementaux via l'inhalation de

substances et de particules de l'environnement. Les facteurs environnementaux (ou exposome environnemental) peuvent être des allergènes à l'intérieur des habitations (acariens, squames des animaux de compagnie...), des allergènes extérieurs (pollens et moisissures), la fumée de tabac, des produits chimiques irritants, mais aussi plus largement la pollution de l'air.

L'asthme est une maladie hétérogène, où la considération accumulée de données sur l'obstruction des voies aériennes, l'inflammation, l'infection et l'altération du réflexe de la toux, couplé au contexte extra-pulmonaire et aux facteurs sociaux et environnementaux permettrait de déterminer un « phénotype », ceci dans le but d'adapter la prise en charge thérapeutique à chaque patient (Hirose et Horiguchi 2017). Ainsi, plusieurs phénotypes ont été identifiés, les plus communs décrits par le rapport GINA 2019 sont :

- **L'asthme allergique** : le plus évident à identifier, qui commence dès l'enfance et est souvent associé à un passif et/ou une histoire familiale de maladies allergiques telles que l'eczéma, les rhinites allergiques, les allergies alimentaires ou médicamenteuses. L'analyse d'expectorations de ces patients, en amont du traitement, révèle le plus souvent une inflammation à éosinophiles des voies respiratoires. Ces patients atteints d'asthme allergique répondent souvent très bien aux corticoïdes inhalés. Dans ce contexte, la présence d'IgE spécifiques est engendrée par la surproduction de cytokines de la voie Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) dans les voies aériennes. Ces cytokines provoquent l'éosinophilie et participent au remodelage bronchique (Figure 3 (Kuruvilla, Lee, et Lee 2019)).

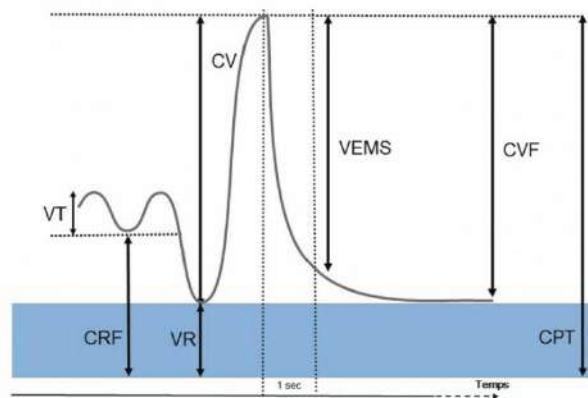


**Figure 3 : Voies inflammatoires Th2 dans l'asthme.** La barrière épithéliale dérégulée facilite la translocation des allergènes, des polluants de l'air et des virus entraînant la libération d'alarmines telles que des cytokines TSLP (lymphopoïétine stromale thymique), l'IL-25 et l'IL-33. Ces interleukines amorcent les cellules dendritiques pour induire la différenciation des cellules T naïves en cellules Th2. Ces cellules Th2 activent les cellules B via IL-4 pour se différencier en cellules plasmiques qui génèrent les IgE nécessaires à la réponse des mastocytes aux allergènes. IL-25 et IL-33 peuvent aussi activer les cellules lymphoïdes (ILC-2), les mastocytes, les éosinophiles et les basophiles. Les ILC-2 activées, comme les cellules Th2, produisent de l'IL-5 et IL-13. L'IL-5 favorise la différenciation et la survie des éosinophiles. L'IL-13, IL-4 et les médiateurs inflammatoires des mastocytes, des basophiles et des éosinophiles ont des effets sur l'hypersensibilité des voies respiratoires, l'hypertrophie des muscles lisses et le remodelage des voies respiratoires (Kuruvillea, Lee, et Lee 2019).

- **Asthme non-allergique** : certains patients présentent un asthme qui n'est pas associé à une allergie. Le profil cellulaire des expectorations de ces patients peut être neutrophilique, éosinophilique ou contenir seulement quelques cellules inflammatoires. Ces patients présentant un asthme dit non-allergique montrent souvent moins de réponse à court terme au traitement par corticoïdes inhalés. Dans ce contexte, les cytokines Th2 ne sont pas activées.
- **Asthme tardif (chez l'adulte)** : certains adultes, particulièrement des femmes, déclarent un asthme à l'âge adulte. Ces patients sont généralement non-allergiques, et requièrent le plus souvent de hautes doses de corticoïdes inhalés (ces patients sont très rarement réfractaires aux traitements corticoïdes).
- **Asthme avec persistance de la limitation du flux d'air** : les patients asthmatiques de longue date développent une limitation du flux d'air, de façon persistante ou incomplètement réversible. Cela semble être dû au remodelage des parois des voies respiratoires.

- **Asthme associé à l'obésité** : certains patients obèses ont des symptômes respiratoires prédominants et une légère inflammation éosinophilique des voies aériennes, en faveur d'un asthme.

Caractériser un état asthmatique ainsi que le phénotype repose entre autres, sur la mesure des capacités respiratoires du patient, ce qui est aussi utile pour son suivi. L'exploration fonctionnelle respiratoire (EFR) permet ces mesures et regroupe différents examens dont la spirométrie, la pléthysmographie, la gazométrie (les gaz du sang) et les épreuves d'exercices. La spirométrie mesure des volumes pulmonaires mobilisables, notamment le volume expiratoire maximum au cours de la première seconde lors d'une expiration forcée (VEMS), à partir de la capacité pulmonaire totale (CPT) et la capacité vitale forcée (CVF) (Figure 4). La pléthysmographie mesure quant à elle les volumes pulmonaires non mobilisables tels que le volume résiduel (VR).



**Figure 4 : Volumes pulmonaires mesurables par spirométrie et pléthysmographie.** VT : volume courant ; CV : capacité vitale ; VEMS : volume expiratoire maximum en 1 seconde ; CVF : capacité vitale forcée. La zone bleue indique les volumes mesurables uniquement par pléthysmographie : CPT : capacité pulmonaire totale ; CRF : capacité résiduelle fonctionnelle ; VR : volume résiduel.

L'évaluation de la composante inflammatoire chez le patient asthmatique est aussi une étape permettant la caractérisation phénotypique de l'asthme. De plus, l'identification du phénotype permet d'anticiper la réponse au traitement, en particulier en prédisant la probabilité de réponse aux corticoïdes, et le risque d'exacerbation future. Ceci est réalisé par l'analyse de l'expectoration induite, la mesure du monoxyde d'azote dans l'air exhalé (FeNO) ou des condensats d'air exhalés (Schleich et Louis 2012). L'expectoration, induite par l'utilisation d'un nébuliseur ultrasonique et l'inhalation d'une solution saline hypertonique, permet l'analyse du contenu cellulaire (les macrophages et neutrophiles représentant la majeure partie des cellules retrouvées dans cette expectoration) et l'analyse biochimique du liquide contenu dans les lumières bronchiques. La mesure de l'inflammation présente dans les voies respiratoires proximales, et le taux d'éosinophiles retrouvé participent à la détermination du phénotype.

La mesure du FeNO est considérée comme une mesure de substitution fiable pour l'évaluation du nombre d'éosinophiles présents dans l'expectoration. Elle a l'avantage d'être une technique non invasive donnant des résultats reproductibles et immédiats. Le FeNO est une molécule gazeuse produite en réponse à une réaction inflammatoire. Le monoxyde d'azote (NO) joue un rôle important dans le système immunitaire en contrôlant le tonus vasculaire et bronchique. Il est produit par les cellules épithéliales, les mastocytes, les macrophages, les cellules endothéliales et les fibres musculaires lisses vasculaires. Dans le contexte de l'asthme, sa production dépend principalement des cellules épithéliales. Un niveau de FeNO inférieur à 25 *parts per billion* (ppb) est considéré comme normal, supérieur à 25 ppb considéré comme intermédiaire (jusqu'à 50 ppb) et élevé au-delà de 50 ppb (Miskoff, Dewan, et Chaudhri 2019).

La gravité de l'asthme est classée en différentes catégories, en fonction des capacités respiratoires et du niveau d'inflammation mesuré, mais aussi en fonction de la fréquence des crises, ce qui oriente la prise en charge thérapeutique du patient. On distingue le traitement de fond, qui est adapté tout au long du suivi d'un patient asthmatique, du traitement de crise lors d'une exacerbation. Le traitement de fond permet de limiter la fréquence de crises et se compose d'anti-inflammatoires : corticostéroïdes inhalés ou anti-leucotriènes pouvant être associés à un bronchodilatateur d'action longue durée. Le traitement de crise quant à lui se compose de bronchodilatateur d'action rapide, permettant de limiter instantanément les symptômes.

De récents progrès ont été réalisés concernant les traitements dits « ciblés » de l'asthme sévère, notamment l'apparition d'anticorps monoclonaux anti-IgE pour traiter l'asthme allergique. Ces anticorps anti-IgE empêchent la liaison des IgE libres aux récepteurs présents sur les mastocytes et les basophiles en se liant à l'IgE libre. D'autres alternatives thérapeutiques émergent, par exemple, les anticorps anti-IL5 utilisés dans le cas d'asthme à éosinophiles (Kian F. Chung 2018). En général, plus l'asthme est sévère plus la prise en charge thérapeutique sera complexe, faisant appel à l'ensemble de l'arsenal thérapeutique brièvement décrit ici.

### 3. Le mycobiote et microbiote respiratoire dit « endogène »

La composition des communautés fongiques (mycobiote) et des communautés bactériennes (microbiote) de l'appareil respiratoire est aujourd'hui décrite aussi bien chez l'individu sain que chez l'individu atteint de MRC (Cox, Ege, et Mutius 2019). Mais le rôle précis de ces communautés sur la santé et ses mécanismes fonctionnels (notamment les interactions avec le système immunitaire hôte) ne sont pas encore bien compris. De même, les mécanismes par lesquels le myco-microbiote participe



ou régule le développement et la progression de la maladie respiratoire font l'objet d'études qui révèlent de nombreuses pistes sans que celles-ci soient encore totalement comprises et cliniquement exploitables.

Parmi les outils disponibles pour étudier ces communautés poly-microbiennes, les nouvelles technologies de NGS sont les plus prometteuses et ne cessent d'évoluer pour augmenter en résolution. Elles présentent encore aujourd'hui de nombreux défis, tant sur le point méthodologique qu'analytique. La méthodologie détaillée ici concernera la métagénomique ciblée, l'approche aujourd'hui la plus adaptée pour l'étude des communautés microbiennes dans un contexte de biomasse rare comme l'appareil respiratoire où la présence de cellules immunitaires entraîne la présence importante d'ADN de l'hôte qui représente une contrainte méthodologique pour l'analyse des communautés microbiennes.

#### A. Méthodologie d'analyse : de l'échantillonnage au séquençage

##### ✓ *Echantillonnage*

L'expectoration (spontanée ou induite), les sécrétions pulmonaires prélevées par aspiration, le lavage bronchoalvéolaire (LBA) sont les principaux types d'échantillons biologiques utilisés pour l'étude du microbiote pulmonaire. A ce jour, l'expectoration est la plus largement utilisée pour l'étude des MRC. Bien que ce type de prélèvement présente des risques de contamination par les voies respiratoires supérieures, le microbiote pulmonaire ainsi identifié s'est révélé cohérent avec les données clinico-biologiques telles que l'inflammation des voies respiratoires ou la fréquence des exacerbations (Dickson et al. 2016).

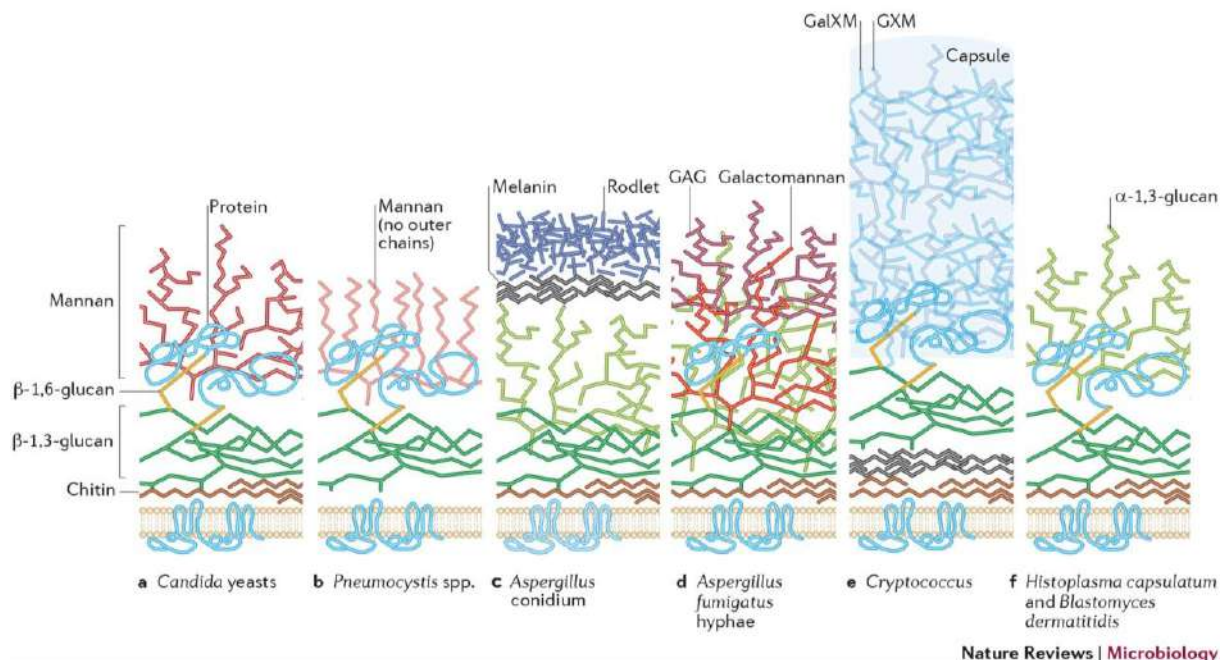
Cependant, il n'existe pas aujourd'hui de consensus quant à la méthode de prélèvement la plus pertinente pour le séquençage des communautés microbiennes pulmonaires par NGS. La communauté microbienne pulmonaire reste une des plus complexes à étudier, quel que soit le type d'échantillon. En effet, en raison de la faible biomasse microbienne présente au niveau du système respiratoire, il existe des risques avérés de contamination liée à la technique de prélèvement mais aussi aux réactifs de laboratoire (description plus complète dans le chapitre 6 de la revue (Cox, Ege, et Mutius 2019), Partie IV de cette introduction)).

Si la méthode de prélèvement respiratoire n'est pas encore standardisée, il en est de même pour les différentes étapes de préparation de cet échantillon pour l'analyse du microbiote.

✓ *Extraction d'ADN*

L'extraction de l'ADN est une étape cruciale, pour laquelle des prétraitements chimiques (DTT) et enzymatiques (lysostaphin, lysozyme) semblent nécessaires pour obtenir la meilleure représentation possible des communautés bactériennes (Oriano et al. 2019). Les kits fournisseurs sont rarement optimisés pour l'extraction de l'ADN bactérien et fongique, pourtant les champignons sont des cellules eucaryotes dont les différents éléments pariétaux pour accéder à l'ADN sont difficile à lyser.

La paroi cellulaire fongique se compose d'un noyau de  $\beta$ - (1,3) glucane lié de manière covalente à 3-4% de chitine (Figure 5). Ceci constitue l'exosquelette qui permet aux champignons de résister à la pression hydrostatique. Il est lié à des protéines et/ou à d'autres polysaccharides dont la composition va varier en fonction de l'espèce fongique (Gow, Latge, et Munro 2017).

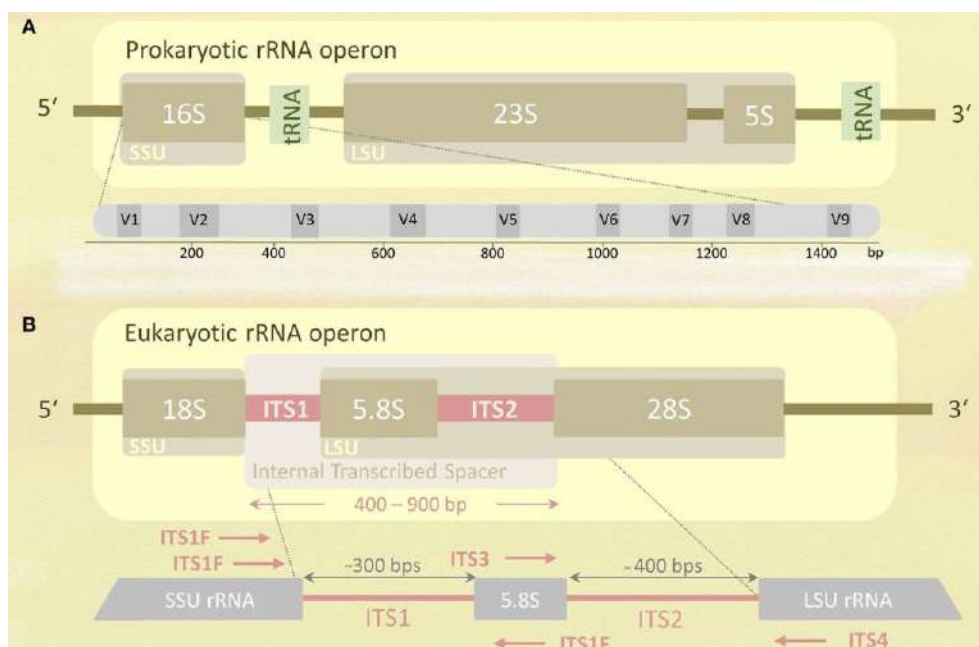


**Figure 5 : Organisation structurale de la paroi de six espèces de champignons pathogènes (Gow, Latge, et Munro 2017).**

Cette structure spécifique des parois fongiques, particulièrement résistante, est donc l'enjeu de l'étape d'extraction, où la lyse cellulaire, chimique, enzymatique, thermique et mécanique a été évaluée, dans le contexte de la caractérisation du mycobiote et microbiote oraux (Vesty et al. 2017) (Rosenbaum et al. 2019). Ces études révèlent que la qualité et le rendement d'extraction de l'ADN sont impactés par la méthode utilisée, et que la lyse enzymatique apporte un meilleur rendement (en termes de dosage des acides nucléiques) que la lyse mécanique par « bead-beating ». Cependant, le rendement d'extraction n'est pas forcément lié à la diversité et à la description de la composition des communautés microbiennes.

✓ *Metagénomique ciblée*

La métagénomique ciblée repose sur l'amplification d'une région spécifique du génome des microorganismes, la plupart du temps, les gènes dits ribosomaux. Ces derniers sont ubiquitaires, présents chez tous les organismes vivants et sont constitués d'une alternance de zones à séquences nucléotidiques constantes pouvant être ciblées par des amorces spécifiques, et de zones suffisamment variables pour discriminer les organismes composant la communauté étudiée. L'étude des communautés bactériennes repose sur l'amplification de la petite sous-unité 16S de l'opéron procaryote. Ce gène est composé de 9 régions hypervariables (V1 à V9) (Figure 6-A). L'étude des communautés fongiques est quant à elle basée sur l'amplification des régions inter-géniques (ITS1 et ITS2) ou de la petite sous unité 18S de l'opéron eucaryote (Figure 6-B).



**Figure 6 : Représentation schématique de l'opéron d'ARNr. Opéron ARNr (A) procaryote (B) eucaryote.** La position et l'orientation des amorces utilisées pour l'amplification ITS sont indiquées schématiquement (Halwachs et al. 2017)

Les communautés bactériennes ont été la cible première et majeure des travaux actuellement publiés mais l'étude des communautés fongiques présente aujourd'hui un intérêt croissant. Le choix de la cible de l'opéron eucaryote, qui influence largement la description des communautés et leur diversité, est relativement bien documenté (Halwachs et al. 2017) (De Filippis et al. 2017) (Yarza et al. 2017) (Xu 2016) (Tonge, Pashley, et Gant 2014). Il semblerait aujourd'hui que la cible ITS reste la plus efficiente, car la plus discriminante sur le plan phylogénétique (Irinyi et al. 2015). ITS1 amplifierait préférentiellement le sous-règne non-Dikarya (autres phylum que Basidiomycota et Ascomycota) (Tonge, Pashley, et Gant 2014). La cible ITS2 présente une structure secondaire mieux conservée chez

les eucaryotes qu'ITS1, ce qui permet une comparaison phylogénétique plus précise ; ITS2 est également mieux représentée dans les bases de données (Lindahl et al. 2013; Tang et al. 2015; Hoggard et al. 2018).

✓ *Préparation de librairie NGS et séquençage 2<sup>ème</sup> génération*

Dans les approches NGS, l'amplification de la zone cible est suivie d'autres étapes permettant le multiplexage et le séquençage des échantillons à haut-débit. Par une succession d'amplification, ligation ou transposition, des séquences nucléotidiques appelées « adaptateurs » et spécifiques à la technologie de séquençage utilisée, sont ajoutées à chaque amplicon. Je décrirai ici très brièvement le séquençage de deuxième génération basé sur un séquençage clonal parallélisé à haut-débit : le pyroséquençage par la technologie 454 (Roche diagnostic®) et le séquençage par synthèse (SBS) par la technologie Illumina®, tous deux utilisés dans le cadre des études décrites par la suite.

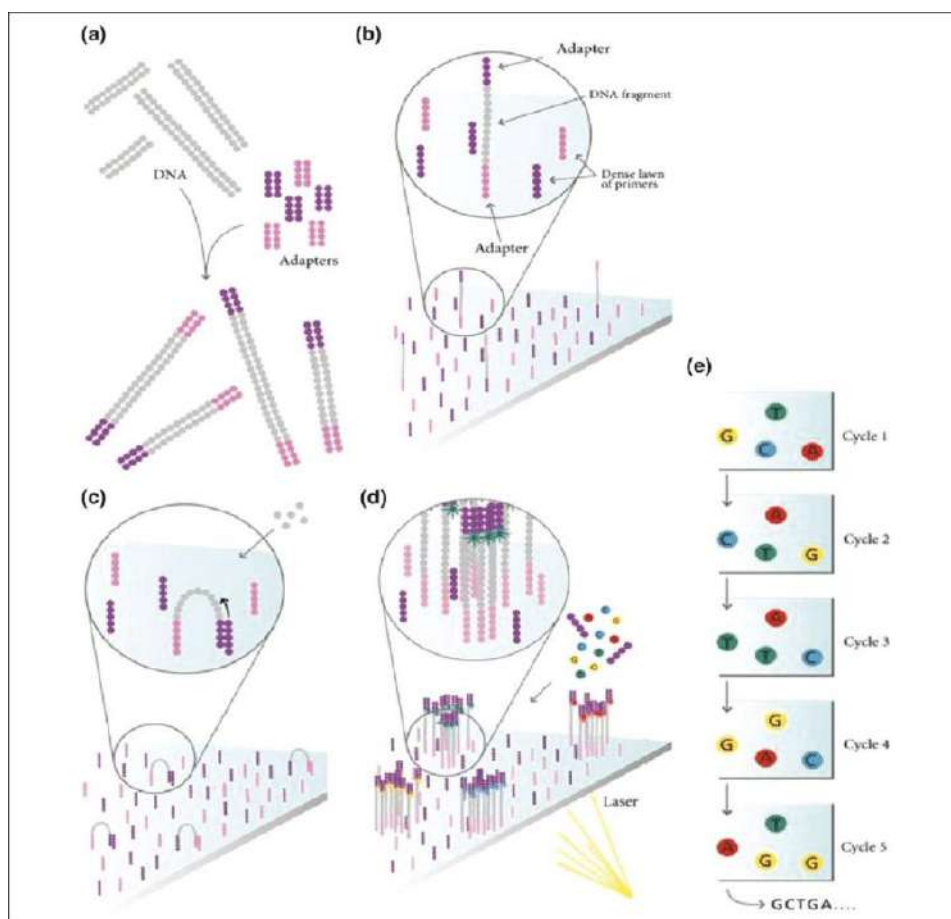
**La technologie 454 :** Le pyroséquençage consiste en la polymérisation, base par base, d'un monobrin complémentaire à la séquence étudiée, avec détection à chaque étape de l'activité de la polymérase par une autre enzyme chimiluminescente : la luciférase. En effet, il s'agit d'une réaction en temps réel où l'élongation du brin amplifié entraîne la formation d'ions pyrophosphates qui sont convertis en photons. L'intensité lumineuse est alors proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés à la suite. Les quatre nucléotides sont rajoutés de façon séquentielle : après chaque ajout d'un nucléotide, le surplus est éliminé par l'action d'une apyrase, puis le nucléotide suivant peut être incorporé et ainsi de suite. La séquence nucléotidique est donc déterminée en fonction de l'émission lumineuse à chaque incorporation d'un nucléotide (Harrington et al. 2013). La principale limite de cette technologie concerne la lecture des homopolymères (répétition d'une même base), qui entraîne un taux d'erreur plus élevé par l'insertion et la suppression de bases (Shendure et Ji 2008). Cette technologie n'est plus utilisable depuis 2016, suite à la décision par le fournisseur d'arrêter la production des réactifs et séquenceurs.

**La technologie Illumina :** Elle repose sur un système en deux étapes :

(i) L'amplification clonale où les amplicons hybridés sur la lame de séquençage sont amplifiés par un système de pont, grâce à deux adaptateurs différents présents sur les amplicons et complémentaires de fragments présents sur la lame. L'hybridation aléatoire des amplicons sur la lame est suivie d'une amplification par une polymérase qui permet l'élongation et la synthèse du brin complémentaire. Le double hybride est ensuite dénaturé et la molécule originale éliminée. L'extrémité libre du fragment composé du second adaptateur s'hybride à l'amorce complémentaire à cet adaptateur présent à la surface de la lame. La polymérase synthétise un brin complémentaire à celui rattaché à la lame en pont

par ses deux extrémités, puis de nouveau, les nouveaux brins synthétisés sont dénaturés. Ces cycles d'amplification se répètent et constituent des clusters composés de séquences identiques (Figure 7 (a) à (d)) ;

(ii) Le séquençage est ensuite initié par des amorces de séquençage, qui sont complémentaires des adaptateurs ajoutés pendant la préparation des bibliothèques sur les amplicons. Ces amorces libres s'hybrident aux fragments à séquencer et les quatre bases (A, T, C et G) sont ajoutées. A chaque cycle, l'incorporation réversible d'un nucléotide fluorescent va empêcher l'ajout d'autres nucléotides et une étape d'imagerie va relever la fluorescence de cette incorporation. La lecture de cette fluorescence, à chaque cycle, permet la description de la séquence. La technologie Illumina est robuste, avec un taux d'erreur à 0.1% où le type d'erreur le plus rencontré est la substitution (Shendure et Ji 2008) (Figure 7 (e)).



**Figure 7 : Représentation schématique du séquençage Illumina.** La bibliothèque, comportant les adaptateurs en 3' et 5' (a) est chargée sur la flowcell (b) et une amplification « en pont » est effectuée (c). Après n cycles d'amplification, un cluster d'une molécule identique à une position donnée est obtenu (d). Le séquençage est réalisé à partir de nucléotides marqués qui sont détectés par l'émission d'une fluorescence spécifique à chaque nucléotide (e).

✓ *L'analyse bio-informatique des données NGS*

Dans le contexte de métagénomique ciblée, l'analyse bio-informatique comprend une première étape de pre-processing qui permet dans un premier temps de démultiplexer les séquences, c'est-à-dire d'attribuer chaque séquence à l'échantillon correspondant (utilisation d'un index unique pour chaque échantillon). Dans un deuxième temps, le pre-processing comprends une étape de filtres de qualité basé sur le score Phred (indicateur de qualité assigné à chaque base en fonction de la probabilité d'une mauvaise base identifiée). Les lectures issues de ces filtres sont ensuite assemblées (dans le cas de séquençage en « paired-end » du séquençage Illumina où le séquençage est effectué à partir des deux extrémités des fragments) et celles présentant plus de 97% d'identité sont regroupées en OTU (*Operational Taxonomic Unit*). La séquence consensus de chaque OTU est alors comparée à une base de données pour obtenir l'affiliation taxonomique. Ceci permet de déduire la composition taxonomique (du phylum au genre ou espèce) des communautés microbiennes analysées, et donc de caractériser le myco-microbiote des matrices d'intérêts.

## B. Microbiote et mycobiote pulmonaire de l'individu sain

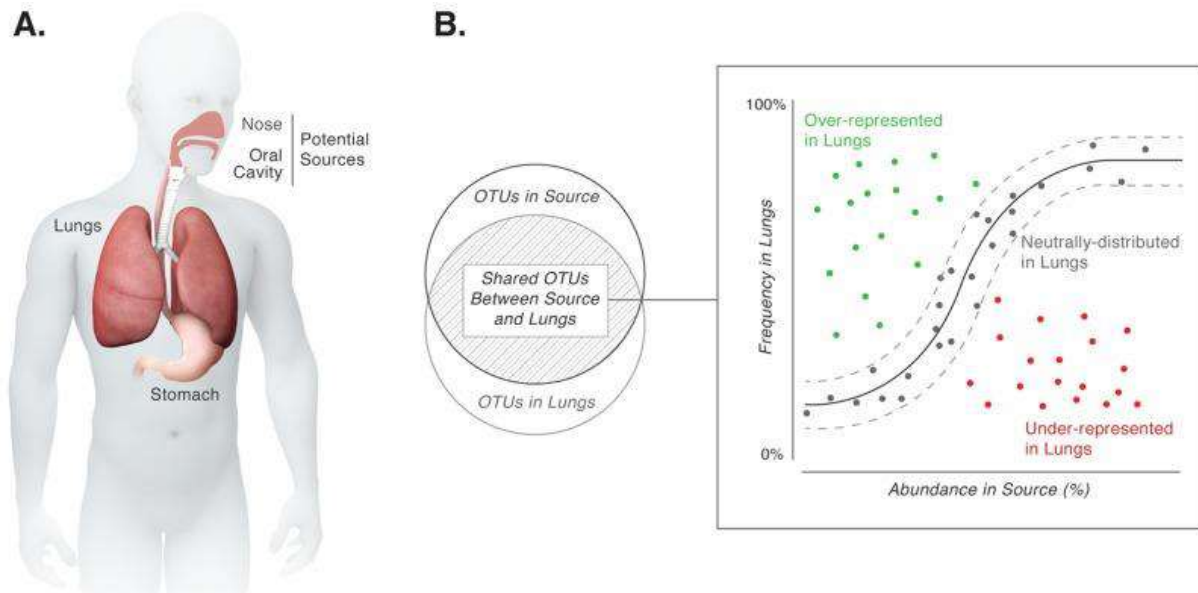
✓ *Communautés bactériennes : le microbiote pulmonaire*

Les poumons comportent approximativement  $2.2 \times 10^3$  génomes bactériens par  $\text{cm}^2$  (Mathieu et al. 2018). Les bactéries du microbiote pulmonaire entrent dans le corps par la cavité buccale (Figure 8 (A)). Ces bactéries sont en suspension dans l'air et contenues dans des microparticules de sécrétions telle que la salive. Puis, la constitution du microbiote pulmonaire est déterminée par trois facteurs :

- (i) l'immigration microbienne (due à la dispersion à partir de la muqueuse buccale, aux micro-aspirations et inhalation),
- (ii) l'élimination microbienne (due aux mouvements muco-ciliaires, à la toux et au système immunitaire) et
- (iii) le taux relatif de multiplication de chaque membre de la communauté bactérienne.

Une balance entre l'immigration et l'élimination microbienne permet de conserver l'équilibre microbien du sujet sain (Dickson et Huffnagle 2015). L'étude de Venkataraman et al. utilise le modèle de dispersion neutre pour évaluer la dispersion et la sélection des organismes dans les voies respiratoires (Figure 8 (B)). La composition du microbiote pulmonaire chez l'individu sain concorde avec ce modèle écologique lorsque les différents sites de la cavité orale sont considérés comme la source des communautés pulmonaires (Whiteson, Bailey, et al. 2014). Le flux microbien entre la cavité orale et les poumons étant relativement constant, la dispersion devient le processus le plus important. Brièvement, l'abondance relative des OTU des communautés sources est utilisée pour calculer la probabilité de détecter cet OTU dans les poumons (Figure 8 (B)). L'abondance élevée d'une espèce

dans la source conduit à une probabilité élevée de dispersion au niveau pulmonaire et, inversement, une faible abondance dans la source conduit à une faible dispersion au niveau des voies aériennes jusqu'aux poumons (Venkataraman et al. 2015).



**Figure 8 :** (A) Les connexions anatomiques entre les poumons, l'estomac et les cavités orales et nasales permettent le mouvement des microorganismes entre ces différents sites. (B) Implémentation du modèle écologique de dispersion neutre pour l'analyse des communautés microbiennes (Venkataraman et al. 2015). La ligne continue noire représente le modèle neutre le mieux ajusté à partir de probabilité de distribution. Les lignes noires en pointillées représentent l'intervalle de confiance à 95%. Les espèces dans cet intervalle de confiance (points noirs) sont présentes dans les poumons suivant ce modèle de dispersion neutre (dispersion à partir de la communauté source par exemple). Les espèces qui s'éloignent de ce modèle (points rouges et verts) sont sujets à la sélection ou n'ont pas la capacité de se disperser (comme ceux de la source).

Chez l'individu en bonne santé, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Haemophilus* et *Fusobacterium* sont les genres bactériens les plus abondants du microbiote pulmonaire (Figure 9) (Mathieu et al. 2018).

✓ *Communautés fongiques : le mycobiote pulmonaire*

Le mycobiote pulmonaire est composé de micromycètes dans des proportions bien moins importantes que les bactéries (Linh D. N. Nguyen, Viscogliosi, et Delhaes 2015; Zoll et al. 2016; Botterel et al. 2018). Il est aujourd'hui démontré que les micromycètes sont présents des voies supérieures aux voies inférieures de l'appareil respiratoire de l'individu sain. Ces communautés commensales fongiques sont très variables entre les individus, et font principalement partie du sous-règne des Dikaria qui est composé des phylums Ascomycota et Basidiomycota. Les taxons retrouvés appartiennent essentiellement aux genres *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Candida* et *Malassezia* ; ce sont des

champignons issus de l'environnement et des levures (Linh D. N. Nguyen, Viscogliosi, et Delhaes 2015; Tipton, Ghedin, et Morris 2017).

Une étude chez le sujet sain (Cui et al. 2015) a montré des signatures significativement différentes entre les communautés fongiques buccales et pulmonaires mais avec un certain chevauchement. Le modèle écologique de dispersion neutre appliqué au mycobiote a montré que, tout comme les bactéries, un nombre important de taxons identifiés au niveau pulmonaire l'est aussi au niveau buccal, ce qui confirme les phénomènes d'immigration des micromycètes par micro-aspiration. Il est retrouvé une proportion importante du genre *Candida* au niveau du mycobiote buccal et ce genre est aussi retrouvé, dans des proportions moindres, au niveau du mycobiote pulmonaire. Ce genre fait partie de la flore commensale mais peut devenir un pathogène opportuniste dans un contexte de déséquilibre du mycobiote, déséquilibre existant dans les MRC.

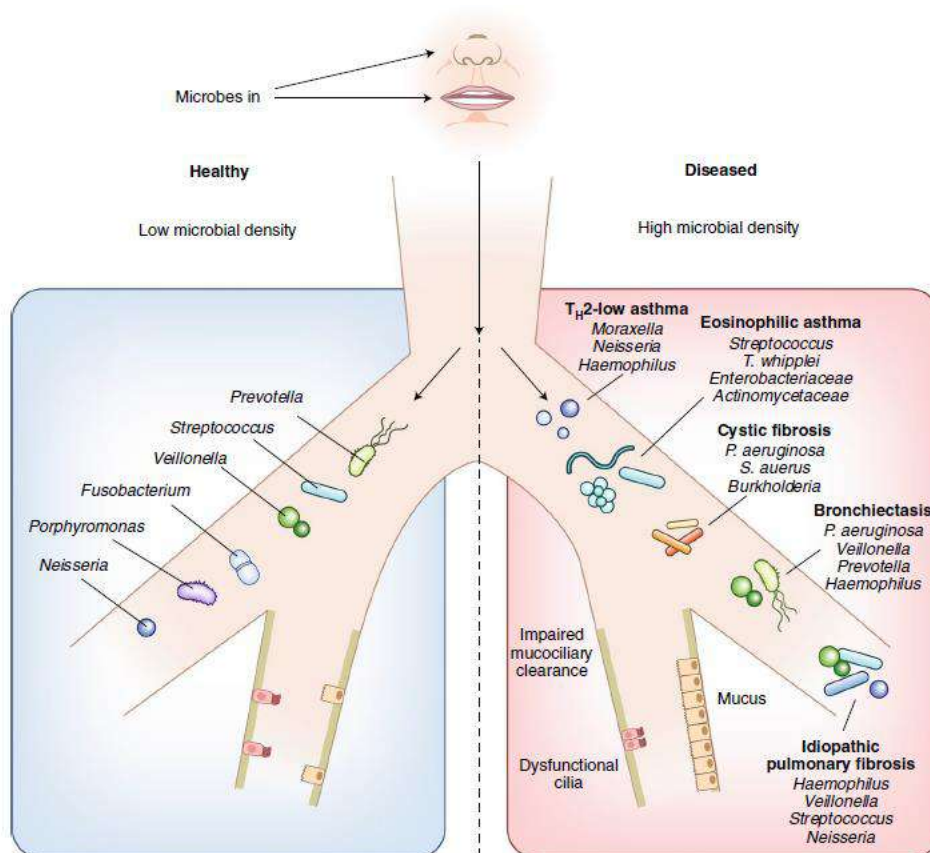
### C. Microbiote et mycobiote dans les MRC

Au niveau pulmonaire, une perte de l'équilibre naturel des communautés fongiques et bactériennes est observée dans un contexte de pathologie respiratoire. Les perturbations de cet équilibre, impliquant la migration, l'élimination et la croissance microbienne entraînent un changement nommé dysbiose (Figure 9).

Dans les MRC, des modifications physico-chimiques dues à l'inflammation chronique et des modifications physiologiques telles que le dysfonctionnement ciliaire facilitent la croissance de certaines espèces, qui peuvent devenir alors résidentes et non plus transitoires (Wypych, Wickramasinghe, et Marsland 2019). Ceci participe à cette dysbiose pulmonaire.

Des études portant sur le lien entre le mycobiote et les MRC mettent en évidence une modification de diversité associée à la maladie. Qu'en est-il du myco-microbiote de patients atteints de mucoviscidose ou asthmatiques ?





**Figure 9 : Le microbiote pulmonaire chez le sujet sain versus sujet malade.** Côté gauche (en bleu) : les six principaux genres bactériens qui colonisent les poumons de sujet sain. A ce stade, la densité bactérienne est relativement basse. L'équilibre entre l'immigration et l'élimination détermine la nature transitoire des bactéries du microbiote pulmonaire, ce qui caractérise le sujet sain. Côté droit (en rouge) : l'augmentation de la propagation bactérienne chez le sujet malade entraîne l'incapacité des voies respiratoires à éliminer les bactéries, ce qui provoque une augmentation de la densité bactérienne. L'augmentation de la production de mucus et la dysfonction ciliaire contribuent à diminuer la clairance mucociliaire et à favoriser le piégeage des microorganismes dans les voies respiratoires. Les différentes conditions respiratoires sont caractérisées par des espèces bactériennes dominantes récapitulées sur cette figure (Wypych, Wickramasinghe, et Marsland 2019).

✓ Chez les patients atteints de mucoviscidose

Dans la mucoviscidose, les phénomènes de colonisations et/ou infections bactériennes et fongiques récurrentes représentent un problème de santé majeur et ont fait l'objet de nombreuses études NGS. Ainsi, l'étude des communautés bactériennes pulmonaires de patients atteints de mucoviscidose de la petite enfance jusqu'à l'adolescence suggère un lien entre le développement précoce de la dysbiose bactérienne pulmonaire et la progression défavorable de la maladie. La diversité bactérienne est maximale de la petite enfance jusqu'à l'adolescence, puis décline à l'âge adulte (Huang et LiPuma 2016). Chez l'adulte, plusieurs études ont montré une grande hétérogénéité entre les patients au niveau de la composition des communautés bactériennes (Kramer et al. 2015). Les genres identifiés comme les plus prévalents sont *Pseudomonas*, *Burkholderia* et *Staphylococcus* (Figure 9). Des études ont tenté de corréliser l'état clinique du patient atteint de mucoviscidose (état stable ou exacerbé) à sa

communauté bactérienne. Basée sur un seul échantillon par patient, certaines ont conclu que ces communautés ne semblent pas varier dans le temps (Carmody et al. 2015), d'autres que la charge et la composition bactérienne ne semblent pas être impactées lors d'un phénomène d'exacerbation (Zhao et al. 2012). Une étude plus récente (Caverly et al. 2019) basée sur plusieurs échantillons de mêmes patients pendant dix périodes de stabilité clinique a montré différents degrés de stabilité au cours du temps des communautés bactériennes au niveau respiratoire. Cette étude longitudinale révèle donc la difficulté d'étudier ces variations en fonction de l'état clinique à partir d'un seul échantillon par patient. Néanmoins, l'augmentation des espèces faiblement représentées pendant un phénomène d'exacerbation pourrait signifier que ces espèces non-prédominantes auraient un rôle significatif dans l'aggravation de l'état clinique du patient (Carmody et al. 2015). Finalement les antibiotiques prescrits lors de phénomène d'exacerbation ne semblent pas impacter les communautés bactériennes à long terme, qui seraient résilientes à ces perturbations anti-microbiennes (retour du microbiote pulmonaire à son état basal, semblable à celui avant l'exacerbation) (Huang et LiPuma 2016).

Concernant l'étude du mycobiote respiratoire de patients atteints de mucoviscidose, les principaux genres identifiés sont *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Malassezia*, *Penicillium* et *Kluyveromyces*. Plusieurs études ont montré que la diversité fongique est significativement plus faible chez les patients présentant une altération de la fonction respiratoire, et/ou un état clinique altéré. Ceci résulterait d'un micro-environnement plus favorable à certains micromycètes qui deviendraient plus abondants (par exemple, à l'accumulation du mucus au niveau des voies respiratoires et donc à la modification du pH au niveau local) (Cox, Ege, et Mutius 2019; Delhaes et al. 2012; Bittinger et al. 2014). Une étude qui caractérise le myco-microbiote de 56 patients pendant un état stable à différents temps pendant 2 ans, a montré une différence dans la structure des communautés bactériennes et fongiques avec un nombre considérable d'espèces fongiques par comparaison au nombre réduit d'espèces bactériennes (Kramer et al. 2015). Le microbiote d'un individu est dominé par seulement quelques espèces, tandis que la biosphère rare des champignons est plus diversifiée. L'analyse des échantillons dans le temps ont montré que ces communautés fongiques ont tendance à fluctuer au cours du temps, ce qui est moins observé pour les communautés bactériennes. Les auteurs concluent que l'inhalation de spores de champignons environnementaux est à l'origine de la présence d'espèces fongiques transitoires au niveau du mycobiote pulmonaire (Kramer et al. 2015).

La migration des microorganismes dans les voies respiratoires et les colonisations/infections dans la physiopathologie de la mucoviscidose ont été illustrées dans la mucoviscidose par un modèle écologique appelé « Climax/Attack » (Whiteson, Meinardi, et al. 2014; Quinn et al. 2015). Dans ce modèle, la communauté « Climax » est composée de populations microbiennes persistantes (par

exemple *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus sp.*, *Candida albicans*, ou *Scedosporium*) qui colonisent les voies respiratoires au cours des périodes stables en s'adaptant aux réponses immunes et inflammatoires de l'hôte. Ces populations seraient plus résistantes à l'antibiothérapie à large spectre. En revanche, la communauté « Attack », plus virulente et transitoire est généralement composée d'agents pathogènes qui sont associés à des exacerbations pulmonaires telles que *S. pneumoniae*, *H. influenza*, rhinovirus, adenovirus, etc. Cette communauté pourrait être plus sensible aux traitements anti-infectieux (Conrad et al. 2013; Whiteson, Meinardi, et al. 2014) (Figure 10). Les auteurs ont également émis l'hypothèse que les bactéries anaérobies seraient membres de la communauté « Attack » et pourraient être responsables du déclenchement d'exacerbation (Quinn et al. 2015). Dans la mucoviscidose, ces deux communautés existent de façon alternative dans les poumons humains et contribueraient ainsi à la diminution progressive de la fonction pulmonaire.

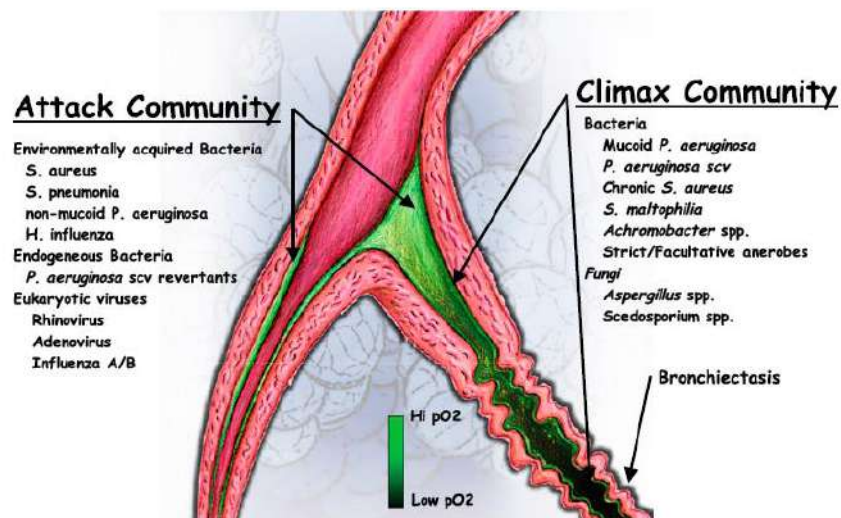


Figure 10 : Modèle « Climax-Attack » appliqué au myco-microbiote pulmonaire dans la mucoviscidose (Conrad et al. 2013)

✓ Chez les patients asthmatiques

Pendant l'enfance, une interaction entre les microorganismes et les muqueuses notamment pulmonaire a été récemment mise en évidence, avec plusieurs composants du microbiote identifiés comme participant activement à la défense de l'hôte. Ainsi la muqueuse du corps humain est colonisée par des communautés poly-microbiennes rencontrées dès l'enfance et est continuellement façonnée par son environnement. Il semble donc que les conséquences de l'exposition à des microorganismes pendant l'enfance influencerait notre tolérance à ces microorganismes et le développement de pathologies telles que les allergies ou l'asthme tout au long de la vie (Katsoulis et al. 2019). Ceci rejoint la théorie hygiéniste où la faible exposition microbienne (milieu plutôt urbain par opposition au milieu

rural) serait liée à un risque élevé de développer des allergies ou un asthme (Mathieu et al. 2018). L'inhalation de microorganismes environnementaux impacte le microbiote respiratoire, qui est aussi modulé par le microbiote intestinal de façon directe (via les reflux gastriques ou phénomènes de micro-aspiration) ou indirecte (via la réponse immune et inflammatoire par exemple).

Ainsi, le microbiote pulmonaire de patients asthmatiques montre une augmentation du phylum *Proteobacteria* chez les patients asthmatiques modérés et sévères, dominé par le genre *Haemophilus* et parfois par les genres *Klebsiella*, *Neisseria* et *Moraxella* (Figure 9). Le genre *Streptococcus* (phylum *Firmicute*) a aussi été corrélé avec la sévérité de l'asthme. Ces études montrent aussi une association entre traitement par stéroïdes et/ou bronchodilatateurs et une prévalence plus élevée des *Proteobacteria* avec une diversité bactérienne plus élevée pour les patients sains (Marri et al. 2013) (Huang et al. 2015). L'augmentation de ce phylum n'a pas été retrouvée dans une étude comparant le microbiote respiratoire de 24 patients asthmatiques non sévères, 25 sévères et 15 adultes en bonne santé. Il ne trouve pas non plus de différence de diversité entre ces trois groupes de patients. Cette étude s'est intéressée au lien entre microbiote respiratoire et état inflammatoire des patients et a mis en évidence que les familles *Pseudomonadaceae* et *Enterobacteriaceae* sont plus abondantes chez les patients asthmatiques et que la famille *Actinomycetaceae* est plus abondante chez les patients éosinophiliques avec inflammation chronique des voies respiratoires (N. Li et al. 2017). Finalement le lien entre le microbiote respiratoire et les caractéristiques des patients asthmatiques tels que la sévérité, le phénotype, le statut inflammatoire et les traitements commence à être documenté, en particulier par la mise en évidence de l'expression différentielle de certains taxons (OTU) corrélée à ces caractéristiques. Il n'y a pas de preuve aujourd'hui concernant les modifications des communautés bactériennes pendant un phénomène d'exacerbation chez les patients asthmatiques. Néanmoins, il semble que des interactions bidirectionnelles entre le microbiote respiratoire et le système immunitaire existent et modulent ce dernier (Di Cicco et al. 2018).

L'étude du mycobiote respiratoire de patients asthmatiques concerne relativement peu d'études, alors qu'il a été montré que la sensibilisation fongique est associée à un mauvais contrôle de l'asthme, particulièrement quand il s'agit d'une sensibilisation à *Aspergillus* et *Penicillium* (Katsoulis et al. 2019). La comparaison entre le mycobiote pulmonaire de sujets sains et celui de patients asthmatiques a mis en évidence une abondance significativement plus élevée des espèces *Malassezia pachydermatis*, *Psathyrella candolleana* et *Termitomyces clypeatus* chez les patients asthmatiques (van Woerden et al. 2013). Une étude s'est intéressée à la charge fongique estimée à partir de LBA de patients asthmatiques sévères et révèle également une charge plus importante chez ces patients que chez des sujets sains. De plus, les patients qui ont reçu un traitement par corticostéroïdes présentent une charge fongique significativement plus élevée que les patients non traités (Fraczek et al. 2018).

✓ *Interactions entre le système immunitaire de l'hôte et les communautés microbiennes*

Les interactions entre le système immunitaire de l'hôte et le microbiote pulmonaire seraient impliquées dans le développement et potentiellement l'aggravation des MRC (Di Cicco et al. 2018). Concernant les champignons, le système immunitaire de la muqueuse pulmonaire est continuellement confronté à des micromycètes et leurs antigènes, en particulier en raison de l'exposition permanente des poumons à des champignons oraux et environnementaux (Underhill et Iliev 2014; Linh D. N. Nguyen, Viscogliosi, et Delhaes 2015; Zoll et al. 2016). Le mycobote pulmonaire peut donc avoir des effets inflammatoires importants pouvant causer ou aggraver une MRC, notamment via les PAMPS (motifs moléculaires associés aux agents pathogènes) tels que le glucan et la chitine présents à la surface des micromycètes qui sont reconnus par des récepteurs capables d'activer les cellules immunitaires et de provoquer une inflammation (Tipton, Ghedin, et Morris 2017).

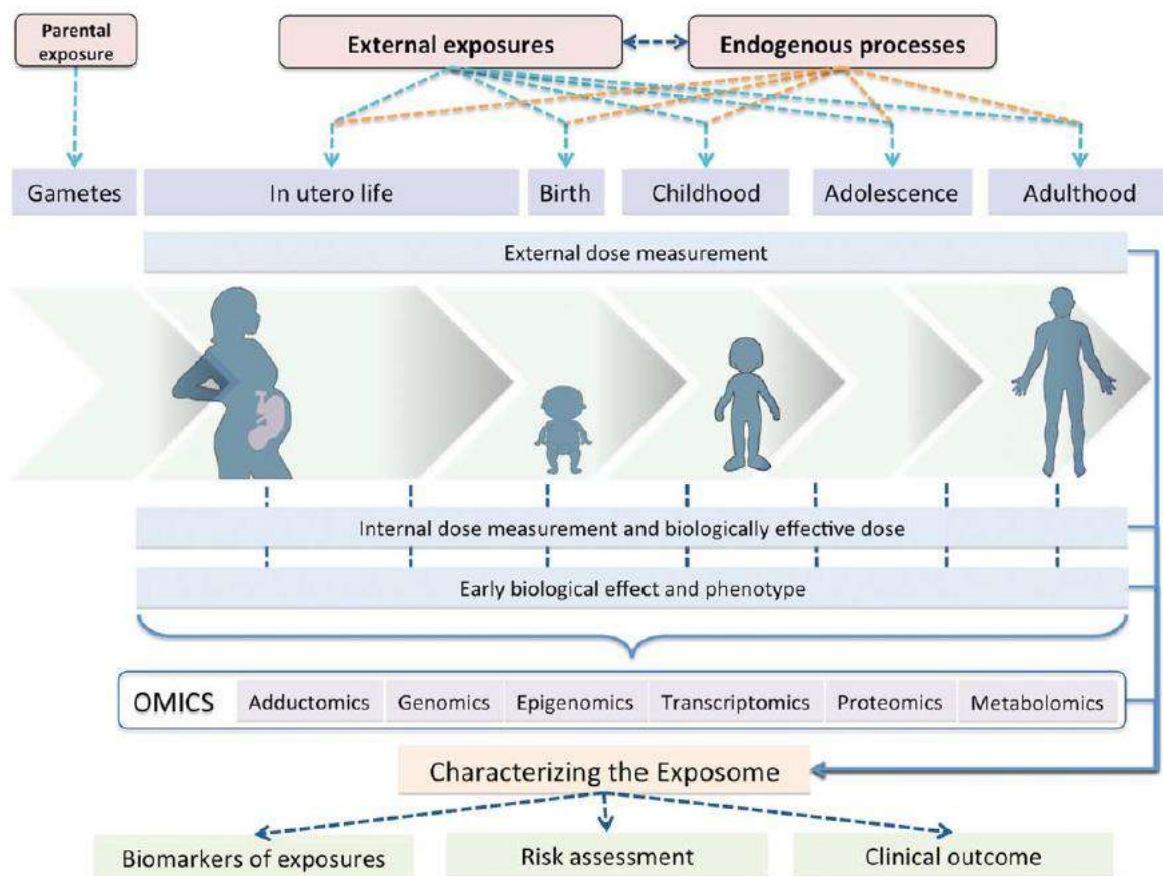
✓ *Interactions interrègnes entre les communautés bactériennes et fongiques*

Les interactions interrègnes entre les communautés de micromycètes et de bactéries semblent jouer un rôle prépondérant dans le développement et la progression de pathologies respiratoires (Nogueira et al. 2019). Parmi les différentes formes d'interactions décrites dans la littérature, une a été bien détaillée (Krüger et al. 2019): les bactéries vont être en compétition avec certains micromycètes. Par exemple la croissance de *Candida*, retrouvé dans des proportions importantes dans le mycobote de patients atteints de mucoviscidose, est réprimée quand *Pseudomonas aeruginosa* est dominant (présent en forte abondance). Cette inhibition de la croissance fongique par des bactéries peut être liée à une compétition nutritionnelle, permettant aux bactéries de s'assurer leurs besoins pour sécuriser leur fixation aux cellules hôtes (Haiko et al. 2019) (Fourie et Pohl 2019).

Les recherches sur les interactions interrègnes n'en sont qu'à leurs prémices, mais semblent incontournables dans la compréhension des pathologies respiratoires telles que les MRC ; leur prise en compte pouvant aboutir au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Il semble indéniable que certaines combinaisons bactérie-champignon identifiées dans les études de myco-microbiote seront le point de départ de futures recherches (Krüger et al. 2019).

## II. L'EXPOSOME MICROBIEN DE L'ENVIRONNEMENT INTERIEUR

En 2015, l'exposome entre pour la première fois dans un article de loi française de santé publique (Article 1er de la loi Touraine). Ce terme définit l'ensemble des expositions environnementales rencontrées par un sujet tout au long de sa vie : de sa conception à sa mort (Figure 11). Ce concept a été développé pour attirer l'attention sur les besoins de considérer l'impact de l'exposome sur la santé, et ainsi mieux comprendre les causes de certaines pathologies et améliorer leur prévention. De plus, cet intérêt croissant permet de disposer de données environnementales plus complètes dans le cadre d'études épidémiologiques (Christopher Paul Wild 2012).



**Figure 11 : Caractérisation de l'exposome. Les expositions peuvent être classées en deux catégories : les sources externes et internes.** Les sources externes concernent différents facteurs environnementaux et modes de vie (par exemple, des composés chimiques, le tabac, l'alimentation) et les sources internes concernent les processus endogènes tels que les hormones, inflammation, le microbiote etc. L'exposome est étudié par un large éventail d'outils, parmi lesquels les « omics » ne représentent qu'une seule approche (Christopher P. Wild, Scalbert, et Herceg 2013).

L'exposition aux microorganismes de l'environnement est une part importante de l'exposome, on parle alors « d'exposome microbien ». Cette exposition commence *in utero* et se poursuit par une colonisation microbienne postnatale (Figure 11), dépendant de l'environnement, de l'urbanisation, du

mode de vie et du régime alimentaire qui influenceraient les microorganismes auxquels nous sommes exposés, et notre susceptibilité à leur exposition. Le rythme d'urbanisation ces dix dernières années n'a fait que s'accroître, environ 54% de la population mondiale vit aujourd'hui dans un environnement urbain. Ce phénomène signifie que nous passons plus de temps dans un environnement clos ou intérieur (estimé à environ 90% de notre temps). Cela impliquerait que nous sommes exposés à une moins grande diversité microbienne, ce qui impacterait notre système immunitaire et donc notre physiologie (Sharma et Gilbert 2018). Les nouvelles technologies de séquençage ont ouvert la voie de l'investigation de ces communautés microbiennes de l'environnement intérieur, et de leur impact sur la santé en particulier chez les populations sensibles comme celles atteintes de MRC.

Après un point méthodologique sur les méthodes d'échantillonnage et d'analyse de l'exposome microbien, l'origine du myco-microbiote exogène sera détaillé et l'état des connaissances actuelles sur son rôle dans les MRC en particulier la mucoviscidose et l'asthme sera développé.

## 1. L'exposome microbien de l'air intérieur

Récemment, la vaste communauté microbienne présente dans l'environnement intérieur a fait l'objet d'une attention particulière par leur omniprésence et leur diversité. C'est devenu une fraction détectable et analysable qui peut être prise en considération dans la qualité de l'air intérieur. Si certaines contaminations sont visibles à l'œil nu, telle que la présence de moisissures dans certains logements, d'autres agents microbiens sont invisibles. Au-delà de la présence de microorganismes, l'environnement intérieur peut concerner la présence de pollen, de phanères (fines particules de peau, d'ongles, de poils etc.), d'insectes, d'acariens ou même de composés organo-volatils. Au niveau microbien, cet environnement comprend des virus, des bactéries et des microchampignons qui peuvent être analysés de différentes manières. Les technologies de séquençage NGS permettent de caractériser ces communautés microbiennes en offrant un aperçu plus exhaustif. Nous nous concentrerons à présent sur l'étude des communautés bactériennes et fongiques présentes dans l'environnement intérieur (Shan et al. 2019).

### A. Méthodologie d'analyse : de l'échantillonnage à l'analyse NGS

#### ✓ *Echantillonnage*

Il existe plusieurs techniques d'échantillonnages et d'analyses qui permettent de capturer et caractériser les microorganismes présents dans l'air intérieur.

Le piégeage des microorganismes peut se faire à partir de matrices différentes : surface, air, poussières, et à partir de matériaux différents : écouvillons, filtres, lingettes (Eduard 2009; Nevalainen, Täubel, et Hyvärinen 2015; Leppänen et al. 2018) :

- Air : l'impaction sur boîte de pétri ou en milieu liquide, la filtration ou l'aspiration
- Surface : écouvillonnage, ruban adhésif ou boîte de pétri directement en contact avec une surface donnée
- Poussières : par aspiration ou par capteur avec l'utilisation d'une lingette.

La question biologique oriente sur le type d'échantillonnage à réaliser (recueil visant à explorer la contamination aigue ou au contraire chronique) et le type d'analyse envisagé (culture microbiologique ou analyse moléculaire).

Les poussières sont une source représentant un réservoir majeur des microorganismes présents dans l'air intérieur. Elles ont fait l'objet de nombreuses études qui ont confirmé sa capacité à représenter l'exposome microbien (Leppänen et al. 2018; Shan et al. 2019).

On distingue également les prélèvements actifs, effectués à un instant « t » et qui représentent l'exposition microbienne au moment de l'échantillonnage, des prélèvements passifs effectués sur une durée plus longue. Ceux-ci représentent l'exposition microbienne durant le temps du prélèvement et permettent d'estimer une exposition chronique (Eduard 2009; Nevalainen, Täubel, et Hyvärinen 2015; Leppänen et al. 2018). Les prélèvements passifs par l'utilisation de capteurs électrostatiques (EDC pour « *Electrostatic Dust Collector* ») ont l'avantage d'être peu coûteux, donc facilement déployables dans une étude qui regroupe un nombre important de patients/logements. Ils ont fait l'objet d'études validant la captation des microchampignons et de bactéries, mais aussi d'acariens (Scherer et al. 2014) (Normand et al. 2016).

#### ✓ Analyses

Les méthodes classiques de culture sur des milieux spécifiques couplées à la microscopie ont largement été utilisées et permettent, en plus d'identifier les moisissures capables d'être cultivées, de les quantifier en CFU (pour « *Colony Forming Unit* »). Cependant ces méthodes ne sont pas exhaustives car dépendantes des conditions de culture utilisées (milieux, température et durée d'incubation). Enfin, un prélèvement unique ne peut être utilisé que pour un type de microorganisme (bactéries ou champignons etc.), et l'identification en parallèle de microorganismes de règnes différents nécessite de multiplier les prélèvements (Cabral 2010; Nevalainen, Täubel, et Hyvärinen 2015).



Les méthodes de biologie moléculaire, par des approches de PCR quantitative en temps réel (qPCR) sont très utiles pour cibler des espèces pathogènes chez l'homme. Ces approches offrent la possibilité d'identifier et de quantifier plusieurs microorganismes à partir d'un seul échantillon. Le séquençage NGS, par métagénomique ciblée est quant à lui une approche sans a priori qui présente de multiples avantages en caractérisant les communautés microbiennes du prélèvement. Cependant, cette technique conserve un certain nombre de défis méthodologiques, et ceci à plusieurs étapes du processus expérimental (Behzad, Gojobori, et Mineta 2015). En effet, l'extraction des acides nucléiques à partir des prélèvements d'air, de surface ou de poussières sur une surface et durant un temps donné offrent des rendements faibles. Tout comme le myco-microbiome respiratoire, il s'agit donc de caractériser de la biomasse rare, ce qui implique de grandes précautions quant aux risques de contaminations (laboratoire, réactifs de laboratoire, manipulateurs etc.) et d'interprétation. Néanmoins, l'émergence de ces technologies décrivant l'exposome microbien nous permet de mieux appréhender les mécanismes structurant ces communautés et *in fine* de mieux investiguer le lien avec la santé (Korpelainen et Pietiläinen 2017).

## B. Le myco-microbiote de l'air intérieur dit « exogène »

Les facteurs environnementaux extérieurs affectent particulièrement la composition de l'exposome microbien du milieu intérieur. Décrire la composition de cet exposome microbien intérieur repose en grande partie sur l'étude de ces facteurs qui sont aujourd'hui de plus en plus détaillés dans la littérature. La question principale à ce jour est : quelle est l'origine des microorganismes retrouvés dans notre air intérieur, en particulier pour les micromycètes et les bactéries ?

### ✓ *L'origine des microorganismes de l'environnement intérieur*

L'origine des microorganismes de l'air intérieur en termes de biodiversité et d'écologie a été étudié dans différents milieux tels que les toilettes publiques, les hôpitaux, les résidences, les salles de classes, les bureaux regroupés dans des immeubles, aux domiciles d'individus sains ou malades etc. Ces études ont cherché le lien entre les communautés microbiennes et les facteurs environnementaux spécifiques du lieu étudié (Gaüzère et al. 2014; Adams et al. 2015). Ainsi, il a été identifié que les sources de l'exposome microbien de l'air intérieur sont avant tout l'environnement extérieur (le sol et l'air), les sources intérieures (les systèmes de ventilations, de chauffage, l'humidité, les matériaux de construction) et les occupants humains et non-humains (animaux domestiques) (Shan et al. 2019).

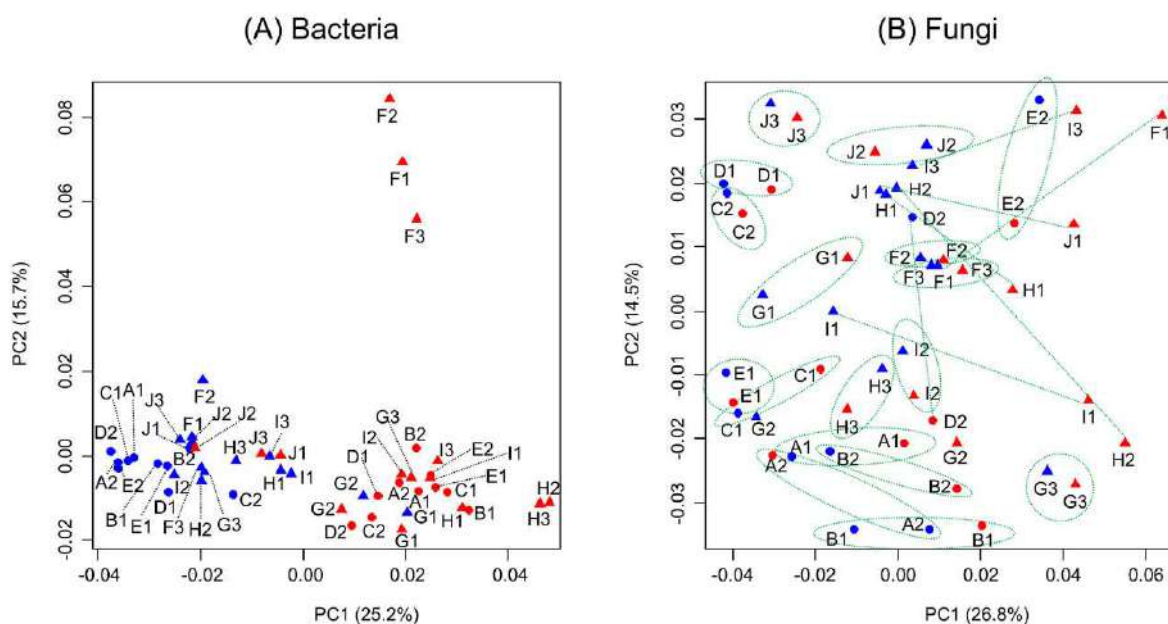
## L'exposome fongique de l'environnement intérieur

Les communautés fongiques de l'air intérieur sont décrites comme similaires aux communautés fongiques de l'air extérieur (Figure 12 (B)) (Nevalainen, Täubel, et Hyvärinen 2015; Shin et al. 2015; Jayaprakash et al. 2017; Shan et al. 2019). Les champignons (notamment sous forme de spores) ont la particularité de résister à des conditions environnementales extrêmes, et ont des capacités de dissémination très importantes dues à la taille de leurs spores (de 2 à 100 µm selon les espèces), leurs formes et leurs poids qui leur permettent de se disperser dans l'air à des distances très importantes (Peay, Kennedy, et Talbot 2016). L'atmosphère, qui comprend l'air que nous respirons, compte une densité d'espèces fongiques inférieure au sol et à l'eau. Nous sommes donc majoritairement en contact des microorganismes de l'air via la respiration. Les spores fongiques constituent une fraction importante de l'exposome microbien, et sont 100 à 1000 fois plus nombreuses que les autres particules microbiennes de l'exposome. Les champignons dans l'environnement intérieur représentent donc une part importante de l'air inhalé (Cabral 2010). La biomasse fongique de l'air extérieur est corrélée à la biomasse fongique de l'air intérieur. Ainsi le lieu géographique de l'habitation détermine la biomasse de l'air intérieur, qui évoluera en fonction des saisons. Au-delà de la biomasse, la composition des communautés de l'air intérieur ressemble aux communautés de l'air extérieur. Cependant, certaines espèces de champignons sont plus abondantes en milieu intérieur que dans l'air extérieur, comme par exemple le genre *Penicillium*. Ceci témoignerait d'une origine plutôt liée à l'occupation humaine qu'à l'environnement extérieur. D'autres sources de champignons de l'environnement intérieur peuvent provenir de la manipulation de matières organiques ou biologiques telles que les légumes, fruits ou fromage dans l'habitation. De plus, la présence de plantes vertes en pot est aussi un facteur qui impacte la biomasse et la composition fongique de l'exposome microbien de l'environnement intérieur (Nevalainen, Täubel, et Hyvärinen 2015).

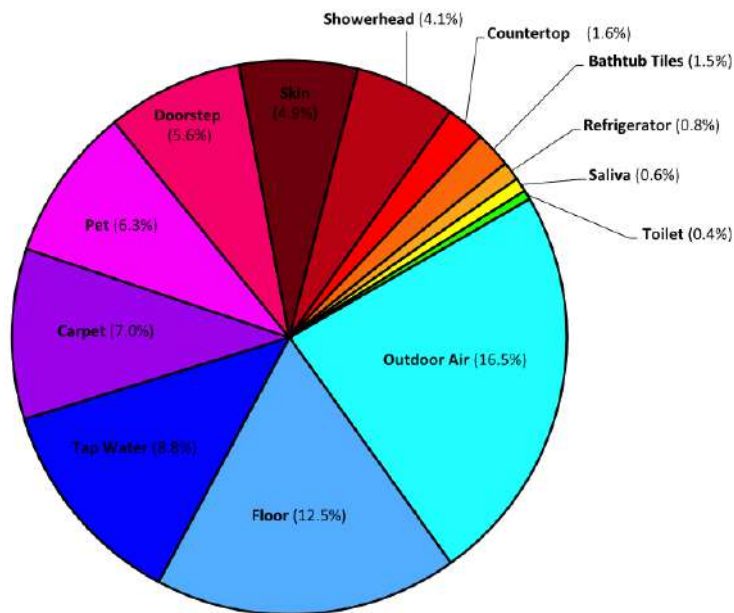
Le type de chauffage a révélé être un autre facteur de modification de l'exposome fongique intérieur, avec une diminution de la diversité fongique et une augmentation d'*Epicoccum nigrum*, dans le cas d'un chauffage au bois. Ceci a été montré dans une étude qui s'est concentrée sur l'analyse de logements sans problème de moisissure apparente (Rocchi et al. 2017). Une étude sur des logements avec de la moisissure apparente, a évalué l'impact d'interventions (de rénovation) en comparant l'exposome fongique avant et après interventions. Elle a montré une diminution significative de la diversité fongique (et bactérienne) après rénovation, uniquement quand les occupants restaient dans le logement pendant l'étape de rénovation (Jayaprakash et al. 2017). Cette étude suggère l'impact de l'occupation humaine sur la diversité de l'exposome microbien.

## L'exposome bactérien de l'environnement intérieur

Si la source principale des champignons de l'environnement intérieur est l'air extérieur, il en est autrement pour les communautés de bactéries. Celles-ci sont surtout déterminées par l'occupation de l'habitat, présence humaine et/ou animale. Parmi plusieurs études, celle de (Shin et al. 2015) montre une différence significative des communautés bactériennes entre l'exposome microbien de l'air intérieur et celui de l'air extérieur (Figure 12 (A)). En effet l'exposome bactérien est principalement composé de bactéries connues pour être associées à l'homme telles que *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, et *Propionibacterium*. Le nombre de résidents et la fréquence d'aération des lieux de vie seraient associés à l'augmentation de la charge bactérienne dans de l'air intérieur. De plus, la proportion de bactéries supposées dérivées de la peau augmente avec le nombre de résidents, et les chiens (et non les chats) augmentent significativement la diversité des communautés bactériennes de l'air intérieur. Les animaux domestiques seraient la source des bactéries de l'air intérieur à hauteur de 6,3% (Figure 13). Cependant, d'autres études ont montré qu'une proportion non négligeable de bactéries retrouvées dans l'environnement intérieur sont issues de l'air extérieur (Figure 13). (Miletto et Lindow 2015; Richardson et al. 2019).



**Figure 12 : Analyse en composante principale (ACP) des communautés bactériennes (A) et fongiques (B) de l'air intérieur (bleu) et de l'air extérieur (rouge) de 5 garderies (sites A à E, rond) et 5 écoles élémentaires (sites F à J, triangle) à Séoul en Corée du Sud. Les cercles et lignes vertes indiquent les paires d'échantillons (air intérieur et extérieur) à partir du même site d'échantillonnage. La structure des communautés bactériennes est significativement différente entre les échantillons d'air intérieur et extérieur (d'après un test de Wilcoxon). Cette figure est issue de l'étude de (Shin et al. 2015).**



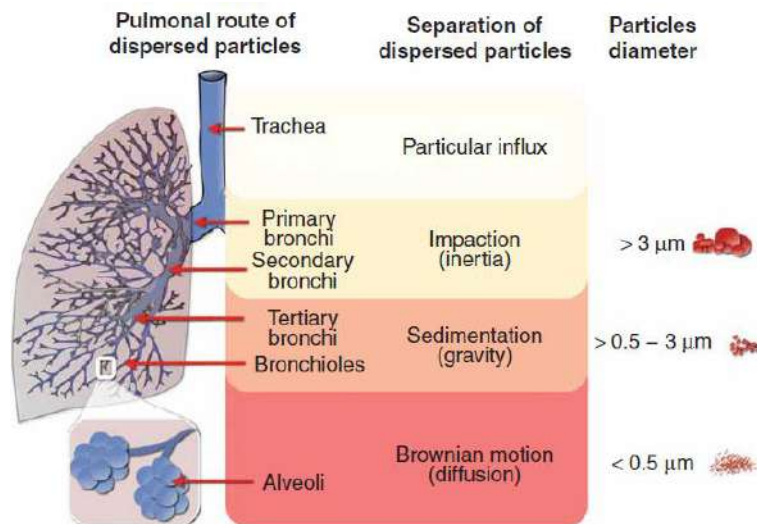
**Figure 13 : Sources de l'exposome bactérien de l'air intérieur.** Les prédictions ont été estimées par l'utilisation de SourceTracker. La proportion de sources non-identifiées correspond à 29,6% et n'est pas représentée sur ce camembert (Miletto et Lindow 2015).

Une méta-analyse a regroupé les résultats de 23 études, dans le but d'identifier des mécanismes récurrents entre ces études expliquant la structure des communautés microbiennes de milieux intérieurs, et si les communautés bactériennes et fongiques seraient soumises aux mêmes mécanismes. Les auteurs mettent en évidence la difficulté de tirer des conclusions du fait de l'hétérogénéité des méthodes utilisées. En effet, de l'étape d'échantillonnage à l'analyse des données NGS, le manque de standardisation et la variabilité entre les environnements étudiés (localisation géographique, matériaux de construction etc.) ne permet pas de conclure sur des mécanismes communs structurant les communautés microbiennes de l'air intérieur (Adams et al. 2015).

## 2. L'impact de l'exposome microbien sur l'état de santé de patients atteints de MRC

Les poumons humains représentent une surface d'environ 50 m<sup>2</sup>, et sont en contact avec plus de 15 000 litres d'air chaque jour. A chaque inspiration, environ 5 000 particules de poussières sont inhalées. De la taille de ces particules va dépendre leur capacité à pénétrer les voies respiratoires, ceci étant illustré chez un individu sain en Figure 14. La poussière dans l'atmosphère de la terre contient entre 10 000 et 100 000 microorganismes par gramme de poussière. Le système respiratoire représente donc la première porte d'entrée d'un grand nombre de microorganismes (van Woerden et al. 2013; Sullivan et al. 2016). Les conséquences de l'inhalation de substances présentes dans l'air (sous

forme de poussières, de gaz, de composés organiques volatils etc.) sont de plus en plus considérées dans l'étude des pathologies respiratoires. Et il est clair que les conséquences de cette inhalation vont dépendre de l'état de santé du patient.



**Figure 14 : Dépôt pulmonaire de particules inhalées et mode de séparation dans les poumons d'un individu sain.** La taille des particules, leur densité et leur géométrie influencent leur cheminement dans les poumons d'un individu sain : les particules inhalées avec un diamètre supérieur à 5 μm ne dépassent pas le nez et la gorge, alors que les particules entre 1 et 3 μm atteignent les bronches primaires et secondaires par impaction (par le principe d'inertie). Les particules de 0,5 à 3 μm quant à elles pénètrent dans les bronches tertiaires jusqu'aux bronchioles par sédimentation. Finalement les particules inférieures à 0.5 μm se déposent via le mouvement brownien (mouvement aléatoire d'une particule soumise uniquement à l'interaction de chocs avec de plus petites particules) dans les petites alvéoles (Klinger-Strobel et al. 2015).

Les communautés fongiques qui occupent les voies respiratoires humaines sont hautement variables entre individus : le nombre d'espèces fongiques présent seulement chez un individu peut être supérieur au nombre d'espèces partagées entre des individus différents. Ceci peut s'expliquer par l'existence d'un exposome environnemental unique, propre à chaque individu (Tipton, Ghedin, et Morris 2017). Les études sur l'exposome microbien (myco-microbiote exogène) ont montré des associations significatives entre les communautés microbiennes de l'environnement intérieur et le développement et/ou l'aggravation de maladies respiratoires chroniques (Dannemiller et al. 2014; Rocchi et al. 2015; Sharpe et al. 2015; Dannemiller et al. 2016; Pekkanen et al. 2018; Caillaud et al. 2018; Karvonen et al. 2019; Kirjavainen et al. 2019; Yashiro, Savova-Bianchi, et Niculita-Hirzel 2019). Je vais maintenant porter un intérêt particulier aux études centrées sur la mucoviscidose et l'asthme.

## A. Mucoviscidose

Il est fréquent que les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose soient colonisées par des champignons filamenteux, notamment par *Aspergillus fumigatus*. La majorité des études de l'exposome microbien chez ces patients concerne la détection de ce microchampignon. La colonisation par *A. fumigatus* peut conduire à l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) qui est reconnue comme une cause de morbidité et de détérioration de la fonction respiratoire chez les patients atteints de mucoviscidose. Une concentration plus élevée d'*A.fumigatus* estimée par qPCR a été mise en évidence dans le domicile de patients atteints de mucoviscidose et porteur d'une ABPA (Rocchi et al. 2015). Cependant, par des méthodes conventionnelles de culture mycologique, il a été montré que le nombre de colonies d'*Aspergillus sp.* ne diffèrent pas significativement d'un domicile de patient avec pathologie aspergillaire à celui d'un domicile de patient sans pathologie aspergillaire (Pricope et al. 2015). L'investigation de l'exposome microbien de patients atteints de mucoviscidose a été peu étudié, et ces investigations ont ciblé spécifiquement certaines espèces fongiques telles que *A.fumigatus* et non une communauté fongique, ce qui est cohérent avec la physiopathologie d'une ABPA dans la mucoviscidose dont les causes sont bien connues. Cependant, l'exposome co-présent pourrait être à l'origine de l'aggravation de l'état clinique du patient.

De rares études chez les patients atteints de mucoviscidose ont tenté de corréler les communautés fongiques pulmonaires de ces patients à la composante fongique de leur exposome. Une étude réalisée chez des patients pendant un état clinique stable et au cours de traitement antibiotiques a montré qu'une proportion considérable d'espèces fongiques présentes dans leur environnement extérieur (région d'habitation des patients) sont identifiées dans le mycobiote pulmonaire (Kramer et al. 2015). Sachant que la première source de l'exposome fongique de l'environnement intérieur est l'environnement extérieur, l'exposition à des espèces fongiques présentes dans l'environnement immédiat du patient participe à la structuration de son mycobiote respiratoire, et pourrait être impliquée dans son évolution clinique.

## B. Asthme

L'exposition à des microorganismes pendant l'enfance a été largement associée au risque de développer de l'asthme, ou au contraire certaines espèces pourraient avoir un effet protecteur quant à son déclenchement. Différents facteurs associant l'exposome microbien et le développement de l'asthme ont été identifiés et examinés ces dernières années, notamment l'effet fratrie, la prise en compte du lieu de vie, la présence d'animaux domestiques et de moisissures visibles dans le lieu d'habitation. Ces facteurs ont été examinés dès le plus jeune âge, dans le but d'identifier les facteurs

de risque associés à l'asthme et d'expliquer la forte prévalence de l'asthme chez les enfants. Ce lien a aussi été documenté chez les adultes asthmatiques chez qui le lien entre les crises d'asthme, l'aggravation de leur état clinique et l'exposome microbien a été démontré (Sharpe et al. 2015; Caillaud et al. 2018; Karvonen et al. 2019; Cox, Ege, et Mutius 2019).

✓ *L'exposome microbien chez l'enfant : prédictif, délétère ou protecteur de l'asthme ?*

L'incidence de l'asthme chez les enfants n'a cessé d'augmenter ces dix dernières années, ce qui a fortement dynamisé la recherche sur les facteurs de risque dès le plus jeune âge. Le myco-microbiote de l'air intérieur a donc été majoritairement étudié chez l'enfant (Caillaud et al. 2018; von Mutius 2016). Les enfants qui grandiraient à la ferme auraient moins de risque de développer un asthme que ceux habitants dans un environnement urbain (Kirjavainen et al. 2019). Ceci a été reproduit dans deux pays (Finlande et Allemagne) où l'effet « protecteur » de l'exposome microbien des fermes sur le développement de l'asthme a été démontré. La caractérisation du myco-microbiome exogène de l'environnement intérieur des enfants ne vivant pas dans une ferme a mis en évidence que leur risque de développer un asthme diminue à mesure que leur microbiote (communautés bactériennes) tend à ressembler à celui des enfants vivant dans une ferme. Ce microbiote « protecteur » a une faible abondance de la famille Streptococcaceae qui est un taxon retrouvé dans le microbiote de l'air extérieur. L'effet protecteur est associé à une diminution de la réponse aux cytokines pro-inflammatoire contre les parois cellulaires bactériennes. Par ailleurs, les communautés bactériennes de l'air intérieur de nourrissons de 2 mois jusqu'à leur onzième année ont été suivies et ont été associées au risque de développer un asthme, notamment le genre *Lactococcus*. 12 genres appartenant principalement à l'ordre Actinomycetales sont quant à eux associés à une diminution du risque de développer un asthme et pourraient faire partie d'un « core protecteur ». Finalement, la recherche de genres bactériens présents dans l'exposome microbien et sa composition pourrait être un facteur prédictif de développement de l'asthme et donc une cible potentielle pour des approches de prévention, si celui-ci s'avère modulable (Karvonen et al. 2019).

Concernant les micromycètes, une diminution de la diversité fongique de l'exposome microbien est associée à l'augmentation du risque de développer un asthme pendant l'enfance. Cependant, l'humidité et les moisissures visibles présentes dans les logements semblent liées à une augmentation de la diversité fongique mais aussi être associées à l'augmentation du risque de développer un asthme (Dannemiller et al. 2014). De plus, il a été montré que l'association entre le mycobiote exogène et le risque de développer un asthme semble différente selon le type d'asthme (allergique ou non allergique) (Dannemiller et al. 2016).

✓ *L'exposome microbien chez l'adulte asthmatique et phénomène d'exacerbation*

Beaucoup d'études ont été effectuées chez l'enfant et ont établi que le myco-microbiote environnemental pouvait avoir un rôle délétère ou protecteur sur le déclenchement de l'asthme, mais peu d'études se sont intéressées à l'adulte asthmatique. La comparaison du microbiote de l'air intérieur de maison de patients asthmatiques et non-asthmatiques a révélé l'effet protecteur de *Clostridium* (Pekkanen et al. 2018). L'étude du mycobioote exogène a révélé un lien avec le déclenchement ou l'aggravation des symptômes de l'asthme chez l'adulte (Sharpe et al. 2015). Une méta-analyse a révélé que les espèces fongiques *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium* ont été identifiées dans des concentrations plus élevées dans les maisons de patients asthmatiques. De plus, *Cladosporium*, *Aspergillus* et *Penicillium* ont été aussi associés au risque de développer des symptômes d'asthme, et ces trois micromycètes, avec *Alternaria*, sont liés à une augmentation des phénomènes d'exacerbations (Sharpe et al. 2015).



### III. REVUE : FROM CULTUROMICS TO METAGENOMICS : CLINICAL RELEVANCE OF THE MYCOBIOME L-E.VANDENBORGH AND AL. 2019

Titre révisé pour publication: **“From culturomics to metagenomics: the mycobiome in chronic respiratory diseases”** Vandenberght L-E., Enaud R., Coron N., Denning D., Delhaes L. Chapter 6. The Lung Microbiome. Michael J. Cox, Markus J. Ege, et Erika von Mutius, The Lung Microbiome, vol. 83 (European Respiratory Society, 2019), <https://doi.org/10.1183/2312508X.erm8319>.

L'ensemble de notre travail de synthèse bibliographique a donné lieu à une participation sous forme de chapitre à la monographie de la Société Européenne de Pneumologie (ERS) dédiée au microbiome pulmonaire (ERS Monograph : « The Lung Microbiome » edited by Michael J. Cox, Markus J. Ege and Erika von Mutius).

#### 1. Résumé :

Le règne des champignons inclut environ 5 millions d'espèces, qui pour certains produisent des spores que nous inhalons quotidiennement. Les conséquences vont dépendre de l'état de santé du sujet, en particulier de son système immunitaire et d'atteintes pulmonaires déjà présentes. Habituellement, l'inhalation de spores provoque une colonisation transitoire du système respiratoire. Cependant, chez les patients atteints de MRC ou immunodéprimés, la colonisation fongique, notamment par *Aspergillus spp* peut être à l'origine d'une allergie ou d'une infection et peut impacter le mycobiote respiratoire ainsi que l'état clinique du patient.

Ce chapitre se concentre sur le mycobiome dans le contexte des MRC en détaillant les populations de patients à risque, et en synthétisant les différentes méthodes utilisées pour diagnostiquer la colonisation ou l'infection fongique au cours des MRC, et en expliquant l'apport du NGS dans l'analyse du mycobiote respiratoire. Nous proposons une revue des outils diagnostiques depuis les méthodes conventionnelles (ou culturomique) jusqu'aux approches NGS de métagénomique ciblée, en abordant également le concept d'« exposome fongique ».

#### 2. Plan du chapitre

- ✓ *Fungal colonization and infection: the risk for different patient groups*
- ✓ *Assessing the fungal risk in Chronic Respiratory Diseases (CRDs): an update of conventional methods*
- ✓ *The challenging area of NGS of the lung mycobiome in CRDs*
- ✓ *Place of the fungal exposome*



# From culturomics to metagenomics: clinical relevance of the mycobiome

Louise-Eva Vandenberght<sup>1,2</sup>, Raphaël Enaud<sup>1,3,4</sup>, Noémie Coron<sup>1,3</sup>, David Denning<sup>5</sup> and Laurence Delhaes<sup>1,3,4</sup>

The Fungi Kingdom includes about 5 million species of yeasts, moulds and the more familiar mushrooms, all producing spores that are present in the human environment. A large proportion of respiratory and endemic fungal infections start with spore inhalation. Inhaled fungi affect human health related to the host immune status and any underlying pulmonary disorder such as primary infections, progressive opportunistic infections, chronic infections and allergic disease. Usually, inhalation of fungi results in transient colonisation of the respiratory tract, as they are cleared by an intact respiratory tract and immune system. However, when the patient has a chronic respiratory disorder (CRD) or is immunocompromised, fungal colonisation, notably with *Aspergillus* spp., may lead to allergic disease or infection. Whatever persists defines the respiratory mycobiome. This chapter focuses on the mycobiome in the context of CRDs and reviews the patient populations at risk, advances in the laboratory tools used to diagnose fungal respiratory disease ranging from conventional methods (culturomics) to NGS approaches (targeted metagenomics), and the concept of the “fungal exposome”.

**Cite as:** Vandenberght LE, Enaud R, Coron N, *et al.* From culturomics to metagenomics: clinical relevance of the mycobiome in chronic respiratory diseases. *In:* Cox MJ, Ege MJ, von Mutius E, eds. The Lung Microbiome (ERS Monograph). Sheffield, European Respiratory Society, 2018; pp. 000–000 [<https://doi.org/10.1183/2312508X.10015918>].



@ERSpublications

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX <http://ow.ly/MZSK30mLWop>

Fungal diseases occur worldwide, affect hundreds of millions of people and are probably responsible for an increasing number of deaths. Paradoxically, therapeutic advances may have resulted in an increased number of survivors of (malignant) disease able to develop mycosis, which is often misdiagnosed and responsible for patient death. Mortality associated with mycosis is estimated at 1.6 million, comparable to that of tuberculosis and

<sup>1</sup>University of Bordeaux, INSERM, Cardiothoracic Research Center, UMR 1045, Bordeaux, France. <sup>2</sup>Genoscreen Society, Lille, France. <sup>3</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Bordeaux, France. <sup>4</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, CRCM Pédiatrique, CIC 1401, Bordeaux, France. <sup>5</sup>National Aspergillosis Centre, Wythenshawe Hospital, University of Manchester, Manchester Academic Health Science Centre, Manchester, UK.

Correspondence: Laurence Delhaes, Laboratory of Parasitology–Mycology, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, INSERM, Center for Cardiothoracic Research of Bordeaux, U1045, CIC 1401, F-33000, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France. E-mail: [laurence.delhaes@chu-bordeaux.fr](mailto:laurence.delhaes@chu-bordeaux.fr)

Copyright ©ERS 2018. Print ISBN: 978-1-84984-101-6. Online ISBN: 978-1-84984-102-3. Print ISSN: 2312-508X. Online ISSN: 2312-5098.

three times that of malaria. Serious fungal infections are either potentially fatal or cause major morbidity [1]. A large proportion of respiratory and endemic fungal infections start with spore inhalation [2]. Inhaled fungi affect human health in a variety of ways related to the host immune status, such as primary infections (e.g. acute pulmonary histoplasmosis), progressive opportunistic infections (e.g. *Pneumocystis* pneumonia, invasive aspergillosis (IA)), slowly progressive and chronic infections (e.g. chronic pulmonary aspergillosis (CPA), paracoccidioidomycosis) and allergic disease (e.g. allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA), extrinsic allergic alveolitis) [2–4].

Spores are ubiquitous, found in all environments from deserts to buildings and including most human dwellings. Some fungi are truly global, notably *Aspergillus* spp., bread mould (*Rhizopus* spp.) and many allergenic fungi such as *Alternaria* and *Cladosporium* spp. Due to their morphological and biochemical features, they are easily dispersed, moving large distances. The air we breathe always contains viable fungal spores, broken hyphae coated with allergenic protein material and dust with fungal allergens attached; there are usually 100 to >1 000 000 spores·m<sup>-3</sup>, unless explicitly filtered out in clean-air environments, such as operating rooms [3, 4]. According to their size (2–100 µm), form and weight, spores encounter the human respiratory tract at different points from the upper and lower airways to the alveoli. Whatever persists (evading destruction by the normal superficial and deeper immune defences) defines the respiratory mycobiome. It is likely that micro-aspiration from the mouth, pharynx, paranasal sinuses or oesophagus also contributes to the respiratory mycobiome in some or all people.

While fungal exposure is a daily universal experience for the human respiratory system, only a very few fungi are virulent enough to cause disease, including in patients with complete immunity. For example, inhalation of a single arthrospore of *Coccidioides immitis* is enough to cause disease [5]. Only about 600 of the estimated 3–5 million species of fungi on Earth [6, 7] have been noted to cause disease, although probably many more are allergenic. Those with low virulence potential are considered opportunist pathogens and usually result in transient colonisation, defined as when micro-organisms (here fungi) grow on body sites (here the respiratory tract) exposed to the environment, without causing any infection. These organisms are cleared by an intact respiratory tract and immune system. However, when the patient suffers from a chronic respiratory disorder (CRD) or is immunocompromised, fungal colonisation, especially with *Aspergillus* spp., may lead to allergic disease or infection [1, 2, 8, 9].

Respiratory samples may reveal filamentous fungi and/or certain yeasts on culture or on microscopy [2, 10, 11]. Negative cultures for *Aspergillus* spp. are more common than positive cultures in all forms of aspergillosis. Positive mycological cultures in respiratory samples from patients have to be interpreted with caution, because yeasts frequently reflect recent antibiotic or corticosteroid use, and airborne contamination of agar plates in the laboratory may yield filamentous fungi that are not present in the patient's airways. The diagnosis of fungal diseases is evolving, with retention of conventional methods such as direct microscopy, culture and antigen biomarkers, but also with recent advances in molecular testing, especially NGS.

In this chapter, we will review and discuss the patient populations at risk, the advances in laboratory tools used to diagnose fungal respiratory disease ranging from conventional methods to NGS approaches, and the concept of the “exposome”, taking into account both our ability to characterise mainly fungal flora or the mycobiome, and our difficulty in

deciding on the clinical relevance of this respiratory mycobiome. The exposome is a new concept, and refers to all exposures to environmental factors that a human undergoes from conception and development *in utero* to death. Exposure accompanies any genetic predisposition (and may induce epigenetic changes) to explain many chronic disorders, total health being comprised not only of genetic traits but also of interactions between genes, environment and time, as proposed recently [12, 13]. This novel concept of the exposome has drawn attention to the critical need for more assessment of environmental exposures, especially in clinical studies focused on chronic disorders that appear to have their origin in the surroundings and in the lifestyle of an individual, rather than in the genetic constitution of the patient [14, 15]. It includes a viable portion but also a nonviable portion such as allergens, radiation, chemical contaminants, environmental pollutants, and diet and lifestyle factors such as smoking that may also be important. Here, we will focus on the fungal exposome, which refers to the mycological component of the whole exposome, and which has been documented recently in CRDs using NGS [16].

## Fungal colonisation and infection: the risk for different patient groups

Inhalation of various pathogenic micro-organisms, such as bacteria, viruses and fungi, that comprise the viable part of the exposome can affect our health by colonising and damaging the human respiratory tract. Among these, fungi are now known to cause a wide range of disorders from colonisation to infection and allergy, such as ABPA, which was first recognised as a clinical entity by Hinson [17] in 1952, against a background of underlying local and/or systemic risk factors (figure 1). Apart from *Candida* spp. yeasts (and probably other yeasts) that colonise and infect patients through the colonisation mode of endosaprophytic micro-organisms (micro-organisms, especially fungi, that belong to the endogenous host flora on mucosal surfaces and in natural host cavities that live at the expense of the host but without causing disease) and *Pneumocystis jirovecii*, which is strictly a human infection with airborne transmission between people, fungi are inhaled and disseminated as exosaprophytic micro-organisms (micro-organisms living in the outdoor environment in a saprophytic status, *i.e.* feeding on decomposing organic matter). Many soil-inhabiting and plant-pathogenic fungi can cause respiratory disorders and have been described recently [19]. In this section, we will summarise the risks associated with fungi, especially from *Aspergillus* and *Candida* spp., which represent the two genera isolated most frequently from respiratory samples of patients, focusing on CRDs, which confer high morbidity and mortality.

### Role of fungi in CRDs: from bystander to pathogen status

Besides the well-described host–pathogen interactions of *Aspergillus fumigatus* and, to a lesser degree, *Aspergillus flavus* (table 1) [18], many other fungi are able to produce similar host–pathogen interactions (figure 1). Invasive mycosis has been described with *Aspergillus*, *Scedosporium* and *Fusarium* spp., *Candida* ascomycetes and members of the order Mucorales. Aspergilloma and allergic sinusitis have been associated with *Fusarium* spp., while ABPA and allergic bronchopulmonary mycosis (ABPM; due to fungi other than *Aspergillus* spp. including *Candida albicans*) have been associated mainly with CF or asthma [2, 10, 19, 20–28]. A new entity has been described associating severe asthma with fungal sensitisation (SAFS) [2, 10, 19, 20–28]. *Aspergillus* bronchitis may be caused by any of the pathogenic *Aspergillus* spp., and is a chronic superficial infection of the lower airways

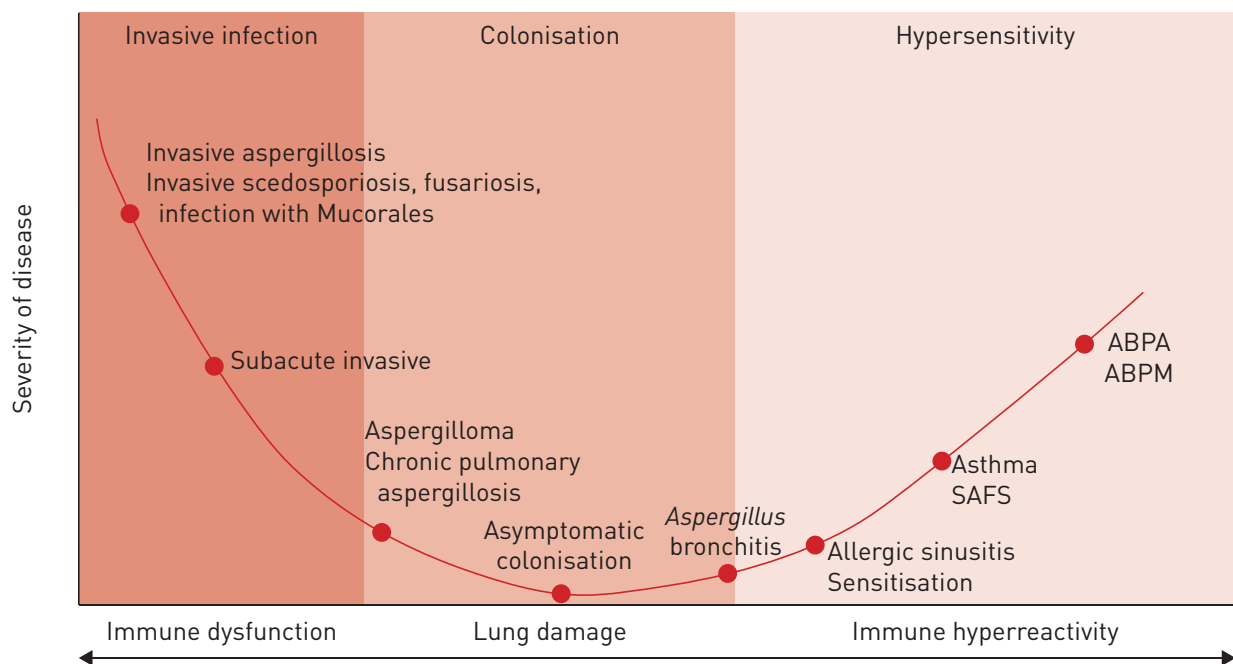


Figure 1. Patterns of fungal interactions exemplifying different host–pathogen interactions, according to the host damage response framework. Invasive mycosis has been described with *Aspergillus*, *Scedosporium* and *Fusarium* spp., *Candida* ascomycetes and members of the order Mucorales. Aspergilloma and allergic sinusitis have been associated with *Fusarium* spp. Severe asthma with fungal sensitisation (SAFS) is a new entity characterised by the presence of severe asthma and fungal sensitisation but without bronchiectasis or mucus plugging, and with total IgE values of  $<1000 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) and allergic bronchopulmonary mycosis (ABPM) are caused by *Aspergillus* spp. or fungi other than *Aspergillus* spp. (including *Candida albicans*). Information from [18].

(trachea and bronchi) of typically nonimmunocompromised patients such as CF patients or those with bronchiectasis. In CF, ABPA seems to be underestimated ( $\sim 20\text{--}25\%$  of patients) and is associated with significant morbidity; it has been detailed elsewhere [29–32]. In asthma, ABPA prevalence ranges from 2.5% to 22.3% and has been reviewed elsewhere [2, 31]. More recently, allergic fungal rhinosinusitis has been considered as the upper airway expression of ABPA, as the pathogenesis of these diseases appears to be similar [33]. *Aspergillus* sensitisation, defined as the presence of immediate cutaneous hypersensitivity or elevated IgE levels against *A. fumigatus*, has been associated with more severe disease in

Table 1. Clinical patterns of aspergillosis that may be extended to other filamentous infections

Organ	Type of disease			
	Invasive (acute and subacute)	Chronic	Saprophytic	Allergic
Lung	Invasive, granulomatous	Chronic cavitary <i>Aspergillus</i> nodule Chronic fibrosing <i>Aspergillus</i> bronchitis	Aspergilloma (single) Airway colonisation	Allergic bronchopulmonary Severe asthma with fungal sensitisation Extrinsic allergic alveolitis
Sinus	Acute invasive	Chronic invasive Chronic granulomatous	Maxillary or sphenoid Fungal ball	Allergic fungal sinusitis Eosinophilic fungal rhinosinusitis



patients with asthma and CF [26, 29]. Sensitisation to other fungi, especially to other moulds, has been described in asthma [2, 31]. Finally, persistent carriage of *A. fumigatus* was also associated with lung function decline in CF [34].

Therefore, differentiating transient carriage, chronic colonisation and infection is key in making the correct clinical decisions.

Colonisation is not necessarily with normal flora. It may persist durably, with resolution influenced by the host immune response, by competition at the site from other micro-organisms and, occasionally, by the use of antimicrobial drugs. Fungal colonisation is well known and has been documented in the URT [35]. In contrast, the LRT was thought to be sterile for decades, until recent observations challenged this [36, 37]. Based on recent molecular techniques, especially NGS, it is now evident that asymptomatic colonisation also occurs in the LRT (reviewed in [38]). Persistent carriage or chronic colonisation with *Aspergillus* spp. has been defined in CF. Similar to the definition of chronic colonisation with *Pseudomonas aeruginosa*, chronic colonisation with *Aspergillus* spp. refers to  $\geq 50\%$  of sputum samples over 6–12 months or at least two samples in 1 year as positive for *Aspergillus* spp. isolation [10].

There is growing evidence that the presence of fungi in the respiratory tract is associated with poorer lung function in CF, asthma and COPD (table 2) [2, 23, 34, 53, 58, 63]. Briefly, *Aspergillus* spp., in particular *A. fumigatus*, have been associated with a faster decline in lung function [34, 39, 42, 44–47], with acute exacerbation [40, 42, 44, 53, 64] and with an increased risk of exacerbation requiring hospitalisation [42, 53] in CF, asthma and/or COPD.

Sensitisation or exposure to other moulds (evaluated by a mould score or molecular quantification using quantitative PCR) has been significantly associated with asthma and COPD [42, 48–50, 54, 55]. Invasive mycosis due to non-*Aspergillus* spp. mould, especially *Scedosporium* spp., has been reported in CF [10, 62]. In CF and non-CF bronchiectasis, patients with *C. albicans* persistent colonisation had a worse FEV<sub>1</sub> and more hospital-treated exacerbations (table 2) [40, 43]. In intensive care unit (ICU) patients, *Candida* spp. airway isolation is associated with more initial disease severity but does not influence the outcome [52].

IA has been reported to be rare in CF but does occur, especially in CF patients with lung transplantation [41]. It is also reported in asthma and COPD, but CPA, such as bronchitis, is more frequent (table 2) [26, 57–60, 61, 65].

Regarding *P. jirovecii*, which represents an atypical uncultivable fungus responsible for pneumonia (known as PCP for *Pneumocystis pneumonia*) typically observed in immunosuppression contexts such as HIV-infected patients, colonisation was found to occur in CF, asthma and COPD patients (table 2) [1, 49, 55, 66]. Apart from COPD for which *P. jirovecii* colonisation is a well-documented risk factor for more severe disease [1, 36], further studies are warranted to clarify its role in CRDs.

### Populations at risk for pulmonary mycosis: updated major features

Infections caused by filamentous fungi represent a major growing burden as they have emerged in non-neutropenic patients with predisposing conditions such as corticosteroid treatment, asthma, COPD, HIV infection and ICU hospitalisation [1, 2, 6, 51]. Asthma,

Table 2. Summary of the main fungal species isolated from the respiratory tract and associated with respiratory features in patients with chronic respiratory disorder and their significance, expressed as pairs of biological criteria/associated clinical trait

Clinical feature	Fungal species			
	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Other moulds	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
<b>Acute pulmonary exacerbation (APE)</b>	In CF: persistent colonisation/hospital-treated exacerbations [39] In non-CF bronchiectasis: persistent colonisation/more hospital-treated APE [40]	In CF: sensitisation/APE [32] In asthma: sensitisation/APE [33] In COPD: <i>Aspergillus</i> spp. isolation in sputum/APE in the previous year [41]	In asthma: sensitisation to <i>Alternaria</i> sp./APE [42]	
<b>Lung function alteration</b>	In CF: persistent colonisation/worse FEV <sub>1</sub> [40, 43]	In CF: sensitisation and persistent colonisation/greater lung function decline [34, 39, 44–46] In asthma: sensitisation/decreased FEV <sub>1</sub> /FVC ratio [47]; colonisation/worse FEV <sub>1</sub>	In asthma: exposition to moulds/decreased FEV <sub>1</sub> /FVC ratio or FEV <sub>1</sub> [39, 48, 49]; <i>Penicillium</i> spp. colonisation/worse FEV <sub>1</sub> [39] In COPD: total fungal DNA/worse FEV <sub>1</sub> and FVC [50]	In CF: <i>P. jirovecii</i> DNA detected in sputum samples/greater FEV <sub>1</sub> [51] In COPD: colonisation/worse lung function and greater inflammation [36]
<b>Hospitalisation</b>	In CF: persistent colonisation/hospital-treated exacerbations [43] In ICU: <i>Candida</i> spp. airway isolation/more initial disease severity [52]	In CF: persistent colonisation/increased risk of APE requiring hospitalisation [53] In asthma: sensitisation/hospitalisation for APE [42]	In asthma: mould exposure/persistent airways obstruction [48, 54]; number of asthma admissions/number and size of positive mould skin allergy tests [55]	
<b>Invasive infection</b>	In ICU: candidaemia/high risk of mortality [56]	In CF: IA/higher risk in lung transplantation in CF <i>versus</i> non-CF patients [41] In asthma: IA/long-term corticotherapy [57] In COPD: IA/severe COPD [58–61] In ICU: IA/prolonged stay in ICU [1]	In CF: persistent colonisation with <i>Scedosporium apiospermum</i> /disseminated scedosporiosis [10, 62]	In non-HIV immunosuppressed patients: more severe <i>P. jirovecii</i> pneumonia [1]

FVC: forced vital capacity; ICU: intensive care unit; IA: invasive aspergillosis.

COPD and CF represent CRD populations with increasing causes of disease and mortality. They affect more than 300 million, 384 million and 100 000 people worldwide, respectively, and are populations in whom airways fungal colonisation often occurs [67–70]. This growing impact of fungi has led to the proposal of several novel mycological classifications.

In patients with COPD, a definition of pulmonary aspergillosis as proven, probable, possible and colonisation has recently been proposed [71]. As >10% of pulmonary aspergillosis cases are seen in patients with advanced COPD [72], a search for *Aspergillus* spp. in the respiratory tract is currently recommended when COPD patients are at risk, *i.e.* previous or current treatment with corticosteroids or antimicrobials, advanced COPD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) classification greater than or equal to stage III), pulmonary cavitation, radiological or clinical deterioration, high comorbidity or a stay in the ICU [72, 73]. *Aspergillus* spp. sensitisation has been associated with worse lung function in COPD [58, 72, 74–77]. In CF, patient risk factors associated with fungal colonisation or infection have recently been reviewed [10]. Among these, a 10% drop in FEV<sub>1</sub> is associated with increased odds of isolating filamentous fungi by 5%, which paves the way for mycological monitoring of sputum whenever CF patients start lung function alteration. In non-CF bronchiectasis, *Aspergillus* sensitisation or ABPA was associated with more severe disease, poorer lung function and acute exacerbations, indicating a need for systematic screening for *Aspergillus*-associated disorders [78].

Among people with suppression of their immune system, inhaled fungi as well as the commensal fungal community may cause infection. The risk is higher if they have an underlying pulmonary disease, prior pneumonia or lung damage. Invasive mycosis poses the chief infectious challenge in haematology, oncology and the ICU. In particular, candidaemia is highly frequent in ICU patients with comorbidity factors such as severe COPD. In addition, IA is frequent in the AIDS population, and may be responsible for ~4% of deaths in this population (*i.e.* 40 000 deaths) [1].

Finally, patients with chronic pulmonary symptoms and evidence of *Aspergillus* spp. (or another fungus at a lower degree of frequency) in the airways who do not fulfil the diagnostic criteria for CPA, ABPA or IA may suffer from bronchitis (table 1). The prominent symptoms will distinguish these patients from those with fungal colonisation and will require specific treatment and follow-up.

## Assessing the fungal risk in CRDs: an update of conventional methods

The presence of fungi in the respiratory tract of patients with a CRD remains an unresolved dilemma for clinical management, and is becoming more frequent and problematic as a larger diversity of fungi is reported in the respiratory mycobiome. Although distinguishing between temporary carriage, long-term carriage or colonisation, and a sign preceding invasive or allergic disease remains difficult, several advances in standardising conventional methods, in analysing the respiratory mycobiome and in characterising the fungal exposome have been made.

### Sampling methods

Sputum, induced sputum, bronchial specimens, BAL and distal protected samples are all suitable specimens for detecting fungi; microscopy (direct examination), cultures,



galactomannan (GM) or  $\beta$ -glucan antigen, and PCR targeting fungal species or genera such as *Aspergillus* are useful tests.

Apart from differentiating distal protected samples from others due to the exceptional contamination of such samples, there is no consensus on the relative value of each type of respiratory sample. However, noninvasive samples such as sputum or induced sputum are the most accessible in patients on chronic follow-up. However, if a fungal infection is suspected, endotracheal aspirate, BAL or a protected brush specimen is recommended, as all are superior to sputum [76]. In paediatrics, sputum samples are often difficult to obtain and therefore oropharyngeal swabs are frequently done [76]. The main characteristics of each type of sample are summarised in table 3 [1, 10, 79–83]. Currently, the method of choice for sampling the respiratory tract for mycological analysis continues to be refined, with consideration of the risks and benefits of more invasive approaches, the duration of such monitoring, and the increased understanding of spatial variations in upper- and lower-airway microbiota [84, 85].

### Fungal cultures and extended cultures

While direct examination, specific mycological media and mass spectrometry are widely used to identify fungi, there is no consensus on specimen volume and preparation, the choice of media, or the temperature and duration of incubation for fungal cultures. However, notable advances have been completed based on clinical and microbiological trials done mainly in the field of CF.

The use of specific mycological media for culture-based detection has recently been reviewed [10, 74, 86]. The most frequent fungi isolated from respiratory samples, especially *Aspergillus* spp., grow well on rich bacterial media including sheep or horse blood agar. Primary mycological isolation media include yeast–peptone–dextrose agar (YPDA) or Sabouraud dextrose agar (SDA), and other fungal media containing cycloheximide or antibacterial agents (e.g. Mycosel). However, isolation rates in established disease are <50%, so improvements in media or culture technology are required. In asthma and COPD, YPDA or SDA are used to characterise fungal flora [39, 46, 74, 86–88].

Several selective media have been tested in CRD sputum analysis. In CF, dichloran–rose–bengal–benomyl agar, *Scedosporium*-selective medium, YPDA or SDA supplemented with chloramphenicol and cycloheximide, B<sup>+</sup> medium and erythritol medium have been used to improve the growth and detection of, respectively: 1) any slow-growing fungus (as benomyl inhibits the microtubule network of fungal cells), 2) *Scedosporium* spp., 3) slow-growing fungi that are resistant to cycloheximide, such as *Scedosporium* spp., 4) any slow-growing fungus inhibited by bacteria that the supplementation with four broad-spectrum antibiotics suppressed, and 5) *Exophiala* spp. (given their ability to use erythritol as a carbon substrate) [11, 89–92]. To overcome rapid bacterial growth inhibiting fungal growth, potato dextrose agar containing 16  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of chloramphenicol, 4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of gentamicin and 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of fluconazole has been used in sputum analysis from COPD patients [74]. A chromogenic medium can be used to isolate and identify *Candida* spp. [11, 73, 89, 93].

Primary isolation media do not require any special gas mixture and can be incubated successfully at 30°C or 37°C. A higher temperature (i.e. 42°C) inhibits *Candida* spp. growth. Birdseed agar allows *Cryptococcus* spp. to grow, preventing *Candida* spp. growth,

Table 3. Respiratory samples: main characteristics, advantages and disadvantages, pre-analytical modalities and mycological use

Sample (from URT to LRT)	Characteristics	Advantages/disadvantages	Pre-analytical modalities (minimal volume and shipment; current pre-treatment)	Mycology analysis
<b>Sputum, induced sputum</b>	Usual diagnostic approach in adult populations who require chronic monitoring (CF, COPD and asthma patients) Induced sputum collects an adequate sample of secretions from the lower airways in subjects who do not expectorate spontaneously	Easy to perform, noninvasive Difficult to obtain from paediatric patients Not validated in ICU patients Induced sputum produces a higher density of cell recovery but requires administration of nebulised isotonic or hypertonic solution	≥1 mL, 4 h at room temperature, for more; storage and shipment at +4°C Specimen homogenisation (chemical±sonication) before analysis recommended in CF; may be extended to other CRDs; centrifugation may be used	Mycological cultures on a high volume or on the pellet Galactomannan test has been proposed on the supernatant in CF
<b>Endotracheal aspirate, bronchial aspirate</b>	More invasive than induced sputum	Superior to sputum to determine the pathogenic role of a micro-organism Useful technique for children	≥1 mL, 4 h at room temperature, for more; storage and shipment at +4°C Specimen homogenisation (vortex)	Mycological cultures
<b>BAL</b>	Invasive procedure that requires sufficient respiratory capacity and anaesthesia of the patient, no major bleeding diathesis, and instruction and consent from the patient	Superior to sputum in determining pathogenic role of micro-organisms but depends on BAL quality (considerable variation) among practitioners, (no consensus reached) Explores a broader area of alveoli compared with other types of sample but has low yield for peripheral nodular lesions	≥1 mL, 4 h at room temperature, for more; storage and shipment at +4°C Centrifugation	Mycological cultures and PCR on pellet, associated with cytology analysis Galactomannan or β-glucan test, and PCR on supernatant

Continued

Table 3. Continued

Sample (from URT to LRT)	Characteristics	Advantages/disadvantages	Pre-analytical modalities (minimal volume and shipment; current pre-treatment)	Mycology analysis
<b>Distal protected samples (protected brush specimen)</b>	Invasive procedure (as for BAL)	Superior to sputum to determine the pathogenic role of a micro-organism	As much as possible is diluted into 1 mL of sterile physiological buffer	Mycological cultures and PCR
<b>Lung biopsy (transbronchial, percutaneous needle biopsy)</b>	Invasive procedure (as for BAL)	Ultimate way to determine if a micro-organism is a pathogen More suitable for peripheral lesions but not generally recommended due to low yield and frequent patient comorbidities that exclude this diagnostic approach Percutaneous needle biopsy may be more sensitive than BAL	On sterile humid compress, 4 h at room temperature, for more; storage and shipment at +4°C No pre-treatment	Mycological cultures and PCR

ICU: intensive care unit; CRD: chronic respiratory disorder.

which may be valuable in HIV-infected patients [94]. Cultures should be inspected daily for 5 days and not discarded for 14 days (for *Aspergillus*, *Scedosporium* or *Exophiala* spp. culture or in the search for filamentous basidiomycetes), especially if inoculated with a LRT sample or tissue [11, 19].

There are three reasons why a culture may be positive for a mould, including *Aspergillus* spp. First, the patient has invasive, chronic or allergic disease. Second, the patient is colonised, which may or may not represent a subsequent risk for the development of disease, depending on the clinical context. Third, the culture has been contaminated by airborne conidia present in the laboratory, which occurs more and more occasionally as mycosis frequency has increased and laboratory security post are commonly used to treat respiratory samples [95]. Currently, the likelihood of a positive culture representing disease is much higher, but interpretation of the relevance of a positive culture in the clinical context is still necessary. There is no relationship between the number of colonies and disease [96], but positive microscopy showing hyphae together with a positive culture is highly likely to represent significant disease, sometimes tracheobronchitis. Clinical laboratories are advised to report all positive isolations, regardless of the likelihood of contamination, perhaps adding a comment that contamination is possible, if necessary (mould isolation from samples that are rarely positive such as blood or urine, or a colony position on the plate that is not on the streak, indicates suspicion of airborne contamination but is not proof alone).

Isolated fungi are identified based not only on macroscopic and microscopic features but also on matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Given the development of a robust protocol and well-documented databases, MALDI-TOF MS has improved species identification, including cryptic species belonging to section [97–100].

An annual mycological analysis of sputum samples is now recommended by the European Cystic Fibrosis Society [12]; microbial analysis of sputum or any other lung specimen has recently been proposed in COPD patients with frequent exacerbations, exacerbations requiring mechanical ventilation or severe airflow limitation [67].

### Range of organisms

Using these specific approaches, the prevalence of fungi in CRDs can be assessed, despite some variations existing according to the mycological approach used.

Overall, *Aspergillus* and *Candida* spp. are the most frequent fungi associated with CRDs (figure 2) [13, 81, 88]. *A. fumigatus* and *C. albicans* are the most frequently recovered species from respiratory specimens in patients with CRD. Due to their being part of the normal gastrointestinal flora from the mouth to the anus, *Candida* spp., especially *C. albicans*, may colonise the URT when their digestive tract concentration is high, and/or when translocation occurs [101]. *Candida* spp. prevalence in CRD is quite high (up to 50%), although its clinical impact is unclear. *Aspergillus* spp. may be present in the respiratory tract of normal individuals, although it is difficult to define the precise frequency with which *Aspergillus* spp. are recovered from a truly “normal” population. For example, *Aspergillus* spp. were recovered from the tonsils of Finnish patients. In another study, 17 out of 23 throat culture specimens grew *Aspergillus* spp., as did four out of 26 jejunal cultures, 15 out of 20 ileal cultures and 12 out of 17 colonic cultures from

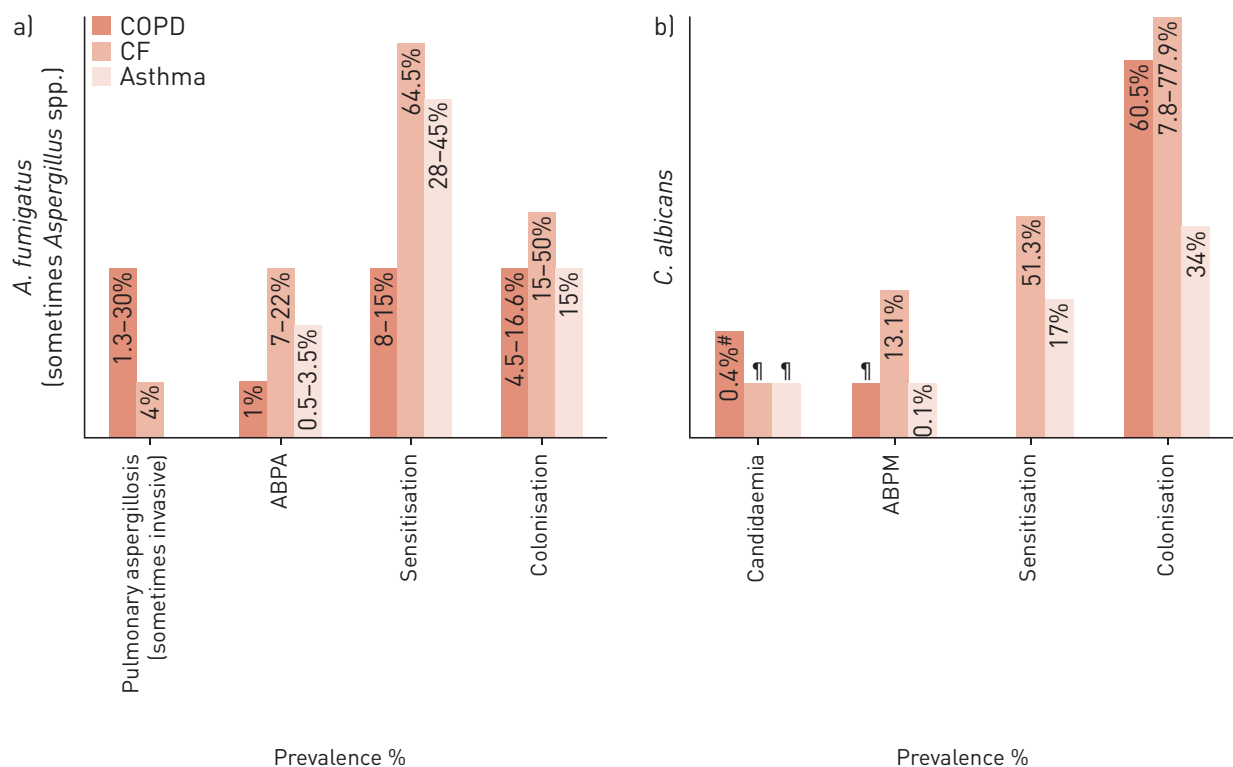


Figure 2. Ranges of prevalence of infection, allergic bronchopulmonary aspergillosis/mycosis (ABPA/ABPM), sensitisation and colonisation due to a) *Aspergillus fumigatus* and b) *Candida albicans* among patients with CRD. #: 0.4% probable API; 6% in the intensive care unit; ¶: sporadic cases.

healthy individuals. *Aspergillus niger* was the most common isolate, and no specimens yielded *A. fumigatus* or *A. flavus* [95]. Over 300 species are described in the genus *Aspergillus*. Species of the sections Fumigati, Flavi and Nigri, especially *A. fumigatus*, *A. flavus* and *A. niger*, represent the most common species implicated in human disease. *A. fumigatus* is the most implicated species (figure 2), the other species being recovered from about 10–31% and 1–6% of cases for *A. flavus*, and for *A. niger* or *Aspergillus terreus*, respectively, in CF and COPD populations [10, 73]. Several other filamentous fungi have emerged as opportunistic lung pathogens, such as *Fusarium solani*, *Lomentospora prolificans* and *Penicillium oxalicum*, probably in relation to the use of antifungals, as these species have poor or no antifungal susceptibility (reviewed in [19]). Isolation of species such as *Scedosporium* spp., *L. prolificans*, *Exophiala* spp., *Trichosporon mycotoxinivorans*, *Rasamsonia* spp. and filamentous basidiomycetes are increasingly reported, mainly in CF but also in other CRDs [10, 19, 102].

Fungal sensitisation is common, affecting 3–10% of the population, with sensitisation to *Alternaria* spp. being the most common [81], particularly in asthma patients. Sporadic cases of Mucorales sensitisation have also been described [13, 24]. *Candida* spp. sensitisation has been reported in asthma and CF patients, although no pathological significance could be attributed to this finding [103]. Cross-reactivity is common, with an unclear clinical relevance [104]. Specific *A. fumigatus* allergens, such as manganese superoxide dismutase, have been developed into ELISA approaches, but their diagnostic value in discriminating allergy from ABPA in CF or asthma remains a matter of debate [19, 81, 105]. To date, ABPA and ABPM are more frequent in an asthma or CF context than in COPD, with ABPA being much more frequent than ABPM (figure 2).

## Other diagnostic tools

Several biomarkers have been tested in order to improve mycosis diagnosis in CRDs, especially in CF patients. The skin-prick test, serum total IgE and specific IgE tests are the most recommended tests to screen for fungal allergy diseases (table 4). A specific IgG test could be used but is not specific for ABPA/ABPM diagnosis.

As  $\beta$ -glucan is a component of almost all pathogenic fungal cell walls (except for members of the Mucorales and *Cryptococcus* spp.), it represents a “pan-fungal” biomarker with a high negative predictive value, which may be useful in candidiasis and pneumocystosis, especially in ICU patients [8]. GM is a component of the *Aspergillus* cell wall, as well as that of *Penicillium* and *Histoplasma* spp. Both  $\beta$ -glucan and GM are released during fungal growth, and consequently signify an active fungal invasion, an observation particularly relevant in differentiating colonisation from infection in respiratory specimens [71, 106]. Currently, GM in BAL is considered the gold standard to diagnose pulmonary aspergillosis in neutropenic and non-neutropenic patients, with GM in serum being less sensitive in CRD populations (table 4). More recently, an *Aspergillus*-specific lateral-flow device test detecting an extracellular glycoprotein antigen secreted during active growth of *Aspergillus* spp. has been proposed as a promising test for diagnosing aspergillosis in both neutropenic and non-neutropenic patients (reviewed in [72]).

A PCR targeting fungal DNA, especially *Aspergillus* spp. DNA, is a highly sensitive test. Combining serological, PCR and GM tests, BAXTER *et al.* [106] defined three distinct classes of aspergillosis in CF, in which GM seemed to have the best added value, as it signalled an invasive process. Such a classification will be useful to decipher better the pathogenicity and management of CF aspergillosis.

The key test for CPA is *Aspergillus*-specific IgG. It is usually positive in cases of subacute invasive (previously chronic necrotising) pulmonary aspergillosis and in some cases of chronic and granulomatous sinusitis. The majority of patients with *Aspergillus* nodules or *Aspergillus* bronchitis are also positive, but false negatives are more frequent. This test is positive in >90% of CPA cases in Europe, with uncertain performance in countries where *A. flavus* and *A. niger* predominate. It is a critical part of the evaluation of patients with CPA, and titres can be used to follow therapy [107, 108].

## The challenging area of NGS of the lung mycobiome in CRDs

Due to its ability to cause profound inflammatory effects in addition to being responsible for allergic or infectious diseases, the fungal flora plays a key role in both healthy and diseased respiratory tracts, and NGS approaches have transformed this into a hot research area. Among the different approaches available when using NGS, targeted amplicon sequencing (also named targeted metagenomics, and defined as a high-throughput sequencing application focusing on a nucleotide target, such as ribosomal gene, in a microbiome to describe its taxonomic content and assess its diversity, to determine the microbial community of a sample) is more relevant to capture the fungal biomass of a given site such as the lung. It is based on the locus amplification of the eukaryotic nuclear ribosomal operon, because the high level of variability enables discrimination between very closely related fungal genera. Despite a lack of standardisation in primer designs, reference



Table 4. Biomarkers used to diagnose fungal diseases

Biomarkers	Advantage/disadvantage	Current use	Comments
<b>Skin-prick test (SPT)</b>	Simple and useful test High negative predictive value (NPV) (95% of NPV)	To screen for sensitisation	Difficult to standardise antigen production
<b>Intradermal test</b>	More sensitive than the SPT but with a high rate of false positives	Rarely used	Not used in daily clinical practice
<b>Specific IgE</b>	Highly sensitive test More sensitive than SPT but more expensive	To screen for sensitisation and ABPA/ABPM diagnosis Criterion diagnostic for ABPA/ABPM	Tests for specific IgE against <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Candida albicans</i> and <i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium</i> and <i>Alternaria</i> spp. are available; <i>Cladosporium</i> and <i>Alternaria</i> spp. are the two moulds recommended to assess atopy according to the European Community Respiratory Health Survey Proposed cut-off value of $>0.35 \text{ kUA}\cdot\text{L}^{-1} \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ in asthma
<b>Total IgE</b>	Sensitive, commercialised test	Criterion diagnostic for ABPA/ABPM	Proposed cut-off value of $1000 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ (or $2400 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in asthma and COPD, and of $500 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ (or $1200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in CF
<b>Specific IgG β-Glucan</b>	Sensitive tests Pan-fungal test, high NPV	Criterion diagnostic for ABPA/ABPM Serum test: to diagnose invasive mycosis, especially candidaemia and pneumocystosis; useful as a noninvasive test for pneumocystosis diagnosis	Not specific for ABPA or ABPM A positive test signals fungal growth (a cut-off value of $80 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ is used to screen for invasive mycosis using sera) Of note, measurement of β-glucan in BAL is not validated and remains a matter of debate
<b>Galactomannan (GM)</b>	Sensitive test, specific to <i>Aspergillus</i> spp., high NPV	Serum and BAL test: to diagnose invasive aspergillosis To classify pulmonary aspergillosis in COPD	A positive test signs fungal growth (index GM manufacturing cut-off value of 0.5) Proposed to classify aspergillosis in CF
<b>PCR targeting fungal DNA</b>	Highly sensitive but not standardised	To diagnose invasive aspergillosis or mycosis, especially pneumocystosis, as <i>Pneumocystis jirovecii</i> cannot be cultured	Not a current criterion to classify aspergillosis Useful to achieve an early diagnosis of pneumocystosis

ABPA: allergic bronchopulmonary aspergillosis; ABPM: allergic bronchopulmonary mycosis; kUA: allergen-specific IgE units.

databases and analytic methods (reviewed in [38, 109]), several studies have addressed the respiratory mycobiome in healthy and CRD contexts.

Using the same sampling methods as for culture, NGS reveals a higher complexity and diversity of fungal communities than estimated previously in the context of CF, asthma, COPD, lung transplantation and ICU hospitalisation. A lower fungal diversity has been associated with a lower respiratory function [109–113]. This reduced diversity may be due to overgrowth of a specific fungus, or the loss of some rare species [114].

### In healthy people

The lung mycobiome is composed mainly of environmental species and species in genera such as *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium* and *Penicillium* (table 5) [109, 112, 113, 115], which indirectly confirms that the healthy lung mycobiome is composed of a majority of transient environmental fungi. It is highly variable from one individual to another, and appears to be related to environmental exposures and to the complex oral mycobiome, which may explain why it is also composed of a number of *Malassezia* spp. [119, 120].

### In the CF population

Due to its well-established polymicrobial lung context, CF received the earliest and greatest attention. Several studies have pointed out an inverse correlation between mycobiome diversity and disease progression, which may result from a “less adapted for fungal growth” micro-environment (such as that resulting from mucus dysfunction in CF) [109–111, 113, 114]. This decreased diversity was also confirmed in non-CF bronchiectasis [78]. Three studies (including one based on single-strand chain polymorphism fingerprints and sequencing [121]) showed that the mycobiome composition is relatively stable throughout antimicrobial treatment [116, 117, 121]; two of these highlighted the importance of inter- and intra-species phenotypic variation as a crucial trait for host adaptation [117, 121]. In particular, *Candida* spp. (28 isolates from six patients) were found to have a mutated transcriptional repressor NRG1, rendering their filamentation uncoupled from NRG1 pathway signals and possible even in the presence of filamentation repressive signals produced by *P. aeruginosa* [117]. On the whole, compared with the microbiome in which major bacterial pathogens are frequently observed, fungi known to be pathogens in CF were detected mostly in low abundance [110, 111, 114, 116, 117, 121].

### In the asthma population

The mycobiome of sputum samples from asthma patients was significantly richer in *Malassezia pachydermatis*, *Psathyrella candolleana* and *Termitomyces clypeatus* than that of control subjects [115], the last two species being Macromycetes (mushrooms) species that may represent the fungal exposome detailed in a later section. Compared with patients with mild asthma or healthy subjects, the BAL of severe asthmatics carried higher loads of fungus characterised by members of the order Malasseziales and *A. fumigatus* [119]. This increased fungal load was significantly associated with corticosteroid treatment [119].

### In the COPD population

Two studies from the same group focused on COPD patients [112, 122]. Comparing HIV-infected patients with and without COPD [112], the main results were a mycobiome



Table 5. Characterisation of the fungal community in the respiratory tract based on NGS analysis

First author [ref.]	Type of sample and cohort	NGS technology, locus targeted, database used	Major results	Main fungi identified
<b>DELHAES [111]</b>	Eight sputa from CF patients	Pyrosequencing FLX 454 (Roche Life Science, Indianapolis, IN, USA); ITS2; ITS2dbScreen	Up to 60% of the species or genera identified by deep sequencing were not detected by culture	<i>Candida</i> , <i>Malassezia</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Hyphodontia</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Peniophora</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Clavispora</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Eurotiomycetes</i> , <i>Piptoporus</i> and <i>Didymella</i> spp.
<b>CHARLSON [109]</b>	BAL and oral wash of lung transplant recipients and healthy volunteers	Pyrosequencing FLX 454; ITS1; NCBI (nucleotide) database	Healthy oral wash revealed mainly environmental agents <i>Candida</i> spp. were absent in healthy BAL, which contained <i>Davidiellaceae</i> and <i>Cladosporium</i> spp; in contrast, BAL from lung transplant recipients were dominated by <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> and <i>Cryptococcus</i> spp.	<i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Wallemia</i> , <i>Eurotium</i> and <i>Penicillium</i> spp.
<b>VAN WOERDEN [115]</b>	Induced sputa of 30 asthmatic patients and 13 control subjects; patients were free of oral corticoid use for $\geq 2$ weeks	Pyrosequencing FLX 454; 18S rRNA; SILVA database	136 fungal species were identified: 90 species were more common in asthma patients, while 46 species were more common in control subjects <i>Malassezia</i> spp. yeasts were significantly more frequent in asthma sputum samples	Asthma patients: <i>Psathyrella candolleana</i> , <i>Malassezia pachydermatis</i> , <i>Termitomyces clypeatus</i> and <i>Grifola sordulenta</i> Controls: <i>Eremothecium sincaudum</i> , <i>Systenostrema alba</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> and <i>Vanderwaltozyma polyspora</i>
<b>BITTINGER [113]</b>	69 oral wash and 149 BAL of 12 healthy subjects, 19 HIV-positive patients, 13 with mixed pulmonary diseases and 42 lung transplant recipients, plus contamination controls	Pyrosequencing FLX 454; ITS1; NCBI (nucleotide) database	Fungal abundances were decreased in patients compared with healthy people, even after filtering out putative contamination sequences and OTUs, with HIV-infected patients having a lesser fungal abundance than lung transplant recipients	<i>Candida</i> , <i>Malassezia</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Wallemia</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Pichia</i> and <i>Rhodotorula</i> spp.

Continued

Table 5. Continued

First author [ref.]	Type of sample and cohort	NGS technology, locus targeted, database used	Major results	Main fungi identified
<b>WILLGER [116]</b>	Six sputa from CF patients (before and after antibacterial therapy)	Pyrosequencing FLX 454; ITS1; UNITE database	<i>Candida</i> and <i>Malassezia</i> spp. dominated the mycobiome and were present in all samples (74–99% of fungal reads); the fungal community was stable before and after antibiotics	<i>Candida</i> , <i>Malassezia</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Oxyporus</i> , <i>Epicoccum</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Phoma</i> , <i>Antrodia</i> , <i>Hypocreales</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Saccharomyces</i> and <i>Cryptococcus</i> spp.
<b>Cui [112]</b>	Oral wash, induced sputum and BAL from 56 subjects: 32 patients with HIV infection and 24 COPD patients without HIV infection	Ion PGM Sequencer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA); 18S rRNA, ITS1; 18S database and a local ITS-BLASTN database	<i>Candida</i> spp. represented 90% of ITS reads and were clearly dominant in oral washes compared with BAL, while <i>Pneumocystis jirovecii</i> was significantly overrepresented in both groups (HIV and COPD patients); interestingly, induced sputum had a mycobiome composition similar to that of BAL	In patients and healthy subjects: <i>Candida</i> , <i>Malassezia</i> , <i>Cladosporium</i> and <i>Ceriporia</i> spp. In HIV-infected and COPD patients: <i>Penicillium</i> , <i>Saccharomyces</i> and <i>Pneumocystis</i> spp.
<b>KIM [117]</b>	89 sputa from 28 CF patients with treated exacerbation	MiSeq sequencer (Illumina Inc., San Diego, CA, USA); ITS1; BLASTn and the FHiTINGS v.1–2 reference database	The mycobiome was quite stable throughout exacerbation and treatment; other species clinically relevant in CF were also sporadically identified, <i>i.e.</i> <i>Exophiala dermatitidis</i> , <i>Geosmithia argillacea</i> and <i>Malassezia</i> sp.	<i>Candida</i> spp. were the most abundant fungi (51 out of 89 samples), followed by <i>Aspergillus</i> spp. (18 out of 89 samples)
<b>NGUYEN [114]</b>	15 sputa from five CF patients with acute exacerbation treated by intravenous antibiotics	Ion PGM Sequencer; ITS2; DBScreen database	Dominant fungal genera were <i>Candida</i> spp. (more than two-thirds of reads), <i>Saccharomyces</i> spp. and <i>Nakaseomyces</i> spp.	<i>Candida</i> , <i>Saccharomyces</i> and <i>Nakaseomyces</i> spp., plus minority populations of <i>Malassezia</i> , <i>Alternaria</i> and <i>Fusarium</i> spp.
<b>KRAUSE [118]</b>	Endobronchial secretions and BAL of 202 ICU patients and control groups	Pyrosequencing FLX 454; ITS; UNITE database	Endobronchial secretions and BAL showed similar results; a shift of LRT mycobiome profiles into <i>Candida</i> -dominated profiles was associated with admission to and therapeutic management in the ICU but not with antibiotics	<i>Candida</i> was the dominant genus in ICU patients but not in non-ICU controls

Continued

Table 5. Continued

First author [ref.]	Type of sample and cohort	NGS technology, locus targeted, database used	Major results	Main fungi identified
<b>BOTTEREL [110]</b>	Four sputa from CF patients	Pyrosequencing FLX 454; ITS2; UNITE database	Ultra-deep sequencing is a powerful method to identify dominant taxa	<i>Aspergillus</i> , <i>Scedosporium</i> , <i>Candida</i> , <i>Malassezia</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Gloeotinia</i> , <i>Parastagonospora</i> , <i>Pseudopithomyces</i> , <i>Penicillium</i> and <i>Fusarium</i> spp.
<b>AOGAIN [78]</b>	Sputum and blood were obtained from each of 238 patients with bronchiectasis or from healthy subjects	HiSeq sequencer (Illumina Inc.); ITS1; UNITE database	The bronchiectasis mycobiome was distinct from the healthy one and was characterised mainly by <i>Aspergillus</i> , <i>Cryptococcus</i> and <i>Clavispora</i> spp.; a geographical variation was also reported	In both groups: <i>Candida</i> , <i>Saccharomyces</i> and <i>Penicillium</i> spp. In patients with bronchiectasis: <i>Aspergillus</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Clavispora</i> , <i>Botrytis</i> and <i>Alternaria</i> spp.
<b>FRACZEK [119]</b>	BAL samples of 16 ABPA, 16 SAFS, nine severe and seven mild asthma patients and 10 healthy subjects	MiSeq sequencer (Illumina Inc.); ITS1; BLASTn	The mycobiome was highly varied, with severe asthmatics carrying higher loads of fungi associated with corticosteroids	<i>Aspergillus fumigatus</i> and Malasseziales in asthma BAL

ITS, internal transcribed spacer; OTU: operational taxonomic unit; ICU: intensive care unit; ABPA: allergic bronchopulmonary aspergillosis; SAFS: severe asthma with fungal sensitisation.

dominated by *Candida* spp. in oral washes and induced sputum samples, a more diverse mycobiome in the BAL of patients (compared with controls), and a clear overrepresentation of *P. jirovecii* in both HIV-infected and COPD groups (compared with the control group using the neutral model). Using Random Forest and Metastats, 12 species were identified as specific to the COPD mycobiome [112].

### In a lung transplantation context

The mycobiome of lung transplant patients (including CF patients) was first characterised by CHARLSON *et al.* [109], who identified a reduced richness of both bacterial and fungal communities in BAL samples compared with healthy controls. The dominant species were *A. fumigatus* and *C. albicans*. Given the absence of patient clinical data, links between the mycobiome and its pathogenic role were not evaluated in this study. The same group analysed a larger cohort of BAL and oral wash samples from healthy individuals, HIV-positive patients and lung transplant patients [113]. They demonstrated that microbial communities from BAL and oral wash samples differed significantly from contamination controls, and found an increased representation of medically relevant organisms (*Candida*, *Cryptococcus* and *Aspergillus* spp.) in patients with more severe pulmonary and immunological deficits.

### In an ICU context

Two studies have focused on ICU patient mycobiomes [118, 123], only one using NGS [118]. *C. albicans* was the most abundant signature of the mycobiome from the BAL of ICU patients with and without pneumonia [123]. Fungal floras showed different trends according to the pneumonia aetiology: *Aspergillus*, *Penicillium* and *Cladophialophora* were the dominant genera in patients with community-acquired pneumonia, while *Cryptococcus* spp., and members of the class Agaricomycetes plus unclassified members of the Ascomycota were identified in nonventilator- and ventilator-associated pneumonia, respectively [123]. In the second study based on endotracheal samples to avoid oral flora contamination [121], *Candida* was identified as the dominant genus in ICU patients but not in non-ICU controls. Moreover, shifts in mycobiome profiles from the LRT into *Candida*-dominated LRT profiles were associated with admission to and management in the ICU but not with use of antibiotics [118].

## Place of the fungal exposome

Although the atmosphere accounts for a much lower density of fungal species than soil and water, it includes the air we breathe. Fungal spores constitute an important fraction of the bioaerosol component, in which they are 100–1000 times more numerous than other microbial particles. This bioaerosol concentration of spores depends on different factors such as humidity, temperature, and spore morphology or weight. The fungal exposome is now recognised as a risk associated with a range of detrimental health effects, including CRDs such as asthma [124–127].

### Main traits of outdoor and indoor spore composition

One main source of the indoor fungal exposome is outdoor air. The indoor fungal composition will then depend on the geographical location of dwellings, with climate and

season being responsible for notable variations in indoor fungal occurrences. Outdoor fungal biomass seems to be greater in winter than in summer [128]. Human behaviours, socioeconomic factors and building environments have clearly changed our exposure to fungal spores [14, 15, 129, 130]. As we breathe about 10 m<sup>3</sup> of air every day and spend >80% of our lifetime indoors, the composition of indoor air represents a critical public health investigation field.

### Indoor fungal exposure and CRDs

Indoor fungal exposure and allergic respiratory diseases (*e.g.* ABPA and ABPM) have been shown to be clearly linked, documented by the similarity of fungal genera identified in both human respiratory samples and the indoor air environment of patients. In CF patients, ROCCHI *et al.* [131] revealed that *A. fumigatus* was ubiquitous in all patients' dwellings but that the concentration was significantly associated with the occurrence of ABPA. Furthermore, a lower fungal diversity in house dusts to which children are exposed at 12 months of age is associated with increased probability of later asthma development [132]. Older children and teenagers are more likely to develop asthma for the first time in water-damaged, damp housing across Europe [133]. Recently, the concept of "transient species" has been described by KRAMER *et al.* [121]. This illustrates the fluctuation over time and among patients of fungal species in contrast to the bacterial communities identified in sputa, this fluctuation being directly related to the presence of numerous fungi with a rapid turnover in inhaled air [121].

The fungal exposome therefore seems to be associated with the onset and development of many diseases, which legitimises our interest in the mycobiome in the context of CRDs.

### Methods of measuring the fungal exposome

The fungal indoor composition can be assessed from different matrices (*e.g.* surfaces, air, dust samples), using different sampling materials (*e.g.* swabs, filters, wipes, vacuum pumps) and different analytic techniques (*e.g.* culture-dependent and micro-scopic methods, conventional molecular biology, NGS approaches). Among these, sedimentary sampling using electrostatic dust collectors is one of the simplest and cheapest methods. It requires a certain delay in sampling (10 weeks [130]), and consequently represents chronic (long-term) exposure rather than acute exposure. The long period of sampling has been shown to increase the measurement significance and reproducibility [4, 124].

Culture-dependent methods based on colony counts are widely used, often combined with quantitative PCR targeting specific moulds or terminal restriction fragment length polymorphisms [134]. NGS has been used in only a few studies but appears promising to obtain an exhaustive representation of the airborne fungal exposome (table 6).

NGS approaches have confirmed the fungal genera isolated previously with culture methods, and detected a major proportion of members of the Basidiomycota compared with a previous non-NGS study [130, 137–140]. However, genera in the Basidiomycota may be different according to the heterogeneous methodologies of these NGS studies (table 6). NGS studies showed variations in diversity, richness and evenness of the fungal exposome across environments that may have an impact on human health. Analysing the fungal exposome of five university laboratory classrooms, including one

Table 6. The fungal exposome characterised by NGS approaches

First author [ref.]	Country	Type of sample and cohort	Areas and techniques for sampling	Molecular approaches (NGS technology, target, bioinformatics analysis and database used)	Main results
YAMAMOTO [135]	USA	Outdoor air in an urban setting in north-eastern USA	Sampling for the four seasons on the rooftop of a five-storey building in New Haven; airborne particles on glass fibre substrates and operated continuously for 4 weeks	Pyrosequencing FLX 454 (Roche Life Science, USA); ITS1F/ITS4; QIIME 1.3.0	Strong relationships between fungal aerodynamic diameters and features of taxonomic compositions; the relative abundance of airborne allergenic fungi peaked in the autumn, while fungi that can cause invasive fungal infections peaked in the spring
ADAMS [136]	USA	Five or eight samples of five laboratory-type classrooms (n=34)	Classrooms with no visible mould problems; dust-fall collector (Petri dish)	Pyrosequencing FLX 454; ITS1F/ITS2; QIIME 1.5 (clustering at 97% similarity), UNITE database	The dust fungal community in classrooms including mycology courses (potentially contaminated with fungi) was less rich than that in other classrooms
ADAMS [128]	USA	Four indoor samples, one outdoor sample (for 4 weeks in two seasons)	Family-housing complex (kitchen, living room, bathroom and bedroom); dust-fall collector (Petri dish)	Pyrosequencing FLX 454; ITS1F/ITS2; QIIME 1.5 (clustering at 97% similarity), UNITE database	At the local level, outdoor air fungi dominated the pattern of indoor air
ADAMS [137]	USA	Once in August 2011 in 11 units and again in January 2012 for eight of the same units	Windowsills and drains, plus the forehead of inhabitants; surface swabs	Pyrosequencing FLX 454; ITS1F/ITS2; QIIME 1.5 (clustering at 97% similarity), UNITE database	<i>Cladosporium</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Candida</i> , <i>Malassezia</i> , <i>Phoma</i> , <i>Exophiala</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Wallemia</i> and <i>Fusarium</i> were the main genera identified
DANNEMILLER [132]	USA	13 asthma cases and 28 controls	Living room, child's bedroom and kitchen; sampling of large surfaces using vacuum cleaner with MediVac dust sampling and head vacuuming	Pyrosequencing FLX 454 and qPCR; ITS1F/ITS4; QIIME 1.5 (clustering at 97% similarity), early version of UNITE database	Lower fungal diversity in house dust was associated with increased risk of childhood asthma development; low <i>Cryptococcus</i> spp. diversity was associated with a higher asthma risk
SHIN [138]	Korea	Five day-care centres and five elementary schools	Day-care centres, outdoor and indoor samples of elementary schools; air samples using a filter fixed on a vacuum pump	Pyrosequencing FLX 454 and MiSeq; ITS2: ITS3F/ITS4R; UNITE database	Basidiomycota: 74% indoor, 60% outdoor; Ascomycota: 24% indoor, 35% outdoor

Continued

Table 6. Continued

First author [ref.]	Country	Type of sample and cohort	Areas and techniques for sampling	Molecular approaches (NGS technology, target, bioinformatics analysis and database used)	Main results
<b>BARBERAN [139]</b>	USA	Outdoor dust samples in 50 states of the USA	Dust collected from the outside surface from upper door trims of an external door; dual-tipped sterile bands and culture swabs	MiSeq or HiSeq sequencers (Illumina Inc.); ITS1; custom PYTHON script and use of UPARSE pipeline and RDP classifier, UNITE database	Dust samples dominated by Ascomycota from the orders Capnodiales and Pleosporales
<b>ROCCHI [130]</b>	France	14 dwellings without moisture problems	Kitchen	MiSeq sequencer; ITS2: ITS3/ITS4; Mothur pipeline, NCBI (nucleotide) database	The most abundant genera were <i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Epicoccum</i> , <i>Aspergillus</i> and <i>Alternaria</i>
<b>KORPELAINEN [140]</b>	Finland	Two university buildings, two nursery schools and an old inhabited farmhouse at four different times	University office rooms, playrooms in school nursery, bedrooms in farmhouses; electrostatic dust collectors	Pyrosequencing FLX 454 and MiSeq sequencer; ITS2: ITS3/ITS4; TAXAassign, NCBI (nucleotide) database	University samples found <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Preussia</i> spp. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Cyberlindnera jadinii</i> and <i>Rhodotorula</i> spp; nursery schools had <i>Cadophora</i> spp., <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Pestalotiopsis</i> spp., <i>S. cerevisiae</i> and <i>Cryptococcus</i> spp; farm samples found <i>Candida jadinii</i> and <i>Candida</i> sp.
<b>Dannemiller [141]</b>	Germany	Cohort of asthmatic young children (n=196)	Living area, seat cushion, seat back and arms of a couch or chair; dust samples using cellulose extraction thimble fixed on a vacuum pump	Pyrosequencing FLX 454; ITS1F/ITS4; QIIME 1.7 and FHiTINGS 1.1	Increased asthma severity was significantly associated with elevated concentrations of summed allergenic fungal species and a high total fungal concentration; <i>Volutella</i> spp. were associated with increased asthma severity in atopic children; yeast <i>Kondoa</i> spp. may be protective; <i>Cryptococcus</i> spp. may also impact asthma severity

ITS, internal transcribed spacer; qPCR, quantitative PCR.



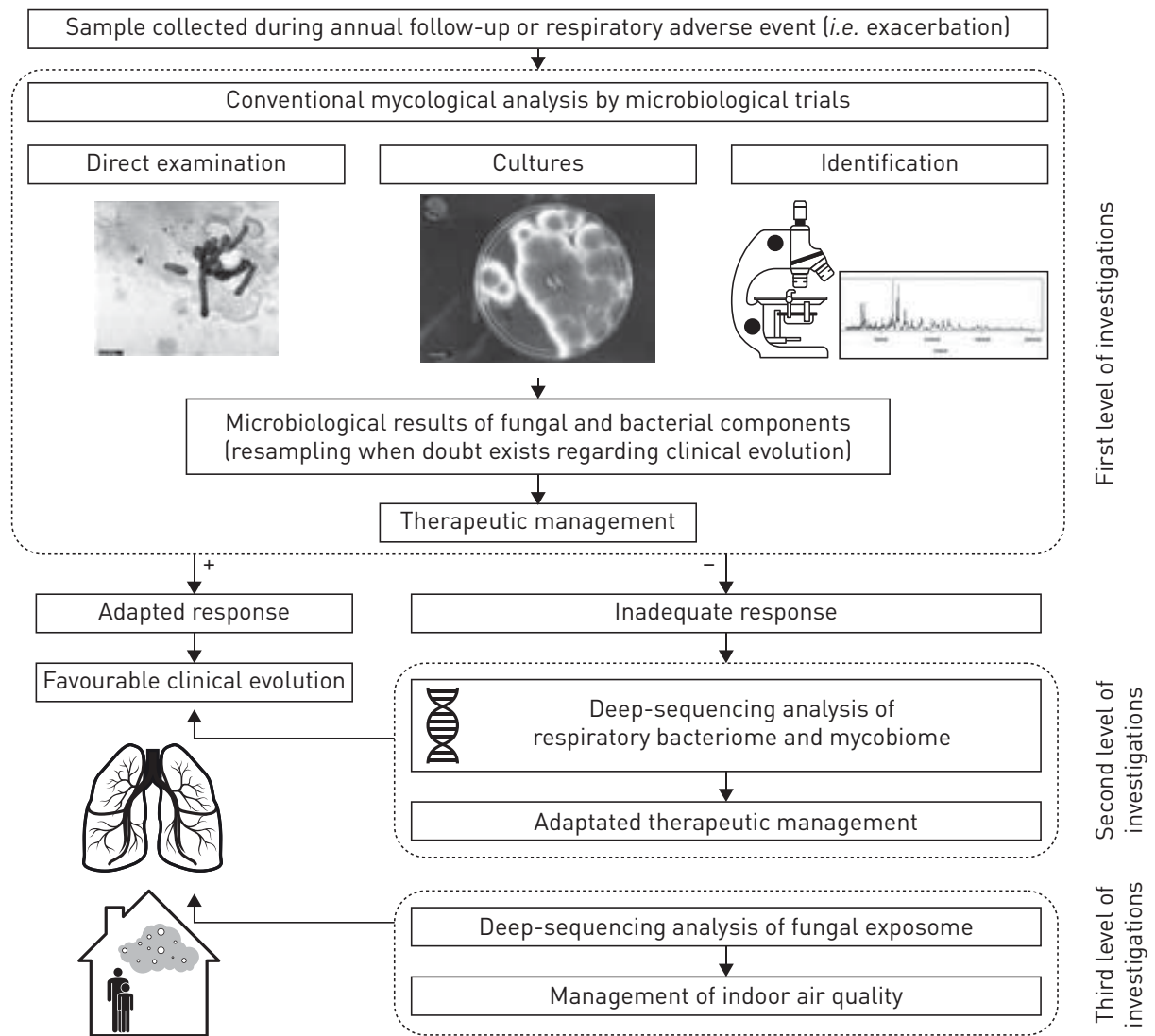


Figure 3. Proposed positions of culturomics and metagenomics approaches among the different levels of microbial investigations to evaluate the risk related to the mycobiome component in chronic respiratory disorders.

used for mycology courses, ADAMS *et al.* [136] showed that the fungal richness and composition of the mycology classroom was lower and different from that of other classrooms: it was dominated by abundantly sporulating fungi. Comparing dust samples from asthma cases and controls, DANNEMILLER *et al.* [132] demonstrated that low *Cryptococcus* spp. diversity of dust samples was associated with a higher risk of later asthma.

Overall, characterising environmental fungal communities with NGS is a real challenge, as the load of the fungal component collected is often lower than that of other components. This may lead to the study of rare biomass, which requires insurances to differentiate real biological signals from artefacts of current NGS techniques. Several publications using NGS technologies suggest a link between the fungal exposome and clinical outcome, especially in CRDs, that needs to be more fully documented [140], but few combined results from mycobiome analysis of endogenous (or the respiratory mycobiome) and exogenous (the fungal exposome) sites [130, 132].



Table 7. Key take-home messages

<b>State of the art</b>	<p>The mortality associated with mycosis is high, estimated at 1.6 million, and is comparable to that of tuberculosis and three times more than that of malaria [1].</p> <p>Human fungal exposure is a daily universal experience for our respiratory system, with 100 to &gt;1 000 000 spores·m<sup>-3</sup> of air, unless explicitly filtered out in clean-air environments such as operating rooms [3, 4].</p> <p>Fungal colonisation occurs in the whole respiratory tract (the LRT is no longer considered sterile); based on NGS analysis, fungal colonisation is now well documented and accepted not only in the URT but also in the LRT, which was thought for many decades to be sterile [38].</p>
<b>Clinical relevance</b>	<p>Given the growing clinical impact of fungus isolation from the respiratory tract (table 2), differentiating transient carriage, chronic colonisation and infection is a key factor in correct clinical management. Many recent advances in this area have been published.</p>
<b>Advances on the clinical side</b>	<p>1) New definitions or classifications. In CF, persistent carriage or chronic colonisation with <i>Aspergillus</i> spp. refers to ≥50% of sputum samples over 6–12 months, or at least two samples in 1 year, being positive for <i>Aspergillus</i> spp. isolation [10]. Combining serological, PCR and GM tests, BAXTER <i>et al.</i> [106] defined three distinct classes of aspergillosis in CF, in which GM seemed to have the best added value as it signalled an invasive process. In COPD, a definition of pulmonary aspergillosis as proven, probable, possible and colonisation has recently been proposed [71].</p> <p>2) Current clinical proposed management. A search for moulds, especially <i>Aspergillus</i> spp., is highly recommended in respiratory samples of CF patients whenever patients start lung function alteration [10], and of COPD patients when patients are at risk for aspergillosis (<i>i.e.</i> previous or current treatment with corticosteroids or antimicrobials, advanced COPD (GOLD ≥ stage III), pulmonary cavitation, radiological or clinical deterioration, high comorbidity or a stay in the ICU) [72, 73]. A systematic screen for <i>Aspergillus</i>-associated disorders is also indicated in non-CF bronchiectasis [78].</p>
<b>Advances on the mycological side</b>	<p>Direct examination, specific mycological media and mass spectrometry are widely used to identify fungi. In asthma, CF and COPD, YPDA or SDA are mainly used to characterise fungal flora [11, 19, 39, 46, 73, 74, 86–89, 93]. While there is no consensus on the fungal culture procedure, notable international advances have been completed in the area of CF [93].</p> <p>An annual mycological analysis of sputum samples is now clearly recommended by the European Cystic Fibrosis Society [12]; microbial analysis of sputum or any other lung specimen was recently proposed in COPD patients with frequent exacerbation, exacerbation requiring mechanical ventilation or severe airflow limitation [67].</p>
<b>Range of micro-organisms</b>	<p><i>Aspergillus</i> and <i>Candida</i> spp. are the most frequent fungi associated with CRDs, although other moulds and Basidiomycetes are increasingly reported, mainly in CF but also in other CRDs [10, 19, 93, 102].</p>
<b>The lung mycobiome in CRDs</b>	<p>The fungal flora plays a key role in both healthy and diseased respiratory tracts, and NGS approaches have transformed this</p>

Continued

Table 7. Continued

<p><b>Place of the fungal exposome</b></p>	<p>into a hot research area. Despite a lack of standardisation in primer designs, reference databases and analytic methods of these targeted metagenomics approaches, reviewed recently [38, 109], NGS reveals a higher complexity and diversity of fungal communities than previously estimated in the context of CF, asthma, COPD, lung transplantation and ICU stays. A lower fungal diversity has been associated with a lower respiratory function [109–113]. This reduced diversity may be due to overgrowth of a specific fungus or the loss of some rare species [114].</p> <p>The fungal exposome is now recognised as a risk associated with a range of detrimental health effects including CRDs such as asthma [124–127].</p> <p>Despite variation in climate and season being responsible for notable variations of indoor fungal occurrences, the fungal exposome is associated with the onset and development of many diseases (such as asthma, or allergic respiratory disease (as ABPA or ABPM)), which legitimises the interest in the mycobiome in the context of CRDs. In the near future, analysis of the fungal exposome will benefit from NGS to confirm fungal genera isolated previously with culture methods, and NGS has detected a major proportion of Basidiomycota compared with a previous non-NGS study [130, 137–140].</p>
--	---

---

GM: galactomannan; GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease; ICU: intensive care unit; YPDA: yeast-peptone-dextrose agar; SDA: Sabouraud dextrose agar; CRD: chronic respiratory disorder; ABPA: allergic bronchopulmonary aspergillosis; ABPM: allergic bronchopulmonary mycosis.

---

## Conclusion and perspectives

As fungi can trigger both innate and adaptive immune responses, the respiratory mycobiome may play a key role in CRD evolution. A growing literature presents multiple lines of evidence showing the ability of *A. fumigatus*, but also other fungi, to have an impact on the clinical course and outcomes of patients with CRD, leading to clear consensual recommendations for realising a mycological analysis of sputum or any other lung specimen at least yearly in CF patients, or when facing an adverse event (such as exacerbation) in CRDs [12, 67, 78].

Fungal culturomics (defined as an *in vitro* method that allows the description of mycological composition by extensive (high-throughput) culture) still represents the primary approach for isolating fungi (first investigation level in figure 3). Some guidelines have recently emerged [11, 74], which will help in standardising protocols and in coalescing data to improve our knowledge of the role of the mycobiome in CRDs (table 7).

Despite recent advances in culturomics as well as in genomics, the challenge remains to differentiate transient colonisation from clinically relevant infection or chronic colonisation. Most of the time, the physician has to put together the different pieces of the CRD puzzle, which is composed of the underlying disease(s), the clinical status of the patient, the radiological findings, any changes in oxygenation or ventilatory status, and the microbial results, to determine whether antimicrobial therapy should be initiated.

Recent advances in NGS have allowed us to have a better knowledge of the respiratory mycobiome, in addition to the bacteriome, and may provide novel insights into how fungi are able to develop within CRD lungs and cause further pulmonary disorders. In the near future, using NGS approaches as a second line of disease investigations whenever patients do not respond well to the first line of therapeutic management will probably help in detecting specific changes in the fungal, aerobic and/or anaerobic composition of the respiratory flora that may justify therapeutic adjustments (second investigation level in figure 3). The fungal exposome may represent a complementary level of investigations to address the management of indoor air quality (third investigation level in figure 3). However, given the limited number of NGS studies on the respiratory mycobiome and fungal exposome that have currently been published, strong conclusions are difficult to draw. Future cooperative research and clinical trials are urgently warranted to better characterise this respiratory mycobiome in CRDs, as well as the fungal exposome. They will be essential not only to decipher CRD pathogenesis but also to develop new therapeutic management.

## References

1. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, *et al.* Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. *J Fungi* 2017; 3: E57.
2. Denning DW, Pashley C, Hartl D, *et al.* Fungal allergy in asthma – state of the art and research needs. *Clin Transl Allergy* 2014; 4: 14.
3. Peay KG, Kennedy PG, Talbot JM. Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. *Nat Rev Microbiol* 2016; 14: 434–447.
4. Eduard W. Fungal spores: a critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting. *Crit Rev Toxicol* 2009; 39: 799–864.
5. Stevens DA, Clemons KV, Levine HB, *et al.* Expert opinion: what to do when there is *Coccidioides* exposure in a laboratory. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 919–923.
6. Hawksworth DL. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res* 2001; 105: 1422–1432.
7. Roilides E. Emerging fungi causing human infection: new or better identified? *Clin Microbiol Infect* 2016; 22: 660–661.
8. Bassetti M, Bouza E. Invasive mould infections in the ICU setting: complexities and solutions. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72: i39–i47.
9. Schwarz C, Vandeputte P, Rougeron A, *et al.* Developing collaborative works for faster progress on fungal respiratory infections in cystic fibrosis. *Med Mycol* 2018; 56: 42–59.
10. Tracy MC, Moss RB. The myriad challenges of respiratory fungal infection in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2018; 53: S75–S85.
11. Coron N, Pihet M, Fréalle E, *et al.* Toward the standardization of mycological examination of sputum samples in cystic fibrosis: results from a French multicenter prospective study. *Mycopathologia* 2018; 183: 101–117.
12. Castellani C, Duff AJA, Bell SC, *et al.* ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *J Cyst Fibros* 2018; 17: 153–178.
13. Agarwal R, Hazarika B, Gupta D, *et al.* *Aspergillus* hypersensitivity in patients with chronic obstructive pulmonary disease: COPD as a risk factor for ABPA? *Med Mycol* 2010; 48: 988–994.
14. Renz H, Holt PG, Inouye M, *et al.* An exposome perspective: early-life events and immune development in a changing world. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 140: 24–40.
15. Wild CP. The exposome: from concept to utility. *Int J Epidemiol* 2012; 41: 24–32.
16. Hanson B, Zhou Y, Bautista EJ, *et al.* Characterization of the bacterial and fungal microbiome in indoor dust and outdoor air samples: a pilot study. *Environ Sci Process Impacts* 2016; 18: 713–724.
17. Hinson KFW, Moon AJ, Plummer NS. Bronchopulmonary aspergillosis. *Thorax* 1952; 7: 317–333.
18. Pirofski LA, Casadevall A. The damage-response framework as a tool for the physician-scientist to understand the pathogenesis of infectious diseases. *J Infect Dis* 2018; 218: S7–S11.
19. Chowdhary A, Agarwal K, Meis JF. Filamentous fungi in respiratory infections. What lies beyond aspergillosis and mucormycosis? *PLoS Pathog* 2016; 12: e1005491.
20. Arsenijević VA, Denning DW. Estimated burden of serious fungal diseases in Serbia. *J Fungi* 2018; 4: 76.
21. Nucci F, Nouér SA, Capone D, *et al.* Invasive mould disease in haematologic patients: comparison between fusariosis and aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24: 1105.e1–1105.e4.

22. McCarthy MW, Katragkou A, Iosifidis E, *et al.* Recent advances in the treatment of scedosporiosis and fusariosis. *J Fungi* 2018; 4: E73.
23. Knutsen AP. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in asthma. *Expert Rev Clin Immunol* 2017; 13: 11–14.
24. Chowdhary A, Agarwal K, Kathuria S, *et al.* Allergic bronchopulmonary mycosis due to fungi other than *Aspergillus*: a global overview. *Crit Rev Microbiol* 2014; 40: 30–48.
25. Montagna MT, Caggiano G, Lovero G, *et al.* Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). *Infection* 2013; 41: 645–653.
26. Knutsen AP, Bush RK, Demain JG, *et al.* Fungi and allergic lower respiratory tract diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 280–291.
27. Denning DW, O’Driscoll BR, Powell G, *et al.* Randomized controlled trial of oral antifungal treatment for severe asthma with fungal sensitization: the Fungal Asthma Sensitization Trial (FAST) study. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179: 11–18.
28. Denning DW, O’Driscoll BR, Hogaboam CM, *et al.* The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence. *Eur Respir J* 2006; 27: 615–626.
29. Tracy MC, Okorie CUA, Foley EA, *et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Fungi* 2016; 2: E17.
30. Armstead J, Morris J, Denning DW. Multi-country estimate of different manifestations of aspergillosis in cystic fibrosis. *PLoS One* 2014; 9: e98502.
31. Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, *et al.* ABPA complicating asthma ISHAM working group. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin Exp Allergy* 2013; 43: 850–873.
32. Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, *et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis – state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis* 2003; 37: Suppl.3, S225–S264.
33. Barac A, Ong DSY, Jovancevic L, *et al.* Fungi-induced upper and lower respiratory tract allergic diseases: one entity. *Front Microbiol* 2018; 9: 583.
34. Fillaux J, Brémont F, Murriss M, *et al.* Assessment of *Aspergillus* sensitization or persistent carriage as a factor in lung function impairment in cystic fibrosis patients. *Scand J Infect Dis* 2012; 44: 842–847.
35. Ponikau JU, Sherris DA, Kern EB, *et al.* The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis. *Mayo Clin Proc* 1999; 74: 877–884.
36. Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25: 297–317.
37. Denning DW, Park S, Lass-Flörl C, *et al.* High-frequency triazole resistance found in nonculturable *Aspergillus fumigatus* from lungs of patients with chronic fungal disease. *Clin Infect Dis* 2011; 52: 1123–1129.
38. Nguyen LDN, Viscogliosi E, Delhaes L. The lung mycobiome: an emerging field of the human respiratory microbiome. *Front Microbiol* 2015; 6: 89.
39. Agbetile J, Fairs A, Desai D, *et al.* Isolation of filamentous fungi from sputum in asthma is associated with reduced post-bronchodilator FEV<sub>1</sub>. *Clin Exp Allergy* 2012; 42: 782–791.
40. Máiz L, Vendrell M, Oliveira C, *et al.* Prevalence and factors associated with isolation of *Aspergillus* and *Candida* from sputum in patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Respir Int Rev Thorac Dis* 2015; 89: 396–403.
41. Iversen M, Burton CM, Vand S, *et al.* *Aspergillus* infection in lung transplant patients: incidence and prognosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 879–886.
42. Beck AF, Huang B, Kerckmar CM, *et al.* Allergen sensitization profiles in a population-based cohort of children hospitalized for asthma. *Ann Am Thorac Soc* 2015; 12: 376–384.
43. Chotirmall SH, O’Donoghue E, Bennett K, *et al.* Sputum *Candida albicans* presages FEV<sub>1</sub> decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis. *Chest* 2010; 138: 1186–1195.
44. Baxter CG, Moore CB, Jones AM, *et al.* IgE-mediated immune responses and airway detection of *Aspergillus* and *Candida* in adult cystic fibrosis. *Chest* 2013; 143: 1351–1357.
45. Wojnarowski C, Eichler I, Gartner C, *et al.* Sensitization to *Aspergillus fumigatus* and lung function in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1902–1907.
46. Fairs A, Agbetile J, Hargadon B, *et al.* IgE sensitization to *Aspergillus fumigatus* is associated with reduced lung function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 1362–1368.
47. Menzies D, Holmes L, McCumesky G, *et al.* *Aspergillus* sensitization is associated with airflow limitation and bronchiectasis in severe asthma. *Allergy* 2011; 66: 679–685.
48. Ciebiada M, Domagała M, Gorska-Ciebiada M, *et al.* Risk factors associated with irreversible airway obstruction in nonsmoking adult patients with severe asthma. *Allergy Asthma Proc* 2014; 35: 72–79.
49. Norbäck D, Zock JP, Plana E, *et al.* Lung function decline in relation to mould and dampness in the home: the longitudinal European Community Respiratory Health Survey ECRHS II. *Thorax* 2011; 66: 396–401.
50. Shendell DG, Mizan SS, Yamamoto N, *et al.* Associations between quantitative measures of fungi in home floor dust and lung function among older adults with chronic respiratory disease: a pilot study. *J Asthma* 2012; 49: 502–509.
51. Hernández-Hernández F, Fréal E, Caneiro P, *et al.* Prospective multicenter study of *Pneumocystis jirovecii* colonization among cystic fibrosis patients in France. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 4107–4110.



52. Terraneo S, Ferrer M, Martín-Loeches I, *et al.* Impact of *Candida* spp. isolation in the respiratory tract in patients with intensive care unit-acquired pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22: 94.e1–94.e8.
53. Amin R, Dupuis A, Aaron SD, *et al.* The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest* 2010; 137: 171–176.
54. Sharpe RA, Thornton CR, Tyrrell J, *et al.* Variable risk of atopic disease due to indoor fungal exposure in NHANES 2005–2006. *Clin Exp Allergy* 2015; 45: 1566–1578.
55. O’Driscoll BR, Hopkinson LC, Denning DW. Mold sensitization is common amongst patients with severe asthma requiring multiple hospital admissions. *BMC Pulm Med* 2005; 5: 4.
56. Jia X, Li C, Cao J, *et al.* Clinical characteristics and predictors of mortality in patients with candidemia: a six-year retrospective study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018; 37: 1717–1724.
57. Kim CW, Seo JS, Kim MK, *et al.* Secondary cutaneous aspergillosis disseminated from the lungs of a patient with asthma on 1 month steroid treatment. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 66: 104–107.
58. Barberán J, García-Pérez FJ, Villena V, *et al.* Development of *Aspergillosis* in a cohort of non-neutropenic, non-transplant patients colonised by *Aspergillus* spp. *BMC Infect Dis* 2017; 17: 34.
59. Dimopoulos G, Frantzeskaki F, Poulakou G, *et al.* Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1272: 31–39.
60. Barberan J, Alcazar B, Malmierca E, *et al.* Repeated *Aspergillus* isolation in respiratory samples from non-immunocompromised patients not selected based on clinical diagnoses: colonisation or infection? *BMC Infect Dis* 2012; 12: 295.
61. Dimopoulos G, Piagnerelli M, Berré J, *et al.* Disseminated aspergillosis in intensive care unit patients: an autopsy study. *J Chemother* 2003; 15: 71–75.
62. Russell GK, Gadhok R, Simmonds NJ. The destructive combination of *Scediosporium apiospermum* lung disease and exuberant inflammation in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 2013; 14: Suppl. 1, 22–25.
63. Speirs JJ, van der Ent CK, Beekman JM. Effects of *Aspergillus fumigatus* colonization on lung function in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2012; 18: 632–638.
64. Huerta A, Soler N, Esperatti M, *et al.* Importance of *Aspergillus* spp. isolation in acute exacerbations of severe COPD: prevalence, factors and follow-up: the FUNGI-COPD study. *Respir Res* 2014; 15: 17.
65. Cornillet A, Camus C, Nimubona S, *et al.* Comparison of epidemiological, clinical, and biological features of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients: a 6-year survey. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 577–584.
66. Davey EL, Colombo RE, Fiorentino C, *et al.* *Pneumocystis* colonization in asthmatic patients not receiving oral corticosteroid therapy. *J Investig Med* 2017; 65: 800–802.
67. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). *Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD*. 2018. Available from: <http://goldcopd.org/>
68. Global Action Fund for Fungal Infections (GAFFI). Roadmap. Available from: [www.gaffi.org/roadmap/](http://www.gaffi.org/roadmap/) Date last accessed: December 12, 2019.
69. Global Initiative for Asthma (GINA). *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*, 2018. Available from: <http://ginasthma.org/>
70. Touati K, Nguyen DNL, Delhaes L. The airway colonization by opportunistic filamentous fungi in patients with cystic fibrosis: recent updates. *Curr Fungal Infect Rep* 2014; 8: 302–311.
71. Bulpa P, Dive A, Sibille Y. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2007; 30: 782–800.
72. Barberán J, Candel FJ, Arribi A. How should we approach *Aspergillus* in lung secretions of patients with COPD? *Rev Espanola Quimioter* 2016; 29: 175–182.
73. Shahi M, Ayatollahi Mousavi SA, Nabili M, *et al.* *Aspergillus* colonization in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Med Mycol* 2015; 1: 45–51.
74. Pashley CH, Fairs A, Morley JP, *et al.* Routine processing procedures for isolating filamentous fungi from respiratory sputum samples may underestimate fungal prevalence. *Med Mycol* 2012; 50: 433–438.
75. Yii ACA, Tan JHY, Lapperre TS, *et al.* Long-term future risk of severe exacerbations: distinct 5-year trajectories of problematic asthma. *Allergy* 2017; 72: 1398–1405.
76. Bafadhel M, McKenna S, Agbetile J, *et al.* *Aspergillus fumigatus* during stable state and exacerbations of COPD. *Eur Respir J* 2014; 43: 64–71.
77. Smith NL, Denning DW. Underlying conditions in chronic pulmonary aspergillosis including simple aspergilloma. *Eur Respir J* 2011; 37: 865–872.
78. Mac Aogáin M, Chandrasekaran R, Lim AYH, *et al.* Immunological corollary of the pulmonary mycobiome in bronchiectasis: the CAMEB study. *Eur Respir J* 2018; 52: 1800766.
79. Robinson J. Colonization and infection of the respiratory tract: what do we know? *Paediatr Child Health* 2004; 9: 21–24.
80. Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, *et al.* Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2016; 63: e1–e60.

81. Pashley CH. Fungal culture and sensitisation in asthma, cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disorder: what does it tell us? *Mycopathologia* 2014; 178: 457–463.
82. Baxter CG, Jones AM, Webb K, *et al.* Homogenisation of cystic fibrosis sputum by sonication – an essential step for *Aspergillus* PCR. *J Microbiol Methods* 2011; 85: 75–81.
83. PL Paggiaro, Chanez P, Holz O, *et al.* Sputum induction. *Eur Respir J* 2002; 20: 3S–8S.
84. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, *et al.* Spatial variation in the healthy human lung microbiome and the adapted island model of lung biogeography. *Ann Am Thorac Soc* 2015; 12: 821–830.
85. Whiteson KL, Bailey B, Bergkessel M, *et al.* The upper respiratory tract as a microbial source for pulmonary infections in cystic fibrosis. Parallels from island biogeography. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189: 1309–1315.
86. Fraczek MG, Kirwan MB, Moore CB, *et al.* Volume dependency for culture of fungi from respiratory secretions and increased sensitivity of *Aspergillus* quantitative PCR. *Mycoses* 2014; 57: 69–78.
87. Fairs A, Agbetile J, Bourne M, *et al.* Isolation of *Aspergillus fumigatus* from sputum is associated with elevated airborne levels in homes of patients with asthma. *Indoor Air* 2013; 23: 275–284.
88. Máiz L, Cuevas M, Quirce S, *et al.* Serologic IgE immune responses against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* in patients with cystic fibrosis. *Chest* 2002; 121: 782–788.
89. Borman AM, Palmer MD, Delhaes L, *et al.* Lack of standardization in the procedures for mycological examination of sputum samples from CF patients: a possible cause for variations in the prevalence of filamentous fungi. *Med Mycol* 2010; 48: Suppl. 1, S88–S97.
90. Rainer J, Kaltseis J, de Hoog SG, *et al.* Efficacy of a selective isolation procedure for members of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2008; 93: 315–322.
91. Nagano Y, Millar BC, Goldsmith CE, *et al.* Development of selective media for the isolation of yeasts and filamentous fungi from the sputum of adult patients with cystic fibrosis (CF). *J Cyst Fibros* 2008; 7: 566–572.
92. de Hoog GS, Haase G. Nutritional physiology and selective isolation of *Exophiala dermatitidis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1993; 64: 17–26.
93. Delhaes L, Touati K, Faure-Cognet O, *et al.* Prevalence, geographic risk factor, and development of a standardized protocol for fungal isolation in cystic fibrosis: results from the international prospective study “MFIP”. *J Cyst Fibros* 2018; in press [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.10.001>].
94. Denning DW, Stevens DA, Hamilton JR. Comparison of *Guizotia abyssinica* seed extract (birdseed) agar with conventional media for selective identification of *Cryptococcus neoformans* in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2565–2567.
95. Barnes AJ, Denning DW. Aspergilli – significance as pathogens. *Rev Med Microbiol* 1993; 4: 176–180.
96. Greub G, Bille J. *Aspergillus* species isolated from clinical specimens: suggested clinical and microbiological criteria to determine significance. *Clin Microbiol Infect* 1998; 4: 710–716.
97. Stein M, Tran V, Nichol KA, *et al.* Evaluation of three MALDI-TOF mass spectrometry libraries for the identification of filamentous fungi in three clinical microbiology laboratories in Manitoba, Canada. *Mycoses* 2018; 61: 743–753.
98. Normand AC, Becker P, Gabriel F, *et al.* Validation of a new web application for identification of fungi by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2017; 55: 2661–2670.
99. Normand AC, Cassagne C, Gautier M, *et al.* Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. *BMC Microbiol* 2017; 17: 25.
100. Vidal-Acuña MR, Ruiz-Pérez de Pipaón M, Torres-Sánchez MJ, *et al.* Identification of clinical isolates of *Aspergillus*, including cryptic species, by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Med Mycol* 2018; 56: 838–846.
101. Liew YX, Teo J, Too IAL, *et al.* *Candida* surveillance in surgical intensive care unit (SICU) in a tertiary institution. *BMC Infect Dis* 2015; 15: 256.
102. Chowdhary A, Kathuria S, Agarwal K, *et al.* Recognizing filamentous basidiomycetes as agents of human disease: a review. *Med Mycol* 2014; 52: 782–797.
103. Ramachandran S, Shah A, Pant K, *et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis and *Candida albicans* colonization of the respiratory tract in corticosteroid-dependent asthma. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1990; 8: 123–126.
104. Powers-Fletcher MV, Hanson KE. Nonculture diagnostics in fungal disease. *Infect Dis Clin North Am* 2016; 30: 37–49.
105. Muthu V, Sehgal IS, Dhooria S, *et al.* Utility of recombinant *Aspergillus fumigatus* antigens in the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis: a systematic review and diagnostic test accuracy meta-analysis. *Clin Exp Allergy* 2018; 48: 1107–1136.
106. Baxter CG, Dunn G, Jones AM, *et al.* Novel immunologic classification of aspergillosis in adult cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132: 560–566.
107. Denning DW, Page ID, Chakaya J, *et al.* Case definition of chronic pulmonary aspergillosis in resource-constrained settings. *Emerging Infect Dis* 2018; in press [DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2408.171312>].

108. Page ID, Richardson M, Denning DW. Antibody testing in aspergillosis – quo vadis? *Med Mycol* 2015; 53: 417–439.
109. Charlson ES, Diamond JM, Bittinger K, *et al.* Lung-enriched organisms and aberrant bacterial and fungal respiratory microbiota after lung transplant. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186: 536–545.
110. Botterel F, Angebault C, Cabaret O, *et al.* Fungal and bacterial diversity of airway microbiota in adults with cystic fibrosis: concordance between conventional methods and ultra-deep sequencing, and their practical use in the clinical laboratory. *Mycopathologia* 2018; 183: 171–183.
111. Delhaes L, Monchy S, Fréalle E, *et al.* The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community – implications for therapeutic management. *PLoS One* 2012; 7: e36313.
112. Cui L, Lucht L, Tipton L, *et al.* Topographic diversity of the respiratory tract mycobiome and alteration in HIV and lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191: 932–942.
113. Bittinger K, Charlson ES, Loy E, *et al.* Improved characterization of medically relevant fungi in the human respiratory tract using next-generation sequencing. *Genome Biol* 2014; 15: 487.
114. Nguyen LDN, Deschaght P, Merlin S, *et al.* Effects of propidium monoazide (PMA) treatment on mycobiome and bacteriome analysis of cystic fibrosis airways during exacerbation. *PLoS One* 2016; 11: e0168860.
115. van Woerden HC, Gregory C, Brown R, *et al.* Differences in fungi present in induced sputum samples from asthma patients and non-atopic controls: a community based case control study. *BMC Infect Dis* 2013; 13: 69.
116. Willger SD, Grim SL, Dolben EL, *et al.* Characterization and quantification of the fungal microbiome in serial samples from individuals with cystic fibrosis. *Microbiome* 2014; 2: 40.
117. Kim SH, Clark ST, Surendra A, *et al.* Global analysis of the fungal microbiome in cystic fibrosis patients reveals loss of function of the transcriptional repressor Nrg1 as a mechanism of pathogen adaptation. *PLoS Pathog* 2015; 11: e1005308.
118. Krause R, Halwachs B, Thallinger GG, *et al.* Characterisation of *Candida* within the mycobiome/microbiome of the lower respiratory tract of ICU patients. *PLoS One* 2016; 11: e0155033.
119. Fraczek MG, Chishimba L, Niven RM, *et al.* Corticosteroid treatment is associated with increased filamentous fungal burden in allergic fungal disease. *J Allergy Clin Immunol* 2018; 142: 407–414.
120. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, *et al.* Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000713.
121. Kramer R, Sauer-Heilborn A, Welte T, *et al.* Cohort study of airway mycobiome in adult cystic fibrosis patients: differences in community structure between fungi and bacteria reveal predominance of transient fungal elements. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 2900–2907.
122. Tipton L, Müller CL, Kurtz ZD, *et al.* Fungi stabilize connectivity in the lung and skin microbial ecosystems. *Microbiome* 2018; 6: 12.
123. Bousbia S, Papazian L, Saux P, *et al.* Repertoire of intensive care unit pneumonia microbiota. *PloS One* 2012; 7: e32486.
124. Nevalainen A, Täubel M, Hyvärinen A. Indoor fungi: companions and contaminants. *Indoor Air* 2015; 25: 125–156.
125. Reponen T, Lockey J, Bernstein DI, *et al.* Infant origins of childhood asthma associated with specific molds. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130: 639–644.
126. Reponen T, Vesper S, Levin L, *et al.* High environmental relative moldiness index during infancy as a predictor of asthma at 7 years of age. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011; 107: 120–126.
127. Cabral JPS. Can we use indoor fungi as bioindicators of indoor air quality? Historical perspectives and open questions. *Sci Total Environ* 2010; 408: 4285–4295.
128. Adams RI, Miletto M, Taylor JW, *et al.* Dispersal in microbes: fungi in indoor air are dominated by outdoor air and show dispersal limitation at short distances. *ISME J* 2013; 7: 1262–1273.
129. Sharpe RA, Bearman N, Thornton CR, *et al.* Indoor fungal diversity and asthma: a meta-analysis and systematic review of risk factors. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135: 110–122.
130. Rocchi S, Valot B, Reboux G, *et al.* DNA metabarcoding to assess indoor fungal communities: electrostatic dust collectors and Illumina sequencing. *J Microbiol Methods* 2017; 139: 107–112.
131. Rocchi S, Reboux G, Larosa F, *et al.* Evaluation of invasive aspergillosis risk of immunocompromised patients alternatively hospitalized in hematology intensive care unit and at home. *Indoor Air* 2014; 24: 652–661.
132. Dannemiller KC, Mendell MJ, Macher JM, *et al.* Next-generation DNA sequencing reveals that low fungal diversity in house dust is associated with childhood asthma development. *Indoor Air* 2014; 24: 236–247.
133. Norbäck D, Zock JP, Plana E, *et al.* Mould and dampness in dwelling places, and onset of asthma: the population-based cohort ECRHS. *Occup Environ Med* 2013; 70: 325–331.
134. Tischer C, Weigl F, Probst AJ, *et al.* Urban dust microbiome: impact on later atopy and wheezing. *Environ Health Perspect* 2016; 124: 1919–1923.
135. Yamamoto N, Bibby K, Qian J, *et al.* Particle-size distributions and seasonal diversity of allergenic and pathogenic fungi in outdoor air. *ISME J* 2012; 6: 1801–1811.
136. Adams RI, Amend AS, Taylor JW, *et al.* A unique signal distorts the perception of species richness and composition in high-throughput sequencing surveys of microbial communities: a case study of fungi in indoor dust. *Microb Ecol* 2013; 66: 735–741.

137. Adams RI, Miletto M, Taylor JW, *et al.* The diversity and distribution of fungi on residential surfaces. *PLoS One* 2013; 8: e78866.
138. Shin SK, Kim J, Ha S, *et al.* Metagenomic insights into the bioaerosols in the indoor and outdoor environments of childcare facilities. *PLoS One* 2015; 10: e0126960.
139. Barberán A, Dunn RR, Reich BJ, *et al.* The ecology of microscopic life in household dust. *Proc Biol Sci* 2015; 282.
140. Korpelainen H, Pietiläinen M. Diversity of indoor fungi as revealed by DNA metabarcoding. *Genome* 2017; 60: 55–64.
141. Dannemiller K, Gent JF, Leaderer BP, *et al.* Indoor microbial communities: Influence on asthma severity in atopic and nonatopic children. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 138: 76–83.

---

**Acknowledgements:** The authors thank ANOFEL (a collegiate of French Professors of Mycology and Parasitology) for providing free pictures of *A. fumigatus* and *C. albicans* (figure 3; [www.eanofel.fr/](http://www.eanofel.fr/)). Genoscreen provided support in the form of salaries for L.E. Vandenborgh but did not have any additional role in the chapter design, text or decision to publish.

**Disclosures:** R. Enaud reports receiving the Bicodex prize, outside the submitted work. D. Denning and family hold founder shares in F2G Ltd, a University of Manchester (Manchester, UK) spin-out antifungal discovery company. He acts or has recently acted as a consultant to Scynexis, Cidara, Quintiles, Pulmatrix, Pulmocide, Zambon, iCo Therapeutics, Roivant and Fujifilm. In the last 3 years, he has been paid for talks on behalf of Astellas, Dynamiker, Gilead, Merck, Mylan and Pfizer. He is a long-standing member of the Infectious Disease Society of America Aspergillosis Guidelines group, the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases Aspergillosis Guidelines group, and the British Society for Medical Mycology Standards of Care committee. In addition, D. Denning has a patent assay for fungal infection licensed. D. Denning has received grants and personal fees from MSD, outside the submitted work. L. Delhaes reports receiving the following, outside the submitted work: a grant from Aquitaine Science Transfert (AST) for the project Kamyre, which focuses on the indoor fungal exposome of asthmatic patients.



**HYPOTHESE  
DE  
TRAVAIL**

Dans ce contexte des maladies respiratoires chroniques (mucoviscidose et asthme), nos recherches ont porté sur les liens entre la fonction respiratoire des patients et leur composante microbienne endogène (respiratoire) et exogène (exposome). En effet, les facteurs environnementaux immédiats sont connus pour être déterminants dans le risque d'exacerbation de ces MRC, et certains facteurs d'exposition chronique, telle que la contamination fongique, peuvent influencer la fréquence des exacerbations et la sévérité générale des patients asthmatiques. Dans la mucoviscidose comme dans l'asthme, la colonisation fongique de l'appareil respiratoire, en particulier à *Aspergillus* sp., est souvent associée à une altération de la fonction respiratoire voire au développement d'une aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA).

Dans un premier temps, différentes approches permettant l'analyse du mycobiote ainsi que le recueil de l'exposome ont été comparées pour sélectionner les conditions les plus pertinentes (l'objectif 1 résume ce point méthodologique). Puis les liens entre l'état clinique des patients atteints de MRC, leur myco-microbiote respiratoire, et leur exposome fongique et bactérien ont été recherchés (les objectifs 2 et 3 résument cette approche clinico-biologique).

**Objectif 1 :**

- ✓ Optimiser l'analyse du mycobiote, à partir de communautés artificielles de micromycètes, d'échantillons biologiques, depuis l'étape d'extraction jusqu'à la sélection des cibles fongiques les plus efficaces pour une approche de métagénomique ciblée et évaluer des dispositifs de recueil des micromycètes présents dans l'environnement intérieur des patients afin de mettre à disposition de la communauté scientifique un outil optimisé et standardisé

**Objectif 2 :**

- ✓ Relier l'évolution clinique d'une MRC (exemple de la mucoviscidose) à son myco-microbiote endogène, en considérant les interactions interrègnes microchampignons-bactéries

**Objectif 3 :**

- ✓ Intégrer la composante environnementale (myco-microbiote exogène/exposome microbien) dans l'évolution clinique et l'analyse du myco-microbiote respiratoire de patients atteints de MRC (exemple de l'asthme)

# **CHAPITRE 2**

## **MATERIELS ET METHODES**

Ce chapitre « Matériels et Méthodes » concernera uniquement l'objectif 1 ; les objectifs 2 et 3 correspondants à un article accepté (objectif 2) et un en finalisation de rédaction (objectif 3), les matériels et méthodes sont donc détaillées dans le corps de ces articles. Les protocoles ne sont pas intégralement détaillés du fait de la confidentialité et du savoir-faire GenoScreen à respecter.

## I. OPTIMISATION DU PROTOCOLE D'EXTRACTION

L'extraction des champignons, dans le cadre de l'analyse des communautés fongiques par métagénomique ciblée est une étape cruciale qui a été challengée durant mon travail de thèse. Un mélange artificiel de champignons (mock fongique) a été extrait dans différentes conditions et amplifié à partir de plusieurs couples d'amorce ciblant le locus ITS2 afin de sélectionner le plus efficient. Le séquençage des communautés fongiques a été effectué sur un séquenceur MiSeq de la plateforme Illumina.

### 1. Création d'un mock à partir de spores de champignons

Afin d'évaluer l'étape d'extraction, une communauté artificielle de spores de champignons a été constituée à partir de culture des champignons.

#### A. Culture des souches fongiques

Vingt-deux souches fongiques sélectionnées pour leur pertinence environnementale et leur intérêt en médecine ont été cultivées en boîte de pétri, sur milieu Sabouraud et CHROMagar® (uniquement pour la culture des souches du genre *Candida*). Chaque espèce était incubée 48h à 37° ou 30° ±2°C après vérification de la pureté sur subculture et confirmation de l'identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (à l'exception d'*Acremonium*). Des inocula de chacune des souches ont été préparés à partir de 1mL d'eau stérile et de grattage de la gélose avec une anse d'inoculation. La quantité de conidies a été calculée pour chaque souche à l'aide d'une lame de KOVA. Le tableau 1 résume les espèces, les milieux de culture et les concentrations en conidies/μl des inocula préparés pour chaque souche fongique.

Souches		Culture	Inoculum
Genre	Espèce	Milieu de culture	Concentration en conidies/ $\mu$ l
<i>Aspergillus</i>	<i>fumigatus</i>	Sabouraud	9950
<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Sabouraud	22500
<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>	Sabouraud	4400
<i>Aspergillus</i>	<i>terreus</i>	Sabouraud	20000
<i>Scedosporium</i>	<i>aurantiacum</i>	Sabouraud	3600
<i>Scedosporium</i>	<i>apiospermum</i>	Sabouraud	5650
<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>	Sabouraud	22750
<i>Rhodotorula</i>	<i>mucilaginosa</i>	Sabouraud	16450
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	CHROMagar®	27650
<i>Candida</i>	<i>tropicalis</i>	CHROMagar®	11650
<i>Candida</i>	<i>dubliniensis</i>	CHROMagar®	4700
<i>Candida</i>	<i>lusitaniae</i>	CHROMagar®	10250
<i>Candida</i>	<i>glabrata</i>	CHROMagar®	24750
<i>Fusarium</i>	<i>solani</i>	Sabouraud	3550
<i>Fusarium</i>	<i>proliferatum</i>	Sabouraud	3500
<i>Mucor</i>	<i>circillenioides</i>	Sabouraud	11100
<i>Acremonium</i>	<i>variecolor</i>	Sabouraud	7750
<i>Penicillium</i>	<i>terricum</i>	Sabouraud	3450
<i>Penicillium</i>	<i>griseofulvum</i>	Sabouraud	5000
<i>Alternaria</i>	<i>papavericola</i>	Sabouraud	375
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	Sabouraud	12850
<i>Rhizopus</i>	<i>oryzae</i>	Sabouraud	1000

**Tableau 1 : Récapitulatif des souches fongiques cultivées, de leurs milieux de culture et concentration de leurs inocula préparés à partir des cultures.**

## B. Préparation d'un mock fongique

L'ensemble des inocula de spores ont été transféré dans un unique falcon de 50mL. Après homogénéisation de ce falcon, 45 aliquots de 1,25 mL ont été préparés et stockés à 4°C. Il s'agit donc de 45 aliquots identiques composés de proportions variables de chacune des 22 souches fongiques mélangées pour une quantité de  $1.10^7$  conidies par aliquot.

### 1. Extraction à partir de kits de références et tampon de lyse GenoScreen

Un état des lieux de l'utilisation des kits disponibles sur le marché et ceux utilisés dans des études publiées concernant le mycobiote respiratoire et l'exposome microbien a permis d'en sélectionner deux. Ces deux kits ont été utilisés comme référence pour évaluer un nouveau tampon de lyse

GenoScreen et l'impact de différentes lyses sur l'extraction des souches fongiques de la communauté artificielle.

#### A. Kits de références

Les kits « DNeasy PowerSoil® kit » et « QIAamp® DNA Mini kit » ont été utilisés en suivant les étapes préconisées pour levures/champignons ou « échantillons difficile à lyser » selon les recommandations des fournisseurs. Les deux protocoles ont été initiés par une étape de centrifugation à 16 000 g pendant 15 minutes afin de culotter les inocula de spores.

Le protocole du kit « DNeasy PowerSoil® » se compose d'une étape de lyse thermique de 10 minutes à 70°C, suivi d'une lyse mécanique de 10 minutes à 30 Hz avec l'utilisation d'un TissueLyser®. Ces étapes sont préconisées par le fournisseur.

Le kit « QIAamp® DNA Mini kit » a été utilisé en suivant le protocole « DNA purification from Tissues », en suivant les recommandations de l'annexe E correspondant à un protocole adapté pour les levures. Celui-ci est composé d'une lyse enzymatique où le culot de spores est repris dans 600µl de solution de sorbitol dans lequel est ajouté 200 unités de lyticase, le tout incubé 30 minutes à 30°C. Puis une lyse thermique a été aussi effectuée par un chauffage de 10 minutes à 70°C.

Des contrôles négatifs d'extraction, où de l'eau stérile de laboratoire a remplacé le mock fongique ont été préparés en suivant exactement les mêmes étapes que pour le mock. Ceux-ci sont indispensables pour identifier les contaminations inhérentes aux réactifs de laboratoires et potentiels risques de contaminations liés aux manipulations humaines et à l'environnement.

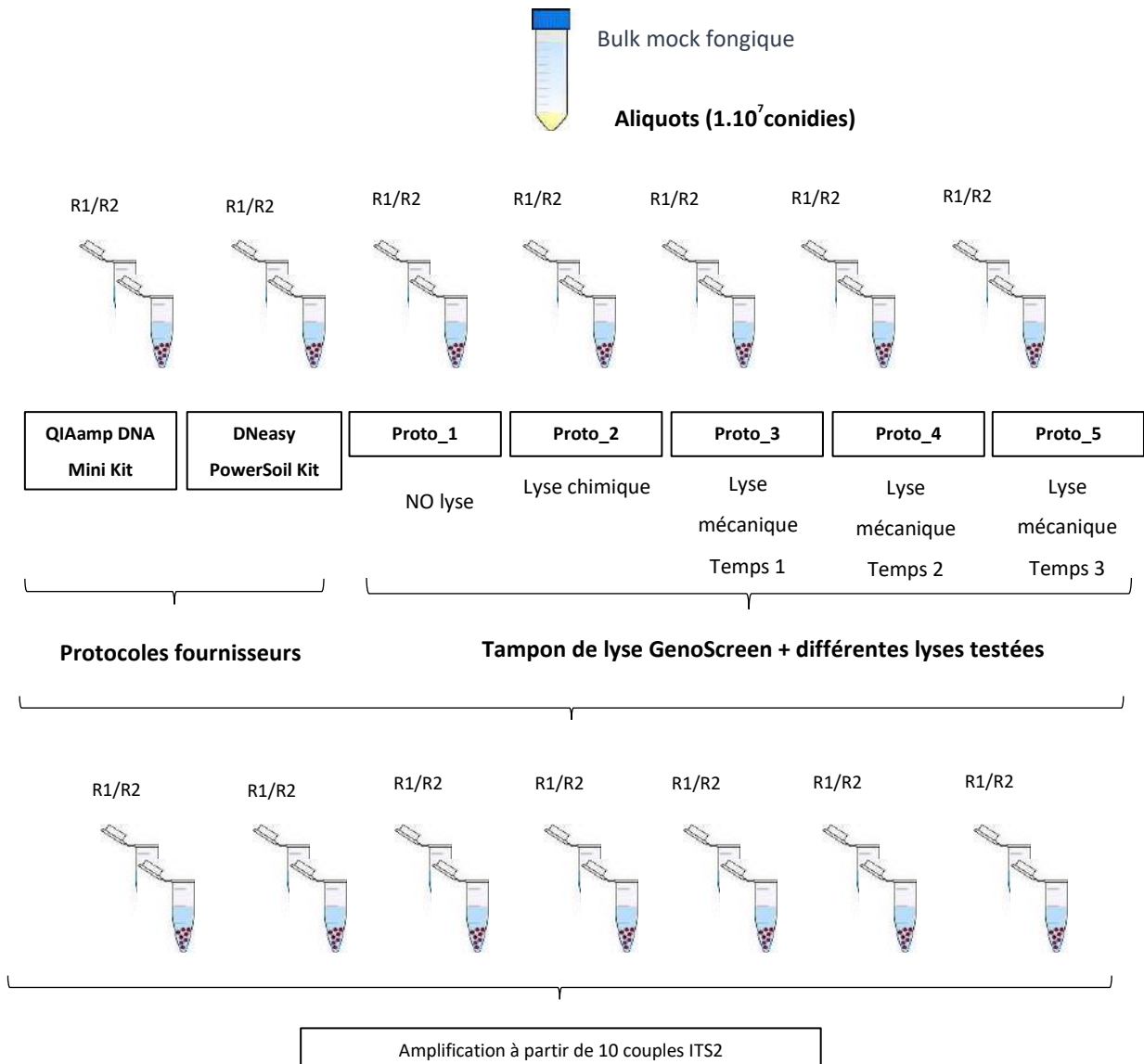
Pour ces deux kits d'extraction, la purification de l'ADN a été effectuée sur colonne de centrifugation (avec membrane de silice) et l'élution a été réalisée dans 100µl de tampon d'élution fourni dans chacun des kits.

#### B. Tampon de lyse GenoScreen

Le tampon développé par GenoScreen était principalement composé de CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide), associé à une solution de Sorbitol qui est un polyol naturel utilisé pour éliminer les polysaccharides. Cette combinaison : solution de Sorbitol et tampon CTAB ont été utilisés avec différentes conditions de lyse détaillées ci-dessous.

### C. Différents protocoles de lyses avec le tampon GenoScreen

L'impact de différentes conditions de lyse a été étudié sur les aliquots de spores de champignons, en duplicat (Figure 15). Une condition sans lyse chimique ni mécanique a été effectuée (Proto\_1). La lyse chimique a été faite avec de la lyticase (Proto\_2) et la lyse mécanique a été effectuée au TissueLyser à partir d'un mélange de billes de tailles différentes et à différents temps d'agitation (Proto\_1 à 5) (Figure 15).



**Figure 15 :** Plan expérimental des comparaisons des kits d'extraction fournisseurs, du tampon de lyse GenoScreen et de l'impact des différentes méthodes de lyse à partir d'aliquots de mocks fongiques. L'ensemble des ADNg extraits ont été amplifiés et séquencés à partir de 10 couples d'amorces ITS2.

## II. SELECTIONS DE LA CIBLE FONGIQUE

Un certain nombre d'amorces fongiques est référencé dans la littérature. Nous avons choisi de cibler le locus ITS2 et sélectionné certaines d'entre elles.

### 1. Les couples d'amorces ITS2

A l'issu de la recherche bibliographique, 5 amorces *forward* et 2 amorces *reverse* ont été sélectionnées, donc 10 couples ont été testés (Tableau 2). Les couples 1 à 5 ont donc la même amorce *reverse*, de même que les couples 6 à 10 partagent l'autre amorce *reverse*.

	Reverse 1	Reverse 2
Forward 1	Couple 1	Couple 6
Forward 2	Couple 2	Couple 7
Forward 3	Couple 3	Couple 8
Forward 4	Couple 4	Couple 9
Forward 5	Couple 5	Couple 10

**Tableau 2 : Dix couples ITS2 formés à partir de 5 amorces forward et 2 amorces reverse**

### 2. Mock et échantillons biologiques

Ces dix couples d'amorces ont été comparés sur l'ensemble des mocks fongiques extraits à partir des deux kits références et du tampon de lyse GenoScreen dans les différentes conditions de lyse déjà explicitées (Figure 15). Cette comparaison a aussi été effectuée à partir de l'ADN extrait d'une selle humaine et d'un échantillon de terre. De plus, les amorces *forward* 1 et 3 associées à l'amorce *reverse* 1 ont été utilisées pour la caractérisation des communautés fongiques pulmonaires de patients atteints de mucoviscidose, au cours d'un traitement anti-fongique (projet Biota-in-ATCF) (Annexe 1).



### III. SEQUENÇAGE NGS ET ANALYSE

Les ADN extraits à partir des mocks fongiques et des deux échantillons biologiques ont été dosés pour initier les étapes de préparation des librairies de séquençage.

#### 1. Dosage des ADN extraits

La quantification des ADNg extraits a été réalisée par fluorimétrie, par l'utilisation de SYBR® Green (ThermoFischer, USA). Le SYBR® Green a été dilué au 1X avec du tampon tris EDTA 1X et ajouté à l'ADN lui-même dilué au 100<sup>ème</sup> dans du tampon Tris EDTA 1X. La fluorescence a été lue par le lecteur de plaque Infinite® 200 (TECAN, France).

#### 2. Préparation des librairies de séquençage

Les librairies de séquençage ont été préparées selon le protocole Metabiote®, un process standardisé et optimisé par la société GenoScreen. Le protocole a été initié par une amplification spécifique de la région intergénique ITS2, à partir des 10 couples d'amorces. Dans le cadre de l'étude de biomasse rare (tels que les myco-microbiote pulmonaire et de l'air intérieur), la préparation de témoin négatifs de préparation de librairies a permis d'identifier les risques de diverses contaminations. Ils ont été préparés en remplaçant la matrice initiale par de l'eau stérile, et ont suivi, en parallèle des échantillons d'intérêt, l'ensemble des étapes du protocole Metabiote®. La librairie finale correspondant au pool de l'ensemble des échantillons, des contrôles négatifs d'extraction et de préparation des librairies. Cette librairie finale a été utilisée pour le lancement du run de séquençage.

#### 3. Séquençage NGS

Le séquençage a été effectué en « *paired-end* », 2\*250pb (chimie v2) sur un Miseq de la plateforme Illumina. A la suite du séquençage, les données brutes obtenues ont été analysées par un pipeline interne à GenoScreen.

## 4. Analyse bio-informatique des données NGS

A partir des données brutes de séquençage, l'analyse se divise en deux étapes, le pre-processing et le processing qui aboutissent à l'affiliation taxonomique. Il est alors possible de mesurer la diversité à l'intérieur d'un échantillon (alpha-diversité), ou entre échantillon (beta-diversité) par différents indices et de les comparer statistiquement.

### A. Pre-processing

Le pre-processing consiste à démultiplexer les lectures en fonction d'un index unique ce qui permet de réattribuer l'ensemble des lectures correspondant à chacun des échantillons. Un filtre qualité basé sur le score Phred est ensuite appliqué pour éliminer les séquences de mauvaise qualité et les lectures « pairend-end » sont réassemblées.

### B. Processing

Les séquences assemblées sont ensuite « clusterisées » à 97% d'identité nucléique, ce qui constitue les OTUs pour « *Operational Taxonomic Units* ». La séquence consensus de chacun des OTUs est comparée à une base donnée de référence : la base de données Unite V7.2 pour les champignons. Cette étape permet l'affiliation taxonomique où chaque OTU est affilié à un taxon, et définit les profils des communautés fongiques pour chacun des échantillons.

### C. L' $\alpha$ -diversité

Des indicateurs de la biodiversité issus de l'écologie ont été adaptés à l'écologie microbienne, notamment à la métagénomique. Il existe plusieurs indices pour estimer la diversité à l'échelle d'un microbiote, ce qui correspond à l'alpha-diversité. L'indice le plus brut utilisé est le nombre d'OTUs différents et présents dans un échantillon (« *observed OTU* »). L'indice Chao1 est très semblable à l'indice « *observed OTU* », mais est pondéré sur les taxons rares dans l'échantillon. L'indice de Shannon quant à lui prend en compte le nombre d'espèces d'un milieu (la richesse spécifique) et la répartition des individus au sein de ces espèces (équitabilité spécifique). Puis l'indice de Simpson est une mesure non-paramétrique qui caractérise la diversité comme étant inversement proportionnelle à la probabilité que deux individus pris au hasard appartiennent à la même espèce.

### D. La $\beta$ -diversité

La  $\beta$ -diversité est une mesure de la diversité qui consiste à comparer la composition des communautés microbiennes de différents échantillons. Ces indices peuvent être séparés en deux catégories : les

indices de similarité binaires qui reposent sur des données de présence/absence des taxons, et les indices de diversités quantitatifs, basés sur les abondances relatives de chaque taxon. Les plus communément utilisés sont les indices de Bray-curtis et UniFrac. L'indice de Bray-Curtis mesure une dissimilarité entre deux communautés. Les valeurs se situent entre 0 et 1, plus cette valeur est proche de 0, plus ces communautés se ressemblent. Cet indice peut être interprété comme une distance et peut donc être visualisé par positionnement multidimensionnel (MDS), un ensemble de techniques géométriques permettant entre autres la représentation de données de dissimilarité selon deux axes ou plus (l'analyse en composante principale (PCA) est une méthode MDS). Le NMDS pour positionnement multidimensionnel non-métrique est recommandé pour l'analyse des communautés et permet de représenter de façon optimale les dissimilarités entre les communautés. Contrairement à l'indice de Bray-Curtis, la distance UniFrac prend en compte les informations phylogénétiques des communautés. Il existe deux versions de la distance UniFrac : la version pondérée (weighted Unifrac) qui prend en compte l'abondance relative des différents taxons, et la distance non pondérée (unweighted UniFrac) basée uniquement sur la présence/ absence des taxons.

#### E. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sur GraphPad et le logiciel R avec les packages vegan et ggplot2. Des tests non-paramétriques de Mann-withney pour les comparaisons deux à deux, et de Kruskal-Wallis pour les groupes ont été effectués pour comparer les différents protocoles d'extraction.

## IV. DEVELOPPEMENT D'UN DISPOSITIF DE RECUEIL DE L'EXPOSOME MICROBIEN

Un dispositif de recueil de l'exposome microbien a été développé durant ce travail de thèse. Dans un premier temps, une copie de la version décrite dans la littérature (Rocchi et al.2017) a été utilisée, dans le cadre du projet COBRA-ENV (voir Chapitre Résultats – 2<sup>ème</sup> partie). Dans un second temps, une réflexion sur le textile permettant le recueil des microorganismes de l'air et sur le capotage (boitier intégrant le textile) a été conduite dans le but de disposer d'un prototype ergonomique et optimisé pour de futures études sur l'exposome microbien (projet KAMYRE). La méthode d'analyse, du culottage des microorganismes déposés sur la lingette, au séquençage des communautés jusqu'à la quantification de la biomasse fongique par lingette sont décrites dans cette partie.

### 1. Le dispositif de recueil de l'exposome microbien

#### A. Version publiée (Rocchi et al. 2017)

##### ✓ *La conception*

La version décrite dans la littérature consiste en un boîtier à CD dans lequel est fixé une lingette ménagère électrostatique achetée dans la grande distribution. La première étape a consisté à l'autoclavage pendant 30 min à 124°C de la lingette, d'une dimension de 17\*20 cm. Le boitier à CD a été quant à lui nettoyé à l'aide d'un désinfectant professionnel, laissé quelques minutes à sécher sous hotte aspirante. La lingette autoclavée a été fixée dans le boitier par de la colle à papier (UHU®). La lingette a été pliée en deux, ce qui permet de fermer le boitier. Celui-ci était ainsi prêt à être utilisé pour recueillir les microorganismes de l'air (Figure 16).



**Figure 16 : Version publiée et utilisée comme référence du capteur électrostatique de poussières en position fermée**

Le dispositif a été ouvert pendant 10 semaines (Rocchi et al. 2017), dans la chambre à coucher de patients asthmatiques dans le cadre de l'étude COBRA-ENV. Le temps d'exposition de 10 semaines a

été considéré pour nos tests comme référence pour la description des communautés fongiques de l'air intérieur.

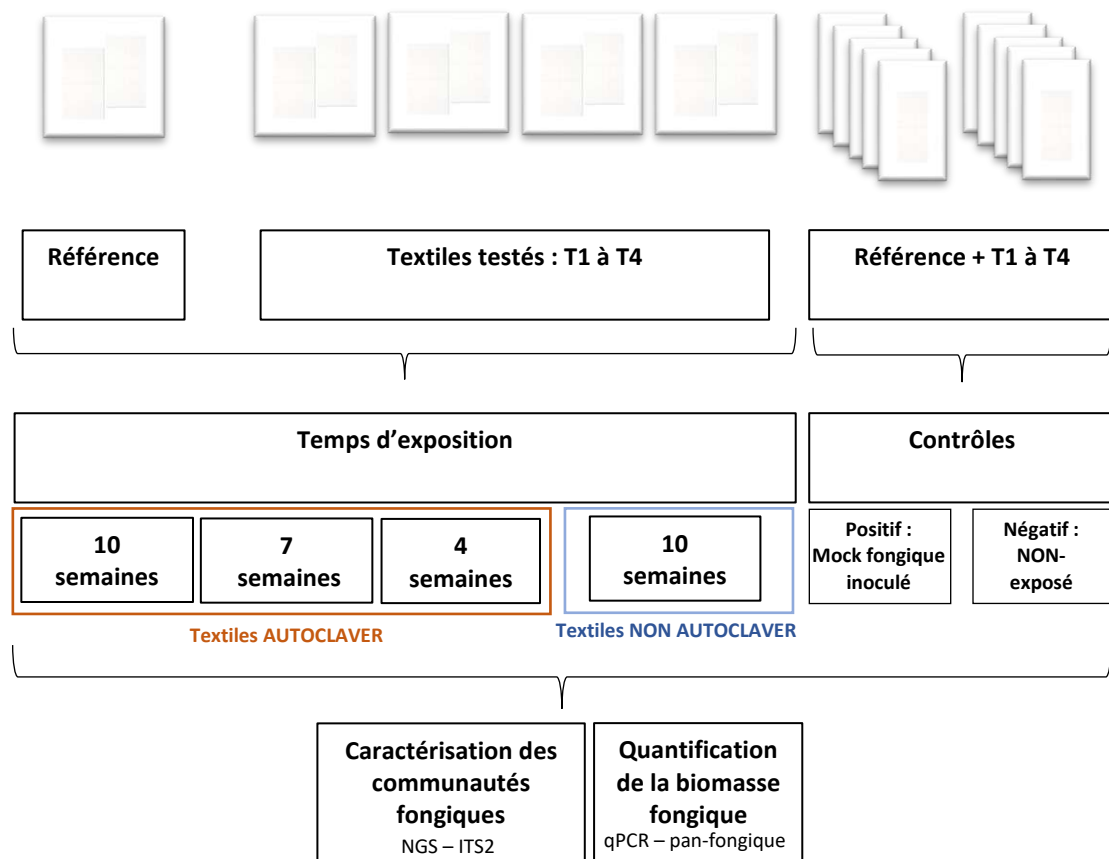
## B. Développement du prototype (lingette et capotage)

### ✓ *Lingettes*

Afin de s'affranchir de la lingette disponible uniquement dans la grande distribution, 4 textiles fournis par le CETI (Centre Européen des Textiles Innovants à Roubaix) se rapprochant des caractéristiques de densité et de composition de la lingette référencée dans la littérature ont été testés. Ainsi la comparaison de la caractérisation et de la quantification des communautés fongiques de la lingette référence et des 4 nouveaux textiles ont été effectuées, en conservant la surface de 17\*20cm. De plus, différents temps d'exposition et l'intérêt de l'autoclavage des 4 textiles et de la lingette référence ont été investigués en exposant, en duplicat ces différentes lingettes dans un couloir de bureaux, sur des armoires (de même hauteur) (Figure 17).

Cette évaluation des différentes lingettes a été complétée par deux contrôles (Figure 17) :

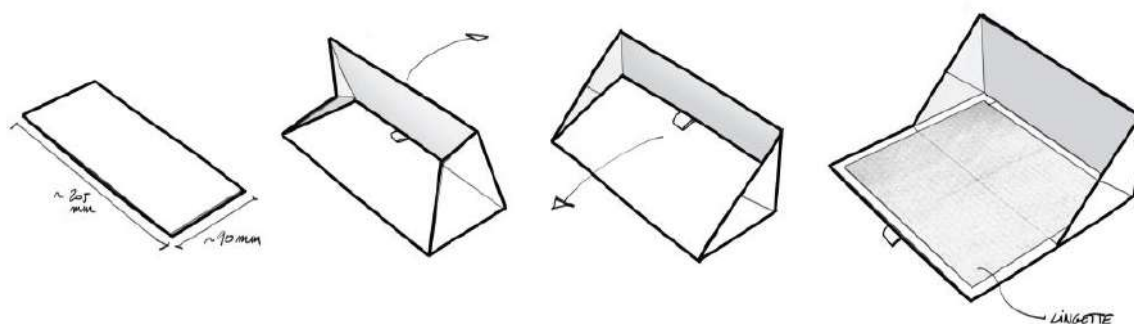
- Contrôle négatif : un exemplaire de chaque lingette, autoclavé, n'a pas été exposé
- Contrôle positif : sur chaque lingette, un aliquot de mock fongique (partie I-1) a été déposé (au goutte à goutte, de façon dispersée sur la surface de la lingette)



**Figure 17 :** Plan expérimental des comparaisons des différents textiles en fonction des temps d'exposition, de l'autoclave, et de deux contrôles : positifs où les lingettes ont été inoculées à partir d'un mock fongique et négatifs où les lingettes autoclavées n'ont pas été exposées.

#### ✓ Capotage

Dans le cadre du projet KAMYRE avec la SATT Aquitaine, une réflexion commune avec le cabinet d'innovation de design industriel Dooingstudio a permis d'imaginer le capotage d'un dispositif de recueil de l'exposome microbien en définissant un cahier des charges précis. Celui-ci a été établi en réfléchissant à sa praticité pour l'utilisateur, mais aussi pour le manipulateur lors du traitement de la lingette au laboratoire. Parmi différentes propositions, celle sélectionnée présentait l'avantage d'être facile à expédier, (du laboratoire au patient, vise-et-versa) dans une simple enveloppe. Puis, de par son pliage permettant sa fermeture et son ouverture, la lingette est protégée de contaminations environnementales lors de son transport (Figure 18).



**Figure 18 : Prototypage de capotage imaginé par le cabinet de design pour le dispositif de recueil de l'exposome microbien.**

## 2. Analyse de l'exposome microbien

Les dispositifs exposés réceptionnés au laboratoire ont été stockés à -20°C jusqu'au traitement de la lingette. La première étape a consisté à culotter les microorganismes déposés sur la lingette. Puis ils ont été extraits, et les communautés fongiques ont été caractérisées par séquençage NGS et quantifiées par qPCR pan-fongique.

### A. Du culottage à l'extraction

La première étape a consisté à culotter les microorganismes présents sur la lingette, inspiré de l'article Adams et al.2015 :

- La lingette a été transférée dans un sac stérile contenant 30 mL de Tween à 0,1%. L'ensemble a été agité par le broyeur homogénéisateur Stomacher 400, 10 minutes à la vitesse maximale.
- Le liquide contenu dans le sac a été transféré dans un falcon de 50 mL et deux lavage successifs de 20 mL et 10 mL ont été effectués afin de rincer la lingette et le sac stérile. L'ensemble est récupéré dans le même falcon de 50 mL.
- Une étape de centrifugation de 10 minutes à 3500 rpm a permis de culotter les microorganismes déposés sur la lingette. Le culot a ensuite été transféré dans un tube de 2 mL pour initier l'étape d'extraction des acides nucléiques.

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir de culot, avec l'utilisation du kit « DNeasy PowerSoil® » d'après les recommandations du fournisseur, décrit précédemment dans la partie I-2-A.

## B. Séquençage et analyse

Le séquençage a été réalisé selon le protocole Metabiote® évoqué partie III, sur runs MiSeq de la plateforme Illumina en 2\*250 pb (chimie v2). L'analyse bio-informatique a aussi été réalisé selon la brève description partie III-3.

## C. Quantification de la biomasse fongique

La biomasse fongique de chaque lingette a été estimée par un essai de qPCR ciblant l'ADNr 18S. Les amorces et la sonde issues de la littérature (Liu et al. 2012) ont été utilisées pour effectuer la quantification, sur la base d'un standard composé de 11 ADNg extraits de différentes souches de champignons (Communauté artificiels de champignons - MetaBiote® Control). Chaque échantillon a été analysé en triplicat. La moyenne de Ct a finalement été confrontée à la courbe standard pour déduire la quantité d'ADN fongique 18S de chaque lingette, ceci exprimé en pg par lingette.



# **CHAPITRE 3**

## **RESULTATS**

# I. OPTIMISATION DE L'ANALYSE DU MYCOBIOTE ET DEVELOPPEMENT D'UN DISPOSITIF DE RECUEIL DE L'EXPOSOME MICROBIEN

## 1. Contexte

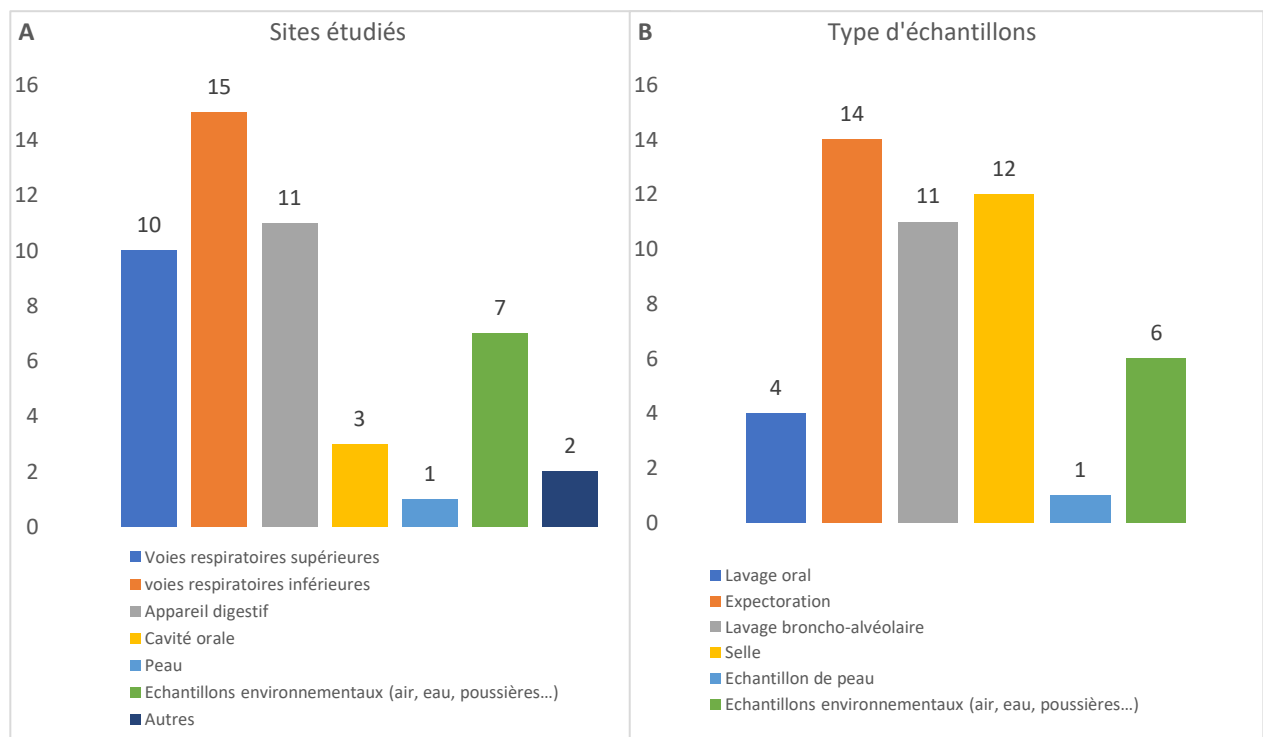
L'analyse par métagénomique ciblée des communautés fongiques présente différents challenges, du recueil biologique jusqu'à l'analyse des données en passant par l'extraction d'ADNg. Il est connu que les méthodologies impactent la caractérisation des communautés fongiques et peuvent générer des biais qui doivent être pris en compte lors de l'analyse finale et l'interprétation des données. Appréhender et identifier les conséquences des méthodes utilisées peut permettre, autant que possible, d'affiner ces choix mais aussi de les prendre en considération, notamment dans un contexte clinique.

Pour l'étude du mycobiote de l'environnement intérieur, nous avons sélectionné le dispositif d'échantillonnage passif par sédimentation pour sa description continue et cumulée dans le temps des microorganismes présents dans l'air auxquels sont exposés les patients atteints de MRC. Dans une première vague d'analyses, le dispositif qui a été utilisé était issu d'études publiées qui avaient déjà évalué la taille, le temps d'exposition et le type de lingette les plus adaptés à l'étude de l'exposome microbien de l'environnement intérieur (Scherer et al. 2014; Rocchi et al. 2017). Durant cette thèse, nous avons réalisé des travaux d'optimisation de ce dispositif pour en améliorer si possible les performances tout en le rendant plus industriel et plus adapté à l'utilisation par un patient à domicile.

De par la structure et la morphologie hétérogène des micromycètes (Gow, Latge, et Munro 2017), l'étape d'extraction représente un défi en soi. Le fait d'appréhender ces champignons dans un contexte de l'étude du mycobiote respiratoire pathologique et de l'air intérieur où ils sont respectivement en faible proportion par rapport aux bactéries et cellules de l'hôte, leur faible biomasse a demandé de challenger les méthodes existantes et d'en tester de nouvelles.

De plus, une enquête internationale menée par le Professeur JP Gangneux dans le cadre du groupe d'étude ECMM (European Confederation of Medical Mycology) et ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) a examiné les procédures actuelles de 26 laboratoires (de 18 pays) concernant les objectifs et les méthodes de caractérisation des études NGS du mycobiote. Cette enquête a fait l'objet d'une publication (Annexe 2). Les résultats obtenus ont mis en évidence que le site majoritairement concerné par les études mycobiote étaient les voies respiratoires inférieures (Figure 19-A), analysés à partir d'expectoration (Figure 19-B). Les études du mycobiote environnemental s'avèrent être en troisième position, après l'étude des voies respiratoires et de

l'appareil digestif. Ces résultats confirment l'intérêt majeur de challenger les méthodologies d'analyse du mycobiote dans le contexte de l'étude des MRC, et de l'exposome fongique des patients.



**Figure 19 : Résultats de l'enquête internationale réalisée sur les études mycobiotes en s'intéressant (A) aux sites ciblés et (B) aux types d'échantillons analysés.**

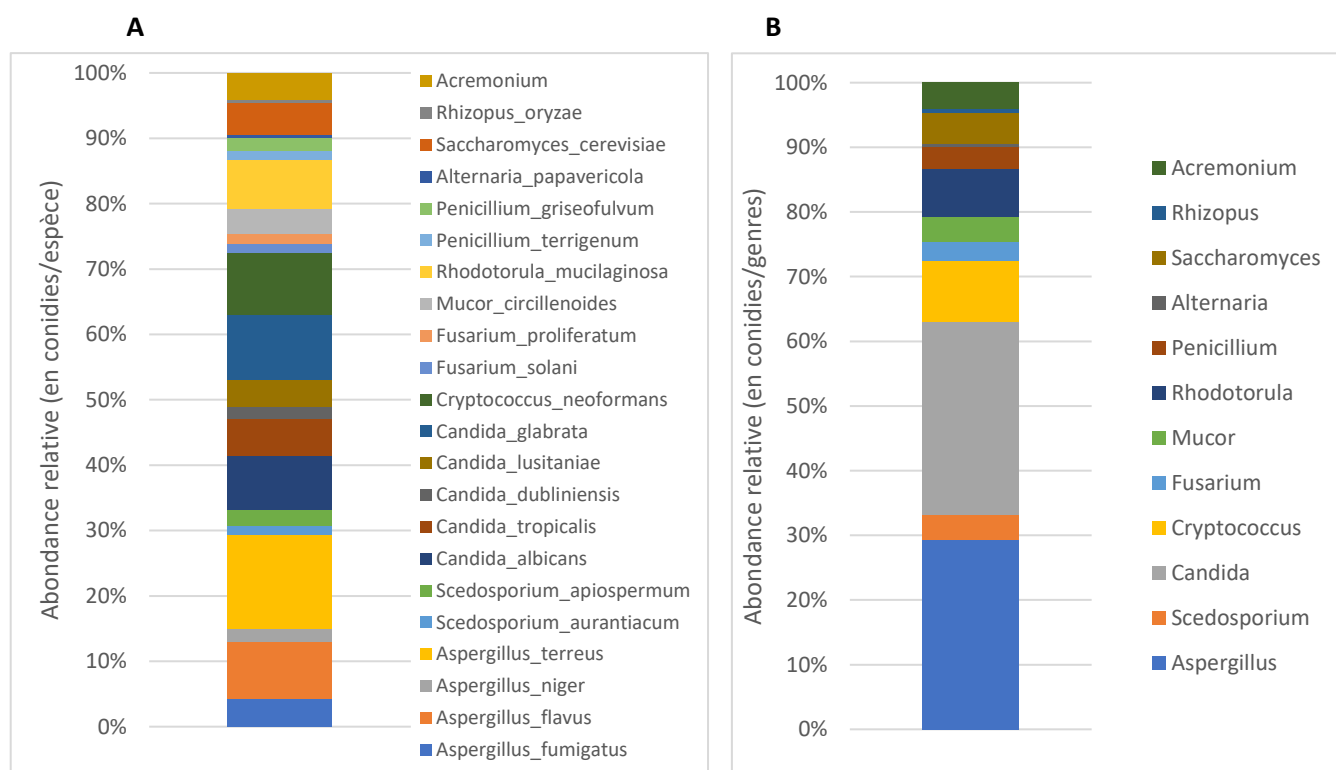
Finalement, l'identification de ces champignons au sein de l'ADNg extrait repose sur l'utilisation de seulement deux amorces encadrant la région intergénique ITS2. De nombreux couples sont décrits dans la littérature, mais qu'en est-il de leur performance respective ?

L'étape d'extraction, la sélection des amorces de la région ITS les plus pertinentes pour l'analyse NGS ainsi que la nature/taille du textile et son temps d'exposition pour le recueil de l'exposome microbien ont été réfléchis et testés pendant la première année de mon travail de thèse.

## 2. Principaux résultats

### A. Analyse du mycobiote : Optimisation de l'étape d'extraction et comparaison de différents couples d'amorces

Il est reconnu que l'accès à l'ADNg de champignons est dépendant de la capacité à dégrader la paroi cellulaire de ces derniers lors des étapes préliminaires de lyse des protocoles d'extraction d'ADNg. Et comme il s'avère compliqué dans le contexte des microbiotes de valider l'efficacité d'un protocole sur un échantillon dont on ne connaît pas réellement la composition, nous avons évalué différents protocoles de lyse sur une même communauté fongique artificielle (mock fongique) que nous avons constituée nous-mêmes et donc de composition parfaitement maîtrisée (Figure 20).



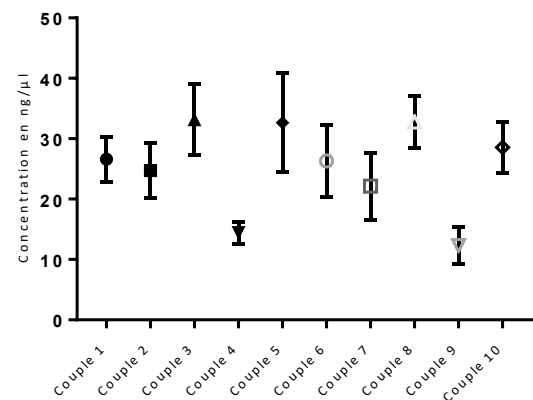
**Figure 20 : Représentation en histogramme des proportions théoriques de chaque souche fongique à l'espèce (A), et au genre (B) de la communauté artificielle fongique (mock fongique).**

Comme décrit dans le Matériels et Méthodes, plusieurs aliquotes identiques de ce mock fongique ont été constituées afin de tester différents protocoles d'extraction, et en particulier de lyse, en association avec l'utilisation de dix couples différents d'amorces ciblant le locus ITS2.

Dans un premier temps, sur dix couples d’amorces ITS2, les couples 4 et 9 présentant l’amorce *forward* 4 en commun (Tableau 2) ont présenté un rendement d’amplification par PCR inférieur aux autres (Figure 21). Ce faible rendement observé à partir d’une quantité standard et pure d’ADNg fongique (5ng) s’avère rédhitoire si l’on projette cette observation dans le contexte de l’étude de biomasses microbiennes rares plus ou moins homogènes en charge fongique. Ils n’ont donc pas été conservés pour la suite des analyses.

	Reverse 1	Reverse 2
Forward 1	Couple 1	Couple 6
Forward 2	Couple 2	Couple 7
Forward 3	Couple 3	Couple 8
Forward 4	Couple 4	Couple 9
Forward 5	Couple 5	Couple 10

**Tableau 2 : Dix couples ITS2 formés à partir de 5 amorces forward (sens) et 2 amorces reverse (antisens)**



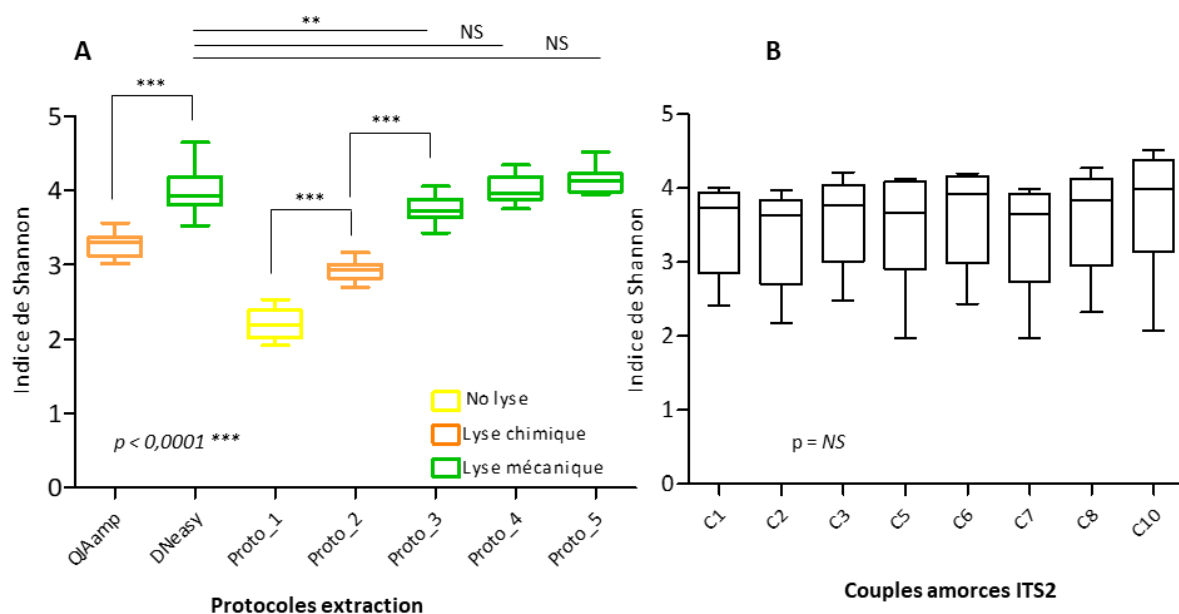
**Figure 21 : Rendement de la PCR sur les communautés artificielles de micromycètes en fonction des amorces spécifiques**

L’analyse taxonomique des ADNg extraits à partir des communautés artificielles fongiques (mock fongique) avec les différents protocoles a permis de confirmer la détection de 11 des 12 genres fongiques de la communauté artificielle. En effet, seul le genre *Mucor* n’a pas été détecté par les 3 protocoles sans lyse mécanique : le kit « QIAamp DNA kit », le protocole 1 (tampon GenoScreen sans aucune lyse additionnelle) et le protocole 2 (tampon GenoScreen et lyse chimique).

Sur les 22 espèces composant ce mock, l’espèce *flavus* du genre *Aspergillus* n’a pas été identifiée, de même que les deux espèces de *Penicillium* (*griseofulvum* et *terrigenum*).

Au-delà de l’identification, la répartition des souches fongiques du mock a été étudiée. Sur la base de l’indice de Shannon, la diversité et l’équitabilité obtenues étaient significativement différentes entre les protocoles d’extraction (Figure 22, A), tandis que les couples d’amorces utilisés n’ont pas d’effet significatif sur cet indice (Figure 22, B).

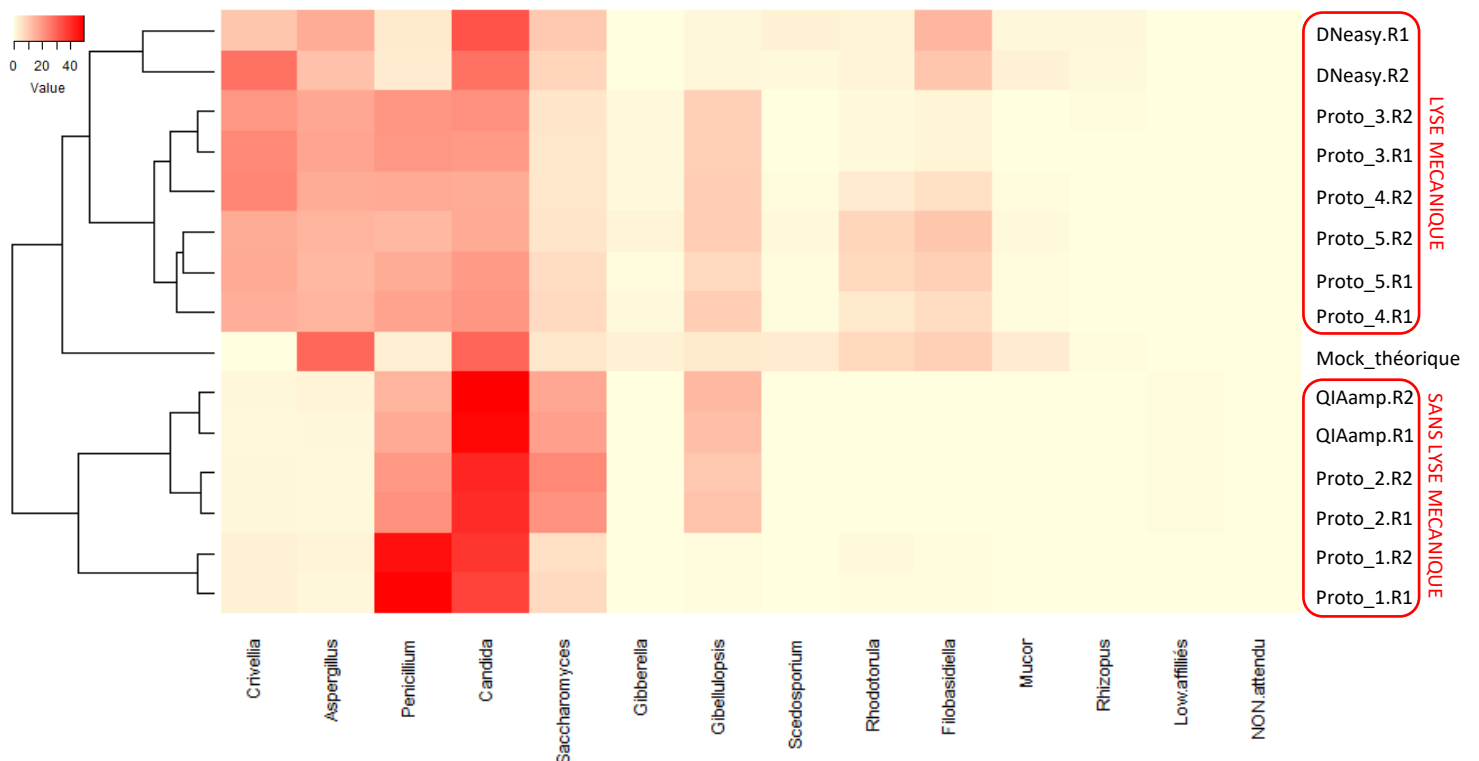
Plus précisément, les protocoles réalisés sur la base du tampon GenoScreen n’ont pas montré une alpha-diversité différente des kits référents, seule la méthode de lyse (chimique ou mécanique) semble impacter cette diversité (Figure 22, A).



**Figure 22 :** Box plot de l'indice de Shannon (A) en fonction des différents protocoles d'extraction (où chaque condition compile les résultats à partir des 8 couples d'amorces ITS2), (B) et en fonction des neuf couples d'amorces ITS2 (où pour chaque couple d'amorce a été cumulé les données des différents protocoles d'extraction).

La diversité des mock fongiques extraits à l'aide du kit « QIAamp® DNA Mini » et du protocole 2 comportant uniquement une lyse chimique sont très proches. De même, la diversité des communautés extraites à l'aide du kit « DNeasy PowerSoil® » et des protocoles 3 à 5 comportant une lyse mécanique ont montré une diversité du même ordre de valeur. L'absence totale d'étape de lyse génère la plus faible diversité observable.

Ainsi, deux profils taxonomiques distincts relatifs à la présence ou non d'une lyse mécanique ont été observés (Figure 23). Le regroupement sur la base de l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis montre une plus grande similarité entre les protocoles avec lyse mécanique et la communauté fongique théorique, qu'avec les protocoles sans aucune lyse ou avec une lyse chimique (Figure 23).

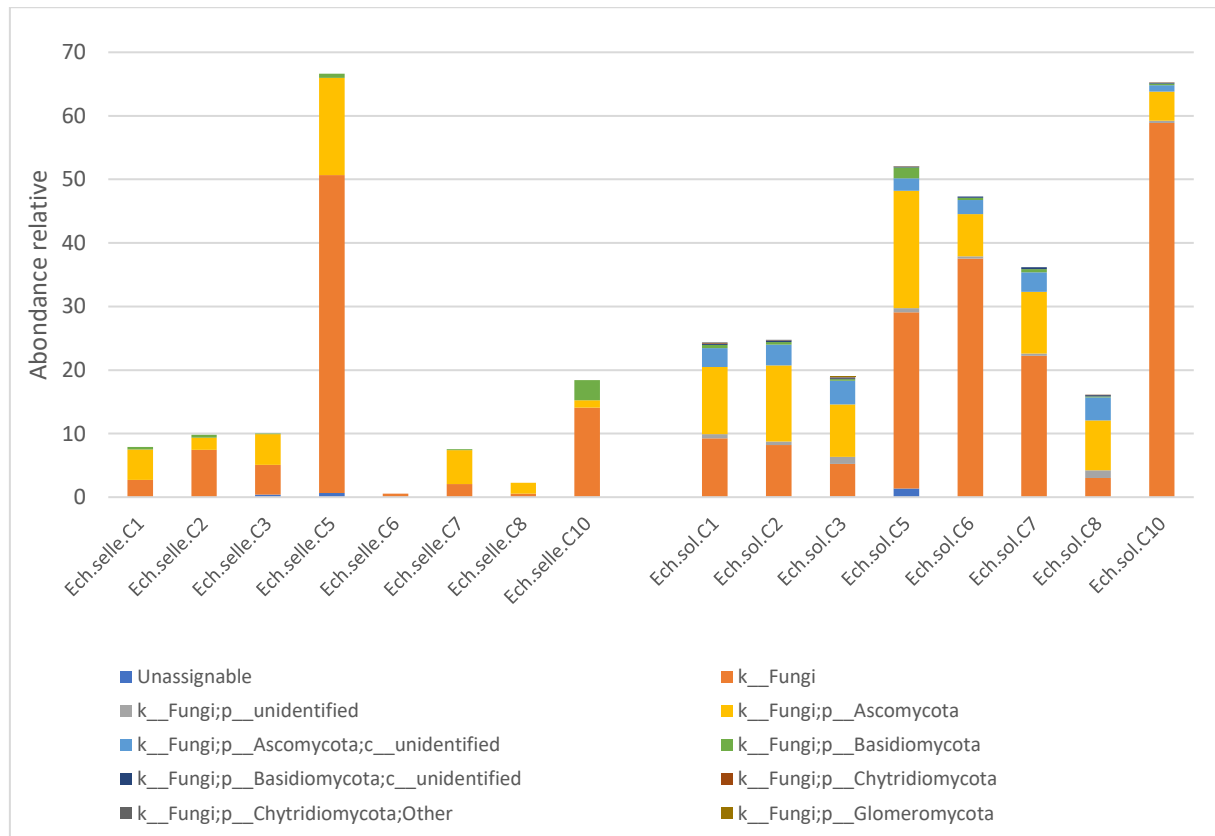


**Figure 23 : Heatmap des abondances relatives des genres du mock fongique en fonction des différents protocoles d'extraction et de la communauté fongique théorique.** Le dendrogramme à gauche est basé sur l'indice de Bray-Curtis. « Low affiliés » concerne les OTU affiliés à des niveaux taxonomiques inférieurs au genre mais pouvant correspondre à des genres de la communauté. « NON attendu » correspond à des affiliations taxonomiques qui ne sont pas présentes dans la communauté.

Finalement, ces résultats nous ont permis de valider le tampon produit par GenoScen et de confirmer la nécessité d'effectuer une lyse mécanique pour une description exhaustive des communautés fongiques. En effet, cette approche mécanique favorise l'extraction des champignons difficiles à lyser, comme par exemple, *Cryptococcus* (*Filobasidiella*) et *Aspergillus*. Toutefois ces résultats n'ont pas permis d'identifier un protocole idéal pour l'extraction en parallèle de différentes espèces fongiques. Même si la répartition des souches fongiques entre les protocoles 4 et 5 est plus similaire que pour le protocole 3, de ces trois protocoles (différents uniquement par le temps de lyse effectué) aucun n'est plus similaire au mock théorique (Figure 23).

L'amplification à partir des 8 couples d'amorces restants de l'ADNg du mock fongique n'a pas montré de différence dans la détection et la répartition des espèces (données non présentées). La faible diversité de ce mock ne représentant pas un challenge pour les couples d'amorces ITS2, il n'était pas étonnant de retrouver l'ensemble des champignons inclus dans le mélange artificiel. C'est pourquoi nous avons confronté ces couples à deux échantillons ADN complexes (un échantillon de selle humaine et un échantillon de sol). Ces travaux ont mis en évidence que les couples C5 et C10 (Amorce Forward

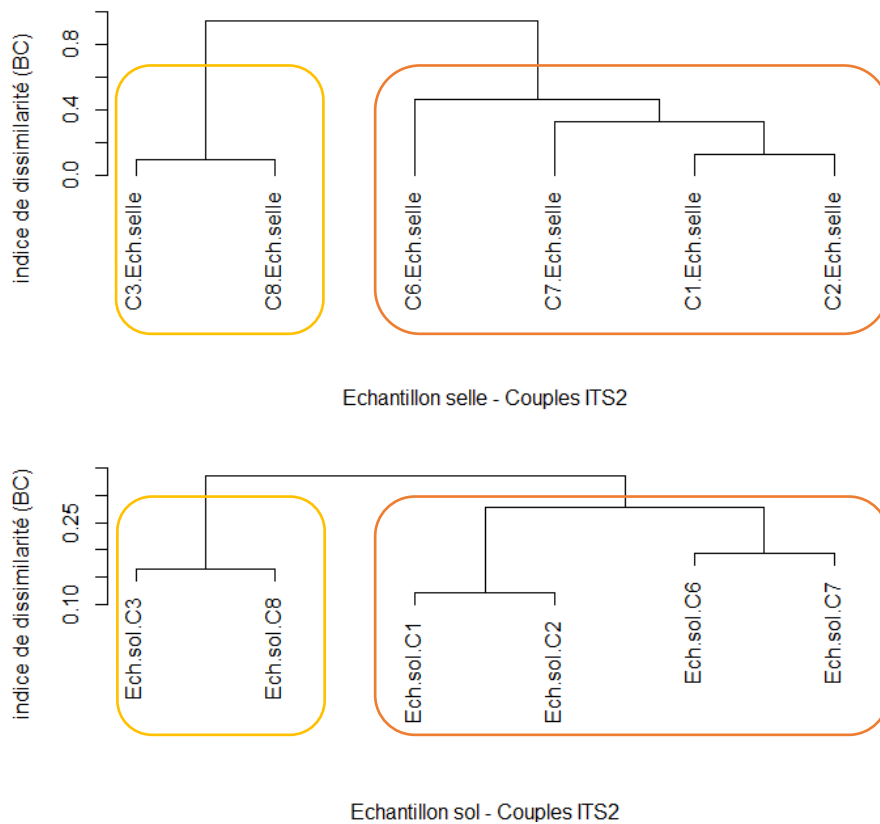
5 en commun) présentait une quantité de séquences avec une affiliation s'arrêtant au règne ou au phylum supérieur à celles des autres couples d'amorces (Figure 24). En conséquence, nous avons décidé de mettre de côté les couples C5 et C10.



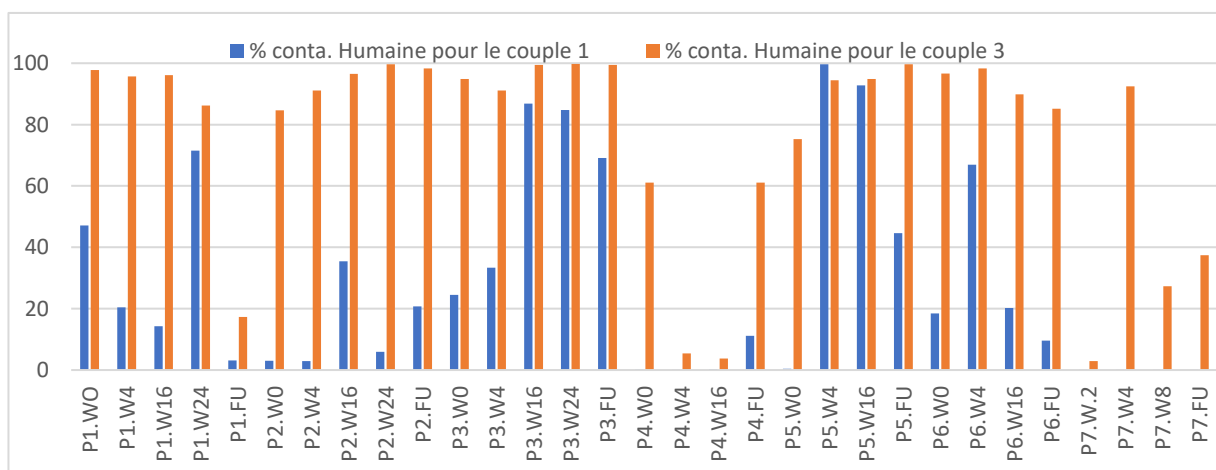
**Figure 24 : Représentation en histogramme des abondances relatives des affiliations « basses » (s'arrêtant au règne ou au phylum) des échantillons biologiques (de selle, à gauche ; de sol, à droite) amplifiés à partir des 8 couples d'amorces.**

Pour les 6 couples d'amorces restants, la représentation en dendrogramme des indices de dissimilarité de Bray-Curtis de ces deux échantillons humains montre que les couples 3 et 8 (Forward 3) ont un profil distinct des 4 autres couples (Figure 25). Cependant l'utilisation de cette forward 3 (couple 3) pour un projet de métagénomique s'intéressant à l'évolution du mycobiote respiratoire de patients atteints de mucoviscidose au cours d'un traitement antifongique (projet Biota-in-ATCF en collaboration avec le Professeur JP Gangneux, poster en Annexe 1) a révélé une proportion importante de séquences de l'hôte (humaines), alors que l'utilisation de la forward 1 réduisait considérablement cette proportion de contamination humaine (Figure 26).





**Figure 25 :** Représentation en dendrogramme des indices de Bray-Curtis (BC) de l'échantillon de selle (en haut) et de l'échantillon de sol (en bas) à partir des six couples d'amorces comparés (C1 à C6). Les cadres jaunes représentent le premier cluster comprenant : C3 et C8 et les cadres orange représentent le deuxième cluster incluant C1, C2, C6 et C7.



**Figure 26 :** Représentation en histogramme des proportions de séquences humaines pour les couples d'amorce 1 et 3 pour l'ensemble des échantillons du projet « Biota-in-ATCF ».

Finalement, aucun indicateur ne nous a permis de discriminer les deux amorces reverse, ni les amorces forward 1 et 2 restantes. Ces deux dernières ayant uniquement une dégénérescence et une base supplémentaire de différences, cela peut expliquer la similitude des communautés fongiques décrites pour les deux échantillons biologiques (Figure 25).

A l'issue de ce travail de comparaisons, les amorces forward 1 et reverse 1 (couple 1) ont été conservées pour les projets cliniques décrits dans les parties II et III des résultats. De même, le protocole adopté pour extraire les ADN totaux des échantillons analysés en parties II et III intégrera une lyse mécanique.

## B. Dispositif de recueil de l'exposome microbien

Dans le contexte de ce projet de thèse, nous avons fait le choix de travailler sur un recueil de l'exposome microbien dit passif (dépôt des particules environnementales par gravité) et continu plus vulgairement appelé « Piège à Poussières ». Ce choix a été fait sur la base de deux considérations, i) la prépondérance de prélèvements dits ponctuels à domicile qui ne sont que l'image très ponctuelle d'un environnement, ii) la cohérence d'un prélèvement continu cumulé avec des maladies dites chroniques. D'un point de vue scientifique, il nous fallait conforter la possibilité de donner ce type de dispositif à des patients et de recueillir une information biologique. Par contre, d'un point de vue industriel, il nous fallait repenser ce dispositif pour le faire passer d'un état « artisanal » à un état industriel sous forme de prototype. Plusieurs éléments à améliorer ou modifier se sont clairement avérés prioritaires :

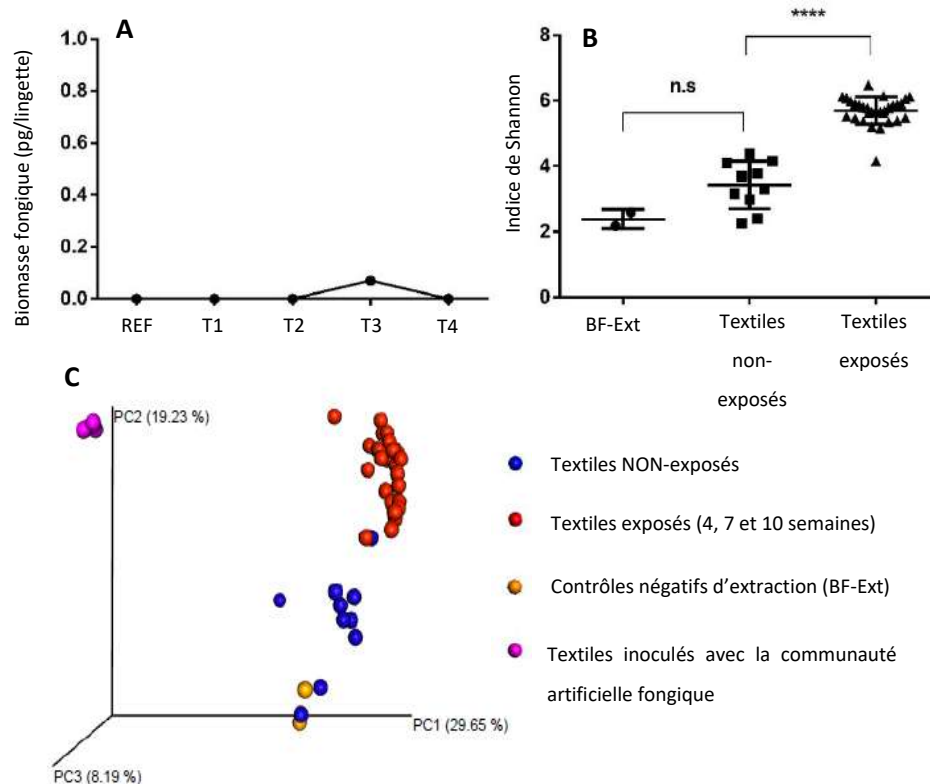
- Le textile utilisé dans le dispositif artisanal (une lingette commerciale produite pour une utilisation ménagère)
- Le capotage (entourage solide recevant la lingette qui est une simple boîte CD dans la version « artisanale »)
- Le temps d'exposition de ce dispositif (10 semaines en référence dans la littérature) qui peut sembler trop long pour le patient et générer des oublis de fermeture et renvoi du dispositif au laboratoire d'analyse.

Globalement, le dispositif a aussi été repensé pour une utilisation plus aisée par le patient ou ses proches, une fermeture facile, un renvoi simple et protégé par la poste.

En ce qui concerne le premier objectif sur le textile, comme indiqué dans le Matériels et Méthodes, des interactions ont été initiées avec le Centre Européen des Textiles Innovants (CETI) localisé à Roubaix-Tourcoing. Ces échanges avec l'équipe de R&D nous ont permis de sélectionner différents textiles proches de la lingette issue de la littérature (Scherer et al. 2014) que le CETI a observé en microscopie électronique. Ainsi, quatre nouveaux textiles ont pu nous être proposés.

Les travaux décrivent ici les comparaisons que nous avons pu effectuer entre la lingette (nommée « Référence » par la suite) et les quatre nouveaux textiles. Ces comparaisons se sont basées sur la quantification de la biomasse fongique et la caractérisation par métagénomique ciblée tout en intégrant dans le plan expérimental différents contrôles : des contrôles négatifs d'extraction (BF-Ext) correspondant aux deux séries d'extraction, un exemplaire de chacune des lingettes autoclavées et non-exposées, et des contrôles positifs correspondant au mock fongique (communauté artificielle) inoculé sur chacun des textiles.

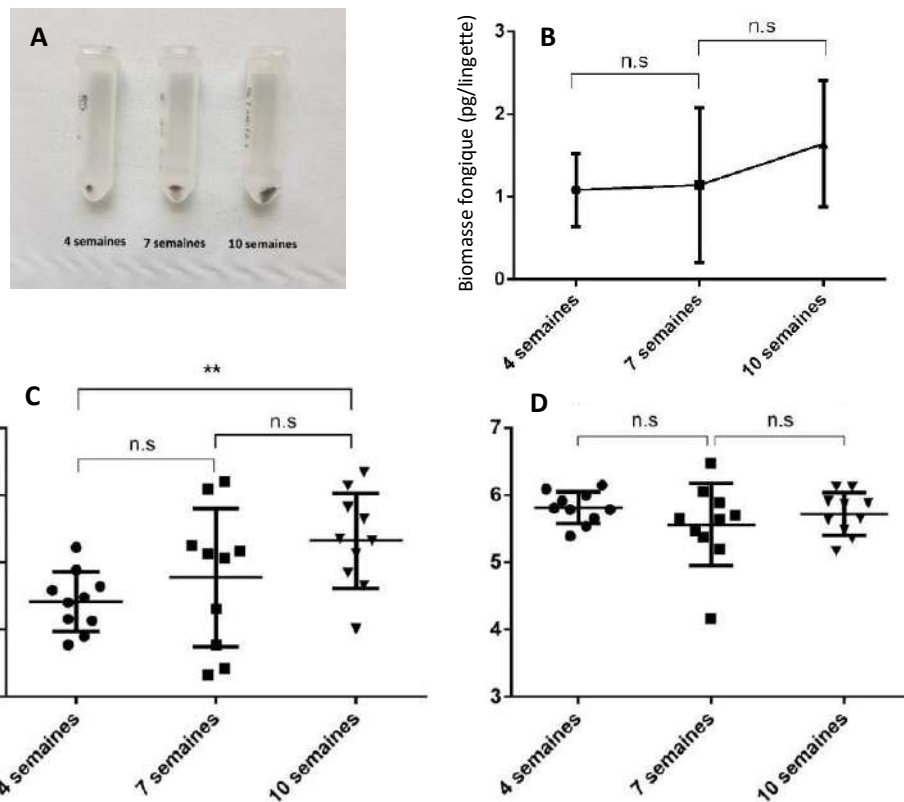
La quantification (par qPCR) de la biomasse fongique de lingettes non-exposées a révélé une biomasse très faible uniquement pour le textile 3 (Figure 27-A), tandis que les témoins d'extraction (témoins négatifs) n'ont pas été dosables par qPCR. Les résultats de métagénomique ciblée ont montré que l'alpha-diversité des témoins négatifs (BF-Ext et textiles non-exposés) n'était pas significativement différente, tandis que cette diversité fongique était significativement plus importante entre les contrôles négatifs et les textiles exposés (Figure 27-B). En s'intéressant à la composition des communautés fongiques mesurée par l'indice de Bray-Curtis, des clusters distincts en fonction des contrôles négatifs, positifs et des textiles exposés ont été identifiés (Figure 27-C).



**Figure 27 : Représentation de la biomasse fongique (A), de la diversité  $\alpha$  (B) et  $\beta$  (C) des contrôles négatifs et des textiles exposés.** (A) Biomasse fongique des textiles non exposés. REF : lingette référence, T1 à T4 : Textiles 1 à 4. (B) Diversité fongique des témoins d'extraction (BF-Ext), des textiles non-exposés et exposés. (C) ACP a été réalisée à partir de l'indice de Bray-Curtis entre les échantillons contrôles (témoins négatifs d'extraction (BF-Ext), textiles non-exposés, textiles inoculés à partir du mock fongique) et des textiles exposés.

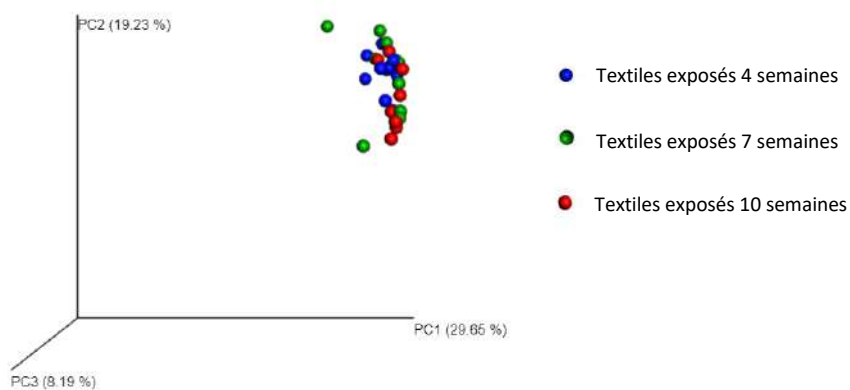
Ces résultats montrent que les textiles non exposés ne présentent pas de biomasse fongique détectable qui leur serait propre (pas de contamination fongique) et que la diversité et composition des communautés fongiques récupérées par ces textiles diffèrent clairement de témoins négatifs ou de textiles non exposés. Ainsi, les observations faites sur ces textiles semblent donc bien spécifiques et non pas la résultante de contaminations diverses (intra-textile, réactifs de biologie moléculaire etc.).

En ce qui concerne le temps d'exposition, différents choix ont été faits (4, 7 et 10 semaines ; ce dernier temps étant celui préconisé (Rocchi et al. 2017)) et ont été comparés pour l'ensemble des textiles, dans l'objectif de savoir si le temps d'exposition pourrait être réduit pour de futures études. Le culot récupéré des particules sédimentées sur les différents textiles était visiblement de taille croissante en fonction du temps d'exposition, cependant la biomasse fongique n'était pas significativement différente entre les trois temps (Figure 28-A et B). Quant à la diversité fongique, l'indice « *observed OTU* » montre une différence significative entre 4 semaines et 10 semaines d'exposition des lingettes, tandis que les indices de Shannon correspondants ne sont pas significativement différents (Figure 28-C et D). L'indice de Shannon, en plus du nombre d'espèces différentes, prend en considération la répartition des espèces au sein d'un l'échantillon, contrairement à l'« *observed OTU* » qui considère uniquement le nombre d'espèces différentes. Ces résultats semblent dire qu'à 10 semaines, les OTU supplémentaires (qui ne sont pas identifiés à 4 semaines) concerneraient essentiellement des OTU rarement détectés.



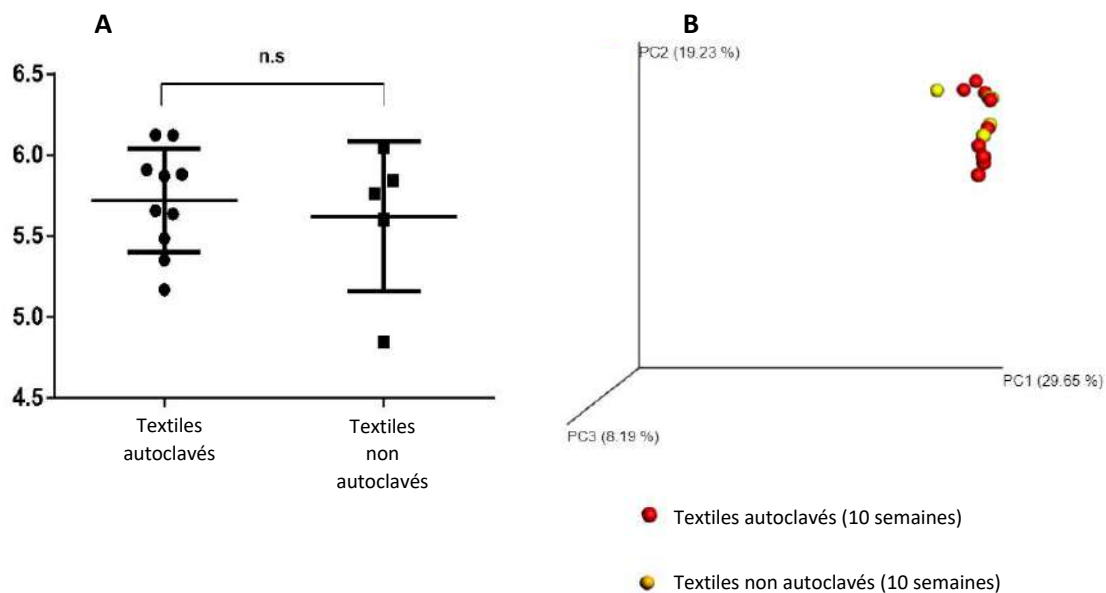
**Figure 28 :** Représentation des différents temps d'exposition (4, 7 et 10 semaines). (A) Visualisation du culot récupéré à partir d'un type de textile. (B) Biomasse fongique en fonction des 3 temps d'exposition pour l'ensemble des types de textiles. Représentation de la diversité  $\alpha$  par (C) l'indice Observed OTU, (D) l'indice de Shannon en fonction des 3 temps d'exposition.

L'analyse de la composition des communautés fongiques et de leur dissimilarité en fonction des 3 temps d'exposition a confirmé cette ressemblance et ne montre pas de différence significative en fonction du temps d'exposition (Figure 29).



**Figure 29 :** Représentation par ACP de la diversité  $\beta$  (l'indice de Bray-Curtis) des textiles exposés 4, 7 et 10 semaines.

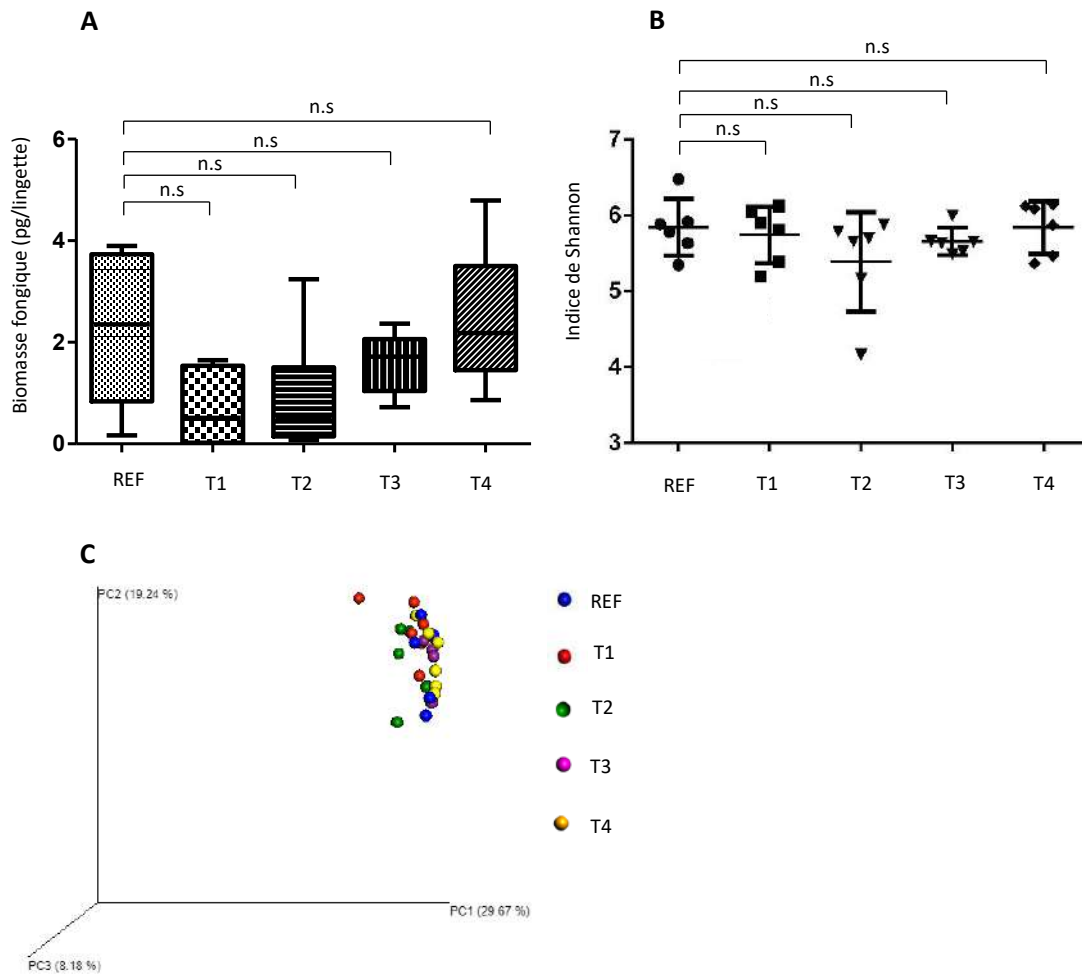
Une autre considération pour la conception d'un dispositif plus industriel qui a été prise en compte est l'étape d'autoclavage de la lingette qui est effectuée si l'on suit le protocole validé dans la littérature. Cette étape étant particulièrement problématique pour une mise en production industrielle, son intérêt a été également investigué en exposant des différents textiles (réfèrent et nouveaux) non autoclavés pendant 10 semaines, et en les comparant aux textiles autoclavés et exposés 10 semaines.



**Figure 30 : Représentation de la diversité  $\alpha$  (A) et de la diversité  $\beta$  (B) des textiles exposés 10 semaines autoclavés ou non-autoclavés. L'ACP a été réalisée à partir de l'indice de Bray-Curtis.**

Aucune différence significative n'a été observée entre la condition autoclavée et non-autoclavée, en termes d'alpha et bêta- diversité fongique (Figure 30). Ceci était particulièrement intéressant dans la considération d'un processus de production plus industriel où l'autoclavage aurait représenté une limitation et un surcoût non négligeable.

Finalement, une comparaison des nouveaux textiles (autoclavés) avec la référence (autoclavée) a permis d'identifier que la biomasse et la diversité fongique entre les différents textiles n'étaient pas significativement différentes du textile de référence (Figure 31-A et B). Cependant le textile 4 (T4 en Figure 31) tend à montrer une biomasse fongique plus importante que les autres textiles étudiés. En ce qui concerne la composition des communautés fongiques, aucune différence significative n'a été observée entre les différents textiles (Figure 31-C). Globalement les différents textiles présentent des performances équivalentes à la lingette commerciale et permettent d'envisager d'acquérir une matière première via des spécialistes du textile et de la configurer exactement aux besoins du dispositif et du futur marché (taille, production etc.). La performance en biomasse fongique récupérée pourrait toutefois favoriser le choix du textile 4.



**Figure 31 : Représentation des différents textiles (réfèrent et nouveaux) en fonction de leur biomasse fongique (A) de la diversité  $\alpha$  (B), et  $\beta$  (C). L'ACP a été réalisée à partir l'indice de Bray-Curtis**

## II. LE MYCOBIOTE ET MICROBIOTE ENDOGENE DANS LA MUCOVISCIDOSE

### 1. Contexte

Les infections bactériennes et fongiques pulmonaires sont un facteur majeur d'aggravation de l'état clinique du patient dans le contexte de la mucoviscidose, pouvant être à l'origine du déclin de la fonction respiratoire et de phénomènes d'exacerbations. Le développement des technologies NGS a largement contribué à la caractérisation du mycobiote et microbiote respiratoire dans la mucoviscidose, ce qui participe à une meilleure compréhension de la physiopathologie de cette maladie. Des communautés bactériennes (Zhao et al. 2012; Linh Do Ngoc Nguyen et al. 2016) et des microorganismes isolés tels que *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus* (Chotirmall et al. 2010; Amin et al. 2010) ont déjà été impliqués dans les phénomènes d'infection et d'exacerbation chez les patients atteints de mucoviscidose. En parallèle, les méthodes statistiques évaluant les réseaux de corrélation entre microorganismes (ou dialogues interrègnes) permettent une analyse globale des communautés microbiennes, en prenant en compte les interactions champignons-bactéries qui se développent dans la même niche écologique. Cependant, peu d'études se sont intéressées à la caractérisation du mycobiote pendant un phénomène d'exacerbation (Willger et al. 2014; Linh Do Ngoc Nguyen et al. 2016), et aucunes aux interactions interrègnes. Dans cette étude, le mycobiote et microbiote respiratoires de 33 patients atteints de mucoviscidose ont été caractérisés, en prenant en compte l'existence ou non d'une exacerbation et les dialogues interrègnes.

L'identification des corrélations positives bactéries-champignons a été confirmée par cultures *in-vitro* de certains des organismes, notamment par co-cultures d'*A. fumigatus* et de *Streptococcus oralis* et *S. mitis*. Afin de relier l'état clinique des patients à leurs communautés microbiennes, la méthode statistique de régression Phy-Lasso (« *Least Absolute Shrinkage and Selection Operator* ») (Rush et al. 2016) a permis de mettre en évidence les genres bactériens et fongiques associés à un phénomène d'exacerbation au sein de notre cohorte, ou associé à un déclin de VEMS1. Ces données ont permis de documenter le modèle écologique « Climax-Attack ».



## 2. Principaux résultats

- ✓ Une corrélation linéaire positive et significative a été identifiée entre les valeurs de VEMS1 et la diversité bactérienne (pour les indices de diversité Chao1 et Shannon).
- ✓ Les populations microbiennes divisées en sous-populations majoritaires et minoritaires (avec un seuil à 1%) ont permis de mettre en évidence une diminution significative des genres *Haemophilus*, *Neisseria* et *Cladosporium* au sein de la population majoritaire (abondance relative des OTU >1%) chez les patients avec exacerbation. Ces genres ont aussi été associés à une perte de la diversité bactérienne et fongique dans la population minoritaire (abondance relative des OTU <1%).
- ✓ La matrice de corrélation a permis de mettre en évidence des interactions bactériennes avec trois principaux genres fongiques : *Candida*, *Aspergillus* et *Scedosporium*. Notamment une corrélation positive entre *Aspergillus* et *Streptococcus* a été confirmée par des co-cultures *in-vitro*, mettant en évidence une croissance significativement augmentée d'*A. fumigatus* en présence de *S. mitis* et *S. aureus*.
- ✓ La prédiction par la méthode Phy-Lasso des communautés fongiques et bactériennes associées à l'altération de la fonction respiratoire ou à l'existence d'une exacerbation a révélé : 4 genres bactériens (*Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* et *Streptococcus*) et 4 genres fongiques (*Candida*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Scedosporium*) négativement associés à la présence d'une exacerbation et 2 genres fongiques (*Malassezia* et *Aspergillus*) positivement associés à la présence d'une exacerbation.
- ✓ Ces données ont permis d'incrémenter le modèle écologique « Climax-Attack » récemment adapté à la mucoviscidose (Conrad et al. 2013) où l'exacerbation réfère à la population « Attack ».

### 3. Article

Page suivante : ***“Respiratory mycobiome and suggestion of inter-kingdom network during acute pulmonary exacerbation in cystic fibrosis”***. Vandeborghht L-E., Soret P., Francis F., Coron N., Enaud R., Avalos M., Schaevebeke T., Berger P., Fayon M., Thiebaut R., Delhaes L.  
Accepté dans Scientific Reports (reference SREP-18-47814C)

Poster en Annexe 3 : **« Caractéristique du mycobiote et du microbiote respiratoire dans la mucoviscidose : Importance du dialogue interrègne lors d’un phénomène d’exacerbation »**. Vandeborghht L-E., Soret P., Coron N., Enaud R., Francis F., Schaevebeke T., Berger P., Fayon M., Thiebaut R., Delhaes L.

**TITLE:** Respiratory mycobiome and suggestion of inter-kingdom network during acute pulmonary exacerbation in cystic fibrosis

**AUTHORS:** Perrine Soret<sup>1,2<sup>μ</sup></sup>, Louise-Eva Vandenberght<sup>3,4<sup>μ</sup></sup>, Florence Francis<sup>5</sup>, Noémie Coron<sup>3,6,7</sup>, Raphael Enaud<sup>3,6,8</sup>, The Mucofong Investigation Group, Marta Avalos<sup>1,2</sup>, Thierry Schaeverbeke<sup>6</sup>, Patrick Berger<sup>3,6</sup>, Michael Fayon<sup>3,6,8</sup>, Rodolphe Thiebaut<sup>1,2,5</sup>, Laurence Delhaes<sup>3,6-9\*</sup>

<sup>μ</sup>These two authors contributed equally and are co-first authors.

**AUTHOR ADDRESSES:** <sup>1</sup>Univ. Bordeaux, Inserm, Bordeaux Population Health Research Center, UMR 1219,F-33000, Bordeaux, France; <sup>2</sup>INRIA SISTM Team, F-33405, Talence, France; <sup>3</sup>Univ. Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33000, Bordeaux, France; <sup>4</sup>Genoscreen Society 59000, Lille, France; <sup>5</sup>CHU Bordeaux, Department of Public Health, F-33000, Bordeaux, France; <sup>6</sup>CHU de Bordeaux, Univ. Bordeaux, FHU ACRONIM, F-33000, Bordeaux, France; <sup>7</sup>CHU de Bordeaux: Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Univ. Bordeaux, F-33000, Bordeaux, France; <sup>8</sup>CHU de Bordeaux, CRCM Pédiatrique, CIC 1401, Bordeaux, France; <sup>9</sup>Previous address: University and CHU of Lille, F-59000, Lille, France.

**\*CORRESPONDING AUTHOR:** Prof Laurence Delhaes, Univ. Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Bordeaux F-33000 Bordeaux, France. [Laurence.delhaes@gmail.com](mailto:Laurence.delhaes@gmail.com) [Laurence.delhaes@u-bordeaux.fr](mailto:Laurence.delhaes@u-bordeaux.fr)

**ABSTRACT:**

Lung infections play a critical role in cystic fibrosis (CF) pathogenesis. CF respiratory tract is now considered to be a polymicrobial niche and advances in high-throughput sequencing allowed to analyze its microbiota and mycobiota. However, no NGS studies until now have characterized both communities during CF pulmonary exacerbation (CFPE).

Thirty-three sputa isolated from patients with and without CFPE were used for metagenomic high-throughput sequencing targeting 16S and ITS2 regions of bacterial and fungal rRNA. We built inter-kingdom network and adapted Phy-Lasso method to highlight correlations in compositional data.

The decline in respiratory function was associated with a decrease in bacterial diversity. The inter-kingdom network revealed three main clusters organized around *Aspergillus*, *Candida*, and *Scedosporium* genera. Using Phy-Lasso method, we identified *Aspergillus* and *Malassezia* as relevantly associated with CFPE, and *Scedosporium* plus *Pseudomonas* with a decline in lung function. We corroborated *in vitro* the cross-domain interactions between *Aspergillus* and *Streptococcus* predicted by the correlation network.

For the first time, we included documented mycobiome data into a version of the ecological Climax/Attack model that opens new lines of thoughts about the physiopathology of CF lung disease and future perspectives to improve its therapeutic management.

**KEYWORDS:** Mycobiome; Microbiome; Inter-kingdom Network; Climax-Attack model; Cystic Fibrosis; Pulmonary exacerbation

## **INTRODUCTION:**

Lung infections play a critical role in cystic fibrosis (CF) pathogenesis where they can lead to significant acute decrease of lung function, known as CF pulmonary exacerbation (CFPE). Developments of next-generation sequencing (NGS) approaches allowed us to understand microbiome composition that can contribute to lung physiopathology in both healthy individuals and patients with lung disease. More recently, NGS together with advances into statistical network inference tools allowed to analyze the microbial airway communities, appreciate the inter-kingdom equilibrium of respiratory floras, and therefore develop understanding of microbial communities as a whole<sup>1-7</sup>.

Acute CFPEs represent major clinical events that significantly decline the lung function, contribute to disease progression and require adapted, prompt anti-infectious treatment<sup>8-11</sup>. Omics approaches confirmed associations between bacterial community and exacerbation<sup>12-20</sup>. Apart from bacteria that are well known agents causing dramatic recurrent CFPEs, respiratory viruses have been recently found to be associated with CFPE, independently of bacteria or as trigger for bacterial infection<sup>21-23</sup>. Fungal species such as *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* have been associated with decreased lung function as well as increased frequency of exacerbations<sup>24,25</sup>. However, only limited number of studies evaluated mycobiome during CFPE<sup>12,26</sup>, and never in association with bacterial community to address inter-kingdom crosstalk.

Although much has been learned about CFPEs, our current knowledge about its pathophysiology and usefulness of diagnostic criteria remains limited. Since CFPEs are difficult to predict, new biomarkers that may derive from current NGS approaches are needed to complete existing assessments<sup>9,13,14</sup>. Given the prevalence of fungal colonization, the predominance of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA), the growing role of fungal infection in CF and the stabilizing function that fungi appear to play in lungs<sup>1,27-30</sup>, we hypothesized that fungi are involved in CF pulmonary disease evolution and in CFPEs. In the present study we considered both fungal and bacterial communities as a unique pathogenic entity, and interpreted our results according to a co-occurrence/co-exclusion pattern approach that highlights relationships between microorganisms sharing the same ecological niche, i.e. the CF respiratory tract. According to our inter-kingdom network results, we selected species belonging to *Aspergillus* and *Streptococcus* genera, and documented experimentally the predicted positive growth of *A. fumigatus* when it is co-cultured with species from *Streptococcus mitis* group. By adapting Phy-Lasso method we pointed out the fungi relevantly associated with CFPE and/or a decline in lung function. Collectively, these data

provided an opportunity to reflect on a revised version of the CF Climax/Attack model (CAM) derived from ecology research field<sup>31</sup>. In CAM model, CF lung infection is no longer interpreted as an invasion of a single pathogen such as *Pseudomonas aeruginosa* but as dynamic changes within the whole microbial community composed of two types of microbial populations (an Attack transient but virulent population associated with CFPE and a Climax chronic population driving the long-term prognostic of CF lung disease)<sup>4,7,13,14,31,32</sup>. While it would be still early to draw definitive conclusions, our results pave the way for future studies on respiratory mycobiome that should help us to begin deciphering the physiopathology of CF lung disease and to improve its therapeutic management. They also suggest the complexity of all respiratory microbiome components' connections, which might yield important insights within the CF disease.

## **RESULTS:**

**Patients and sample characteristics.** Among the 37 patients initially screened, samples of patients 2, 7, 28 and 35 were excluded because their corresponding rarefaction curves and/or numbers of sequences were inadequate to allow biodiversity comparison. Samples from 33 patients, corresponding to 246,228 and 304,914 bacterial and fungal reads respectively, were used to evaluate microbial composition, diversity, and perform network analysis. Patients' characteristics, spirometry data, presence of conventionally cultured pathogens in sputum, and therapeutic management at sampling time are recorded in Table 1. Seventeen patients were classified as having CFPE while 16 were not. According to body mass index (BMI), Shwachman-Kulczycki score (S-K score), and spirometry data (in particular Forced Expiratory Volume in 1s (FEV1) expressed as percent of predicted value), patients were in a medium to advanced stage of CF disease, with several co-morbidities (exocrine pancreatic dysfunction in 90% of cases, and diabetes mellitus or impaired glucose tolerance in 33% of cases). Colonization by *Pseudomonas aeruginosa* was highly prevalent (96.7%, Table 1); all excepted one patient (a 23-year-old woman, patient 14) had positive mycological cultures. *Candida albicans*, other *Candida* sp., and *A. fumigatus* were observed in 66.6%, 18.2%, and 66.6% of patients respectively, as determined by conventional culturing. Most of the patients received rhDNAse and/or inhaled steroids (100%), low dose of azithromycin (69.7%) and antibiotics (90.1% of cases administered orally). Antifungal therapy was prescribed for one patient in agreement with ABPA diagnosis<sup>33</sup>. While 11 (33%) patients were treated with systemic steroids, no other systemic immunosuppressive therapy was used. No significant

difference for those variables was observed between patients with and without CFPE, except for the median age, which was significantly lower in patients with CFPE.

**FEV1 was associated with changes in alpha diversity, and CFPE with shifts in minority populations.** Rarefied data was used to summarize microbial composition and its changes among groups (Fig. 1). These microbial communities inferred from NGS were consistent with results obtained by culturing (Table 1); however greater diversity was evident via NGS approach. We observed a significant positive linear relationship between FEV1 values and Chao1 indexes of bacterial communities (Fig. 1a). This linear relationship was also observed when using Shannon diversity indexes ( $p=0.04$ ), but not using Simpson diversity indexes ( $p=0.10$ ). Different diversity metrics capture, indeed, different information. Microbial populations were divided into majority and minority ones<sup>12,34</sup>. Microbiota and mycobiota of patients with CFPE exhibited a significant decrease in *Haemophilus*, *Neisseria*, and *Cladosporium* genera among majority populations, as well as changes in relative abundances of bacteria significantly associated with a loss in alpha diversity of fungal and bacterial minority populations (Table 2). To evaluate better inter-kingdom equilibrium between the microbial communities, we applied a ratio of fungal to bacterial diversity previously reported in IBD<sup>35</sup>. Fungi-to-bacteria diversity ratios showed a dominance of bacteria on fungus with a median at 0.64 (IQR = [0.43; 4.25]), without any significant disequilibrium between bacterial and fungal loads among patients with and without CFPE. Median of the Basidiomycota/Ascomycota relative abundance ratio was 0.03 (IQR = [0.01; 0.19]).

**Inter-kingdom correlation and network analysis.** We analyzed co-presence or absence patterns between bacteria and fungi, by building a correlation matrix at genus levels of the whole set of NGS data and representing it as a graphical network (Fig. 2, and Fig. 3). We inferred an inter-kingdom network by plotting bacterial genera significantly correlated with at least one fungal genus and vice versa. The network was composed of 26 nodes and 23 edges and it revealed three main clusters organized around *Aspergillus*, *Candida* and *Scedosporium* genera plus three disconnected pairs of microorganisms (Fig. 2). Among these pairs, two contained environmental fungi: *Ramularia* (a phytopathogen) and *Penicillium* connected with the class of Gammaproteobacteria and the phylum of Proteobacteria, respectively. These fungi likely represent environmental transient fungal elements, as previously proposed<sup>12,36,37</sup>. Among the six negatively correlated OTUs identified in our model, *Scedosporium* sp. appeared to display a negative correlation with *Gemella* sp., the latter identified as keystone genus predicting CFPE<sup>4,13</sup>. The other positively correlated OTUs predict interactions between *Aspergillus*, *Candida*, or *Scedosporium* and bacteria belonging to *Capnocytophaga*,

*Parvimonas*, *Streptococcus*, or *Veillonella*. Apart from *Scedosporium* species that were described as belonging to Climax population<sup>31</sup>, our network results preferentially associate fungi to the bacterial population identified during CFPE and referred as Attack population in the ecological Climax/Attack Model (CAM) recently proposed<sup>4,13,31</sup>.

**Assessment of network interactions using in vitro co-cultures.** To document inter-kingdom interactions that we identified in correlation matrix analysis, we performed co-culture experiments between *A. fumigatus* and *Streptococcus mitis* or *Streptococcus oralis*. We selected these microorganisms because of their well-established medical importance in CF (at the species level), high quantity in our cohort associated with a robust positive co-variation (at the genus level), and known conditions for *in vitro* cultures. As predicted, *A. fumigatus* growth appeared to be enhanced by both *S. mitis* and *S. oralis* (Fig. 4). As our experimental method was focused on *A. fumigatus* growth that has a duplication time clearly different from *Streptococcus* sp. (24-48h for *Aspergillus* versus about 1h for *Streptococcus*), it could not inform on bacterial growth.

**Microbiome and mycobiome markers of CF lung dysfunction.** To fully predict the bacterial and fungal communities associated with altered lung function, we applied a feature selection method (bootstrap-enhanced Phy-Lasso) to identify genera relevantly associated with CFPE (Fig. 5a) and/or FEV1 decline (Fig. 5b). In patients' microbiomes *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Candida*, *Fusarium*, *Penicillium*, and *Scedosporium* were selected 150 times out of 200 bootstrap replicates and were negatively associated with the presence of CFPE. *Malassezia* and *Aspergillus* were positively associated with CFPE (Fig. 5a). *Pseudomonas*, *Penicillium*, and *Scedosporium* were negatively associated with FEV1, an increase in their relative abundance being associated with a decrease in FEV1 measure (Fig. 5b). Altogether, these results highlighted the complexity of the microbial community interacting within the CF respiratory tract, and suggested the suitability of developing ecological models such as CAM. Collectively, our findings (inter-kingdom network analysis, in vitro co-culture results, and feature selection based on bootstrap-enhanced Phy-Lasso) pave the way for deciphering the role of fungi in CF lung disease at the ecological level by proposing a new version of the recently-described CAM model<sup>31</sup> (Fig. 6).

## **DISCUSSION:**

CFPEs represent key intermittent events in CF disease that are poorly defined but clearly associated with the decline in lung function and accelerated disease progression. They require



specifically adapted anti-microbial treatments<sup>8–11</sup> but those treatments fail to recover lung function of 25% of patients<sup>38</sup>. Therefore omics approaches represent promising tools to identify and characterize relevant biomarkers able to predict CFPE and to improve therapeutic monitoring<sup>13</sup>. Considering that CF respiratory tract is polymicrobial, i.e. composed of bacteria, viruses and fungi, and since all these microorganisms are able to induce CFPEs, the large data set generated by omics methods should take into account all resident lung microorganisms. Here, we performed a combined analysis of CF airway microbiome and mycobiome, from the microbial diversity to the inter-kingdom network investigation in relation with patient clinical status.

We reported a decrease in alpha diversity of bacteria associated with FEV1 decline and, in agreement with published data<sup>12,14–17,19,20,26,36,37,39–44</sup>. We identified *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Candida*, *Fusarium*, *Penicillium*, and *Scedosporium* as dominant genera (Fig. 1) and numerous shifts in both fungal and bacterial minority populations during CFPE (Table 2). Similarly, Cuthbertson et al.<sup>42</sup> evidenced a greater turnover rate within the rare species compared to the microbial core. Moreover, the simultaneous analysis of mycobiota and microbiota allowed us to appreciate the inter-kingdom interactions. The observed ratios of fungus-to-bacteria diversity were 10 times higher compared to the published digestive ratios<sup>35</sup>, supporting the notion that lung mycobiome is derived from inhaled spores and transient species<sup>12,36,37,45</sup>. Our estimation of the Basidiomycota/Ascomycota relative abundance ratios was lower than digestive ones<sup>35</sup> revealing the excess of Ascomycota, the phylum to which fungal pathogens belong. Together, these results suggest a colonization of airways during CF following an exposure to fungal spores.

Our study design has some notable limitations: (i) First, even though the clinical features of our CF population (Table 1) are congruent with published data<sup>21,26,27,37,39,44</sup>, the limited cohort we analyzed retrospectively was based on samples stored at -20°C, which did not allowed us to realize RNA extraction and meta-transcriptomic analysis. (ii) Secondly, we used sputum samples, which could be contaminated with a buccal flora. However, this sample type is easy to assess, not invasive compared to bronchial alveolar lavage and sufficiently robust in predicting microbiome as previously demonstrated<sup>7,39,46</sup>. (iii) The small sample size (as for the majority of studies about the association between respiratory microbiota or mycobiota and CF<sup>12,26,44,47</sup>) decreased the statistical power to recognize small differences if present. (iv) Finally, the complex structure and the high-dimensional data generated by NGS analysis required specific statistical methods and computational tools that have to be carefully

evaluated. We acknowledge that although correlation does not indicate causation; it can provide a reasonable starting point to assess inter-kingdom network, especially when supported by clinical knowledge about pathogenic species (Fig. 2 and Fig. 5) and experimental *in-vitro* corroboration (Fig. 4). For the first time, the mycobiome aspect of the CAM model recently adapted from the ecology field<sup>4,31</sup> is conjectured from CF fungal data (Fig. 6).

Niche-microbe interaction models have been developed to better interpret the dynamics, composition and role of lung microbial communities<sup>4,7,31,48-50</sup>. These models were focused on bacterial communities and suggested that relative abundances of bacteria were not driven by a neutral model of dispersion in CF<sup>50</sup>. In CF respiratory tract, microbiome assembly is resulting from dynamic selective pressures that are changing with each stage of lung disease. In different layers characterized by local nutrient availability, pH, oxygen pressure, host immune response and antibiotic treatment, a selection of microbiome members occurred and consequently a shift in microbial composition. So far, only CAM model has attempted to formally describe the lung mycobiome<sup>31</sup>.

Even if the role of anaerobes is still matter of debate in terms of community composition, metabolome, and resistome<sup>51,52</sup>, two types of bacterial populations have been highlighted in CAM model. These two populations have distinct metabolic potential defined by carbon source: an Attack transient but virulent population associated with CFPE and a Climax chronic population driving the long-term prognostic<sup>4,7,13,14,32</sup>. While anaerobes have been first affiliated to Climax population<sup>31</sup>, the Attack community appeared to be composed of anaerobes (*Prevotella*, *Parvimonas*, *Veillonella*, *Porphyromonas*, and *Fusobacterium*), facultative anaerobes (*Streptococcus*, *Granulicatella*, and *Rothia*), and the obligatory fermentative (*Gemella*) that have been associated with fermentation pathway producing organics acids and decrease in pH<sup>4,7,13,14,32</sup>. The Climax community is composed of *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, and *Achromobacter* that were strongly associated with ornithine biosynthesis, transport of putrescine, and that were producing ammonia and an increase in pH<sup>4,13</sup>. Taking into account this model<sup>4,7,13,14,32</sup> and our results, data allowed us to make small steps toward achieving a revised version of CAM model in the CF context (Fig. 6), in which the mycobiome role is completed as follow.

The decline in lung function in CF is driven by clinical changes especially by CFPEs, which require active treatment to recover from CFPE and go back to a steady state that may include chronic colonization<sup>4,19,20</sup>. The triggering elements of state shifts are not well known, but it has been proposed that microbiome changes acquired through environmental exposure or

aspiration participate to CFPE occurrence leading to the Attack population ((a) in Fig. 6)<sup>31,53</sup>. Unexpectedly, both *Staphylococcus* and *Pseudomonas* appeared to be negatively correlated with CFPE (Fig. 5). This result may be explained by a CF population composed of adult patients with a rather mild to moderate lung diseases than a severe one (Table 1). Besides being involved into CFPE, a recent interest research has emerged in determining whether *Staphylococcus aureus* can have both damaging and protecting effects for the CF host according to the differences phases in the evolution of the CF airways infection<sup>54</sup>. Our results (Fig. 5b) agree with earlier studies in which colonization with *P. aeruginosa* and methicillin-resistant *S. aureus* was strongly associated with a loss of lung function (a loss of FEV1) in CF<sup>55</sup> while microbiota communities appeared to not differ based on pulmonary exacerbation status of CF patients<sup>39,56</sup>. After CFPE occurred, the perturbed microbial ecosystem will return to its original stable state (Resilience (b) in Fig. 6) or if the perturbation is not controlled, will evolve to a new ecosystem considered as stable but composed of a novel Climax population that differs from the previous community (Adaptation (b') in Fig. 6). According to the CFPE severity, different filters (changes in nutrient sources, level of microorganism growth and virulence, strong host innate immune and inflammatory response, antimicrobial treatment pressure (c) in Fig. 6) will select this new population well adapted to the airway remodeling, in a circular relationship. As microbial community composition and disease progression proceed hand-in-hand, assembly of CF microbiome and mycobiome will result from dynamic events, especially from competitive exclusion or co-occurrence events observed through OTU network and related functional analysis<sup>4,13</sup>. In agreement with the bacterial community partitioned by carbon source<sup>4</sup>, our results suggest fungal species preferentially as Attack members (Fig. 5), which is consistent with clinical and mycological data<sup>28-30</sup>. Among them, *Aspergillus* and *Malassezia* were significantly associated with CFPE (Fig. 5a and Fig. 6). This result is in agreement with the ability of *Aspergillus* to be responsible for ABPA and related exacerbations in CF<sup>28,29</sup>. It goes in the same direction of previous results demonstrating an increased risk of CFPE requiring hospitalization when patients are colonized with *A. fumigatus*<sup>25</sup>. As *Aspergillus* was previously assigned to Climax population<sup>31</sup>, our findings have to be confirmed in a larger CF population. *Malassezia* are lipophilic yeasts, and require specific culture conditions that are not routinely used when a pulmonary exacerbation is monitored. Therefore, *Malassezia* have not been associated with CFPE yet. However, they have been identified as biomarker of chronic inflammatory diseases such as asthma<sup>57</sup>, or inflammatory bowel disease<sup>35</sup>. It may reflect a clear advantage (cross - feeding) that these yeasts get in sharing ecological niche with anaerobes and *Streptococcus*, since they produce

multiple secreted lipases that may help in recycling lipids produced by fermenting bacteria<sup>13,58</sup>. In addition, *Malassezia* -which are part of the normal skin flora- are able to develop at acid pH (skin surface pH is below 5).

On the other side, *Scedosporium* were significantly associated with a decline in FEV1 (Fig 5b), a result congruent with their ability to induce chronic detrimental colonization of CF lung during Climax phases<sup>12,14,15,17,19,20,42,59-63</sup>. As *Pseudomonas* do, *Scedosporium* is able to produce secondary metabolites with antimicrobial activity<sup>64</sup>. It secretes a polyketide boydone A with an anti-staphylococcus activity against methicillin-resistant isolates, which fits well with the course of microbial airway colonization clinically observed in CF. Moreover, the recent whole genome sequencing of *Scedosporium* species (<https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>) revealed a number of genes encoding putative ankyrin motif-containing proteins, methyltransferases and oxidoreductases larger than the one of *A. fumigatus* genome<sup>65</sup>. Whether this larger magnitude of activities allows the mold to use a wider range of nutritive substrates or to be able to synthesize specialized metabolites including ammonia fermentation remains to be elucidated<sup>64-66</sup>, but it may participate in its successful establishment within the respiratory tract of CF patients. Over time, the interchange of these states will lead to the emergence of new Climax communities that are more and more adapted to the airway remodeling, leading to a less diverse community, composed of microorganisms highly resistant to antibiotic or antifungal agents such as *Pseudomonas* or *Scedosporium*.

In summary, microbial interactions are clearly complex in natural communities such as lungs, due to the impact of a multitude of microbes (bacteria, fungi, but also phages and viruses) able to interact<sup>67,68</sup> and to host immune response that appears dual<sup>68,69</sup>. We show that NGS approach combined with inference network and ecological model analysis are useful in helping to decipher physiopathology of CF lung disease, and can be considered as a promising tool for improving our therapeutic protocols. As we clearly improved our knowledge on sequenced genomes of the most frequent molds in CF (<https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/1000fungalgenomes.jsf>), such inter-kingdom analysis should be easily reproduced in a larger cohort, completed to include all significant members of the CF lung microbial community, and extended to analyze the meta-transcriptome and metabolome, in order to confirm or to correct the CAM model efficiency and to define accurate biomarkers of CFPEs. Additional in vitro (cell cultures) and/or in vivo (animal) models are required to support our future findings and to fully understand the complex microbial interactions that drive lung microbial community evolution in CF.

## **MATERIALS AND METHODS:**

**Patients and sputum samples.** Among CF patients enrolled into a 3-year multicenter national prospective study (PHRC number 06/1902, acronym: MucoFong), 37 sputa consecutively collected at hospital centers of Lille (n=19), Dunkerque (n=3), and Grenoble (n=15) were sequenced using NGS. They were alternatively selected from the first 64 sample collection<sup>21</sup> according to CFPE presence or absence, if spirometry, therapeutic, radiological and biological data were collected, and if residual sputum sample was sufficient to perform DNA extraction. The clinical status (pulmonary exacerbation or stable period) of each patient was defined by the physician as follow. Recent changes in clinical parameters and/or modifications of the pulmonary function provide criteria of exacerbation according to European Respiratory Society statement<sup>10</sup>.

Sputa were collected and analyzed according to a standardized protocol previously described<sup>21,70</sup>. DNA extraction was performed as previously described<sup>21</sup>.

**Ethics statement.** MucoFong study was approved by the institutional ethics committees of Lille Hospital (Reference Number: CPP-06/84), and a written informed consent was provided by all participants. All methods were performed in accordance with the relevant guidelines.

**Targeted metagenomic library preparation, sequencing and taxonomic assignation.** V3-V4 and ITS2 regions of bacterial and fungal rDNA were amplified and sequenced as previously described<sup>37,44</sup>. All reactions were prepared in a sterile PCR hood, and negative control reactions were performed and examined by electrophoresis on 1.5% agarose gel. We obtained 429,565 and 443,270 pyrosequences with prokaryotic and eukaryotic loci, respectively. Sequencing data processing was performed using the Metabiote© pipeline where potential chimeras, read with poor quality ( $\leq 20$  quality scores), short read ( $\leq 150$  nucleotides for 16S rRNA gene,  $\leq 100$  nucleotides for ITS2 rRNA gene), homopolymers, singletons, and doubletons were removed before the creation of Operational Taxonomic Unit (OTU). OTUs were created applying complete-linkage clustering with 97% similarity criteria (UClust v1.2.22q); OTUs' annotation was performed using Ribosomal Database Project classifier against Greengenes (v13.8 containing 203,452 16S rRNA sequences) and UNITE (v12.11 containing 97,868 ITS1-ITS2 sequences) databases (Supplementary Table 1). Rarefaction curves were calculated to determine whether deep sequencing was sufficient to accurately characterize the bacterial and fungal community diversity, as previously described<sup>44</sup>.

**Microbial community composition analysis.** Bacterial and fungal data were analyzed at phylum to species levels. Clinical status was assessed using CFPE (patient acutely

exacerbated or stable), S-K score, BMI, and the respiratory capacity measured by FEV1 value. The later was also expressed as categorical by using cut-off values: "mild" (FEV1 >70%), "moderate" (FEV1 between 40-70%) and "severe" ventilatory deficit (FEV1 <40%)<sup>59,71</sup>. Microbial composition was analyzed according to clinical status measured as both continuous and categorical variables.

Alpha diversity was measured through Simpson, Shannon, and Chao1 indexes. Richness and evenness differences between clinical status groups (S-K score, BMI, and FEV1) were tested using Wilcoxon signed-rank test. Since these alpha diversity indexes do not reflect accurately community composition (i.e. two communities could have the same diversity index but different community structures), principal coordinate analysis (PCoA) of beta diversity analysis was performed using Bray-Curtis distance. Structural differences between groups were tested using analysis of dissimilarities (ANOSIM) test. Bacterial and fungal community diversities were analyzed through the *vegan* and *fossil* R packages (v 3.4.3). Their structures were analyzed using *QIIME* (v 1.9.1) software and *vegan* package. To assess inter-kingdom equilibrium between the microbial communities, we computed a fungus-to-bacteria diversity ratio and a Basidiomycota-to-Ascomycota relative abundance ratio<sup>35</sup> that were compared between patient groups using Wilcoxon signed-rank test. Relative abundances of OTUs were compared between groups as follow: for each feature (be OTU, genus, etc.) present in at least 10% of the patients, we first tested the distributional adequacy of the Poisson, the negative binomial and the Gaussian to the normalized non-zero data. Secondly, we considered the model presenting the best fitted distribution and we tested the differences between groups. When none of the three distributions fitted, Wilcoxon signed-rank test was used. Goodness-of-fit tests for discrete distributions were implemented through the *vcd* package (v 1.4.4). The Shapiro-Wilk test was used to test for normality as well as graphical check. Bioconductor packages *DESeq2* (v 1.22.1) and *edgeR* (v 3.16.1) implemented differential analysis for the model with discrete distributions, while *metagenomeSeq* package (v 1.18.0) implemented differential analysis for the zero inflated Gaussian model<sup>72</sup>. Finally, each sample was divided into majority and minority populations (abundant population referring to an OTU relative abundance greater than or equal to 1%, and minority population as having a relative abundance of less than 1 %), since their contribution may differ<sup>12,34</sup>. According to Carmody et al.<sup>15</sup>, we defined a dominant OTU as the most abundant OTU having a relative abundance higher or equal than twice the relative abundance of the second most abundant OTU for each sputum sample. We compared both abundant and minority populations as well as dominant OTUs between clinical status groups.

**Inter-kingdom network analysis.** To assess the relationships among microorganisms and to determine their underlying physio-pathological senses, joint analysis of fungal and bacterial relative abundance data was performed by estimating their correlation matrix.

According to Gevers et al.<sup>73</sup>, to test the correlation while accounting for the compositional nature of data (i.e. proportions that sum to 1), the permutation-renormalization bootstrap method (ReBoot) was used. We built both the null distribution of correlations from renormalized permuted data which represents the correlation structure arising purely from the compositionality, and the distribution of correlations from bootstrap sampled data referring to the confidence interval of the observed correlation. The compositional null distribution and the bootstrap distribution were compared by Z-test with the variance pooled from both distributions. The ccrepe Bioconductor package (v 1.10.0) implemented this ReBoot method, and was used here; it also allows applying network analysis up from 20 samples. The significance of association between features was based on the Spearman correlation as similarity measure (at the 0.05 level). We generated 1,000 bootstrap replicates.

**In vitro co-cultures.** *A. fumigatus* strain CBS144.89, and two clinical strains of *S. oralis* and *S. mitis* isolated from two CF patients and kindly provided by Pr. Lehours (Bacteriology Department, Bordeaux hospital) were used for in vitro experiments. These two Streptococcus isolates were selected according to their prevalence in CF upper airways and their role in CF inflammation and disease<sup>74-77</sup>. Co-cultures (10 million bacterial cells plus 1 million *Aspergillus* conidia) were conducted in brain-heart infusion (BHI) medium, with moderate shaking, at 37°C, under aerobic conditions as recently described<sup>1</sup>. Growth of *A. fumigatus* alone or in co-culture with *S. oralis* or *S. mitis* was measured every 24 hours for five consecutive days. At each time point, a diluted aliquot of microbial BHI-mixture was plated on chocolate agar; fungal colony forming units (CFUs) were counted after a 24-h incubation period. The experiment was done in triplicate.

**Identification of taxonomic traits independently associated with the clinical outcomes.** Among a high number of OTUs (greater than the number of patient that we assimilated to a high-dimensional dataset), we determined which ones were significantly associated with clinical status by applying Least Absolute Shrinkage and Selection Operator (Lasso) regression<sup>78</sup>, after adjusting for the contribution of the other OTUs. Lasso linear or logistic regression models were used when the clinical status was measured, respectively, as a continuous (by FEV1) or binary (by CFPE) variable. In Lasso regression, a penalty on absolute coefficient size is added to the usual loss functions used for regression problems (mean squared error in the linear model and negative logistic log likelihood in the logistic

model). In one hand, the introduction of a penalty often improves the prediction accuracy due to the bias-variance trade-off. On the other hand, if the amount of penalty is sufficiently large, some coefficients are shrunk to exact zero, thus estimation and OTU selection are simultaneously achieved. The Lasso technique has been adapted to hierarchical data. Rush et al.<sup>3</sup> recently proposed a Phy-Lasso method that incorporates the phylogenetic tree structure characteristic of microbiome OTUs. This Phy-Lasso method applied a hierarchical model for each taxonomic level; the corresponding code being available from the author<sup>79</sup>. We added Phy-Lasso linear regression to the toolbox, and estimated the optimal amount of penalty from the data as follow. Because of the small sample size of the present study, we used leave-one-out cross-validation (LOO-CV) in which the model is fitted for n-1 patients and the predicted clinical status for the left-out patient is compared with his/her actual clinical status. This procedure is repeated n times, and the average agreement of the predicted and observed clinical status computed. Among values varying between high and low amounts of penalties, the good amount of penalty is chosen such that the predicted error is minimized. In linear regression (such as FEV1), we considered the predicted quadratic error. In logistic regression (such as CFPE), we considered the predicted classification error determined from a cutoff probability of 0.5. While the Lasso has excellent properties in dimensional reduction and estimation, it over-selects OTUs to reduce the prediction errors when a cross-validation method is used. To address this point, we applied the bootstrap-enhanced Lasso (Bolasso, based on intersecting bootstrapped Lasso estimations<sup>80</sup>), given its appealing asymptotic consistency properties and its simple implementation. In Bolasso, only OTUs frequently chosen by Phy-Lasso over bootstrap samples are selected, which improve results stability. We generated 200 bootstrap replicates. The frequency thresh-old of Bolasso was specified to be conservative (70%), to not miss any OTU associated with clinical status. PhyLasso associated function as well as all the codes used in this study are available at: <https://github.com/psBiostat/MucoFong-study.git>, and summarized in the supplementary Table 2.

**Revision of the Climax-Attack Model (CAM) previously proposed in CF<sup>31</sup>.** Based on our results of inter-kingdom network analysis, in vitro co-cultures and feature selection based on bootstrap-enhanced Phy-Lasso, we proposed a CAM version enriched with the present mycobiome data (Fig. 6). In this new CAM version, we confirmed affiliations of bacteria previously proposed and documented<sup>4,7,13,14,31,32</sup>. Regarding mycobiome, we confirmed the previous *Scedosporium* genus assignation to Climax population, as it was negatively associated with both CFPE and elevated value of FEV1 (see feature selection in Fig. 5), and



as it displays a negative correlation with *Gemella* (Fig. 2), which was a bacterial genus identified as keystone to predict CFPE<sup>4,13</sup>. Based on feature selection (Fig. 5), we proposed the same affiliation for *Penicillium*.

As *Malassezia* and *Aspergillus* are associated with CFPE (Fig. 5a), we proposed to affiliate these genera to the Attack population, which fit well with the positive network interaction (Fig. 2), and the co-cultures results between *Aspergillus* and *Streptococcus* (Fig. 4).

#### **REFERENCES:**

1. Tipton, L. *et al.* Fungi stabilize connectivity in the lung and skin microbial ecosystems. *Microbiome* **6**, 12 (2018).
2. O'Brien, S. & Fothergill, J. L. The role of multispecies social interactions in shaping *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity in the cystic fibrosis lung. *FEMS Microbiol. Lett.* **364**, (2017).
3. Rush, S. T., Lee, C. H., Mio, W. & Kim, P. T. The Phylogenetic LASSO and the Microbiome. *ArXiv160708877 Q-Bio Stat* (2016).
4. Quinn, R. A. *et al.* Ecological networking of cystic fibrosis lung infections. *NPJ Biofilms Microbiomes* **2**, 4 (2016).
5. Kurtz, Z. D. *et al.* Sparse and compositionally robust inference of microbial ecological networks. *PLoS Comput. Biol.* **11**, e1004226 (2015).
6. Berry, D. & Widder, S. Deciphering microbial interactions and detecting keystone species with co-occurrence networks. *Front. Microbiol.* **5**, 219 (2014).
7. Whiteson, K. L. *et al.* The upper respiratory tract as a microbial source for pulmonary infections in cystic fibrosis. Parallels from island biogeography. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 1309–1315 (2014).
8. Bhatt, J. M. Treatment of pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Eur. Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir. Soc.* **22**, 205–216 (2013).
9. Stenbit, A. E. & Flume, P. A. Pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **17**, 442–447 (2011).
10. Bilton, D. *et al.* Pulmonary exacerbation: towards a definition for use in clinical trials. Report from the EuroCareCF Working Group on outcome parameters in clinical trials. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **10 Suppl 2**, S79-81 (2011).
11. Goss, C. H. & Burns, J. L. Exacerbations in cystic fibrosis. 1: Epidemiology and pathogenesis. *Thorax* **62**, 360–367 (2007).

12. Nguyen, L. D. N. *et al.* Effects of Propidium Monoazide (PMA) Treatment on Mycobiome and Bacteriome Analysis of Cystic Fibrosis Airways during Exacerbation. *PloS One* **11**, e0168860 (2016).
13. Quinn, R. A. *et al.* Metabolomics of pulmonary exacerbations reveals the personalized nature of cystic fibrosis disease. *PeerJ* **4**, e2174 (2016).
14. Quinn, R. A. *et al.* A Winogradsky-based culture system shows an association between microbial fermentation and cystic fibrosis exacerbation. *ISME J.* **9**, 1024–1038 (2015).
15. Carmody, L. A. *et al.* Changes in cystic fibrosis airway microbiota at pulmonary exacerbation. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **10**, 179–187 (2013).
16. Tunney, M. M. *et al.* Lung microbiota and bacterial abundance in patients with bronchiectasis when clinically stable and during exacerbation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **187**, 1118–1126 (2013).
17. Zemanick, E. T. *et al.* Inflammation and airway microbiota during cystic fibrosis pulmonary exacerbations. *PloS One* **8**, e62917 (2013).
18. Filkins, L. M. *et al.* Prevalence of streptococci and increased polymicrobial diversity associated with cystic fibrosis patient stability. *J. Bacteriol.* **194**, 4709–4717 (2012).
19. Fodor, A. A. *et al.* The adult cystic fibrosis airway microbiota is stable over time and infection type, and highly resilient to antibiotic treatment of exacerbations. *PloS One* **7**, e45001 (2012).
20. Zhao, J. *et al.* Decade-long bacterial community dynamics in cystic fibrosis airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 5809–5814 (2012).
21. Goffard, A. *et al.* Virus and cystic fibrosis: rhinoviruses are associated with exacerbations in adult patients. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **60**, 147–153 (2014).
22. Willner, D. *et al.* Case studies of the spatial heterogeneity of DNA viruses in the cystic fibrosis lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **46**, 127–131 (2012).
23. Lysholm, F. *et al.* Characterization of the viral microbiome in patients with severe lower respiratory tract infections, using metagenomic sequencing. *PloS One* **7**, e30875 (2012).
24. Chotirmall, S. H. *et al.* Sputum *Candida albicans* presages FEV<sub>1</sub> decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis. *Chest* **138**, 1186–1195 (2010).
25. Amin, R., Dupuis, A., Aaron, S. D. & Ratjen, F. The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest* **137**, 171–176 (2010).
26. Willger, S. D. *et al.* Characterization and quantification of the fungal microbiome in serial samples from individuals with cystic fibrosis. *Microbiome* **2**, 40 (2014).

27. Delhaes, L. *et al.* Prevalence, geographic risk factor, and development of a standardized protocol for fungal isolation in cystic fibrosis: Results from the international prospective study 'MFIP'. *J. Cyst. Fibros.* **18**, 212-220 (2018).
28. Armstead, J., Morris, J. & Denning, D. W. Multi-country estimate of different manifestations of aspergillosis in cystic fibrosis. *PLoS One* **9**, e98502 (2014).
29. Middleton, P. G., Chen, S. C.-A. & Meyer, W. Fungal infections and treatment in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **19**, 670–675 (2013).
30. Speirs, J. J., van der Ent, C. K. & Beekman, J. M. Effects of *Aspergillus fumigatus* colonization on lung function in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **18**, 632–638 (2012).
31. Conrad, D. *et al.* Cystic fibrosis therapy: a community ecology perspective. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **48**, 150–156 (2013).
32. Lim, Y. W. *et al.* Clinical insights from metagenomic analysis of sputum samples from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 425–437 (2014).
33. Stevens, D. A. *et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **37 Suppl 3**, S225-264 (2003).
34. Galand, P. E., Casamayor, E. O., Kirchman, D. L. & Lovejoy, C. Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 22427–22432 (2009).
35. Sokol, H. *et al.* Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* **66**, 1039–1048 (2017).
36. Kramer, R. *et al.* Cohort Study of Airway Mycobiome in Adult Cystic Fibrosis Patients: Differences in Community Structure between Fungi and Bacteria Reveal Predominance of Transient Fungal Elements. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 2900–2907 (2015).
37. Delhaes, L. *et al.* The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community--implications for therapeutic management. *PLoS One* **7**, e36313 (2012).
38. Sanders, D. B. *et al.* Failure to recover to baseline pulmonary function after cystic fibrosis pulmonary exacerbation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 627–632 (2010).
39. Heirali, A. A. *et al.* The effects of inhaled aztreonam on the cystic fibrosis lung microbiome. *Microbiome* **5**, 51 (2017).
40. Bacci, G. *et al.* Pyrosequencing Unveils Cystic Fibrosis Lung Microbiome Differences Associated with a Severe Lung Function Decline. *PLoS One* **11**, e0156807 (2016).

41. Hogan, D. A. *et al.* Analysis of Lung Microbiota in Bronchoalveolar Lavage, Protected Brush and Sputum Samples from Subjects with Mild-To-Moderate Cystic Fibrosis Lung Disease. *PLoS One* **11**, e0149998 (2016).
42. Cuthbertson, L. *et al.* Respiratory microbiota resistance and resilience to pulmonary exacerbation and subsequent antimicrobial intervention. *ISME J.* **10**, 1081–1091 (2016).
43. Bos, L. D. J., Meinardi, S., Blake, D. & Whiteson, K. Bacteria in the airways of patients with cystic fibrosis are genetically capable of producing VOCs in breath. *J. Breath Res.* **10**, 047103 (2016).
44. Botterel, F. *et al.* Fungal and Bacterial Diversity of Airway Microbiota in Adults with Cystic Fibrosis: Concordance Between Conventional Methods and Ultra-Deep Sequencing, and Their Practical use in the Clinical Laboratory. *Mycopathologia* **183**, 171–183 (2018).
45. Richardson, M., Bowyer, P. & Sabino, R. The human lung and *Aspergillus*: You are what you breathe in? *Med. Mycol.* **57**, S145–S154 (2019).
46. Feigelman, R. *et al.* Sputum DNA sequencing in cystic fibrosis: non-invasive access to the lung microbiome and to pathogen details. *Microbiome* **5**, 20 (2017).
47. Kim, S. H. *et al.* Global Analysis of the Fungal Microbiome in Cystic Fibrosis Patients Reveals Loss of Function of the Transcriptional Repressor Nrg1 as a Mechanism of Pathogen Adaptation. *PLoS Pathog.* **11**, e1005308 (2015).
48. Boutin, S. & Dalpke, A. H. Acquisition and adaptation of the airway microbiota in the early life of cystic fibrosis patients. *Mol. Cell. Pediatr.* **4**, 1 (2017).
49. Dickson, R. P. *et al.* Spatial Variation in the Healthy Human Lung Microbiome and the Adapted Island Model of Lung Biogeography. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **12**, 821–830 (2015).
50. Venkataraman, A. *et al.* Application of a neutral community model to assess structuring of the human lung microbiome. *mBio* **6**, (2015).
51. Lamoureux, C., Guilloux, C.-A., Beauruelle, C., Jolivet-Gougeon, A. & Héry-Arnaud, G. Anaerobes in cystic fibrosis patients' airways. *Crit. Rev. Microbiol.* 1–15 (2019). doi:10.1080/1040841X.2018.1549019
52. Caverly, L. J. & LiPuma, J. J. Good cop, bad cop: anaerobes in cystic fibrosis airways. *Eur. Respir. J.* **52**, (2018).
53. Rogers, G. B., Hoffman, L. R., Carroll, M. P. & Bruce, K. D. Interpreting infective microbiota: the importance of an ecological perspective. *Trends Microbiol.* **21**, 271–276 (2013).

54. Hurley, M. N. & Smyth, A. R. Staphylococcus aureus in cystic fibrosis: pivotal role or bit part actor? *Curr. Opin. Pulm. Med.* **24**, 586–591 (2018).
55. Hector, A. *et al.* Microbial colonization and lung function in adolescents with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **15**, 340–349 (2016).
56. Zemanick, E. T. *et al.* Airway microbiota across age and disease spectrum in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* **50**, (2017).
57. van Woerden, H. C. *et al.* Differences in fungi present in induced sputum samples from asthma patients and non-atopic controls: a community based case control study. *BMC Infect. Dis.* **13**, 69 (2013).
58. Guillot, J., Hadina, S. & Guého, E. The genus *Malassezia*: old facts and new concepts. *Parassitologia* **50**, 77–79 (2008).
59. Kerem, E. *et al.* Factors associated with FEV1 decline in cystic fibrosis: analysis of the ECFS patient registry. *Eur. Respir. J.* **43**, 125–133 (2014).
60. Pages-Monteiro, L. *et al.* Strong incidence of *Pseudomonas aeruginosa* on bacterial rrs and ITS genetic structures of cystic fibrosis sputa. *PloS One* **12**, e0173022 (2017).
61. Whelan, F. J. *et al.* Longitudinal sampling of the lung microbiota in individuals with cystic fibrosis. *PloS One* **12**, e0172811 (2017).
62. Somayaji, R. *et al.* Long-term clinical outcomes of ‘Prairie Epidemic Strain’ *Pseudomonas aeruginosa* infection in adults with cystic fibrosis. *Thorax* **72**, 333–339 (2017).
63. Russell, G. K., Gadhok, R. & Simmonds, N. J. The destructive combination of *Scediosporium apiospermum* lung disease and exuberant inflammation in cystic fibrosis. *Paediatr. Respir. Rev.* **14 Suppl 1**, 22–25 (2013).
64. Staerck, C. *et al.* The secreted polyketide boydone A is responsible for the anti-Staphylococcus aureus activity of *Scediosporium boydii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **364**, (2017).
65. Vandeputte, P. *et al.* Draft Genome Sequence of the Pathogenic Fungus *Scediosporium apiospermum*. *Genome Announc.* **2**, (2014).
66. Han, Z., Kautto, L. & Nevalainen, H. Secretion of Proteases by an Opportunistic Fungal Pathogen *Scediosporium aurantiacum*. *PloS One* **12**, e0169403 (2017).
67. Krüger, W., Vielreicher, S., Kapitan, M., Jacobsen, I. D. & Niemiec, M. J. Fungal-Bacterial Interactions in Health and Disease. *Pathog. Basel Switz.* **8**, (2019).
68. Budden, K. F. *et al.* Functional effects of the microbiota in chronic respiratory disease. *Lancet Respir. Med.* (2019). doi:10.1016/S2213-2600(18)30510-1

69. Chiu, L. *et al.* Protective Microbiota: From Localized to Long-Reaching Co-Immunity. *Front. Immunol.* **8**, 1678 (2017).
70. Coron, N. *et al.* Toward the Standardization of Mycological Examination of Sputum Samples in Cystic Fibrosis: Results from a French Multicenter Prospective Study. *Mycopathologia* **183**, 101–117 (2018).
71. Abbott, J. *et al.* What defines a pulmonary exacerbation? The perceptions of adults with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **8**, 356–359 (2009).
72. Paulson, J. N., Stine, O. C., Bravo, H. C. & Pop, M. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nat. Methods* **10**, 1200–1202 (2013).
73. Gevers, D. *et al.* The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn’s disease. *Cell Host Microbe* **15**, 382–392 (2014).
74. Enaud, R. *et al.* Intestinal Inflammation in Children with Cystic Fibrosis Is Associated with Crohn’s-Like Microbiota Disturbances. *J. Clin. Med.* **8**, (2019).
75. Prevaes, S. M. P. J. *et al.* Development of the Nasopharyngeal Microbiota in Infants with Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **193**, 504–515 (2016).
76. Bernarde, C. *et al.* Impact of the CFTR-potentiator ivacaftor on airway microbiota in cystic fibrosis patients carrying a G551D mutation. *PloS One* **10**, e0124124 (2015).
77. Maeda, Y. *et al.* Population structure and characterization of viridans group streptococci (VGS) including *Streptococcus pneumoniae* isolated from adult patients with cystic fibrosis (CF). *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **10**, 133–139 (2011).
78. Tibshirani, R. The lasso method for variable selection in the Cox model. *Stat. Med.* **16**, 385–395 (1997).
79. Rush, S. T. A. The Phylogenetic LASSO and the Microbiome: Metagenomic Modeling in Fecal Microbiota Transplantation. 112
80. Bach, F. R. Bolasso: model consistent Lasso estimation through the bootstrap. in *Proceedings of the 25th international conference on Machine learning - ICML '08* 33–40 (ACM Press, 2008). doi:10.1145/1390156.1390161

**THE MUCOFONG INVESTIGATION GROUP:** Magali Chabe<sup>10</sup>, Christophe Audebert<sup>11</sup>, Isabelle Durand-Joly<sup>12</sup>, Amale Boldron<sup>12</sup>, Isabelle Pin<sup>13</sup>, Odile Cognet<sup>13</sup>, Herve Pelloux<sup>13</sup>, Anne Prevotat<sup>14</sup>, Benoit Wallaert<sup>14</sup>, Nathalie Wizla<sup>14</sup>, Caroline Thumerelle<sup>14</sup>, and Dominique Turck<sup>14</sup>.

Consortia Addresses: <sup>10</sup>Lille University, Lille, France; <sup>11</sup>Pegase consortium, Lille, France; <sup>12</sup>Dunkerque Hospital, Dunkerque, France; <sup>13</sup>Grenoble Hospital and University, Grenoble, France; <sup>14</sup>Lille Hospital and University, Lille, France.

**ACKNOWLEDGEMENTS:** Laurence Delhaes has received a research grant from “Vaincre La Mucoviscidose” (RF20160501626); she is member of ESGHAMI and NGS-MycA working groups of ESCMID and ECCM respectively. Genoscreen Company provided support in the form of Louise-Eva Vandendorgh’s salary (AST CT 2016-394). All the funders had no role in article design, decision to publish, or preparation of the manuscript. **The authors would like to thank Katarzyna Hooks (postdoctoral researcher at University of Bordeaux) for having edited the English language of the text, and Binbin Xu (postdoctoral researcher at Inserm BPH U1219) for his help on testing the R and Fortran codes.**

**COMPETING INTERESTS:** Pr L. Delhaes is member of the scientific advisory board of “Vaincre la Mucoviscidose”, and of the executive committee of ESGHAMI (ESCMID working group). She also did punctual consulting for pharmaceutical companies (Pfizer, Gilead, and MSD) and was invited to participate to scientific congresses as compensations. The other authors declare no potential conflict of interest.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS:** Mucofong Investigation group, MF, LEV, and LD collected sputum samples and clinical data. LEV, NC, RE and LD participated to microbial analysis including NGS. PS, LEV, and LD realized the data analysis and figures/tables conception. PS, LEV, FF, MA, and RT performed the statistical analyses including that of NGS. RT and LD contributed to study design. PS, LEV, and LD wrote the manuscript with significant contributions of other co-authors, especially NC, RE, MA, TS, PB, and RT. All authors read and gave approval on the final manuscript.

### **FIGURE LEGENDS**

**Fig. 1** Diversity and taxonomy summaries of sputa collected from CF patients with a mild (●), moderate (●) and severe (●) alteration of the lung function measured by FEV1.

Dataset from each sputum sample contained an average of 7,909 bacterial reads (ranging from 5,104 to 14,749), and an average of 9,811 fungal reads (ranging from 2,933 to 15,599). Alpha diversity indexes of the bacterial microbiome (a) but not of mycobiome (a’) were positively correlated with FEV1 values. When patients were divided into 3 groups according to FEV1

values<sup>59,71</sup>, bi-dimensional PCoA representations (b and b') based on Bray-Curtis similarity matrix did not show clustering between groups. However, we observed a high proportion (62% and 66%) of Pseudomonadaceae (mainly composed of *Pseudomonas* species) among patients exhibiting a moderate and severe disease, while it represents only 32% of the bacterial composition among patients with a mild ventilatory deficit (c). The fungal composition exhibited also some shifts, especially a decrease in OTUs belonging to Malasseziales in samples from patients with severe lung decline (c'). Taxonomy composition were represented at family level of bacterial (c) and fungal (c') microbiotas; fungal reads that were not identified as family levels are grouped at order or phylum levels.

**Fig. 2** Co-occurrence network between bacteria and fungi from the ReBoot method.

Bacteria and fungi are represented by blue and green circles, respectively. The large circles refer to recognized dominant CF pathogens. Gray lines connecting circles represent strong positive correlation, while red lines represent strong negatively correlation. A negative correlation between a bacteria genus and a fungus genus refers to an increase of bacteria genus abundance and a decrease of fungus genus abundance; a positive correlation to an increase of bacteria genus abundance and an increase of fungus genus abundance.

**Fig. 3** Inter-kingdom correlation from the ReBoot method.

Statistical significance was determined for all pairwise comparisons; only significant correlations ( $p < 0.05$ ) are displayed. Warm colors (red to yellow squares) indicate positive correlations, and cool colors (dark blue to light blue squares) indicate negative correlations.

**Fig. 4** Growth curves for in vitro co-cultures of *A. fumigatus* with *S. mitis*, or *S. oralis* compared to culture of *A. fumigatus* alone.

*A. fumigatus* growth (-●-) expressed in CFU/mL is significantly enhanced by *S. mitis* at day 4 ( $p < 0.05$ ) and day 5 ( $p < 0.01$ ). Growth of *A. fumigatus* plus *S. mitis* (-■-) is significantly higher than growth of *A. fumigatus* plus *S. oralis* (-▲-) at day 5 ( $p < 0.05$ ). Growth of *A. fumigatus* was not significantly enhanced by *S. oralis* excepted at day 2 ( $p < 0.05$ ).

**Fig. 5** OTUs relevantly associated with CFPE (a) and FEV1 (b) by bootstrap-enhanced Phy-Lasso.

Only genera of bacteria (in green) and of fungi (in blue) selected with a frequency  $\geq 15\%$  are represented. Bars are represented at left when the genus was negatively associated, and at right when the genus was positively associated with CFPE or FEV1. We considered OTU consistently associated to clinical features when its selection frequency was greater than 70% (red lines).



**Fig. 6** Adaptation of Climax/Attack model (CAM) in CF as inferred from previous studies and our study<sup>4,7,13,14,31,32</sup>.

According to CAM, two different microbial populations are evolved dynamically in CF lungs, both being potentially composed of anaerobes<sup>4,7,13,14,31,32</sup>. Microbiome changes acquired through environmental exposure or salivary aspiration (a) seem to participate to CFPE occurrence leading to an Attack population. The microbial community will return to its original state (Resilience in (b)) or move to a new community considered as stable but composed of a new Climax population with a different microbial community (Adaptation in (b)), according to perturbation forces of the Attack population and its ability to pass through selection filters (c). Selection filters (c) refer to layers that influence evolution of the microbial structure: changes in nutrient, sources-oxygen pressure, pH, level of microorganism growth and virulence, host immune and inflammatory response, antimicrobial treatment pressure. They participate in selecting the population the most adapted to the new airway remodeling, in a circular relationship. According to a microbial community partitioned by carbon source, the Climax population uses amino acids and produces ammonia, while Attack population uses sugar fermentation and produces acid. In this context, *Malassezia* yeasts which use lipids as carbon sources are unable to ferment sugar, and may have some advantages (cross-feeding) to share ecological niche with anaerobes and *Streptococcus*. *Streptococcus* are responsible for sugar fermentation producing amino acid. By the same time, fermentation is decreasing pH that is favorable for expansion of anaerobes which contribute to produce fermentative compounds. Furthermore, *Malassezia* are able to develop at acid pH. On the other side, *Scedosporium* are associated with decline of FEV1, which fit well with a role into an advanced Climax population in agreement with their ability to use a wider range of nutritive substrates, to synthesize specialized metabolites including ammonia fermentation, and their high resistance to antifungal drugs. Genera in black refer to our bootstrap-enhanced Phy-Lasso analysis, and genera in grey to previous CAM studies.

**TABLES:****Table 1.** Patients' characteristics at inclusion.

Characteristics of patients	Exacerbated N=17	IQR*	Stable N=16	IQR	p-value
<b>Demographic data</b>					
Median Age in years	23	22-30	35	29-36	<.01
Ratio Male/Femme	1.5		1.6		NS**
<b>Clinical data</b>					
Median Sweat chloride test (mmol/L)	129 (n=8)***	126-138	109	86-130	0.17
Median S-K Score	75 (n=16)	53-81	73 (n=14)	65-80	0.50
Median BMI (Kg/m2)	19.9 (n=16)	18.2-19.7	19.8 (n=15)	18.2-20.3	0.61
Median FEV1 (%)	49	41-58	55	41-60	0.72
FEV1 percentage predicted value					
Mild FEV1 (> 70%)	9		4		NS
Moderate FEV1 (40-70%)	4		8		NS
Severe FEV1 (< 40%)	4		4		NS
CTFR mutations ( $\Delta$ F508 homozygous)	7 (n=16)		2 (n=15)		NS
<b>Microbiological data</b>					
Positive bacterial sputum cultures for:					
Methicillin-sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>	4 (n=16)		2 (n=14)		NS
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1		1		NS
<i>P. aeruginosa</i> non-mucoid strain	7		5		NS
<i>P. aeruginosa</i> mucoide strain	8		9		NS
Positive mycological sputum cultures for:					
<i>C. albicans</i>	12 (n=16)		10 (n=14)		NS
Non-albicans <i>Candida</i>	2		4		NS
<i>A. fumigatus</i>	12		10		NS
<i>Scedosporium sp.</i>	1		1		NS
<i>Penicillium sp.</i>	1		6		NS
<b>Therapeutic data</b>					
Treated with:					
Nebulized recombinant human DNase (rhDNase)	17		16		NS
Azithromycin (sub-therapeutic dosage)	15		8		NS
Inhaled steroids (continuous)	17		16		NS
Systemic corticoids (continuous or as bolus)	8		3		NS
Intermittent antimicrobial agent exposure****					
Oral antibiotics					
0, 1 to 3 regimens	14		15		NS
> 3 regimens	0		1		NS
Continuous	3		0		NS
Oral anti-fungal treatment	1		0		NS

\*Values are indicated in median values (and interquartile range) for continuous data and number of patients for categorical data; \*\*NS: No significant difference; \*\*\* If missing values are present, the effective numbers of patients are shown in parentheses; \*\*\*\* Trimethoprim-sulfamethoxazole not included.

**Table 2.** Alpha diversity and abundance differences of total, minority and majority microbial populations among patients without and with CFPE.

Patients	Total Population			Minority Population			Majority Population		
	Without CFPE	With CFPE	p-value	Without CFPE	With CFPE	p-value	Without CFPE	With CFPE	p-value
Alpha diversity (score)									
Bacterial composition:									
Shannon index	0.7 [0.2;1.4]	0.4 [0.3;1.5]	NS	2.2 [2.1;2.4]	2.2 [1.8;2.4]	NS	0.6 [0.2;0.8]	0.4 [0.2;1.0]	NS
Simpson index	0.3 [0.1; 0.5]	0.2 [0.1;0.6]	NS	0.8 [0.8;0.9]	0.8 [0.8;0.9]	NS	0.3 [0.1;0.4]	0.1 [0.1;0.5]	NS
Chao1 index	27.0 [21.0;36.3]	23.0 [20.0;30.5]	NS	19.5 [13.0;28.5]	16 [14.5;23.0]	NS	7.5 [7.0;8.0]	6.0 [6.0;7.5]	NS
Fungal composition									
Shannon index	1.5 [1.1;1.9]	1.4 [1.2;1.7]	NS	1.5 [1.4;1.7]	1.0 [0.8;1.5]	*	1.2 [1.1 ;1.5]	1.1 [0.9 ;1.4]	NS
Simpson index	0.7 [0.5;0.8]	0.6 [0.5;0.8]	NS	0.7 [0.6;0.8]	0.5 [0.4 ;0.7]	*	0.6 [0.5 ;0.7]	0.5 [0.5 ;0.7]	NS
Chao1 index	23.5 [20.0;28;3]	20.0 [17.5;24.0]	NS	12.0 [8.8;16.5]	10.0 [9.0 ;14.0]	NS	11.0 [10.0 ;12.0]	9.0 [7.0 ;11.0]	**
Relative abundance (%)									
Bacteria									
<i>Haemophilus</i>	0.8 [0.3;7.2]	0.0 [0.0;0.5]	**	-	-	-	0.0 [0.3;7.4]	0.0 [0.0;0.6]	**
<i>Neisseria</i>	0.1[0.0;0.8]	0.0 [0.0;0.0]	*	-	-	-	0.1 [0.0;0.8]	0.0 [0.0;0.0]	*
<i>Scardovia</i>	0.0 [0.0;0.0]	0.0 [0.0;0.1]	*	0.0 [0.0;0.0]	0.1 [0.0;3.5]	*	-	-	-
<i>Megasphaera</i>	0.0 [0.0;0.1]	0.0 [0.0;0.0]	**	0.0 [0.0;0.5]	0.0 [0.0;0.2]	*	-	-	-
<i>Kingella</i>	0.0 [0.0;0.0]	0.0 [0.0;0.0]	**	0.0 [0.0;0.2]	0.0 [0.0;0.0]	**	-	-	-
<i>Leptotriectia</i>	0.1 [0.0;0.2]	0.0 [0.0;0.2]	NS	3.2 [1.7;5.9]	0.8 [0.0;2.5]	*	-	-	-
<i>Clostridia</i>	0.1 [0.0;0.1]	0.0 [0.0;0.0]	**	0.0 [0.0;0.6]	0.0 [0.0;0.0]	*	-	-	-
<i>TM7</i>	0.1 [0.0;0.1]	0.0 [0.0;0.1]	**	1.2 [0.1;3.0]	0.0 [0.0;0.8]	*	-	-	-
Fungus									
<i>Cladosporium</i>	0.0 [0.0;0.7]	0.0 [0.0;0.0]	**	-	-	-	0.0 [0.0;0.8]	0.0 [0.0;0.0]	**

(NS p ≥ 0.10, \*p <0 .05, \*\*p <0 .01)

Figure 1.

● Mild (> 60%) ● Moderate ([40%-60%]) ● Severe (<40%)

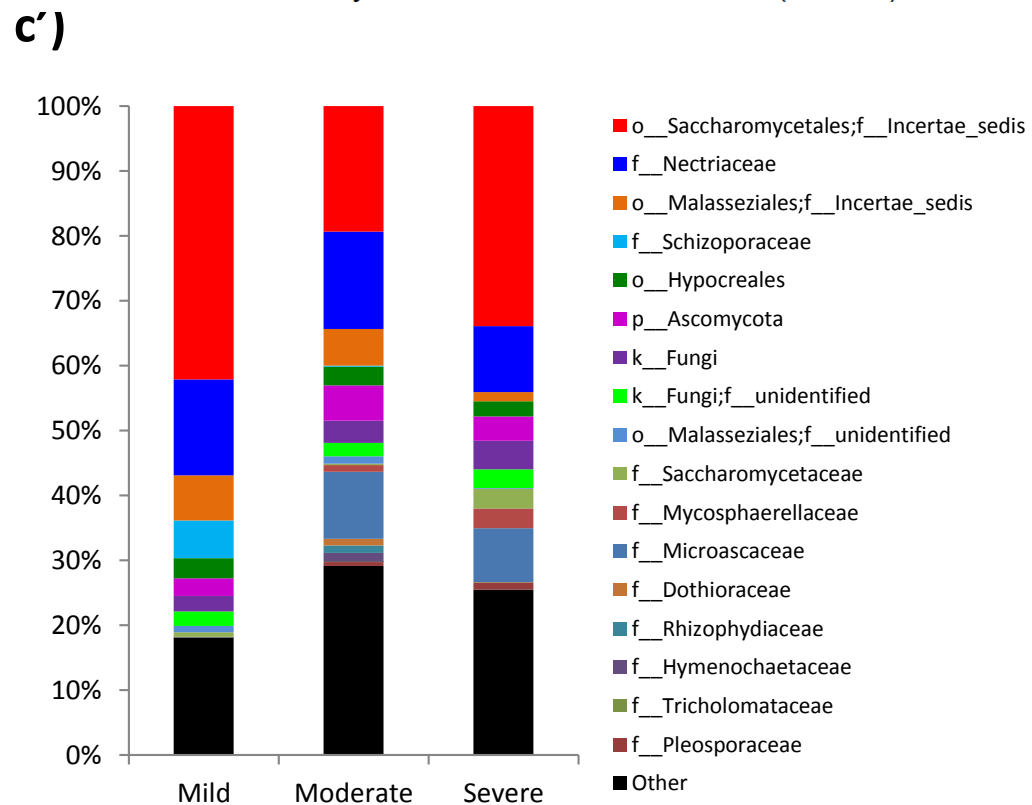
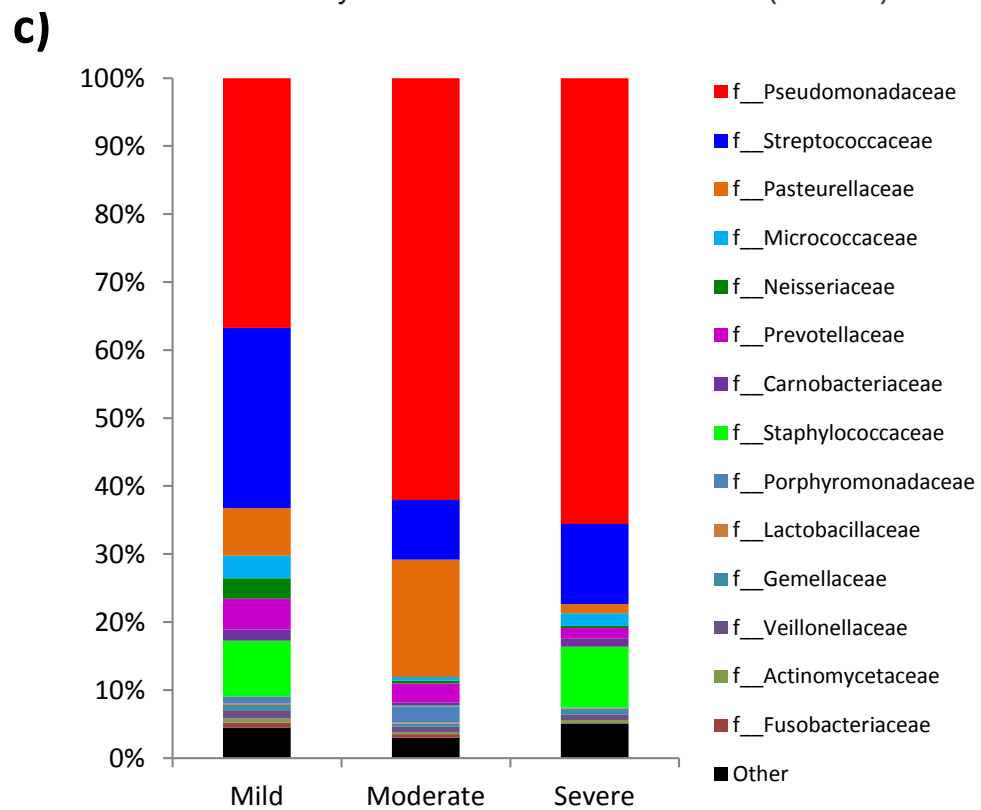
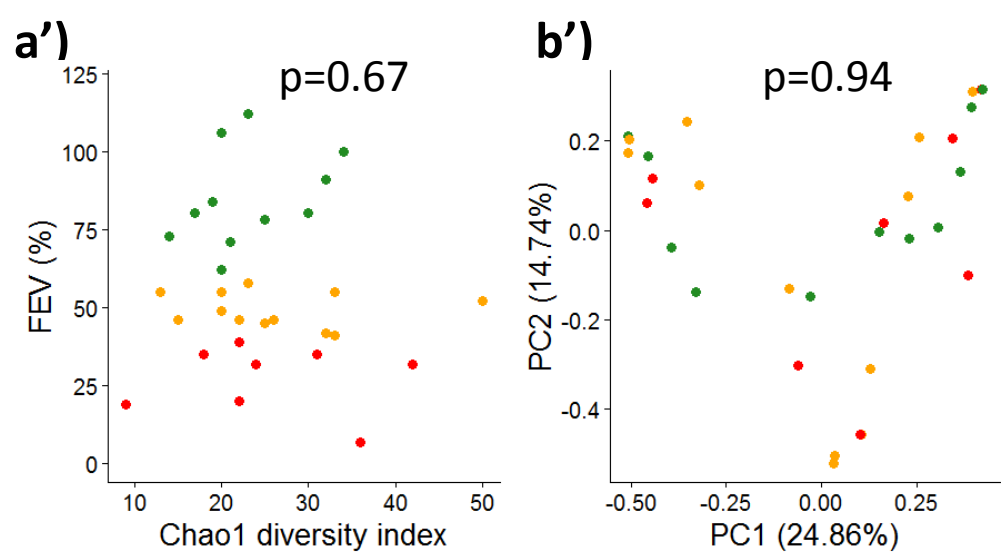
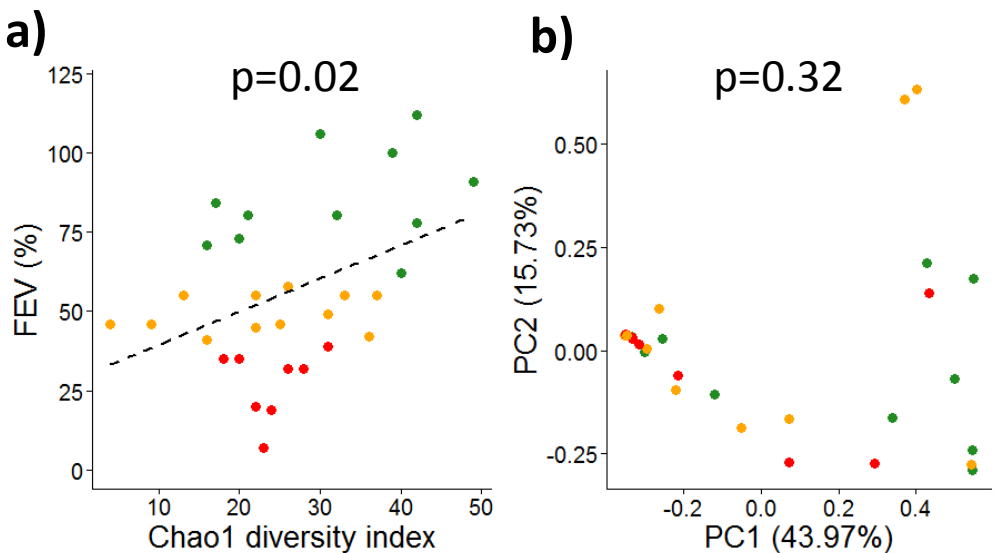


Figure 2.

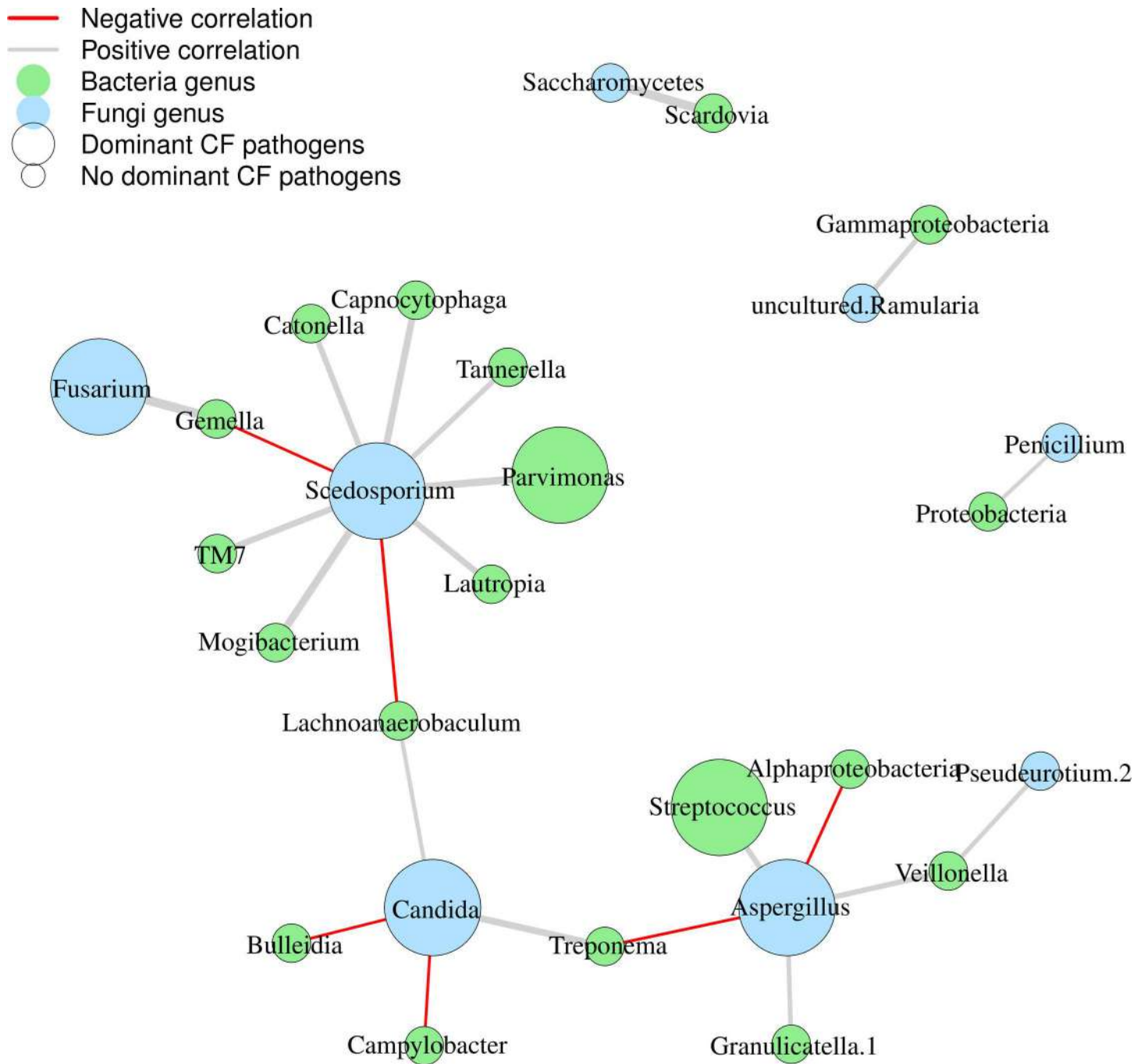


Figure 3.

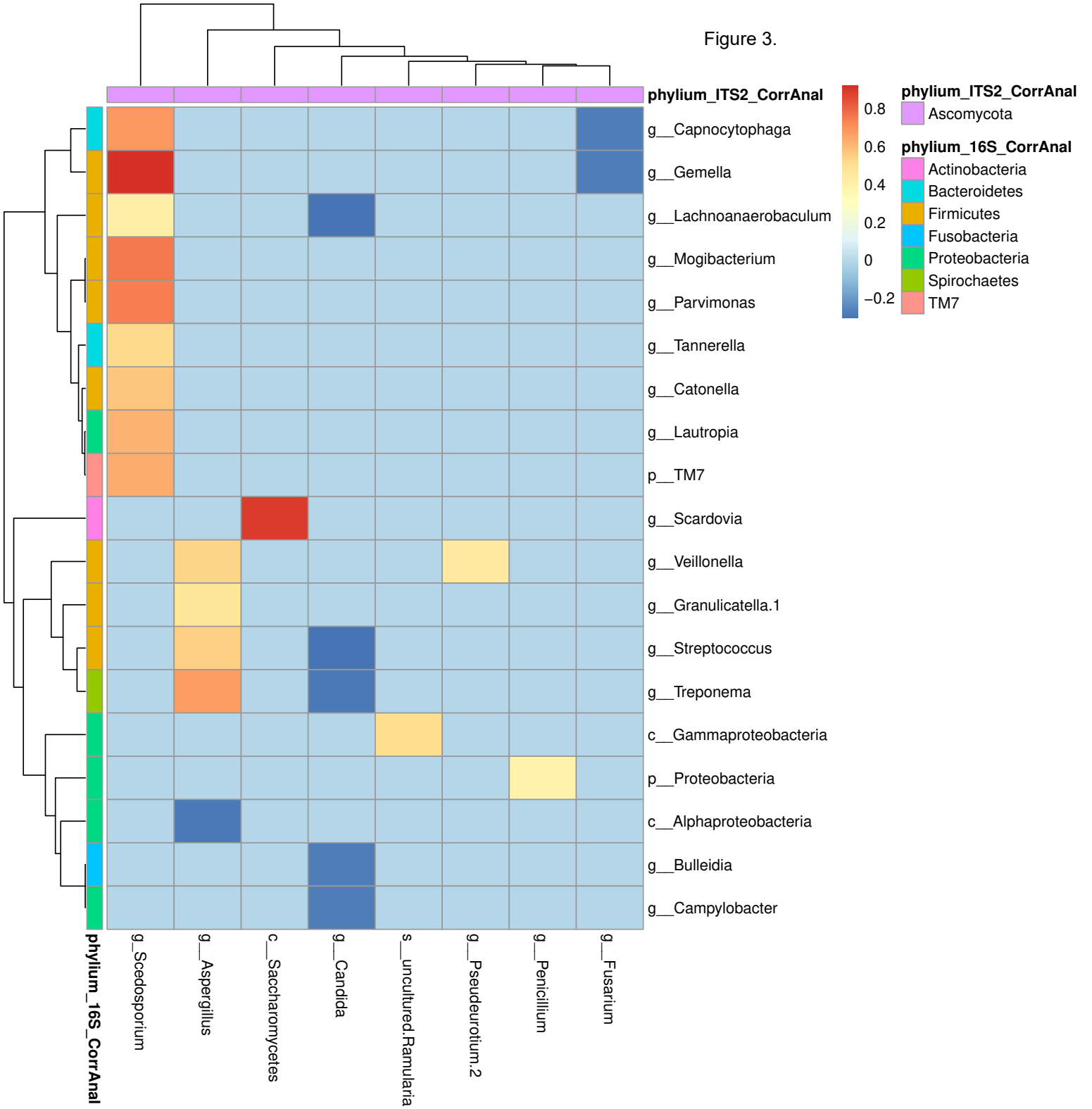


Figure 4.

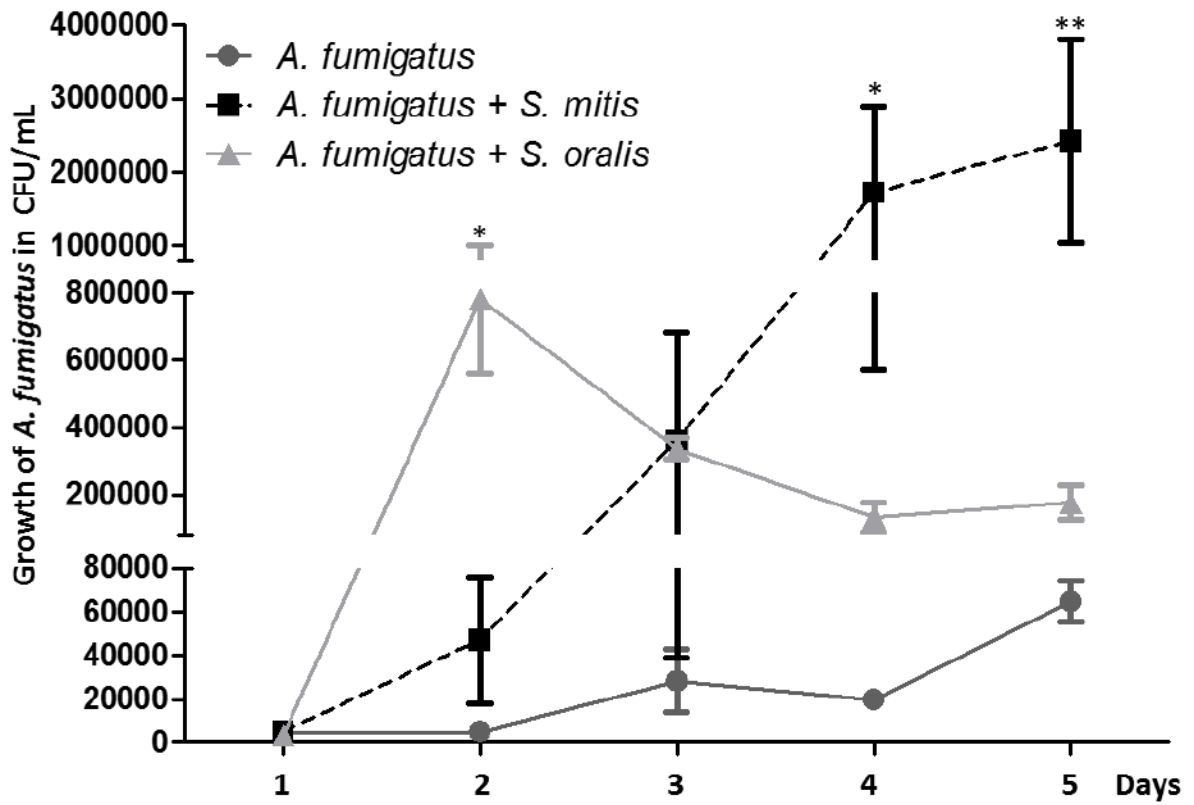


Figure 5.

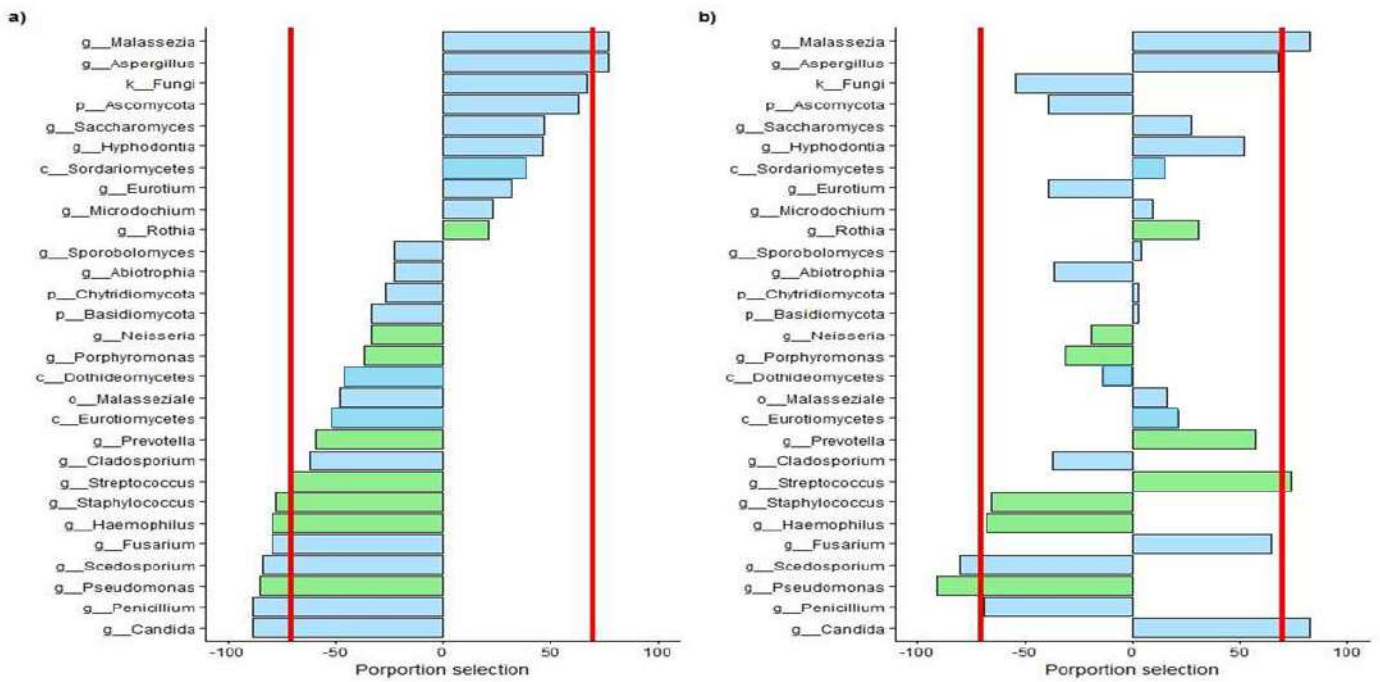
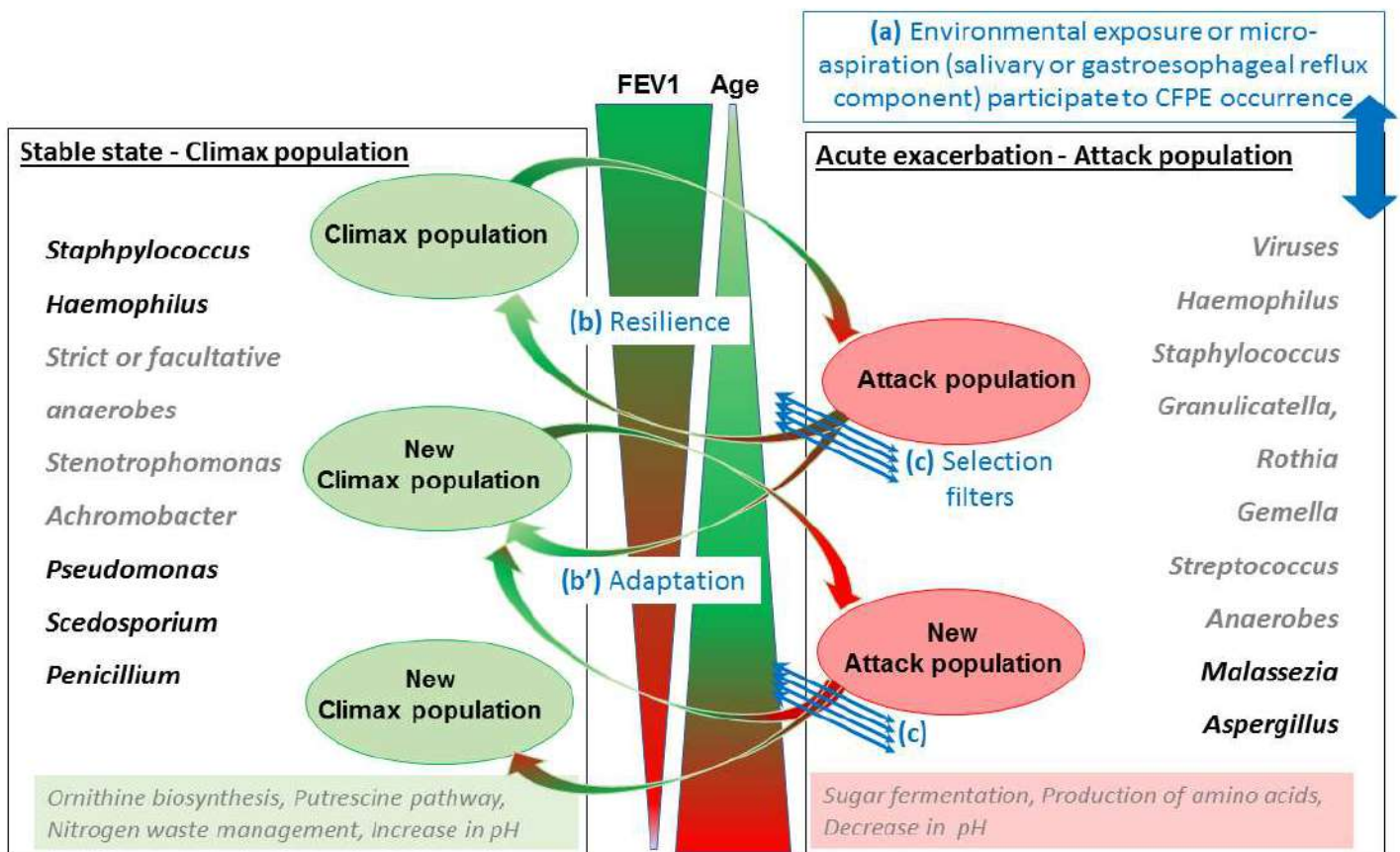




Figure 6.



### III. LES MYCOBIOTES ET MICROBIOTES ENDOGENES ET EXOGENES DE PATIENTS ASTHMATIQUES

#### 1. Contexte

Malgré les progrès récents en matière de traitements thérapeutiques et les efforts déployés par la communauté scientifique pour mieux comprendre la physiopathologie de l'asthme, les patients porteurs d'un asthme sévère présentent toujours un risque élevé de complications, d'exacerbation, une qualité de vie altérée et une augmentation de la mortalité et morbidité (« Reports GINA » 2019; Martinez 2019). L'asthme sévère est connu comme une maladie hétérogène composée de plusieurs endotypes (Kian Fan Chung et al. 2014). Les dernières évolutions thérapeutiques permettent de cibler certains endotypes, tels que l'asthme allergique, l'asthme à éosinophiles, et plus récemment l'asthme de Type-2. Il est maintenant courant de différencier les patients asthmatiques sévères en « Type-2 high » et « Type-2 low », en fonction de leurs taux de FeNO exhalé et d'éosinophiles dans le sang (Kuruvilla, Lee, et Lee 2019), afin d'adapter leur prise en charge thérapeutique.

L'asthme sévère est aussi associé à une dysbiose microbienne pulmonaire, qui jouerait un rôle dans le processus inflammatoire de la maladie. Dans la continuité de la théorie hygiéniste, de récents résultats ont montré qu'une exposition microbienne environnementale diversifiée réduisait l'incidence des symptômes respiratoires chez les jeunes enfants (Loss et al. 2016).

Ainsi, l'exposition fongique issue de l'environnement intérieur est associée à un large éventail d'effets néfastes sur la santé, notamment à l'asthme (Dannemiller et al. 2014; Sharpe et al. 2015; Cavaleiro Rufo et al. 2017). A notre connaissance, l'exposition fongique et bactérienne présente dans l'air intérieur n'a jamais été investiguée dans le contexte des patients asthmatiques sévères de « Type-2 high » et « Type-2 low ».

L'objectif de cette étude a donc été d'étudier la relation entre l'exposome microbien (ou myco-microbiote exogène) et le microbiote respiratoire (mycobiote-microbiote endogène) de patients asthmatiques sévères, en fonction de leur endotype « Type-2 high » et « Type-2 low ».

## 2. Principaux résultats

- ✓ Les patients asthmatiques sévères de « Type-2 high » ont une diversité bactérienne dans leur air intérieur plus élevée que ceux de « Type-2 low », d'après les indices de Simpson et Shannon. La diversité fongique des mêmes échantillons évolue en sens inverse d'après l'indice de Shannon. De plus, le taux de FeNO des patients est corrélé avec l' $\alpha$ -diversité fongique de l'exposome, d'après l'indice de Chao1.
- ✓ La composition des communautés fongiques de l'air intérieur, évalués par l'indice de Bray-Curtis, est significativement différente en fonction de l'endotype Type-2. Ceci n'est pas le cas pour les communautés bactériennes de l'air intérieur.
- ✓ Les communautés bactériennes sont principalement composées des genres *Paracoccus*, *Acinetobacter* et *Streptococcus*, et les communautés fongiques des espèces *Epicoccum nigrum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Malassezia restricta* et *Trametes versicolor*. L'analyse linéaire discriminante (LEfSe) en utilisant l'endotype Type-2 comme covariable nous a permis de mettre en évidence des abondances plus élevées d'OTU bactériens et fongiques connus pour être impliqués dans l'asthme allergique (*Cladosporium*, *Aspergillus*, *Epicoccum*, *Candida*, et *Pseudomonas*, *Pedobacter* et *Sphingomonas*) dans l'environnement des patients avec un taux élevé de FeNO. A l'inverse, l'environnement des patients avec un taux normal de FeNO a montré des abondances plus importantes pour les OTUs fongiques d'origine environnementale issus du phylum Basidiomycota.
- ✓ La composition du mycobiote-microbiote respiratoire des 22 patients arbore une forte signature individuelle et une faible diversité microbienne, tandis que la composition de leur exposome microbien est bien plus diverse, conformément aux données caractérisant les échantillons environnementaux.
- ✓ La diversité bactérienne et fongique du mycobiote-microbiote respiratoire ne diffère pas en fonction de l'endotype Type-2. Cependant, la proportion de taxons fongiques partagée entre les échantillons respiratoires et les recueils d'exposome microbien (EDC) est significativement plus importante pour les échantillons des patients en cours d'exacerbation ; ceci n'est pas le cas pour les taxons bactériens.

- ✓ L'analyse des taxons (ou OTUs) communs identifiés entre les expectorations et les EDC (ou « core microbien ») en fonction de la présence d'une exacerbation a permis de mettre en évidence un seul taxon bactérien commun : le genre *Sphingomonas*. A l'opposé, 9 taxons fongiques communs entre les échantillons des patients en cours d'exacerbation ont été identifiés.
- ✓ Ce core microbien est aussi composé de 17 autres OTUs fongiques, notamment *Saccharomyces cerevisiae*, *Malassezia spp*, *Aspergillus spp* et *Cladosporium spp*, et 4 OTUs bactériens (*Streptococcus spp*, *Paracoccus* et *Haemophilus*) indépendamment de la présence ou non d'une exacerbation.
- ✓ Enfin, parmi ce « core microbien », l'espèce fongique *C. sphaerospermum* et la famille bactérienne Spingomonadaceae ont été identifiées comme surexprimées chez les patients avec un FeNO élevé (> 25 ppb) dans l'analyse d'expression différentielle (LEfSe).
- ✓ Ces résultats ont permis de montrer une association entre le mycobiote et microbiote de l'environnement intérieur de patients asthmatiques et leur état clinique, notamment à leur état inflammatoire bronchique évalué par le FeNO. Cette association devra toutefois être confirmée par de nouvelles études.

### 3. Article

Page suivante : ***"Patients with type 2 severe asthma are exposed to different indoor mycobiota and microbiota"***. Vandeborghht L-E., Enaud R., Urien C., Coron N., Girodet P-O., Ferreira S., Berger P., Delhaes L.

En finalisation de rédaction

Poster en Annexe 4 : ***"Long-term monitoring of indoor air microbiome in dwellings: can we predict asthma exacerbation?"*** Vandeborghht L-E., Coron N., Enaud R., Urien C., Girodet P-O., Berger P., Ferreira S., Delhaes L.

**TITLE: Patients with type 2 severe asthma are exposed to different indoor mycobiota and microbiota**

**AUTHORS:** Louise-Eva VANDENBORGHT<sup>1,2,3</sup>, Raphaël ENAUD<sup>1,2,4</sup>, Charlotte URIEN<sup>3</sup>, Noémie CORON<sup>4</sup>, Pierre-Olivier GIRODET<sup>1,2,4</sup>, Stéphanie FERREIRA<sup>3</sup>, Patrick BERGER<sup>1,2,4</sup>, Laurence DELHAES<sup>1,2,4\*</sup>

**ADDRESSES :** <sup>1</sup>Univ-Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-thoracique de Bordeaux, U1045, Département de Pharmacologie, CIC 1401, F-33000 Bordeaux, France

<sup>2</sup>INSERM, Centre de Recherche Cardio-thoracique de Bordeaux, U1045, CIC 1401, F-33000 Bordeaux, France

<sup>3</sup>GenoScreen, Research and Development, Microbiota team, Lille, France

<sup>4</sup>CHU de Bordeaux, Laboratoire de Parasitologie, mycologie, Service d'exploration fonctionnelle respiratoire, Service de pharmacologie, CIC 1401, F-33604 Pessac, France

**\*CORRESPONDING AUTHOR:** Laurence DELHAES, Centre de Recherche Cardio Thoracique de Bordeaux - Inserm U1045, Plateforme Technologique d'Innovation Biomédicale (PTIB), Hôpital Xavier Arnoz, Avenue du Haut Lévêque, 33604 Pessac Cedex, France.

Tel: [\(+33\) 05 47 30 27 50](tel:+330547302750) ; email: [laurence.delhaes@u-bordeaux.fr](mailto:laurence.delhaes@u-bordeaux.fr)

**AUTHOR CONTRIBUTIONS:** NC, LD, POC and PB collected sputum samples and clinical data. LEV, RE, SF and LD participated to microbial analysis including NGS. LEV, RE, and LD realized the data analysis and figures/tables conception. LEV, and CU performed the statistical analyses including that of NGS. PB and LD contributed to study design. LEV, PB and LD wrote the manuscript with significant contributions of other co-authors, especially RE, and POG. All authors read and gave approval on the final manuscript.

**RUNNING TITLE:** Indoor Mycobiome and Microbiome in Asthma

**KEYWORDS:** indoor environment, mycobiome, microbiome, severe asthma, FeNO

## **INTRODUCTION**

Asthma is a complex, chronic inflammatory disease of the airways, affecting 339 million people worldwide (1, 2). Despite recent advances in new treatments and notable efforts to decipher asthma pathophysiology (2), patients with severe asthma (SA) remain at high risk for complications, exacerbations, poor quality of life and increased mortality and morbidity (1, 2). According to the definition of SA proposed by the international ERS/ATS Task force (3), SA is still recognized as a major unmet need, with an overall prevalence estimated around 5-10% (1–3), and approximately 50% of asthma-associated health care costs (1).

As for non-severe asthma, SA is currently accepted as a heterogeneous disease composed of multiple endotypes that combine clinical characteristics with several identifiable mechanistic pathways (3). Developments of biologic medication in asthma allow to target dedicated endotypes, such as allergic asthma, eosinophilic asthma and more recently Type 2-high asthma. It is now usual to differentiate SA patients in Type 2-high and Type 2-low asthma based on the levels of both FeNO and blood eosinophils (4).

SA has also been related to a microbial lung dysbiosis that would activate the inflammasome and other induced pathways (5–7). In agreement with the hygiene hypothesis, recent findings demonstrated that microbial environmental exposures decreased significantly the incidence of wheezing illnesses in young children with a genetic susceptibility at chromosome 17q21 (8). Moreover, fungal spores have an ubiquitous distribution leading to their regular inhalation as an inevitable consequence of breathing (9, 10). Fungal environmental exposure, especially indoor environment, is associated with a wide range of adverse health effects including asthma and is able to influence asthma severity (8, 11–13). However, to the best of our knowledge, the indoor fungal and bacterial floras have never been evaluated in Type 2-high and Type 2-low SA.

In the present study, we examined whether the indoor fungal and bacterial floras (exogenous mycobiota and microbiota, respectively) were related to clinical parameters in SA patients, and the relation between exogenous and endogenous mycobiota and/or microbiota.

## **Materials and Methods**

### **Patients**

Fifty-five patients from the national COBRA cohort (“Cohorte Obstruction Bronchique et Asthme”, Ethic committee number: 2008-A00294-51 / 1) (14), suffering from SA accordingly to the ERS/ATS guidelines and followed at the university hospital of Bordeaux were included in COBRA-ENV study.

Demographic features, clinical characteristics, lung function and induced sputum test results were determined at the COBRA visit as previously described (14). Patients with Type 2-high SA were defined according to either a level of FeNO higher than 25 ppb or blood eosinophils count higher than 300 cell/mm<sup>3</sup>. Conversely, patients with Type 2-low SA were defined according to both a level of FeNO lower than 25 ppb and a blood eosinophil count lower than 300 cell/mm<sup>3</sup>. Additional details of clinical outcomes of patients are provided in the supplementary method data.

### **Sputum samples and EDC**

Induced sputa were successfully collected in 22 patients, as previously described (18). Additional details of the procedures are provided in the supplementary method data. Indoor dust samples were collected using EDC. All the patients included into COBRA-ENV received guidelines during their COBRA visit to deploy EDC at home according to the same protocol. All EDCs were located at patient’s bedroom, opened the same date (*i.e.*, December, 21<sup>st</sup> 2017) and exposed for the same duration (*i.e.*, 10 weeks), as previously proposed (19).

### **DNA extraction, library preparation, deep-sequencing, and taxonomic assignment**

DNA extraction was carried out on EDCs and sputum samples using DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, France). Negative extraction controls (250µl DNA-free water) were processed using the same protocol.

Microbial diversity and taxonomic composition of samples were determined using the V3-V4 of bacterial 16S gene and the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of the 18S fungal gene, according to an optimized and standardized library preparation protocol Metabiote® (Genoscreen, France) (20). Two positive qualitative controls composed of an artificial bacterial and fungal mock and two negatives controls were used to valid the experimental processes. NGS-sequencing was performed using 250-bp paired-end sequencing protocol on the Illumina MiSeq platform (Illumina, San Diego), as described previously (20).

Taxonomic analysis was performed with the Metabiote Online v2.0 pipeline (GenoScreen, Lille, France), as previously described (20), and each OTU was then taxonomically compared to a reference databases as follow: Greengenes database (release 13\_8) for bacteria and Unite (7.2) for fungi.

### **Data analysis**

R software and packages were used for all statistical analyses. Non-parametric tests were used when appropriate and p-values below 0.05 were considered statistically significant.

Alpha-diversity (within-sample) and beta-diversities (between-sample) were used to examine changes in microbial community structure between EDC and sputa, according to clinical data. For beta-diversity measures, we computed the Bray-Curtis distances using vegan package (22). The principal coordinates analysis (PCoA) method was used to visualize group overall microbial differences using phyloSeq package (23). To determine and analyze the microbial



core, OTUs not contained in at least 20% of sputa per group and 90% of EDCs (24) were removed and Venn Diagram function of RAM package was used (25).

To compare alpha-diversity estimates across clinical parameter of patients, Mann-Whitney tests were performed; Wilcoxon test was used when pairs of sputum and EDC were compared. Sample clustering hypotheses were tested using PERMANOVA analysis. Homogeneity of dispersion among sample groups was assessed using the BETADISPER function (vegan package). To detect differentially abundant OTUs between groups, linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) was performed (27).

## **Results**

### **Study Population**

Overall, 55 SA patients were enrolled but 22 SA patients had complete pairs of EDC and sputum collected and analyzed (Supplemental Figure S1). Patients' characteristics from Type 2-high and Type 2-low are summarized in Table 1. Except FeNO levels, patients with Type 2-high SA were not significantly different from those with Type 2-low SA. Similarly, sputum microbial cultures and indoor fungal load measured by qPCR were not significantly different between the two groups of SA (Table 1).

### **Indoor Mycobiota and Microbiota Differed Significantly According to Type 2 Endotypes**

Patients with Type 2-high SA showed an increased Shannon and Simpson diversity indexes of EDC bacterial communities compared to those with Type 2-low SA (Figure 1A). Conversely, the fungal alpha-diversity only based on the Shannon index of EDCs was significantly lower for the patients with Type 2-High SA compared with that of Type 2-low SA (Figure 1B). FeNO level was significantly correlated with the alpha-diversity of mycobiota measured by Chao1 indexes (Figure 1C). Conversely blood eosinophil count was not correlated with the alpha-

diversity of mycobiota (data not shown). Beta-diversity of EDC fungal communities clustered significantly according to Type 2 endotypes (Figure 1D).

### **Indoor Mycobiota and Microbiota of Patients with Type 2-high SA had Significant Enrichment of Medically Relevant Fungi and Bacteria**

The bacterial composition of the indoor microbiota at the phylum level was dominated by Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria with most abundant OTUs annotated as *Paracoccus spp*, *Acinetobacter spp* and *Streptococcus spp* (supplemental Figure S2). The fungal community was represented by the two major phyla: Ascomycota and Basidiomycota, with most OTUs annotated as *Epicoccum nigrum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Malassezia restricta* and *Trametes versicolor* (supplemental Figure S3). These bacterial and fungal OTUs were submitted to LEfSe method using Type 2 endotypes as covariables.

LEfSe analysis indicated significant community enrichment of EDCs from patients with Type 2-high SA, composed of 7 families and 10 genera of bacterial OTUs (Figure 2A), and 2 genera plus 5 species of fungal OTU (Figure 2B). While enrichments of EDCs from patients with Type 2-low SA were mainly composed of environmental Basidiomycota OTUs (Figure 2B), enrichments of EDCs from patients with Type 2-high SA were composed of fungal and bacterial OTUs known to be medically relevant in allergy or asthma (*i.e.*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Epicoccum*, *Candida*, *Rhodotorula* or *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Erwinia*, *Sphingomonas*, Sphingomonadaceae, or Methylocystaceae).

## **A Mycobiota Core Composed of Medically Relevant Fungi is Shared Between Indoor and Sputum Samples of Patients with Asthma Exacerbation**

Twenty-two patients were able to produce induced sputum during clinically “stable” (n=10) or “exacerbated” (n=12) periods defined at COBRA visit. Both bacterial and fungal diversities of these sputa was lower than those of the corresponding EDCs (Figure 3A). The taxonomic composition of these two types of samples was significantly different (Figure 3B, 3C, 3D, and supplemental Figures S2-S5). It illustrated the highly individual signature of sputum microbiota and mycobiota compared to EDCs, which exhibited a very closely-spaced clustering of samples (Figure 3C, 3D). For instance, the proportion of Basidiomycota -a phylum mainly composed of environmental fungi compared to Ascomycota that hosts medically relevant fungi- was higher in EDCs compared to sputa (Figure 3B), highlighting the complex microbial ecology of human respiratory tract.

We did not observe any difference in the bacterial and fungal diversity of these sputa, according to Type 2 endotypes (data not shown). Whereas the proportion of common bacterial taxa between sputa and EDCs was similar when sputa were collected during exacerbation or at a stable state (Figure 3E), by contrast, the proportion of common fungal taxa between EDCs and sputa was significantly higher when sputa were collected during exacerbation period compared to the stable period (Figure 3F). The Venn diagram results confirmed a limited bacterial core composed of 5 OTUs (Figure 4A) associated to a large fungal core composed of 27 OTUs (Figure 4B).

We identified the core between pairs of sputum and EDC according to the absence or presence of an asthma exacerbation, and confirmed that only one OTU was shared between the bacterial core and the clinical states (*i.e.*, *Sphingomonas* genus, Figure 4A). Surprisingly, 9 fungal OTUs (*i.e.*, *Hyphodontia radula*, *Resinicium bicolor*, *Phlebia radiata*, *Penicillium brevicombactum*, *Cryptococcus victoriae*, *Sistrotremastrum* sp., *Cryptococcus magnus*, *Bjerkandera* sp., and

*Botryotinia fuckeliana*, Figure 4B) were identified as fungal core specifically shared between sputa collected during exacerbation and EDCs. In addition, 17 other OTUs were identified as members of the fungal core independently from the clinical status. They belonged to medically relevant yeasts (*i.e.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Malassezia* species) and molds (*Aspergillus* and *Cladosporium* species), or to environmental yeasts (*i.e.*, Basidiomycota and Ascomycota). Only one *Alternaria brassicae* OTU was shared with stable clinical status (Figure 4B). Among them, several OTUs were both microbial core members and significantly enriched OTUs in EDC microbial communities: *C. sphaerospermum*, *T. versicolor*, and Sphingomonadaceae (Figures 2 and 4).

## Discussion

To the best of our knowledge, this study is the first to report that indoor mycobiota and microbiota of SA patients exhibit distinct signatures according to Type 2 endotypes. Based on pairs of EDC and sputum samples, we also compared exogenous to endogenous microbial communities, and identified a fungal core composed of medically relevant fungi significantly more pronounced when sputa were collected during exacerbation.

Regarding indoor environment, we clearly demonstrated that a higher bacterial alpha-diversity together with a lower fungal alpha-diversity was associated with Type 2-high SA patients, and that bacterial beta-diversity of EDC bacterial communities was clustered according to Type 2 endotypes. Moreover, indoor mycobiota and microbiota of Type 2-high SA patients had a significant enrichment of medically relevant fungi and bacteria. Among them, we identified changes in the relative abundance of Sphingomonadaceae, Methylocystaceae, *Erwinia*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, and *Candida* in agreement with published data on gut microbiota and allergy/asthma (28). Whereas not focused on Type 2 endotypes, only few studies have previously investigated respiratory microbiota or mycobiota of patients with asthma with

varying degrees of severity (29–40). Among them, an association between Firmicutes and Actinobacter with SA has been reported (33, 35). An excess of Proteobacteria has been associated with moderately-severe to severe asthmatics (33). However, little remains known about lung mycobiota in chronic respiratory diseases. *Malassezia* have been significantly associated with asthma (37), and mycobiota of SA patients was carrying higher loads of fungi compared to non-severe asthmatic or healthy people (29). Very few studies have addressed the NGS analysis of indoor mycobiota and/or microbiota in asthma (38–40). A low indoor fungal diversity has been proposed as causal factor in the development of childhood asthma (11); few studies considered adult patients with asthma, its severity and control, but none of them referred to Type 2 endotypes.

Indoor microbial ecology was first investigated using cultures (41), but it has been more recently facilitated by NGS approaches. Overall, the indoor microbiota, sampling by a passive collector such as EDC, allows recovering house dusts which are a complex mixture of inorganic and organic substances. The indoor mycobiota appears to be a large fungal community assemblage (10, 42–48), mainly derived from the outdoor environment (39) but also depending on the inhabitants' mycobiota under selective pressures (10, 42). As previously reported (42, 44, 45, 47), we sampled patient's bedrooms, known to accurately estimate the level of indoor fungi pollution (41). Our results from NGS analysis of EDC mycobiota and microbiota were congruent with these studies. Briefly, we identified Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria as the most abundant bacterial phyla in agreement with recent published data (49, 50). Among them *Pseudomonas* and *Sphingomonas* were significantly enriched in EDCs of patients with Type 2-High SA. On mycobiota site, *Aspergillus versicolor* and *C. sphaerospermum* were identified as indoor species correlated to asthma (41, 48, 49). Using NGS, Dannemiller *et al* identified numerous fungi significantly associated with SA (11, 48). Our results confirmed that several *Cryptococcus* species and *E. nigrum* were associated with

SA, and *Epicoccum* genus was significantly enriched in indoor mycobiota of SA patients with Type 2-high endotype.

In addition to viral infections, fungal sensitization and fungal exposure have been intensely associated with asthma exacerbations and recently reviewed (42). We confirmed that fungal exposure may be a key player during exacerbation, as the fungal OTU proportion shared by sputa and EDCs was significantly higher when sputa were collected during exacerbation.

FeNO is an endogenous gaseous molecule incorporated into clinical management of chronic respiratory diseases in adult and pediatric populations, currently recognized as a biomarker of Type 2 airway inflammation (51). FeNO levels of patients with asthma have been related to environmental exposure (52), while *A. versicolor* and *Cladosporium* have been associated with higher FeNO (53, 54) in agreement with our results. FeNO levels were positively correlated with Type 2 cytokine levels in asthmatics, and with serum IL-17A levels in SA patients (55). As adaptive antifungal immunity includes both Th2 and Th17-type CD4<sup>+</sup> T cells, we may hypothesize that a number of the fungi isolated from indoor mycobiota of SA patients (such as *Aspergillus* and *Cladosporium* species) should contribute to cause detrimental immunopathology in SA patients. Once fungi are inhaled and colonized respiratory airways, they participate to the complex microbial-host interactions by producing secondary metabolites well-known to be involved in this immune response (such as cell-wall components:  $\beta$ -glucan and/or chitin, or secreted enzymes: proteases and/or glycosidases, or toxins) (56).

While our work is novel, it does have limitations including its cross-sectional design and a limited number of fully analyzed pairs of EDC plus sputum. It warrants larger studies to confirm the current findings and hypothesis.

To conclude, mycobiota may have a great effect on the host respiratory health especially in asthma context. Here we identified a correlation between indoor mycobiota and FeNO of patients with SA, renewing the interest in deciphering the interactions between indoor environment, fungi, and host. As SA is still a heterogeneous group with respect to its clinical and physiologic characteristics recently reviewed (6), our results support the use of FeNO level and indoor mycobiota composition as easy measurable biomarkers of asthma severity. Given the role of fungi as potent inducer of the airway inflammation (56), an increase in FeNO may serve as an indicator of respiratory inflammation related to a specific mold exposure that the indoor mycobiota analysis will characterize. Understanding the mechanisms, which link lung mycobiota and microbiota, to indoor environment, and their influence on the development and severity of asthma, will facilitate the development of novel therapeutic managements. We may not overlook anymore the contributions of the poorly explored mycobiota in our research to decipher microbial mechanisms behind respiratory health and disease such as asthma. Further significant works remain to be done to confidently determine the relationships between indoor mycobiota, lung mycobiota, inflammatory response, and the development and severity of asthma.

## **Acknowledgments**

The authors thank Isabelle Goasdoue, Virginie Niel, and Marine Servat from the clinical investigation center, for technical assistance. Regarding project fundings, we strongly acknowledge GenoScreen society (L-E Vandeborghht PhD grant) and the “Fondation de l’Université de Bordeaux (Fonds pour les maladies chroniques nécessitant une assistance médico-technique)” .



## References

1. GINA annual report. <http://ginasthma.org/archived-reports/>.
2. Martinez FD. The State of Asthma Research: Considerable Advances, but Still a Long Way to Go. *Am J Respir Crit Care Med* 2019;199:397–399.
3. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro M, Sterk PJ, Adcock IM, Bateman ED, Bel EH, Bleecker ER, Boulet L-P, Brightling C, Chanez P, Dahlen S-E, Djukanovic R, Frey U, Gaga M, Gibson P, Hamid Q, Jajour NN, Mauad T, Sorkness RL, Teague WG. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J* 2014;43:343–373.
4. Li X, Hastie AT, Peters MC, Hawkins GA, Phipatanakul W, Li H, Moore WC, Busse WW, Castro M, Erzurum SC, Gaston B, Israel E, Jarjour NN, Levy BD, Wenzel SE, Meyers DA, Fahy JV, Bleecker ER, National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program (SARP) Networks. Investigation of the relationship between IL-6 and type 2 biomarkers in patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2019;doi:10.1016/j.jaci.2019.08.031.
5. Li N, Qiu R, Yang Z, Li J, Chung KF, Zhong N, Zhang Q. Sputum microbiota in severe asthma patients: Relationship to eosinophilic inflammation. *Respir Med* 2017;131:192–198.
6. Chung KF. Potential Role of the Lung Microbiome in Shaping Asthma Phenotypes. *Ann Am Thorac Soc* 2017;14:S326–S331.
7. Sharma A, Laxman B, Naureckas ET, Hogarth DK, Sperling AI, Solway J, Ober C, Gilbert JA, White SR. Associations between fungal and bacterial microbiota of airways and asthma endotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2019;doi:10.1016/j.jaci.2019.06.025.
8. Loss GJ, Depner M, Hose AJ, Genuneit J, Karvonen AM, Hyvärinen A, Roudit C, Kabesch M, Lauener R, Pfefferle PI, Pekkanen J, Dalphin J-C, Riedler J, Braun-

- Fahrländer C, von Mutius E, Ege MJ, PASTURE (Protection against Allergy Study in Rural Environments) Study Group. The Early Development of Wheeze. Environmental Determinants and Genetic Susceptibility at 17q21. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;193:889–897.
9. Denning DW, Pashley C, Hartl D, Wardlaw A, Godet C, Del Giacco S, Delhaes L, Sergejeva S. Fungal allergy in asthma-state of the art and research needs. *Clinical and Translational Allergy* 2014;4:14.
  10. Cox MJ, Ege MJ, Mutius E von. *The Lung Microbiome*. European Respiratory Society; 2019.
  11. Dannemiller KC, Mendell MJ, Macher JM, Kumagai K, Bradman A, Holland N, Harley K, Eskenazi B, Peccia J. Next-generation DNA sequencing reveals that low fungal diversity in house dust is associated with childhood asthma development. *Indoor Air* 2014;24:236–247.
  12. Sharpe RA, Bearman N, Thornton CR, Husk K, Osborne NJ. Indoor fungal diversity and asthma: a meta-analysis and systematic review of risk factors. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:110–122.
  13. Cavaleiro Rufo J, Madureira J, Paciência I, Aguiar L, Pereira C, Silva D, Padrão P, Moreira P, Delgado L, Annesi-Maesano I, Oliveira Fernandes E, Teixeira JP, Moreira A. Indoor fungal diversity in primary schools may differently influence allergic sensitization and asthma in children. *Pediatr Allergy Immunol* 2017;28:332–339.
  14. Pretolani M, Soussan D, Poirier I, Thabut G, Aubier M, COBRA Study Group, COBRA cohort Study Group. Clinical and biological characteristics of the French COBRA cohort of adult subjects with asthma. *Eur Respir J* 2017;50:.
  15. Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, Gupta D, Meis JF, Guleria R, Moss R, Denning DW, ABPA complicating asthma ISHAM working group. Allergic bronchopulmonary

- aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin Exp Allergy* 2013;43:850–873.
16. Nordon C, Grimaldi-Bensouda L, Pribil C, Nachbaur G, Amzal B, Thabut G, Marthan R, Aubier M, COBRA Study Group. Clinical and economic burden of severe asthma: A French cohort study. *Respir Med* 2018;144:42–49.
  17. Ozier A, Girodet P-O, Bara I, Tunon de Lara J-M, Marthan R, Berger P. Control maintenance can be predicted by exhaled NO monitoring in asthmatic patients. *Respir Med* 2011;105:989–996.
  18. Silkoff PE, Laviolette M, Singh D, FitzGerald JM, Kelsen S, Backer V, Porsbjerg C, Girodet PO, Berger P, Kline JN, Khatri S, Chanez P, Susulic VS, Barnathan ES, Baribaud F, Loza MJ, ADEPT Investigators. Longitudinal stability of asthma characteristics and biomarkers from the Airways Disease Endotyping for Personalized Therapeutics (ADEPT) study. *Respir Res* 2016;17:43.
  19. Rocchi S, Valot B, Reboux G, Millon L. DNA metabarcoding to assess indoor fungal communities: Electrostatic dust collectors and Illumina sequencing. *Journal of Microbiological Methods* 2017;139:107–112.
  20. Hermon L, Hellal J, Denonfoux J, Vuilleumier S, Imfeld G, Urien C, Ferreira S, Joulian C. Functional Genes and Bacterial Communities During Organohalide Respiration of Chloroethenes in Microcosms of Multi-Contaminated Groundwater. *Front Microbiol* 2019;10:.
  21. Liu CM, Kachur S, Dwan MG, Abraham AG, Aziz M, Hsueh P-R, Huang Y-T, Busch JD, Lamit LJ, Gehring CA, Keim P, Price LB. FungiQuant: A broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay. *BMC Microbiology* 2012;12:255.
  22. Dixon P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science* 2003;14:927–930.

23. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 2013;8:e61217.
24. de Souza RSC, Okura VK, Armanhi JSL, Jorrín B, Lozano N, da Silva MJ, González-Guerrero M, de Araújo LM, Verza NC, Bagheri HC, Imperial J, Arruda P. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. *Sci Rep* 2016;6:.
25. RAM citation info. at <<https://cran.r-project.org/web/packages/RAM/citation.html>>.
26. Paulson JN, Stine OC, Bravo HC, Pop M. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nat Methods* 2013;10:1200–1202.
27. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 2011;12:R60.
28. Buttó LF, Haller D. Functional relevance of microbiome signatures: The correlation era requires tools for consolidation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2017;139:1092–1098.
29. Fraczek MG, Chishimba L, Niven RM, Bromley M, Simpson A, Smyth L, Denning DW, Bowyer P. Corticosteroid treatment is associated with increased filamentous fungal burden in allergic fungal disease. *J Allergy Clin Immunol* 2018;142:407–414.
30. Kuo C-HS, Pavlidis S, Loza M, Baribaud F, Rowe A, Pandis I, Sousa A, Corfield J, Djukanovic R, Lutter R, Sterk PJ, Auffray C, Guo Y, Adcock IM, Chung KF, U-BIOPRED Study Group. T-helper cell type 2 (Th2) and non-Th2 molecular phenotypes of asthma using sputum transcriptomics in U-BIOPRED. *Eur Respir J* 2017;49:.
31. Hauptmann M, Schaible UE. Linking microbiota and respiratory disease. *FEBS Lett* 2016;590:3721–3738.
32. Carpagnano GE, Malerba M, Lacedonia D, Susca A, Logrieco A, Carone M, Cotugno G, Palmiotti GA, Foschino-Barbaro MP. Analysis of the fungal microbiome in exhaled breath condensate of patients with asthma. *allergy asthma proc* 2016;37:41–46.

33. Zhang Q, Cox M, Liang Z, Brinkmann F, Cardenas PA, Duff R, Bhavsar P, Cookson W, Moffatt M, Chung KF. Airway Microbiota in Severe Asthma and Relationship to Asthma Severity and Phenotypes. *PLoS ONE* 2016;11:e0152724.
34. Venkataraman A, Bassis CM, Beck JM, Young VB, Curtis JL, Huffnagle GB, Schmidt TM. Application of a Neutral Community Model To Assess Structuring of the Human Lung Microbiome. *mBio* 2015;6:.
35. Huang YJ, Nariya S, Harris JM, Lynch SV, Choy DF, Arron JR, Boushey H. The airway microbiome in patients with severe asthma: Associations with disease features and severity. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:874–884.
36. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, Beck JM, Curtis JL, Huffnagle GB. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *MBio* 2015;6:e00037.
37. van Woerden HC, Gregory C, Brown R, Marchesi JR, Hoogendoorn B, Matthews IP. Differences in fungi present in induced sputum samples from asthma patients and non-atopic controls: a community based case control study. *BMC Infectious Diseases* 2013;13:69.
38. Sharma A, Gilbert JA. Microbial exposure and human health. *Curr Opin Microbiol* 2018;44:79–87.
39. Shan Y, Wu W, Fan W, Haahtela T, Zhang G. House dust microbiome and human health risks. *Int Microbiol* 2019;doi:10.1007/s10123-019-00057-5.
40. Caillaud D, Leynaert B, Keirsbulck M, Nadif R, mould ANSES working group. Indoor mould exposure, asthma and rhinitis: findings from systematic reviews and recent longitudinal studies. *Eur Respir Rev* 2018;27:.

41. Reboux G, Rocchi S, Laboissière A, Ammari H, Bochaton M, Gardin G, Rame J-M, Millon L. Survey of 1012 moldy dwellings by culture fungal analysis: Threshold proposal for asthmatic patient management. *Indoor Air* 2019;29:5–16.
42. Richardson M, Bowyer P, Sabino R. The human lung and *Aspergillus*: You are what you breathe in? *Med Mycol* 2019;57:S145–S154.
43. Yashiro E, Savova-Bianchi D, Niculita-Hirzel H. Major Differences in the Diversity of Mycobiomes Associated with Wheat Processing and Domestic Environments: Significant Findings from High-Throughput Sequencing of Fungal Barcode ITS1. *Int J Environ Res Public Health* 2019;16:.
44. Hegarty B, Dannemiller KC, Peccia J. Gene expression of indoor fungal communities under damp building conditions: Implications for human health. *Indoor Air* 2018;28:548–558.
45. Coombs K, Taft D, Ward DV, Green BJ, Chew GL, Shamsaei B, Meller J, Indugula R, Reponen T. Variability of indoor fungal microbiome of green and non-green low-income homes in Cincinnati, Ohio. *Sci Total Environ* 2018;610–611:212–218.
46. Tong X, Leung MHY, Wilkins D, Lee PKH. City-scale distribution and dispersal routes of mycobiome in residences. *Microbiome* 2017;5:131.
47. Hanson B, Zhou Y, Bautista EJ, Urch B, Speck M, Silverman F, Muilenberg M, Phipatanakul W, Weinstock G, Sodergren E, Gold DR, Sordillo JE. Characterization of the bacterial and fungal microbiome in indoor dust and outdoor air samples: a pilot study. *Environ Sci Process Impacts* 2016;18:713–724.
48. Dannemiller KC, Gent JF, Leaderer BP, Peccia J. Indoor microbial communities: Influence on asthma severity in atopic and nonatopic children. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:76-83.e1.

49. Richardson M, Gittel N, Gilbert JA, Gordon J, Gandhi P, Reboulet R, Hampton-Marcell JT. Concurrent measurement of microbiome and allergens in the air of bedrooms of allergy disease patients in the Chicago area. *Microbiome* 2019;7:.
50. Adams RI, Bateman AC, Bik HM, Meadow JF. Microbiota of the indoor environment: a meta-analysis. *Microbiome* 2015;3:.
51. Miskoff JA, Dewan A, Chaudhri M. Fractional Exhaled Nitric Oxide Testing: Diagnostic Utility in Asthma, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, or Asthma-chronic Obstructive Pulmonary Disease Overlap Syndrome. *Cureus* 2019;doi:10.7759/cureus.4864.
52. van Kampen V, Brüning T, Merget R. Serial fractional exhaled nitric oxide measurements off and at work in the diagnosis of occupational asthma. *Am J Ind Med* 2019;62:663–671.
53. Norbäck D, Hashim JH, Hashim Z, Cai G-H, Sooria V, Ismail SA, Wieslander G. Respiratory symptoms and fractional exhaled nitric oxide (FeNO) among students in Penang, Malaysia in relation to signs of dampness at school and fungal DNA in school dust. *Sci Total Environ* 2017;577:148–154.
54. Tham R, Erbas B, Dharmage SC, Tang ML, Aldakheel F, Lodge CJ, Thomas PS, Taylor PE, Abramson MJ, Lowe AJ. Outdoor fungal spores and acute respiratory effects in vulnerable individuals. *Environ Res* 2019;178:108675.
55. Chien J-W, Lin C-Y, Yang KD, Lin C-H, Kao J-K, Tsai Y-G. Increased IL-17A secreting CD4+ T cells, serum IL-17 levels and exhaled nitric oxide are correlated with childhood asthma severity. *Clin Exp Allergy* 2013;43:1018–1026.
56. Bartemes KR, Kita H. Innate and adaptive immune responses to fungi in the airway. *J Allergy Clin Immunol* 2018;142:353–363.

## Figure legends

### **Figure 1. Alpha and beta diversities of the EDCs obtained from SA patients according to Type 2 endotypes.**

Alpha diversity of bacterial (A) or fungal (B) communities from EDC is shown using Chao1, Shannon and Simpson diversity indexes. Correlation between FeNO levels and Chao1 fungal diversities is presented (C). Beta diversity of fungal communities (D) is shown. Patients are split in Type 2-high (Dark grey, circles) and Type 2-low (light grey, triangles) SA.

### **Figure 2. Taxonomic difference between Type 2 endotypes across the 22 EDCs shows significant enrichment of specific taxa at OTU levels.**

Linear discriminant analysis (LDA) and effect size (LEfSe) identified (A) bacterial taxa, and (B) fungal taxa differentially enriched according to a LDA score cutoff at 2.5. Patients are split in Type 2-high (Dark grey) and Type 2-low (light grey) SA.

### **Figure 3. Comparison of diversity and composition of both sputum and EDC samples.**

The bacterial (left), and fungal diversities (right) based on Shannon index are presented for EDCs and sputum (A). The proportion of Basidiomycota (a phylum mainly composed of environmental fungi) was more abundant in EDCs than in sputa (B). PCoA based on Bray-Curtis dissimilarity between sputum (circles) and EDC (triangles) samples for bacterial (C) and fungal communities (D) illustrated the highly individual signature of sputa compared to EDCs. Proportion of common bacterial (E) or fungal (F) taxa between EDC and sputa collected at a stable state (STB) or during asthma exacerbation (EXA). The proportion was expressed in percentage of number of reads for each OTU (*i.e.*, relative abundance).



**Figure 4. Microbial core composed of organisms shared between the 22 pairs of indoor and respiratory samples.**

Venn diagrams show the proportion of common bacterial (A) or fungal (B) taxa (at OTU level) between EDC (green) and sputa collected either during exacerbation (Red) or stable period (Blue).

Only OTUs present at least in 20% of each group of sputa (clustered according the presence or not of a pulmonary exacerbation when sputa were collected) and at least in 90% of EDCs were taken into account and represented in Venn diagram. (A) The bacterial core showed only one OTU corresponding to *Sphingomonas* shared between EDC and sputa collected during exacerbation, and two *Streptococcus* OTUs, *Paracoccus* and *Haemophilus* identified independently of the clinical state of the patients. (B) The fungal core was larger than the bacterial core, composed of nine OTUs associated with sputa collected during exacerbation, only one (*Alternaria brassicae*) associated with sputa collected at stable periods, and seventeen OTUs belonging to the fungal core independently of the clinical period.

**Table 1. Clinical and biological characteristics of patients with severe asthma (SA) and complete NGS analysis.**

	<b>Overall</b>	<b>Type 2-low SA</b>	<b>Type 2-high SA</b>	<b>p-values</b>
<b>Number of patients</b>	<b>22</b>	<b>6</b>	<b>16</b>	
<b>Demographic features</b>				
Age	59.09 [16.84]	52.33 [19.69]	61.62 [15.58]	NS*
Sex (Males (%))	10 (45.5)	2 (33.3)	8 (50.0)	NS
BMI	26.96 [4.73]	27.31 [2.98]	26.83 [5.32]	NS
<b>Respiratory data</b>				
FEV1 (%)	75.36 [27.60]	79.32 [33.83]	73.77 [25.89]	NS
FVC (%)	91.20 [21.99]	89.18 [28.75]	92.01 [19.83]	NS
FEV1/FVC (%)	68.25 [17.04]	74.84 [15.82]	65.62 [17.31]	NS
FEF 25-75	49.24 [31.30]	61.83 [36.35]	44.21 [28.85]	NS
FeNO (ppb)	43.32 [32.74]	15.86 [6.26]	53.62 [32.75]	0.01
<b>Clinical features at COBRA visit</b>				

Very poorly controlled asthma**	13	6	9	NS
SAFS	7	3	4	NS
ABPA	3	0	3	NS
Asthma medication used during the last 6 months***				
ICS	20	6	9	NS
LABA	12	5	7	NS
LAMA	16	6	10	NS
Continuous OCS	9	3	6	NS
Biologic treatment	9	3	6	NS
Gastro-esophageal reflux treatment	8	3	5	NS
Azole treatment	1	0	1 (VRC <sup>†</sup> )	NS
Number of exacerbations during COBRA-ENV period	6.45 [5.29]	9.67 [5.32]	5.25 [4.91]	NS
Number of OCS courses during COBRA-ENV period	5.45 [5.09]	8.50 [4.89]	4.31 [4.81]	NS
Number of ATB courses during COBRA-ENV period	4.68 [4.87]	6.83 [3.87]	3.88 [5.07]	NS
<b>Biological data at COBRA visit</b>				
Blood eosinophils count (/mm <sup>3</sup> )	526.82 [1184.46]	120.00 [90.77]	679.38 [1367.61]	NS

Total IgE (in kUI/L)	308.23 [264.80]	236.67 [268.59]	335.06 [267.03]	NS
Sputum microbial cultures	19	6	13	NS
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1	0	NS
<i>Escherichia coli</i>	1	1	0	NS
<i>Haemophilus influenzae, parainfluenzae</i>	2	1	1	NS
<i>Non pneumoniae Streptococcus</i>	2	1	1	NS
<i>Candida albicans</i>	14	6	8	NS
<i>Other yeast</i>	5	1	4	NS
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5	3	2	NS
<i>Other Aspergillus</i>	3	2	1	NS
<i>Other mold</i>	3	1	2	NS
<b>Indoor fungal contamination****</b>				
Total fungal load (pg/EDC)	11.39 [9,82]	11.68 [12.76]	11.28 [8.98]	NS

\*NS: not significant p-value according to Man-Whitney test used for quantitative variables analysis and Fischer test for qualitative variables.

Values were expressed as Mean [SD] or total count (%). \*\*Asthma control as per the ACQ-7. \*\*\*ICS: Inhaled corticosteroid, LABA: Long

acting beta2 agonist; LAMA: Long acting muscarinic antagonist; OCS: oral corticosteroid; †VRC for Voriconazole. \*\*\*\* The method for the estimation of EDC fungal load using qPCR Assay is explained in the supplementary method data.

## **Supplementary Figure Legends**

**Figure S1. Flowchart of COBRA-ENV study and samples distribution across time.**

**Figure S2. Histograms representing the relative abundance at genus level of EDC microbiota.**

**Figure S3 Histograms representing the relative abundance at species level of EDC mycobiota.**

**Figure S4. Histograms representing the relative abundance at genus level of sputum microbiota.**

**Figure S5. Histograms representing the relative abundance at species level of sputum mycobiota.**

## **Supplementary method data**

### **Patients**

COBRA-ENV protocol (Number: 2017/68) was approved by the Ethic committee: “CPP du Sud-Ouest et Outre Mer III”.

A diagnosis of SA with fungal sensitization (SAFS) was considered in patients with SA, who were sensitized to one or more fungi (as demonstrated by skin prick tests or serum specific IgE) but who had a normal serum total IgE (<1KUI /mL) and were negative for allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) (9, 15). Asthma control was established using the Asthma Control Questionnaire (ACQ-7), with a score >1.5 reflecting very poorly controlled asthma (14, 16).

Numbers of moderate asthma exacerbations (*i.e.*, loss of asthma control requiring oral steroid and/or antibiotic courses) were recorded within the year preceding the Electrostatic Dust Collector (EDC) (*i.e.*, from December 2016 to December 2017), during the EDC exposure time (*i.e.*, from December 2017 to March 2018), and during the year following EDC exposure (*i.e.*, from March 2018 to March 2019). All subjects were considered to be free of clinical virus infection.

Spirometry was performed according to American Thoracic Society standard. The fractional exhaled nitric oxide (FeNO in ppb) was assessed, as previously described (17).

### **Sputum samples and EDC**

Induced sputa were successfully collected in 22 patients, briefly, after oral rinse to prevent excessive salivary contamination, inhalation of increasing concentrations of nebulized saline solutions at 3%, 4% and 5% respectively for a 7-min session each was used. For patients with FEV1  $\geq 50 - < 60$  % predicted, induction was performed with normal/isotonic saline (0.9 %).

Sputa from subjects with post-BD FEV1 < 50 % predicted were not induced. Sputa treated with dithiothreitol were submitted to microbial cultures and stored at -20°C until DNA extraction. After EDCs exposition in the bedroom of patients, they were sent to the Mycology laboratory, where each EDC was handled, as described previously (19). Each collected solution was stored at -20°C until DNA extraction. As negative control, one un-exposed EDC was submitted to the same laboratory protocol.

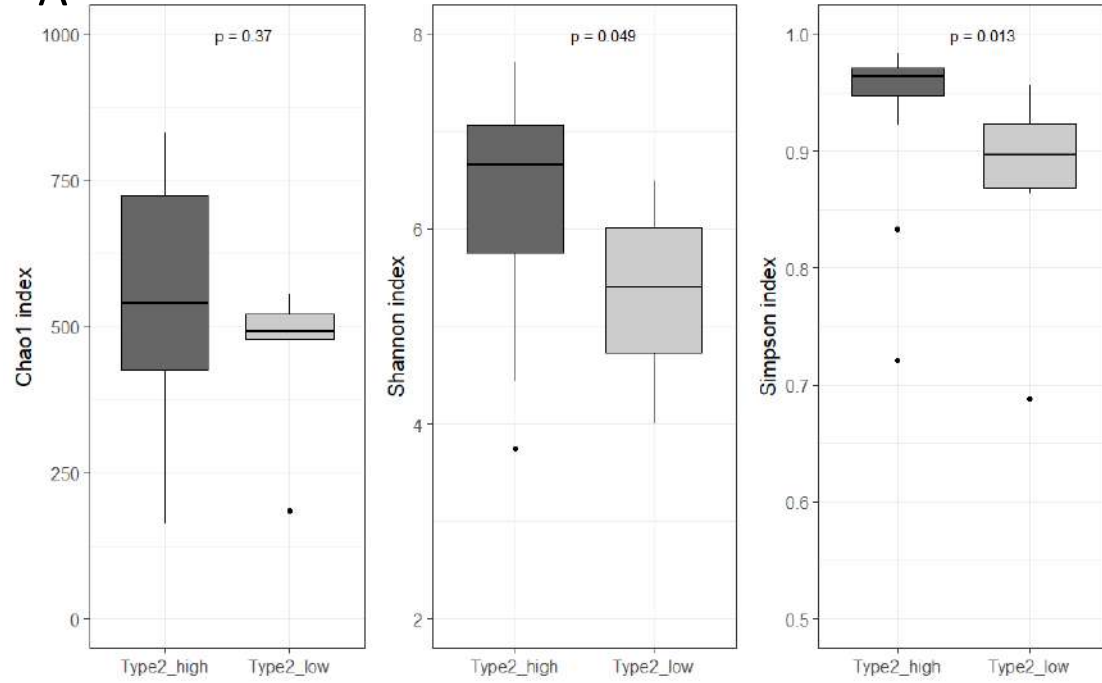
### **Estimation of EDC fungal load using qPCR Assay**

Fungal load of each EDC was estimated with a universal qPCR assay quantifying 18S rDNA (in pg per EDC). Published primers and probe were used to perform the quantification (21), based on a standard composed of 11 genomic DNAs extracted from different fungal strains (Artificial Fungal community MetaBiote® Control). Each sample was analyzed in triplicate; Ct mean was finally confronted to the standard curve to deduce the quantity of fungal 18S DNA of each EDC.

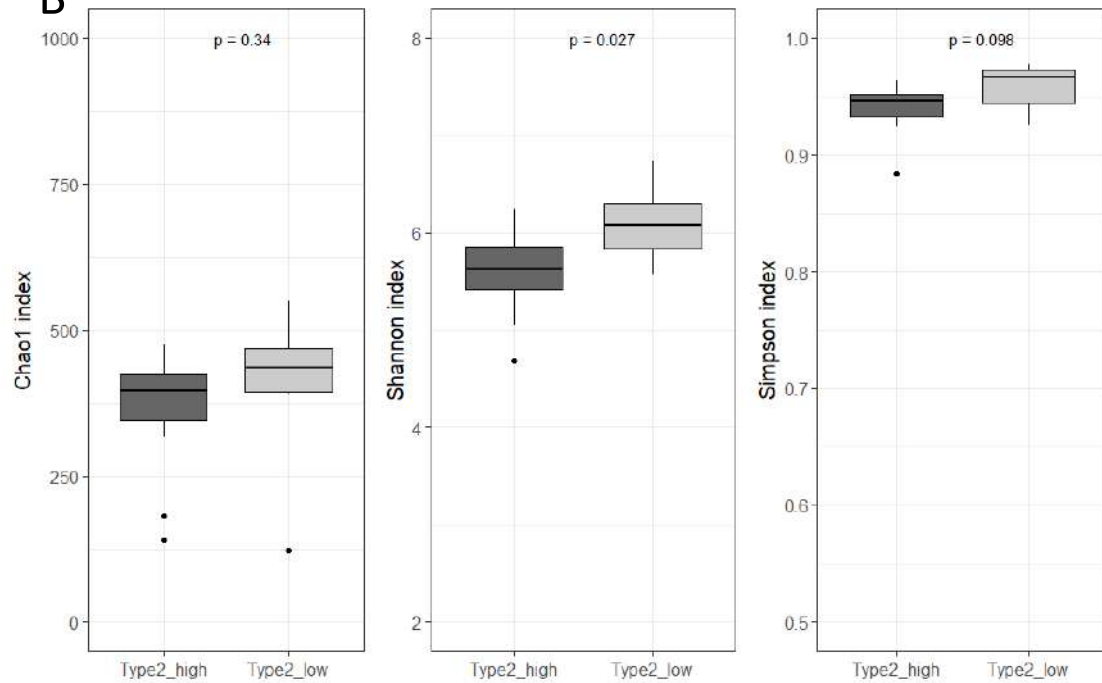


Figure 1.

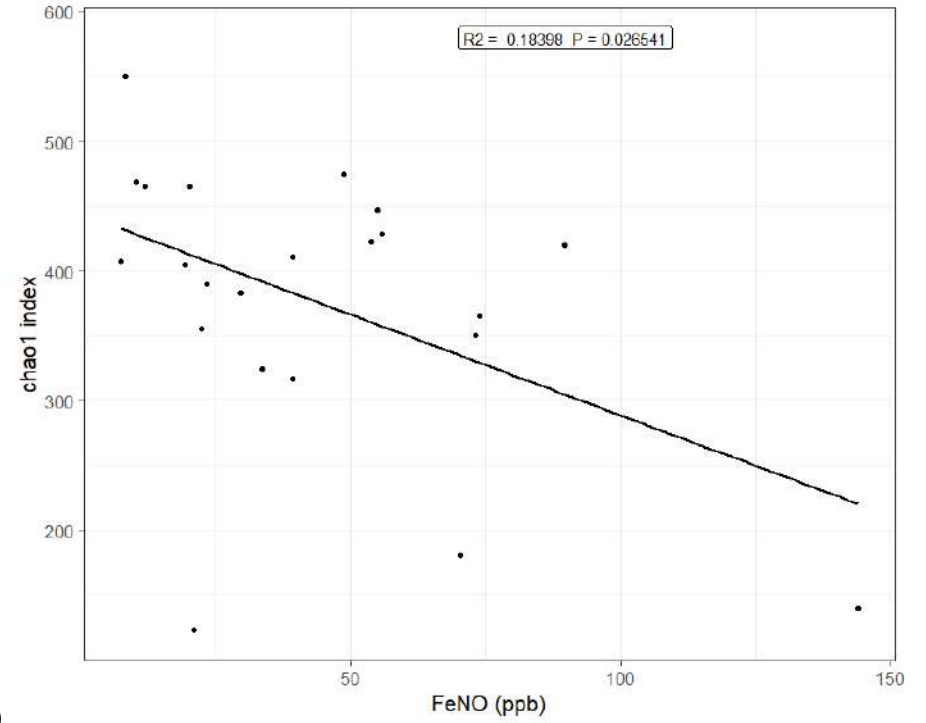
A



B



C



D

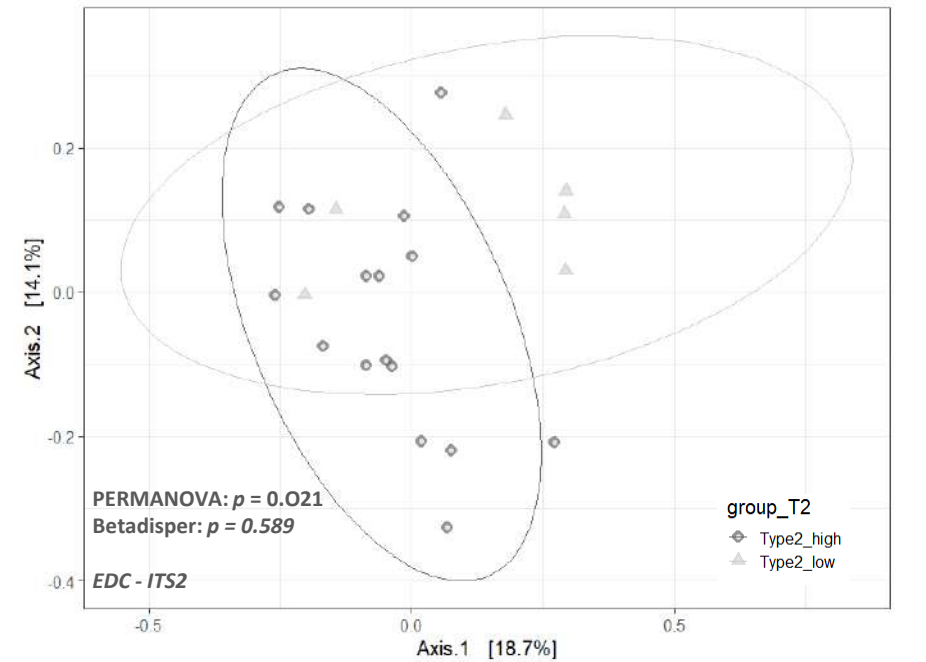
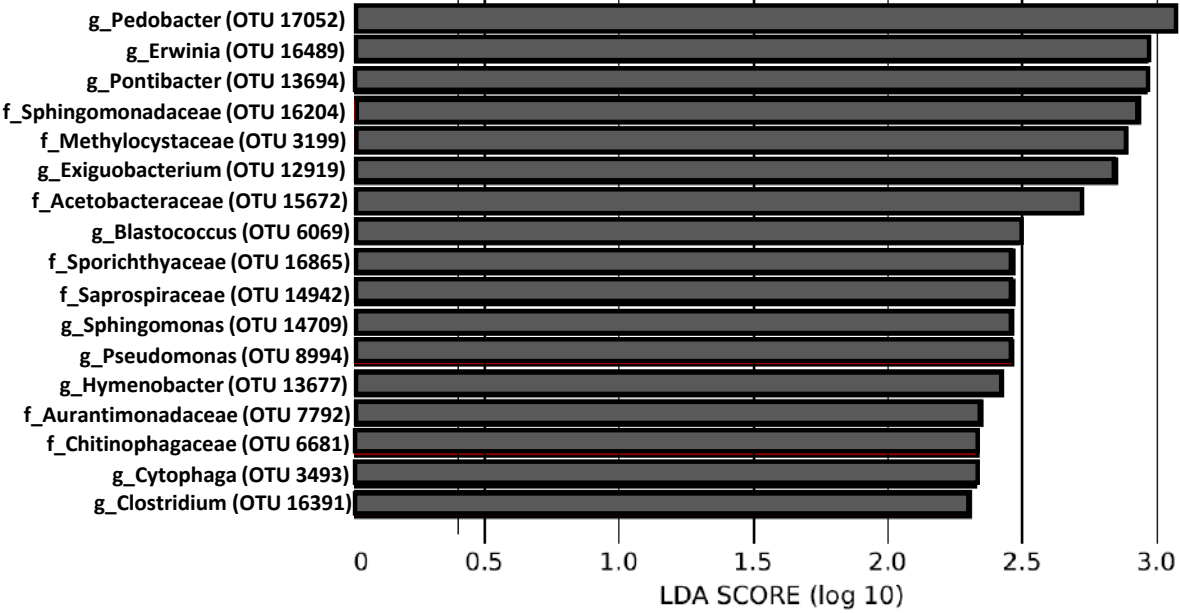


Figure 2.

A



B

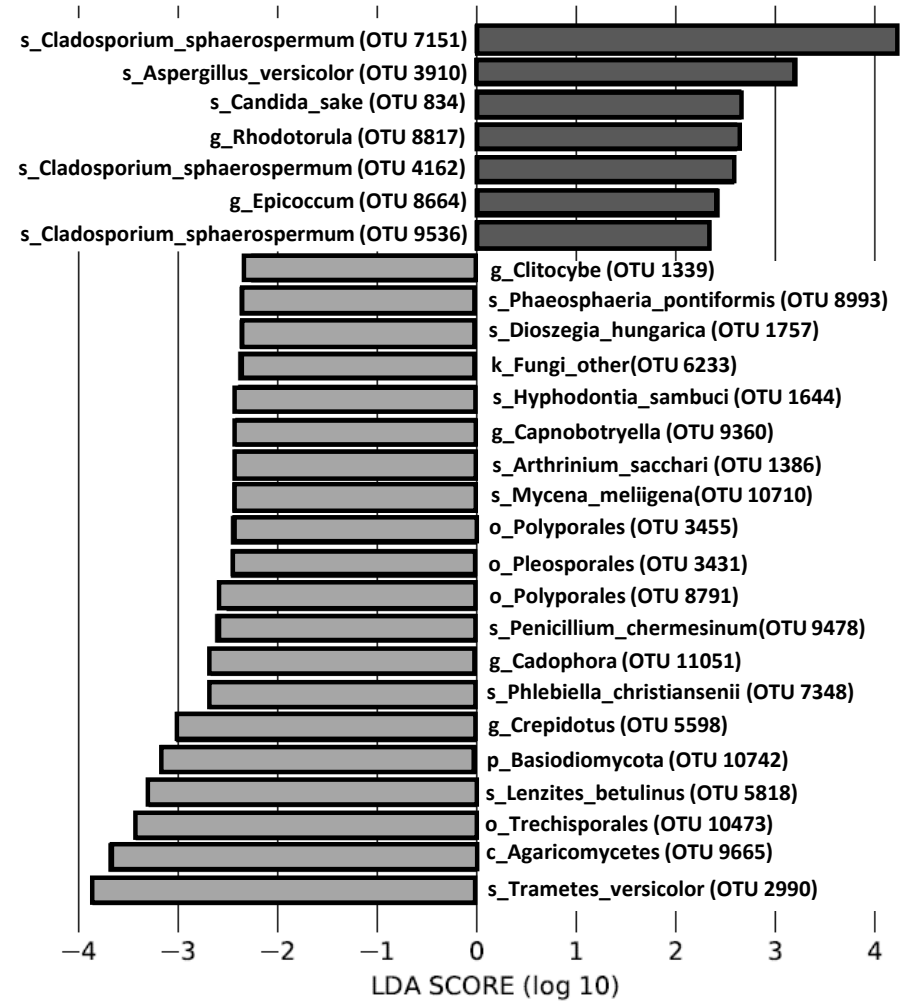
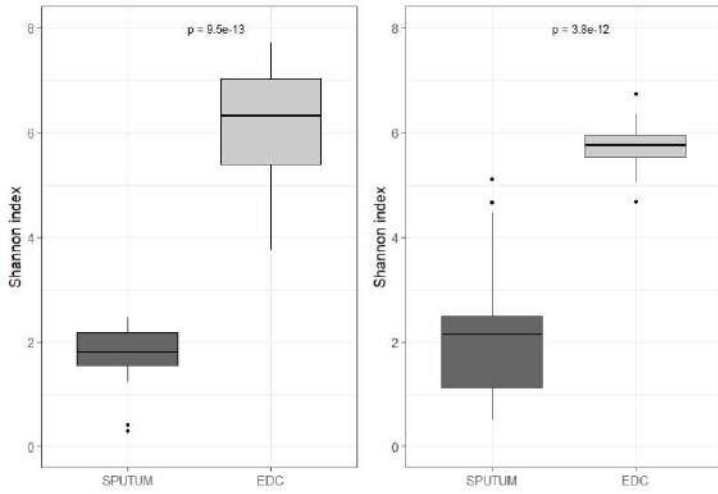
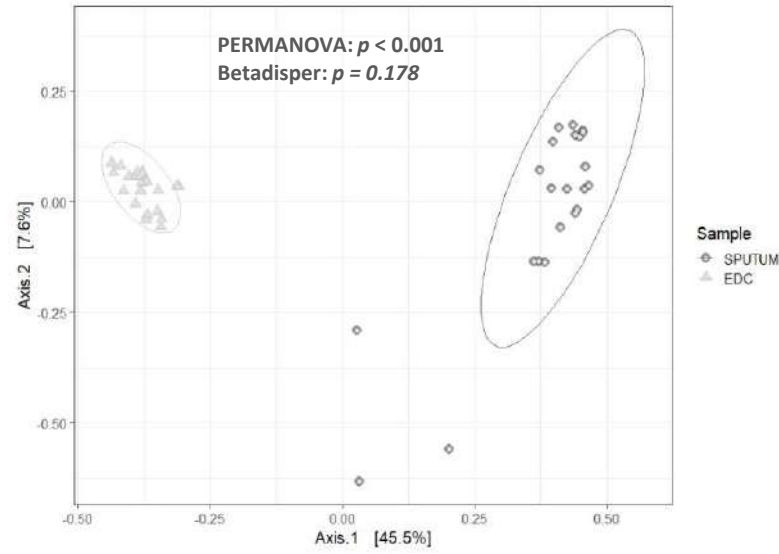


Figure 3.

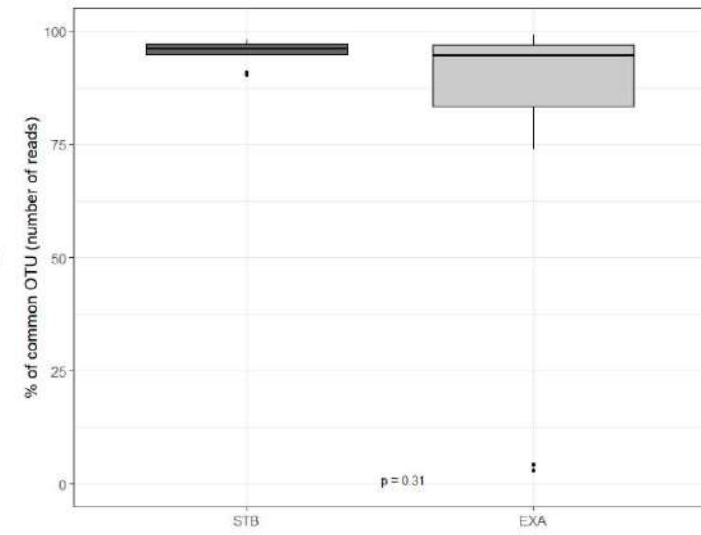
A



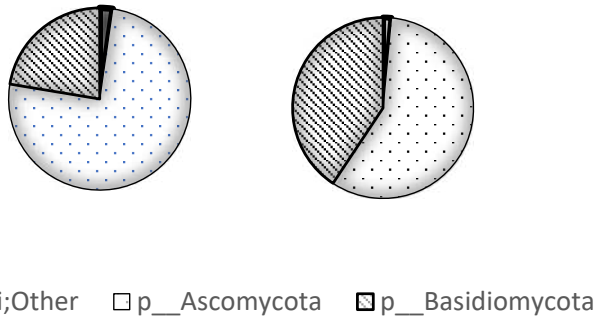
C



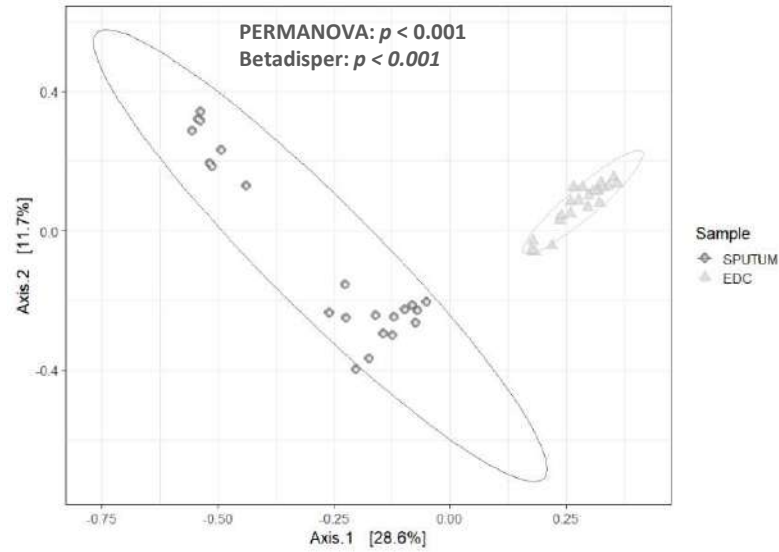
E



B



D



F

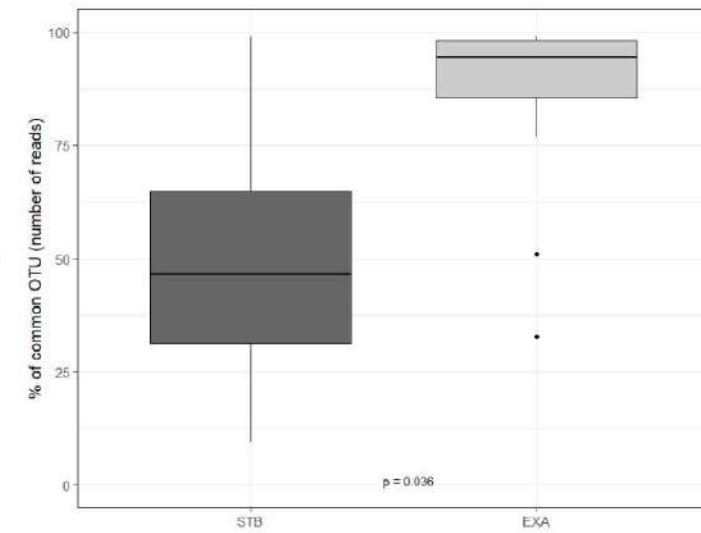
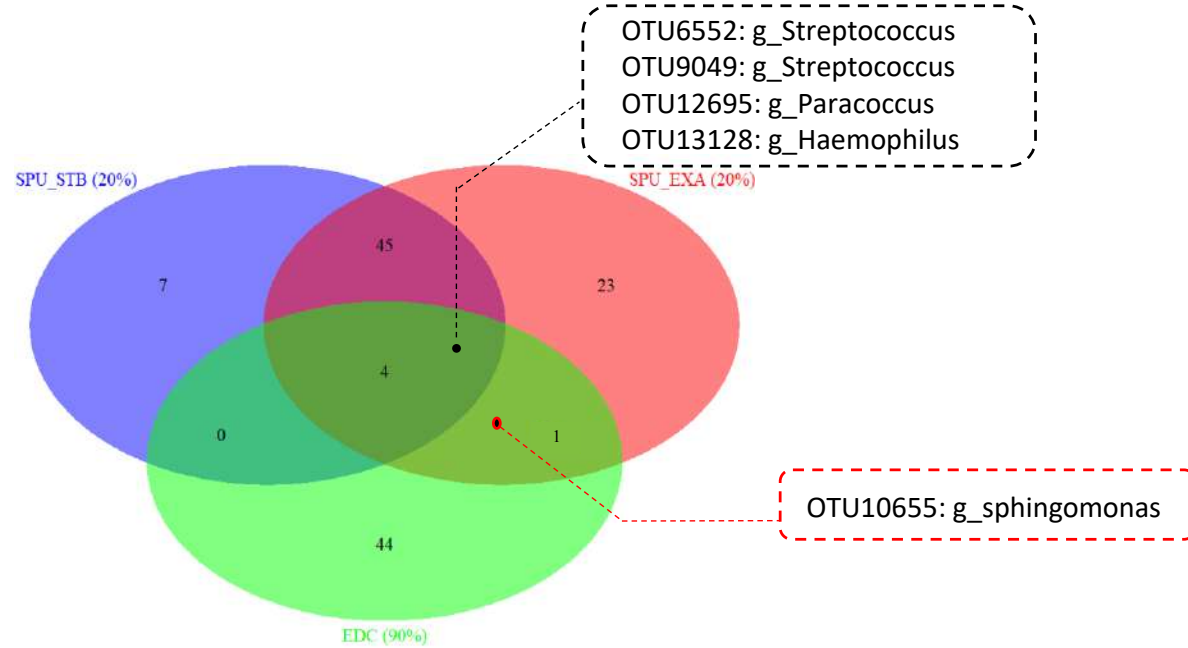


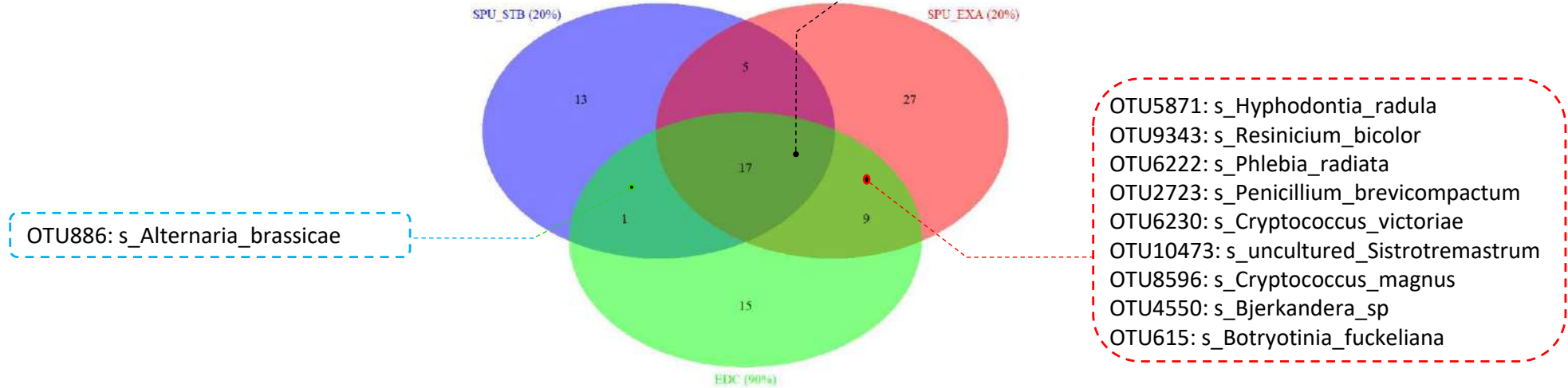
Figure 4.

A



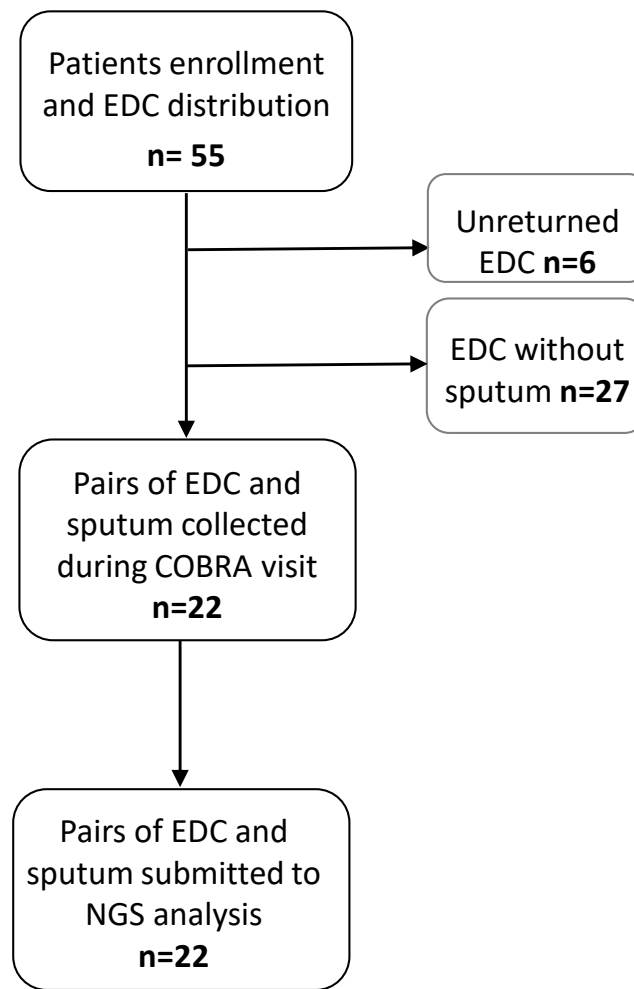
B

- OTU169 : s\_Saccharomyces\_cerevisiae
- OTU1765: s\_Malassezia\_restricta
- OTU8230: s\_Cladosporium\_cladosporioides
- OTU9397: s\_Deбaryomyces\_hansenii
- OTU4944: s\_Stereum\_hirsutum
- OTU3074: s\_Aspergillus\_vitricola
- OTU5486: s\_Aspergillus\_sp\_BF8
- OTU1676: s\_Malassezia\_globosa
- OTU8055: s\_unculturedHyphodontia
- OTU10611: s\_Rhodocollybia\_butyracea
- OTU7151: s\_Cladosporium\_sphaerospermum
- OTU3110: s\_Epicoccum\_nigrum
- OTU2668: s\_basidiomycete\_sp\_OS\_S88
- OTU2990: s\_Trametes\_versicolor
- OTU625: s\_unculturedcf\_Coprinus\_sp
- OTU4712: s\_Lewia\_infectoria
- OTU3467: s\_Cladosporium\_sphaerospermum

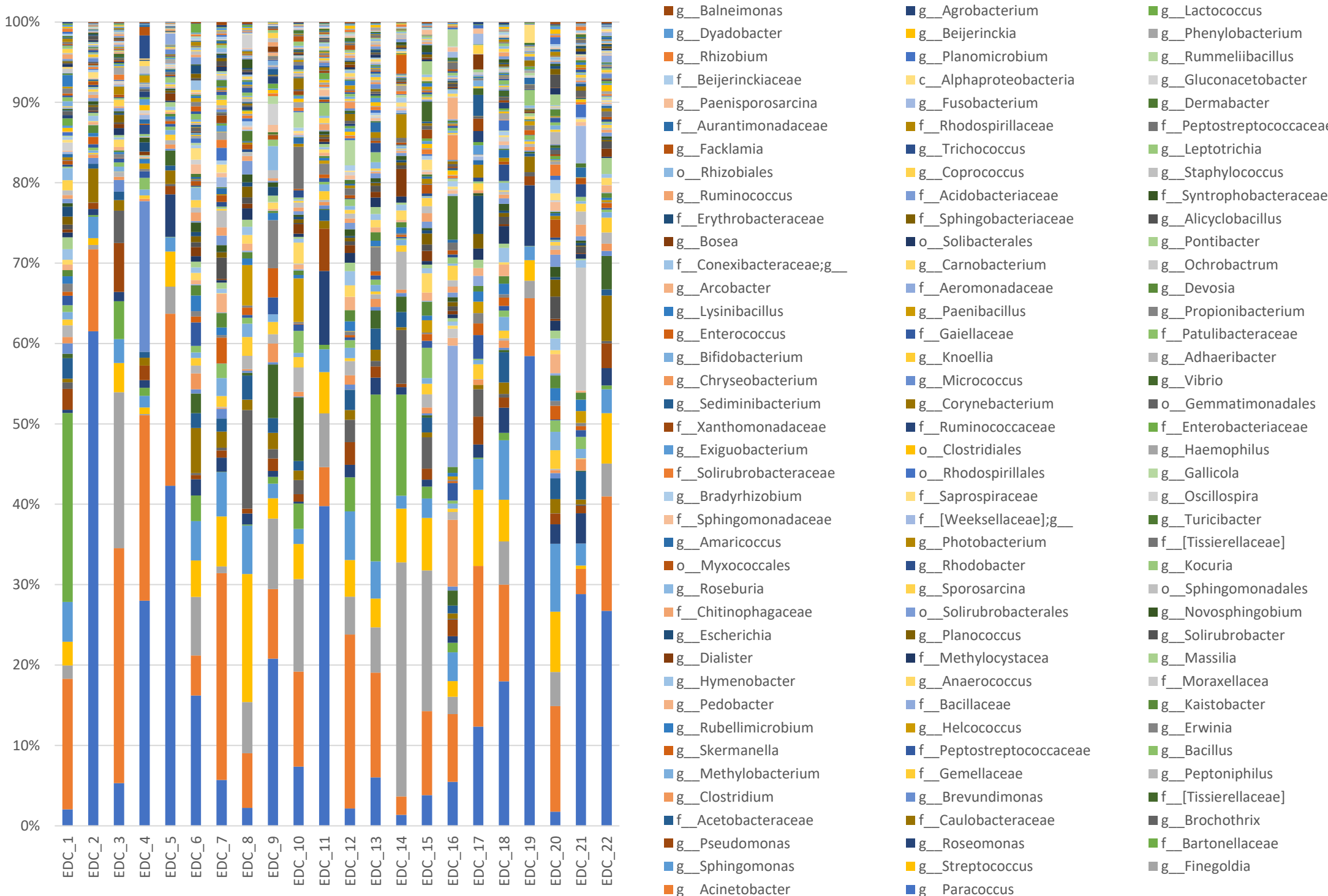


Supplementary figures

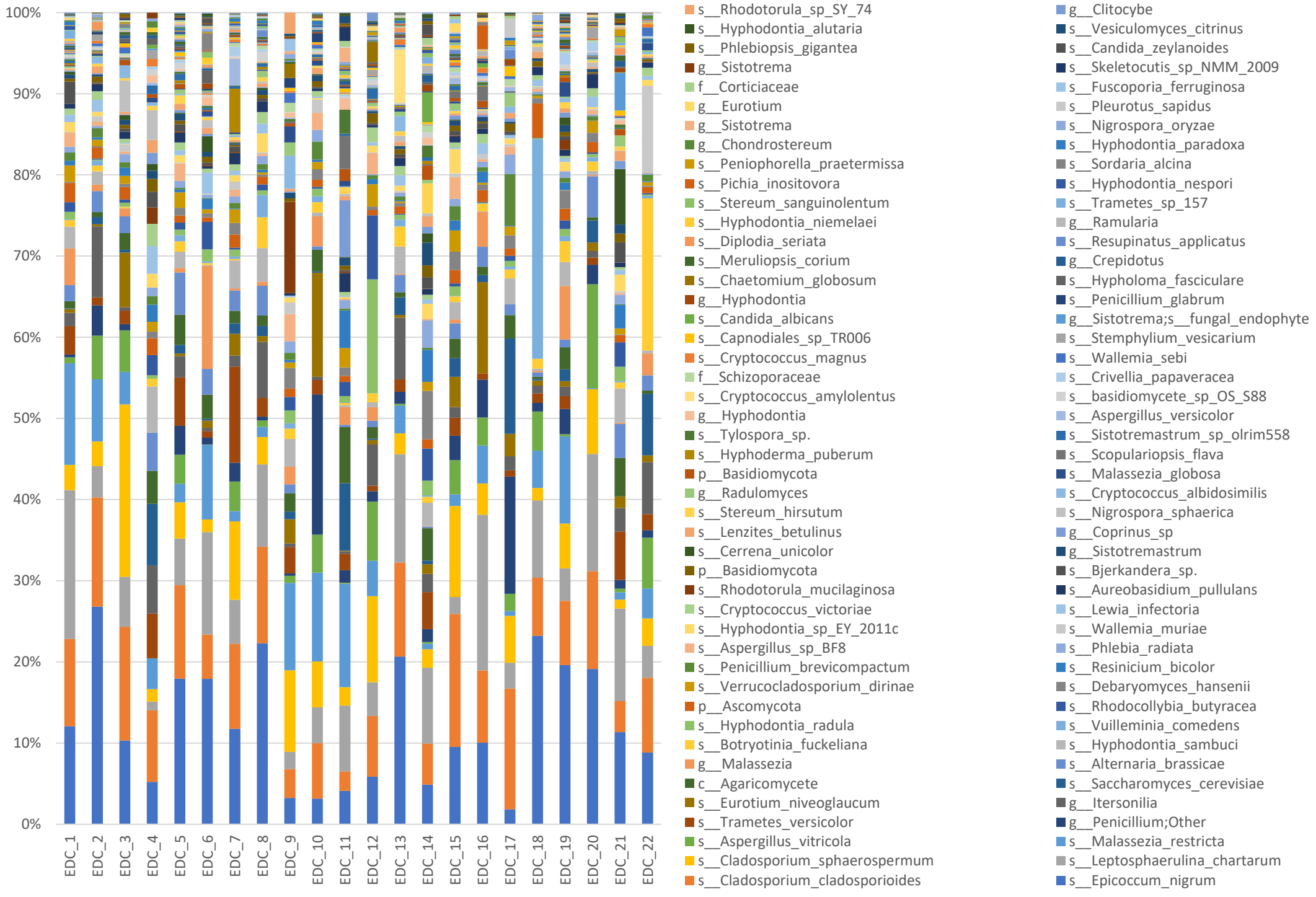
Supplementary Figure 1.



Supplementary Figure 2.



Supplementary Figure 3.









## **CHAPITRE 4**

### **DISCUSSION GENERALE**

Après avoir établi l'état des connaissances actuelles sur l'incidence et les caractéristiques des maladies respiratoires chroniques, en particulier dans l'asthme et la mucoviscidose, les études du mycobiote et microbiote pour ces deux pathologies ont été détaillées. Ces généralités sont suivies d'une revue de la littérature qui a mis l'accent sur la pertinence des études mycobiote en clinique, dans ce contexte de MRC. Le premier objectif de ce travail de thèse était méthodologique, en particulier sur l'impact de la lyse sur la répartition des microchampignons, la sélection de la cible fongique la plus pertinente et le développement d'un dispositif optimisé de recueil de l'exposome microbien. Ce travail a été suivi de la mise en pratique des outils et techniques ainsi sélectionnés, dans un contexte clinique.

## I. POSITIONNEMENT DES CHOIX METHODOLOGIQUES AU VU DES DONNEES DE LA LITTERATURE

Les études réalisées sur des échantillons du tractus respiratoire et oraux ont évalué l'impact de différents protocoles d'extraction (donc différents types de lyse) sur la description des communautés bactériennes (Vesty et al. 2017; Rosenbaum et al. 2019; Oriano et al. 2019). Ces études n'ont pas révélé de différence majeure de diversité et de description de ces communautés en fonction des différentes méthodes de lyse. Cependant, l'extraction de l'ADN des microchampignons est plus compliquée et impacte la représentation des communautés fongiques. En effet, nos résultats ont montré que l'étape de lyse module la répartition des OTU des isolats de la communauté artificielle fongique (mock fongique) extraits à partir de différentes méthodes. Certaines espèces présentant une paroi particulièrement difficile à lyser, telles que les *Cryptococcus (filobasidiella)* sont moins représentées (en proportion) en l'absence de lyse mécanique par « bead-beating ». Cela se traduit par une plus forte diversité pour les aliquotes de mocks fongiques extraites à partir d'un protocole comprenant une étape de lyse mécanique, et une plus grande ressemblance de la répartition de ces isolats avec le mock théorique. Cet impact de la lyse sur la description des communautés fongiques n'a pas été retrouvé sur les lavages oraux-pharyngés (Rosenbaum et al. 2019), mais l'impact de différents protocoles d'extraction sur la description du mycobiote salivaire a été observé (Vesty et al. 2017). Nos résultats portent sur l'extraction d'une communauté simple (mock fongique) ce qui présente l'avantage d'avoir connaissance de la proportion de chacune des isolats qui la compose. Il a été observé que l'absence de « bead-beating » défavorise l'extraction des mucorales (*Mucor* et *Rhizopus*) tandis que les genres présentant une paroi plus facile à lyser, tels que *Candida* et *Penicillium* sont plus abondants au détriment d'autres genres. Pour l'extraction des microchampignons, il nous semble donc indispensable d'intégrer au protocole d'extraction d'ADN une étape de lyse mécanique pour ne pas sous-estimer ceux présentant des parois difficiles à lyser. De plus, le manque de standardisation de la méthode d'extraction dans l'étude du mycobiote rend les comparaisons des études très difficiles.

La métagénomique ciblée n'est pas une approche quantitative absolue, mais relative où la détection majoritaire d'une souche se fait au détriment des autres. Cependant la proportion dans laquelle est détectée une souche n'est pas uniquement due à son abondance dans l'échantillon (liée à la qualité de l'extraction de l'ADN de l'échantillon), mais les amorces utilisées ont elles aussi une affinité qui peut varier en fonction des genres ou espèces fongiques. En effet, ces amorces se fixent à une région conservée de l'ADN ribosomique, mais cette région peut contenir une légère variabilité nucléique. Ces amorces comportent donc des dégénérescences qui peuvent être à l'origine de couverture taxonomique différente en fonction du couple d'amorce utilisé (S. Li et al. 2019). La région ITS2 de l'ADN ribosomal est aujourd'hui largement utilisée dans la communauté scientifique pour caractériser les genres ou espèces fongiques, pour des raisons décrites dans l'introduction (plus discriminante en terme phylogénétique, mieux conservée chez les eucaryotes et mieux représentée dans les bases de données)(Lindahl et al. 2013). Une étude de couverture taxonomique a montré *in silico* que la cible ITS1 présentait des scores moins élevés qu'ITS2 et que la cible ITS2 apportait une plus grande précision dans l'affiliation taxonomique et la structure de la communauté via une analyse de communauté artificielle à partir de différentes amorces (18S, ITS1 et ITS2) (Hoggard et al. 2018). En se concentrant sur 10 couples d'amorces ITS2 (5 amorces *forward* et 2 amorces *reverse*), nos résultats n'ont pas montré de différence significative sur la description du mock fongique pour ces différents couples d'amorces, certainement en raison de la simplicité du mock utilisé (22 espèces/11 genres). A l'inverse, la description des communautés fongiques d'échantillons biologiques (un sol et une selle) a montré des différences notables en termes de rendement de PCR, de proportion de reads correspondant à des OTUs à basse affiliation, ainsi que de composition des communautés fongiques. Ces deux échantillons biologiques ont une biomasse élevée, donc leur quantité d'ADN microbien les rend moins enclin à la contamination d'ADN hôte, une caractéristique favorisant cette comparaison d'amorces. En effet, dans le cadre du projet « Biota-in-ATCF » (Annexe 1), l'utilisation de deux amorces *forward* différentes sur des expectorations de patients atteints de mucoviscidose nous a permis de mettre en évidence des proportions de contaminations d'ADN humain très différentes en fonction de deux amorces testées. Ainsi il est difficile de sélectionner le couple d'amorce le plus efficace sur des échantillons biologiques dont on ne connaît pas précisément les communautés fongiques les composant. Cependant, pour l'étude du mycobiote respiratoire et de l'exposome microbien à partir d'échantillons de faible biomasse, il a été évident d'éliminer les amorces présentant les désavantages cités, tels que les faibles rendements lors de la première étape d'amplification et l'amplification importante d'ADN humain. Hormis les amorces concernées par ces inconvénients, la sélection des amorces les plus efficaces sera toujours une histoire de compromis, sans garanti totale d'être au plus proche de la réalité biologique.

Notre récente enquête centrée sur les principales applications des études mycobiote sur un ensemble de laboratoires (26 laboratoires de 18 pays) a permis d'identifier l'intérêt majeur de l'impact des micromycètes sur la compréhension des MRC, puisque le tractus respiratoire reste le site le plus étudié dans ce contexte (Annexe 2 : (Gangneux et al. 2019)). Ce travail met aussi en évidence la diversité des méthodes utilisées, à toutes les étapes de l'analyse du mycobiote (types d'échantillon, méthodes moléculaires, protocoles utilisés, cibles fongiques et bases de données utilisées pour l'affiliation taxonomique). Les résultats de cette enquête ainsi que ceux de la comparaison des protocoles d'extraction et des cibles fongiques qui illustrent l'impact sur la description des communautés fongiques, confirment la nécessité d'œuvrer à une plus grande standardisation des méthodes d'analyse du mycobiote.

L'échantillonnage de l'exposome microbien a été challengé à partir d'un dispositif passif de recueil par sédimentation (modèle issu de la littérature et notamment des travaux de l'équipe du Pr L Millon). La composition et l'utilisation de ce dispositif ont fait l'objet de publications, tant sur la lingette utilisée (sa taille), que sur le temps et lieu d'exposition où la chambre à coucher permet d'obtenir la meilleure représentation de l'environnement intérieur des patients, en particulier pour l'exposome fongique (Scherer et al. 2014; Rocchi et al. 2017; Reboux et al. 2019). S'affranchir de la lingette vendue dans la grande distribution nous a amené à sélectionner des textiles se rapprochant des résultats obtenus à partir de celle publiée (utilisée comme référence). Les différents textiles sélectionnés par la structure de leurs fibres et leur densité similaires à la référence nous ont permis d'identifier des résultats cohérents avec la référence et de montrer qu'une exposition moins longue serait possible. Ce dernier point présente l'avantage d'obtenir des résultats plus rapidement, en particulier dans le cadre d'études cliniques. Ainsi le textile T4, inséré dans le nouveau capotage (Figure 18 du chapitre 2 Matériels et Méthodes) a été utilisé, en parallèle de la référence dans une nouvelle étude en cours d'analyse. Cette étude concerne les mêmes patients asthmatiques sévères, qui ont exposés dans leur chambre à coucher ces deux dispositifs de recueil de l'exposome microbien ce printemps 2019. L'utilisation de ce prototype dans cette nouvelle étude clinique permettra de valider (ou non) son utilisation, en comparant les descriptions des communautés microbiennes de l'environnement des patients obtenus par chacun des deux dispositifs. Au-delà de l'investigation méthodologique, le suivi sur deux saisons différentes (hiver 2017 et printemps 2019) de l'exposome microbien des mêmes patients, associé à leur évolution clinique pendant cette période apportera de nouveaux éléments quant au lien entre l'exposome microbien et l'évolution clinique des patients atteints de MRC.

L'étude du myco-microbiote respiratoire vient compléter celle de l'exposome microbien. Elle a fait l'objet d'une étude portant sur des patients atteints d'asthme sévère en lien avec leur exposome, et de patients atteints de mucoviscidose en s'intéressant au dialogue micromycètes-bactéries.

## II. MYCROBIOTE ET MICROBIOTE RESPIRATOIRE DES PATIENTS ATTEINTS DE MRC ET EVOLUTION CLINIQUE

Nos résultats portant sur l'étude du microbiote respiratoire de patients atteints de mucoviscidose ont montré une diminution de la diversité bactérienne basé sur l'indice de Chao1, associée au déclin de la fonction respiratoire mesuré par le VEMS1, en accord avec des données publiées (Delhaes et al. 2012; Zemanick et al. 2013; Botterel et al. 2018). Cependant, dans cette étude, la diversité des communautés fongiques n'était pas modulée en fonction de ce paramètre. Les communautés fongiques ont été identifiées dans l'appareil respiratoire de patients atteints de mucoviscidose comment étant majoritairement transitoires, c'est-à-dire avec une tendance à varier dans le temps. Celles-ci sembleraient moins impactées par l'état de santé du patient que par son exposition environnementale inhérente à l'inhalation de spores (Kramer et al. 2015). Dans notre seconde étude, la diversité du mycobiote et microbiote respiratoire des patients atteints d'asthme sévères n'a pas été associée aux paramètres respiratoires cliniques des patients, en particulier à leur asthme de Type 2 « high » ou Type 2 « low ». Si les études cas/témoins ont révélé une diversité bactérienne plus élevée chez les patients asthmatiques par comparaison avec des individus sains (Huang et al. 2011; Marri et al. 2013), au sein même d'une population asthmatique, qui de plus est composée uniquement de patients avec un asthme sévère, la diversité bactérienne ne semble pas varier en fonction des paramètres spirométriques, en accord avec l'étude portant sur des patients asthmatiques non-sévères et sévères (N. Li et al. 2017). Quant à la diversité des communautés fongiques, très peu d'études s'y sont intéressées. Mais une étude réalisée très récemment à partir de brossages endo bronchiques a mis en évidence une diversité fongique significativement plus faible chez les patients Type 2 « high » (asthme éosinophilique), en comparaison aux patients Type 2 « low » (asthme neutrophilique/inflammation mixte) (Sharma et al. 2019), contrairement à nos résultats. De plus, les analyses d'expressions différentielles à partir de ce même type d'échantillons ont permis de mettre en évidence le genre *Trichoderma* comme plus abondant chez les patients asthmatiques Type 2 « high », et le genre *Penicillium* comme plus abondant chez les patients asthmatiques Type 2 « low » (Sharma et al. 2019). De façon intéressante, le genre *Penicillium* a été identifié dans notre étude sur les patients asthmatiques dans le core fongique (OTU commun entre les sputum et les EDC), mais uniquement pour les expectorations prélevées en cours d'exacerbation.

En s'intéressant aux variations du mycobiote et microbiote respiratoire lors d'un phénomène d'exacerbation, notre étude portant sur les patients atteints de mucoviscidose a révélé une diminution significative des genres *Haemophilus*, *Neisseria* et *Cladosporium* chez les patients en cours d'exacerbation, ainsi qu'une association négative des genres *Haemophilus*, *Pseudomonas*,

*Staphylococcus* et *Streptococcus* à un phénomène d'exacerbation. De précédentes études ont révélé la prédominance de ces genres bactériens dans le microbiote respiratoire de patients atteints de mucoviscidose et la diminution de certains genres dominants au cours d'un phénomène d'exacerbation (Delhaes et al. 2012; Willger et al. 2014; Zemanick et al. 2013; Carmody et al. 2015; Kramer et al. 2015). Ceci témoigne de modifications de la structure des communautés bactériennes dans ce contexte de l'aggravation de l'état respiratoire dans la mucoviscidose (Carmody et al. 2015), en accord avec nos résultats. Les deux genres *Malassezia* et *Aspergillus* sont également retrouvés comme positivement associés au phénomène d'exacerbation, tandis que les genres *Candida*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Scedosporium* ont été négativement associés à ce phénomène, dans notre étude. Si le genre *Aspergillus* a largement été décrit comme impliqué dans l'aggravation de l'évolution clinique des patients, même en l'absence d'aspergillose pulmonaire (Yii et al. 2017), le genre *Malassezia* a été plus récemment identifié comme majoritaire dans le mycobiote de patients atteints de mucoviscidose (Delhaes et al. 2012; Willger et al. 2014; Botterel et al. 2018). De façon intéressante, la levure *Malassezia* a été aussi retrouvée en abondance plus importante dans le mycobiote respiratoire de patients asthmatiques (en comparaison à un groupe contrôle) (van Woerden et al. 2013). Elle est bien connue dans le mycobiote cutané où une association étroite entre pathologie cutanée, production d'IgE contre des allergènes spécifiques de *Malassezia* par exemple dans l'eczéma, et rôle de *Malassezia* dans les exacerbations du psoriasis a été montré (Gaitanis et al. 2012).

Ainsi, ces genres fongiques et bactériens impliqués dans les phénomènes d'exacerbation, en lien avec les interactions négatives ou positives entre micromycètes et bactéries au sein du myco-microbiote respiratoire de patients atteints de mucoviscidose a permis d'incrémenter le modèle écologique « Climax-Attack » déjà décrit dans cette MRC (Conrad et al. 2013) (Figure 10).

En effet, les interactions interrègnes identifiées dans notre étude concernent des associations avec trois principaux genres fongiques : *Candida*, *Aspergillus* et *Scedosporium* ; trois autres impliquent des paires de microorganismes, dont deux concernent des micromycètes de l'environnement (*Romularia* et *Penicillium*). L'environnement et les phénomènes de micro-aspirations de salive peuvent participer à l'exacerbation d'un patient atteint de mucoviscidose (Figure 32, (a)), en favorisant l'émergence de certains microorganismes virulents, correspondant à la population « Attack » dans ce modèle. Les communautés microbiennes retournent ensuite progressivement à leur état stable (avant l'exacerbation), correspondant à la population « Climax » du modèle. Ici, soit le patient retrouve une fonction respiratoire (VEMS1) similaire à celle d'avant l'exacerbation, il s'agit alors de résilience (Figure 32, (b)). Soit, sa fonction respiratoire se dégrade un peu, avec le plus souvent l'émergence d'une nouvelle population « Climax » (différente de la précédente, qui peut voir apparaître une colonisation chronique à *Pseudomonas*, ou à *Scedosporium* par exemple), il s'agit alors d'adaptation (Figure 32,



(b')). Ainsi, cette nouvelle population « Climax » sera composée d'autres microorganismes, en fonction des nouvelles populations « Attack » rencontrées, mais aussi de sa capacité à subir différents filtres (Figure 32, (c)), tels que les modifications d'apport en nutriments, les modifications du pH et de la pression en oxygène, de la réponse immunitaire de l'hôte ou encore des traitements antimicrobiens administrés... Ces filtres participent à sélectionner les microorganismes les plus adaptés à ce nouvel environnement local.

Finalement, le processus d'accumulation dans le temps des phénomènes d'exacerbation chez les patients atteints de mucoviscidose ne permet pas aux communautés microbiennes de retrouver leur structure initiale, mais favorise le changement de communauté « Climax » et participe à la dégradation lente mais régulière dans le temps de la fonction respiratoire des patients (Soret & Vandenberght 2019).

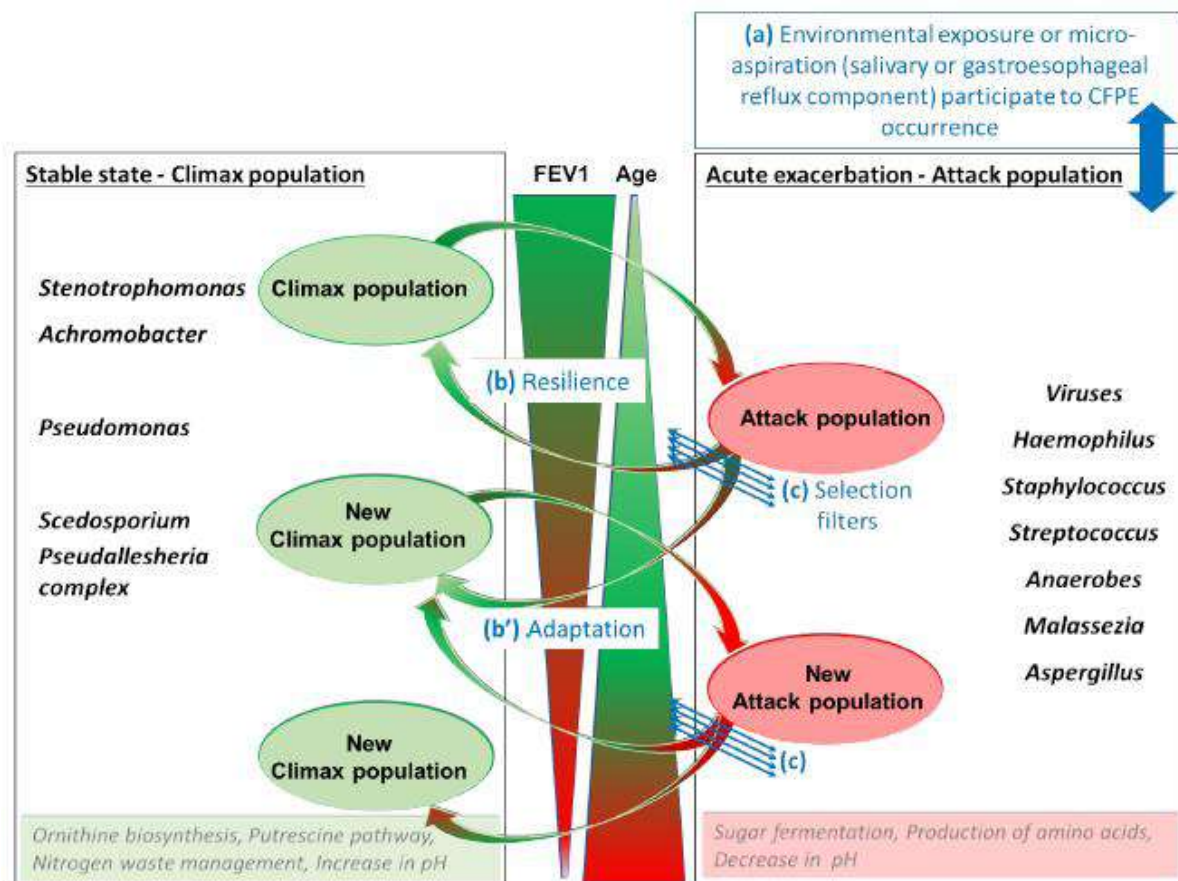


Figure 32 : Adaptation du modèle « Climax-Attack » décrit chez les patients atteints de mucoviscidose à partir de nos résultats (Soret, Vandenberght et al.2019)

Dans l'asthme, aucun modèle écologique permettant d'expliquer la modulation des communautés microbiennes au cours d'exacerbation n'est proposé à ce jour. Néanmoins, notre analyse du mycobiote respiratoire de patients asthmatiques en lien avec son exposome fongique a révélé une proportion significativement plus importante de taxons fongiques communs entre les expectorations des patients

en cours d'exacerbation et leur environnement, qu'avec les expectorations des patients à l'état stable. Ces résultats suggèrent un lien entre exposome fongique et état de santé des patients asthmatiques, discuté à présent dans cette troisième partie.

### III. RELATION ENTRE EXPOSOME MICROBIEN, MYCOBIOTE-MICROBIOTE RESPIRATOIRE ET HOTE

L'exposition microbienne environnementale dans les MRC a été assez peu étudiée chez l'adulte, mais des études ont montré le lien entre l'exposition microbienne pendant l'enfance, voir pendant la grossesse et le développement d'une MRC, telle que l'asthme. Même si les facteurs impliqués sont encore peu compris, le lien semble quant à lui confirmé aujourd'hui par différentes études. L'exposition microbienne diversifiée pendant l'enfance serait associée à une diminution du risque de développer un asthme (Dannemiller et al. 2014; von Mutius 2016; Dannemiller et al. 2016; Karvonen et al. 2019). L'exposome fongique a été plus étudié que l'exposome bactérien, et différentes études décrivent et confirment ses conséquences sur l'altération des fonctions respiratoires (Tham et al. 2019). Notre étude portant sur l'environnement intérieur d'adultes atteints d'asthme sévère a révélé une diversité fongique plus basse dans l'environnement des patients de l'endotype Type 2 « high », en comparaison aux patients de l'endotype Type 2 « low ». De plus, une corrélation positive entre la diminution de la diversité fongique de leur environnement et l'augmentation de leur taux de monoxyde d'azote exhalé (FeNO) lié à leur statut inflammatoire, a été mise en évidence. La diminution de la diversité fongique de l'exposome microbien a été associée à l'augmentation du risque de développer un asthme (Dannemiller et al. 2014). Dans notre étude, la diversité fongique est diminuée chez les patients avec endotype Type 2 « high », et la composition des communautés fongique de l'environnement intérieur est significativement différente en fonction du statut inflammatoire de ces patients, avec un cluster distinct pour les patients en fonction de l'endotype Type 2 « high » et « low ». A l'inverse, la diversité bactérienne est significativement plus élevée chez ces mêmes patients, sans que des différences dans la composition des communautés pour cet endotype soient révélées. Une étude de l'air intérieur chez des enfants asthmatiques a montré qu'une augmentation de la diversité bactérienne était associée à la sévérité de l'asthme (Dannemiller et al. 2016).

De plus, nous avons identifié des genres fongiques et bactériens tels que *Cladosporium*, *Aspergillus* et *Clostridium* comme plus abondants dans l'exposome des patients présentant un taux de FeNO élevé. Les deux genres fongiques *Cladosporium* et *Aspergillus* ont été également retrouvés en concentration plus élevée dans le domicile de patients asthmatiques, l'exposition à ces champignons ayant été

associée à un risque accru de développer des symptômes spécifiques de l'asthme, dont des phénomènes d'exacerbation (Sharpe et al. 2015). Le genre *Cladosporium* retrouvé dans l'environnement a déjà été associé à un taux élevé de FeNO chez des patients atopiques (Sharpe et al. 2015). Dans une étude cas/témoin sur l'exposome bactérien chez des adultes asthmatiques et sains, le genre *Clostridium* a été associé à un effet protecteur vis-à-vis de l'asthme (Pekkanen et al. 2018), tandis qu'il est plus abondant chez les patients avec un taux de FeNO élevé dans notre étude.

D'autres genres tels que *Candida*, *Pseudomonas* et *Sphingomonas*, aussi en abondance plus élevée dans l'exposome des patients asthmatiques sont clairement associés à des pathologies respiratoires en médecine humaine (Pendleton, Huffnagle, et Dickson 2017; Sverrild et al. 2017; Hahn et al. 2018). *Candida* est considéré comme un pathogène opportuniste, souvent identifié dans le tractus respiratoire d'individus sains, pouvant donc faire partie de la flore respiratoire commensale. Il peut aussi jouer un rôle dans la progression de la colonisation, jusqu'à l'infection et pourrait contribuer indirectement au développement d'une MRC, notamment par son association avec le genre bactérien *Pseudomonas* qui doit encore être mieux documentée (Pendleton, Huffnagle, et Dickson 2017). Dans l'asthme, il a été retrouvé en abondance plus élevée dans le microbiote respiratoire (Boutin et al. 2017). Le genre bactérien *Sphingomonas* est quant à lui plus abondant chez des patients asthmatiques et des individus sains présentant un taux d'éosinophiles élevé, en comparaison à des patients asthmatiques avec un taux d'éosinophile plus bas (Sverrild et al. 2017). Au total, ces genres bactériens et fongiques retrouvés en abondance plus élevée dans l'exposome microbien de patients asthmatiques sévères d'endotype Type 2 « high », sont connus pour être fréquemment associés à des pathologies respiratoires et allergiques. Ils ont été identifiés dans le myco-microbiote respiratoire de patients atteints de MRC.

Se concentrant sur l'environnement des patients, nous nous sommes intéressés au « core microbien », c'est-à-dire aux taxons communs entre l'exposome microbien de patients asthmatiques et celui de leur myco-microbiote respiratoire. Le genre *sphingomonas* a été retrouvé dans ce core microbien mais en commun uniquement avec le microbiote respiratoire des patients en cours d'exacerbation. Ce résultat semble venir compléter son abondance plus élevée identifiée chez les patients avec un taux d'éosinophiles élevés (Sverrild et al. 2017) et un taux de FeNO élevé (dans notre étude).

Neuf genres fongiques font également partis du core microbien des patients en cours d'exacerbation. Parmi ces 8 genres fongiques, les genres *Cryptococcus* et *Penicillium* ont été mis en évidence. Le genre *Cryptococcus* a déjà été associé au développement de l'asthme chez des enfants suivis de leur naissance à leur 7 ans (Dannemiller et al. 2014; 2016). Et le genre *Penicillium* a été retrouvé en concentration plus élevée dans le domicile de patients asthmatiques (Sharpe et al. 2015) et dans les

salles des classes ayant un plus grand nombre d'enfants atopiques (Cavaleiro Rufo et al. 2017). Sa présence dans l'exposome fongique de l'environnement intérieur de patients asthmatiques a été associée à un risque accru de développer des symptômes spécifiques de l'asthme, dont des phénomènes d'exacerbation (Sharpe et al. 2015). Finalement, indépendamment de l'état clinique des patients, 4 taxons bactériens et 17 taxons fongiques font partie du core microbien entre l'exposome microbien et leur myco-microbiote respiratoire. Au total, ces résultats révèlent un nombre de genres fongiques bien supérieur au nombre de genres bactériens au sein de l'exposome microbien. Cela illustre l'hypothèse que l'inhalation des spores de champignons n'est pas un événement rare, mais façonne de façon continue le mycobiote respiratoire. Dans le contexte des MRC, cette inhalation a des conséquences directes sur l'état de santé des patients (phénomène inflammatoire, réponse immune, allergique...). Ainsi prendre en considération la composition de l'exposome microbien des patients en lien avec leur myco-microbiote respiratoire pourrait, dans un premier temps, orienter la prise en charge thérapeutique. A plus long terme, le contrôle et la modulation (dans la mesure du possible) de cet exposome microbien pourraient être une mesure de prévention, soit pour éviter le déclenchement d'une MRC, soit pour limiter son aggravation.

# **Chapitre 5**

CONCLUSION

&

PERSPECTIVES

Ainsi, les recherches sur les communautés microbiennes dans le cadre des MRC, tant au niveau respiratoire que dans l'environnement des patients, se sont enrichies de l'utilisation des technologies NGS. Même si des efforts notables de standardisation restent à accomplir par la communauté scientifique, ces recherches s'avèrent aujourd'hui indispensables à une meilleure compréhension de la physiopathologie des MRC, de par l'importance et l'implication des communautés microbiennes dans l'évolution clinique des patients. Au-delà de la description de ces communautés, permettant de compléter les connaissances inhérentes aux colonisations/infections pulmonaires chroniques fréquentes chez les patients atteints de mucoviscidose, la description des associations entre des microorganismes de règnes différents (micromycètes-bactéries) est une voie d'analyse très prometteuse. En effet, l'utilisation de modèles écologiques dans une approche globale, prenant en compte aussi bien les microorganismes de règnes différents que les conditions physiologiques particulières aux MRC, permettrait d'approfondir les connaissances des mécanismes pathologiques de ces maladies chroniques. Après les premières étapes classiques de cultures et identification microbiologiques d'un échantillon biologique, prendre en compte le mycobiote et microbiote respiratoire de patients atteints de MRC pourrait permettre d'adapter le traitement thérapeutique de ces patients, voire d'envisager une approche médicale personnalisée (Figures 33).

Ce deuxième niveau d'analyse, prenant en compte les communautés endogènes respiratoire pourrait être complété par une approche environnementale, intégrant alors les conséquences possibles de l'exposome microbien sur l'état de santé des patients (Figures 33). En effet, le lien révélé entre l'état inflammatoire de patients asthmatiques et leur exposome microbien illustre l'intérêt d'y porter une attention particulière, en considérant l'environnement immédiat de chaque patient, dans une démarche personnalisée. L'étude de l'exposome microbien de patients asthmatiques présentée dans ce manuscrit est actuellement complétée par une nouvelle étude environnementale réalisée chez les mêmes patients mais au printemps (la première avait été réalisée pendant la saison hivernale). Cette étude en cours d'analyse permettra d'intégrer le suivi au long court de l'environnement, en confrontant l'évolution de la diversité de l'exposome microbien à l'évolution clinique des patients, et ainsi de mieux comprendre les facteurs qui contrôlent l'exposome microbien. Ces connaissances pourraient conduire à des recommandations de santé publique pour la prévention de l'asthme.

L'état de santé des patients atteints de MRC n'est pas uniquement façonné par leur exposome microbien et leur mycobiote-microbiote respiratoire, mais d'autres sites, aussi en contact direct (la barrière cutanée) ou indirect (par le microbiote digestif) avec leur environnement semblent être impliqués dans l'évolution clinique des patients. Ainsi, en plus de l'axe poumon-intestin décrit récemment (Budden et al. 2017), l'axe intestin-cerveau joue vraisemblablement un rôle dans l'équilibre microbiotique de l'Homme, de son système immunitaire et donc dans la genèse des MRC. Il

a fait l'objet d'une revue centrée sur le rôle du mycobiotte (Enaud and al. 2019 <https://doi.org/10.3390/microorganisms6010022>).

Finalement, une approche personnalisée dans la description des communautés microbiennes endogènes et exogènes spécifiques à chaque patient associée à une stratégie holistique qui prend en compte les communautés microbiennes des autres sites et l'environnement microbiologique immédiat pourrait être une nouvelle stratégie thérapeutique dans le cadre des MRC.

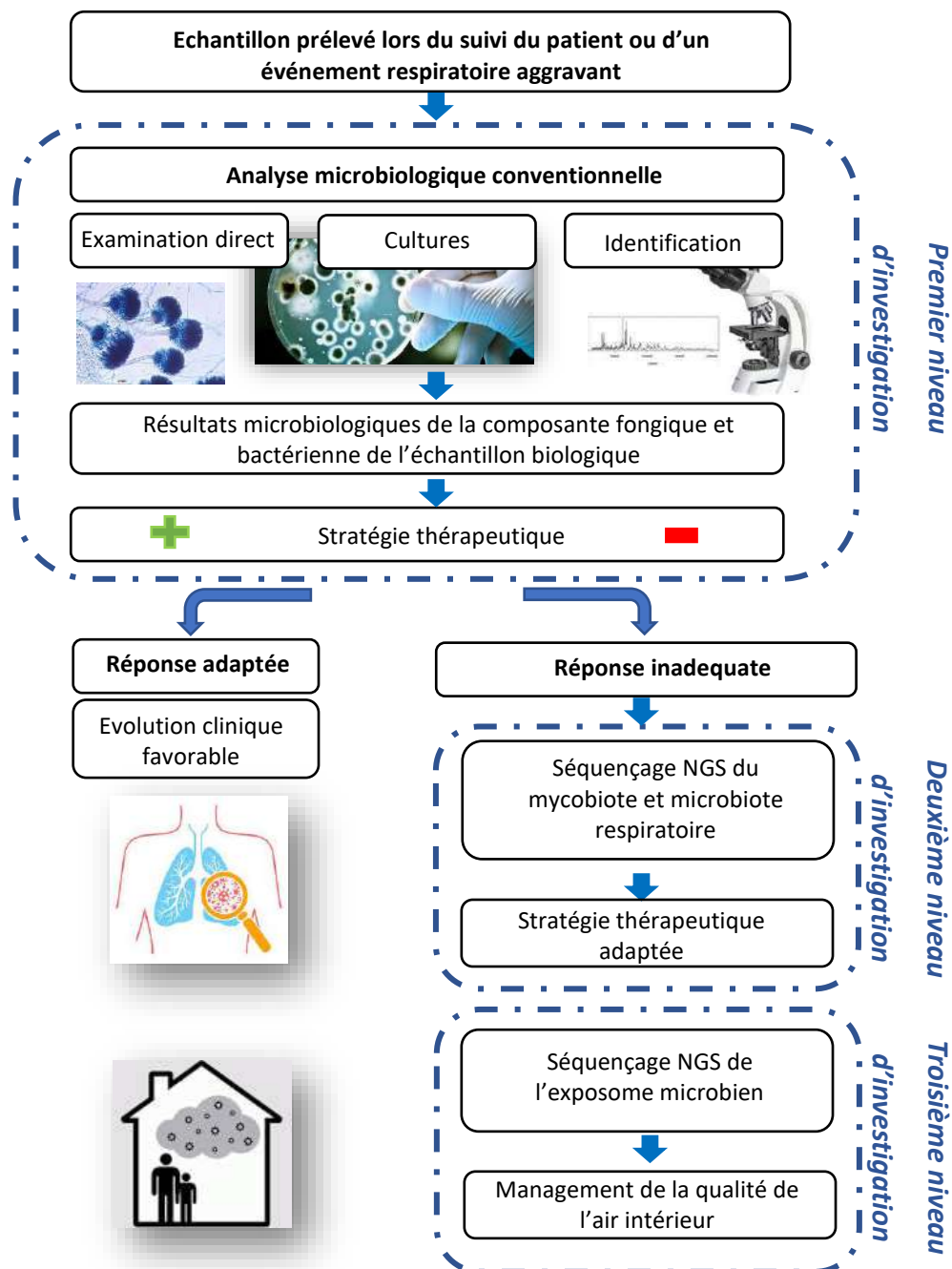


Figure 33 : Schéma récapitulatif inspiré de la revue Vandendorgh et al.2019 (traduction en français).

# **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



- « 2017 Patient Registry Annual Data Report ». 2017, 96.
- Adams, Rachel I., Ashley C. Bateman, Holly M. Bik, et James F. Meadow. 2015. « Microbiota of the indoor environment: a meta-analysis ». *Microbiome* 3 (octobre). <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0108-3>.
- Amin, Reshma, Annie Dupuis, Shawn D. Aaron, et Felix Ratjen. 2010. « The Effect of Chronic Infection with *Aspergillus Fumigatus* on Lung Function and Hospitalization in Patients with Cystic Fibrosis ». *Chest* 137 (1): 171-76. <https://doi.org/10.1378/chest.09-1103>.
- Behzad, Hayedeh, Takashi Gojobori, et Katsuhiko Mineta. 2015. « Challenges and Opportunities of Airborne Metagenomics ». *Genome Biology and Evolution* 7 (5): 1216-26. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv064>.
- Bittinger, Kyle, Emily S Charlson, Elizabeth Loy, David J Shirley, Andrew R Haas, Alice Laughlin, Yanjie Yi, et al. 2014. « Improved characterization of medically relevant fungi in the human respiratory tract using next-generation sequencing ». *Genome Biology* 15 (10). <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0487-y>.
- Botterel, Françoise, Cécile Angebault, Odile Cabaret, Franziska A. Stressmann, Jean-Marc Costa, Frédéric Wallet, Benoit Wallaert, Kenneth Bruce, et Laurence Delhaes. 2018. « Fungal and Bacterial Diversity of Airway Microbiota in Adults with Cystic Fibrosis: Concordance Between Conventional Methods and Ultra-Deep Sequencing, and Their Practical Use in the Clinical Laboratory ». *Mycopathologia* 183 (1): 171-83. <https://doi.org/10.1007/s11046-017-0185-x>.
- Boutin, Sébastien, Martin Depner, Mirjam Stahl, Simon Y. Graeber, Susanne A. Dittrich, Antje Legatzki, Erika von Mutius, Marcus Mall, et Alexander H. Dalpke. 2017. « Comparison of Oropharyngeal Microbiota from Children with Asthma and Cystic Fibrosis ». *Mediators of Inflammation* 2017: 5047403. <https://doi.org/10.1155/2017/5047403>.
- Budden, Kurtis F., Shaan L. Gellatly, David L. A. Wood, Matthew A. Cooper, Mark Morrison, Philip Hugenholtz, et Philip M. Hansbro. 2017. « Emerging Pathogenic Links between Microbiota and the Gut-Lung Axis ». *Nature Reviews. Microbiology* 15 (1): 55-63. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.142>.
- Cabral, João P. S. 2010. « Can We Use Indoor Fungi as Bioindicators of Indoor Air Quality? Historical Perspectives and Open Questions ». *The Science of the Total Environment* 408 (20): 4285–4295. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.005>.
- Caillaud, Denis, Benedicte Leynaert, Marion Keirsbulck, Rachel Nadif, et mould ANSES working group. 2018. « Indoor Mould Exposure, Asthma and Rhinitis: Findings from Systematic Reviews and Recent Longitudinal Studies ». *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society* 27 (148). <https://doi.org/10.1183/16000617.0137-2017>.
- Carmody, Lisa A., Jiangchao Zhao, Linda M. Kalikin, William LeBar, Richard H. Simon, Arvind Venkataraman, Thomas M. Schmidt, Zaid Abdo, Patrick D. Schloss, et John J. LiPuma. 2015. « The Daily Dynamics of Cystic Fibrosis Airway Microbiota during Clinical Stability and at Exacerbation ». *Microbiome* 3: 12. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0074-9>.
- Cavaleiro Rufo, João, Joana Madureira, Inês Paciência, Livia Aguiar, Cristiana Pereira, Diana Silva, Patrícia Padrão, et al. 2017. « Indoor Fungal Diversity in Primary Schools May Differently Influence Allergic Sensitization and Asthma in Children ». *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 28 (4): 332-39. <https://doi.org/10.1111/pai.12704>.
- Caverly, Lindsay J., Junnan Lu, Lisa A. Carmody, Linda M. Kalikin, Kerby Shedden, Kristopher Opron, Michelle Azar, et al. 2019. « Measures of Cystic Fibrosis Airway Microbiota during Periods of Clinical Stability ». *Annals of the American Thoracic Society*, août. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201903-270OC>.
- Chotirmall, Sanjay H., Elaine O'Donoghue, Kathleen Bennett, Cedric Gunaratnam, Shane J. O'Neill, et Noel G. McElvaney. 2010. « Sputum *Candida Albicans* Presages FEV<sub>1</sub> Decline

- and Hospital-Treated Exacerbations in Cystic Fibrosis ». *Chest* 138 (5): 1186-95. <https://doi.org/10.1378/chest.09-2996>.
- Chung, Kian F. 2018. « Precision Medicine in Asthma: Linking Phenotypes to Targeted Treatments ». *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 24 (1): 4-10. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000434>.
- Chung, Kian Fan, Sally E. Wenzel, Jan L. Brozek, Andrew Bush, Mario Castro, Peter J. Sterk, Ian M. Adcock, et al. 2014. « International ERS/ATS Guidelines on Definition, Evaluation and Treatment of Severe Asthma ». *The European Respiratory Journal* 43 (2): 343-73. <https://doi.org/10.1183/09031936.00202013>.
- Connett, GJ. 2019. « Lumacaftor-ivacaftor in the treatment of cystic fibrosis: design, development and place in therapy ». *Drug Design, Development and Therapy* 13 (juillet): 2405-12. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S153719>.
- Conrad, Douglas, Matthew Haynes, Peter Salamon, Paul B. Rainey, Merry Youle, et Forest Rohwer. 2013. « Cystic Fibrosis Therapy: A Community Ecology Perspective ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 48 (2): 150–156. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0059PS>.
- Cox, Michael J., Markus J. Ege, et Erika von Mutius. 2019. *The Lung Microbiome*. Vol. 83. European Respiratory Society. <https://doi.org/10.1183/2312508X.erm8319>.
- Cui, Lijia, Lorrie Lucht, Laura Tipton, Matthew B. Rogers, Adam Fitch, Cathy Kessinger, Danielle Camp, et al. 2015. « Topographic Diversity of the Respiratory Tract Mycobion and Alteration in HIV and Lung Disease ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 191 (8): 932–942. <https://doi.org/10.1164/rccm.201409-1583OC>.
- Dannemiller, Karen C., Janneane F. Gent, Brian P. Leaderer, et Jordan Peccia. 2016. « Indoor Microbial Communities: Influence on Asthma Severity in Atopic and Nonatopic Children ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138 (1): 76-83.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.11.027>.
- Dannemiller, Karen C., Mark J. Mendell, Janet M. Macher, Kazukiyo Kumagai, Asa Bradman, Nina Holland, Kim Harley, Brenda Eskenazi, et Jordan Peccia. 2014. « Next-generation DNA sequencing reveals that low fungal diversity in house dust is associated with childhood asthma development ». *Indoor air* 24 (3): 236–247.
- De Boeck, Kris, Francois Vermeulen, et Lieven Dupont. 2017. « The Diagnosis of Cystic Fibrosis ». *Presse Medicale (Paris, France: 1983)* 46 (6 Pt 2): e97-108. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2017.04.010>.
- De Filippis, Francesca, Manolo Laiola, Giuseppe Blaiotta, et Danilo Ercolini. 2017. « Different Amplicon Targets for Sequencing-Based Studies of Fungal Diversity ». *Applied and Environmental Microbiology*, juin. <https://doi.org/10.1128/AEM.00905-17>.
- Delhaes, Laurence, Sébastien Monchy, Emilie Fréalle, Christine Hubans, Julia Salleron, Sylvie Leroy, Anne Prevotat, et al. 2012. « The Airway Microbiota in Cystic Fibrosis: A Complex Fungal and Bacterial Community—Implications for Therapeutic Management ». *PloS One* 7 (4): e36313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036313>.
- Di Cicco, Maria, Mauro Pistello, Tiago Jacinto, Vincenzo Ragazzo, Martina Piras, Giulia Freer, Massimo Pifferi, et Diego Peroni. 2018. « Does Lung Microbiome Play a Causal or Casual Role in Asthma? ». *Pediatric Pulmonology* 53 (10): 1340-45. <https://doi.org/10.1002/ppul.24086>.
- Dickson, Robert P., John R. Erb-Downward, Fernando J. Martinez, et Gary B. Huffnagle. 2016. « The Microbiome and the Respiratory Tract ». *Annual Review of Physiology* 78 (février): 481. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105238>.
- Dickson, Robert P., et Gary B. Huffnagle. 2015. « The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease ». *PLoS Pathogens* 11 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004923>.

- Eduard, Wijnand. 2009. « Fungal Spores: A Critical Review of the Toxicological and Epidemiological Evidence as a Basis for Occupational Exposure Limit Setting ». *Critical Reviews in Toxicology* 39 (10): 799–864. <https://doi.org/10.3109/10408440903307333>.
- Fajac, Isabelle, et Kris De Boeck. 2017. « New horizons for cystic fibrosis treatment ». *Pharmacology & Therapeutics* 170 (février): 205-11. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.11.009>.
- Fourie, Ruan, et Carolina H. Pohl. 2019. « Beyond Antagonism: The Interaction Between Candida Species and Pseudomonas Aeruginosa ». *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)* 5 (2). <https://doi.org/10.3390/jof5020034>.
- Fraczek, Marcin G., Livingstone Chishimba, Rob M. Niven, Mike Bromley, Angela Simpson, Lucy Smyth, David W. Denning, et Paul Bowyer. 2018. « Corticosteroid Treatment Is Associated with Increased Filamentous Fungal Burden in Allergic Fungal Disease ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 142 (2): 407-14. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.09.039>.
- Gaitanis, Georgios, Prokopios Magiatis, Markus Hantschke, Ioannis D. Bassukas, et Aristeia Velegraki. 2012. « The Malassezia Genus in Skin and Systemic Diseases ». *Clinical Microbiology Reviews* 25 (1): 106-41. <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-11>.
- Gangneux, Jean-Pierre, H el ene Guegan, Louise-Eva Vandenberght, Sylvie Buffet-Bataillon, Raphael Enaud, Laurence Delhaes, et ECMM-ESCMID NGS study group. 2019. « A European ECMM-ESCMID Survey on Goals and Practices for Mycobiota Characterization Using Next Generation Sequencing ». *Mycoses*, septembre. <https://doi.org/10.1111/myc.12999>.
- Ga uz ere, Carole, Jean-Jacques Godon, H el ene Blanquart, Stéphanie Ferreira, Stéphane Moularat, Enric Robine, et Marina Moletta-Denat. 2014. « ‘Core species’ in three sources of indoor air belonging to the human micro-environment to the exclusion of outdoor air ». *Science of The Total Environment* 485-486 (juillet): 508-17. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.117>.
- GINA annual report. s. d. « <http://ginasthma.org/archived-reports/> ».
- Gow, Neil A. R., Jean-Paul Latge, et Carol A. Munro. 2017. « The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function ». *Microbiology Spectrum* 5 (3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>.
- Hahn, Andrea, Stephanie Warnken, Marcos Pérez-Losada, Robert J. Freishtat, et Keith A. Crandall. 2018. « Microbial diversity within the airway microbiome in chronic pediatric lung diseases ». *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 63 (septembre): 316-25. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.12.006>.
- Haiko, Johanna, Baharak Saeedi, Gabriella Bagger, Ferenc Karpati, et Volkan  zenci. 2019. « Coexistence of Candida Species and Bacteria in Patients with Cystic Fibrosis ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 38 (6): 1071-77. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03493-3>.
- Halwachs, Bettina, Nandhitha Madhusudhan, Robert Krause, R. Henrik Nilsson, Christine Moissl-Eichinger, Christoph H ogenauer, Gerhard G. Thallinger, et Gregor Gorkiewicz. 2017. « Critical Issues in Mycobiota Analysis ». *Frontiers in Microbiology* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00180>.
- Harrington, Colleen T., Elaine I. Lin, Matthew T. Olson, et James R. Eshleman. 2013. « Fundamentals of Pyrosequencing ». *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 137 (9): 1296-1303. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0463-RA>.
- Hirose, Masahiro, et Takahiko Horiguchi. 2017. « Asthma phenotypes ». *Journal of General and Family Medicine* 18 (5): 189-94. <https://doi.org/10.1002/jgf2.7>.
- Hoggard, Michael, Anna Vesty, Giselle Wong, Johanna M. Montgomery, Chantelle Fourie, Richard G. Douglas, Kristi Biswas, et Michael W. Taylor. 2018. « Characterizing the Human

- Mycobiota: A Comparison of Small Subunit RRNA, ITS1, ITS2, and Large Subunit RRNA Genomic Targets ». *Frontiers in Microbiology* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02208>.
- Huang, Yvonne J., et John J. LiPuma. 2016. « The Microbiome in Cystic Fibrosis ». *Clinics in Chest Medicine* 37 (1): 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2015.10.003>.
- Huang, Yvonne J., Snehal Nariya, Jeffrey M. Harris, Susan V. Lynch, David F. Choy, Joseph R. Arron, et Homer Boushey. 2015. « The Airway Microbiome in Patients with Severe Asthma: Associations with Disease Features and Severity ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 136 (4): 874-84. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.05.044>.
- Huang, Yvonne J., Craig E. Nelson, Eoin L. Brodie, Todd Z. Desantis, Marshall S. Baek, Jane Liu, Tanja Woyke, et al. 2011. « Airway Microbiota and Bronchial Hyperresponsiveness in Patients with Suboptimally Controlled Asthma ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127 (2): 372-381.e1-3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.048>.
- Irinyi, Laszlo, Carolina Serena, Dea Garcia-Hermoso, Michael Arabatzis, Marie Desnos-Ollivier, Duong Vu, Gianluigi Cardinali, et al. 2015. « International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS Reference DNA Barcoding Database—the Quality Controlled Standard Tool for Routine Identification of Human and Animal Pathogenic Fungi ». *Medical Mycology* 53 (4): 313–337. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv008>.
- Jayaprakash, Balamuralikrishna, Rachel I. Adams, Pirkka Kirjavainen, Anne Karvonen, Asko Vepsäläinen, Maria Valkonen, Kati Järvi, et al. 2017. « Indoor microbiota in severely moisture damaged homes and the impact of interventions ». *Microbiome* 5 (octobre). <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0356-5>.
- Karvonen, Anne M., Pirkka V. Kirjavainen, Martin Täubel, Balamuralikrishna Jayaprakash, Rachel I. Adams, Joanne E. Sordillo, Diane R. Gold, et al. 2019. « Indoor Bacterial Microbiota and the Development of Asthma by 10.5 Years of Age ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, août. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.07.035>.
- Katsoulis, Konstantinos, Georgios Ismailos, Maria Kipourou, et Konstantinos Kostikas. 2019. « Microbiota and Asthma: Clinical Implications ». *Respiratory Medicine* 146 (janvier): 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2018.11.016>.
- Kirjavainen, Pirkka V., Anne M. Karvonen, Rachel I. Adams, Martin Täubel, Marjut Roponen, Pauli Tuoresmäki, Georg Loss, et al. 2019. « Farm-like Indoor Microbiota in Non-Farm Homes Protects Children from Asthma Development ». *Nature Medicine* 25 (7): 1089-95. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0469-4>.
- Klinger-Strobel, Mareike, Christian Lautenschläger, Dagmar Fischer, Jochen G. Mainz, Tony Bruns, Lorena Tuchscher, Mathias W. Pletz, et Oliwia Makarewicz. 2015. « Aspects of Pulmonary Drug Delivery Strategies for Infections in Cystic Fibrosis--Where Do We Stand? » *Expert Opinion on Drug Delivery* 12 (8): 1351-74. <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.1007949>.
- Korpelainen, Helena, et Maria Pietiläinen. 2017. « Diversity of Indoor Fungi as Revealed by DNA Metabarcoding ». *Genome* 60 (1): 55–64. <https://doi.org/10.1139/gen-2015-0191>.
- Kramer, Rolf, Annette Sauer-Heilborn, Tobias Welte, Carlos A. Guzman, Wolf-Rainer Abraham, et Manfred G. Höfle. 2015. « Cohort Study of Airway Mycobiome in Adult Cystic Fibrosis Patients: Differences in Community Structure between Fungi and Bacteria Reveal Predominance of Transient Fungal Elements ». *Journal of Clinical Microbiology* 53 (9): 2900–2907. <https://doi.org/10.1128/JCM.01094-15>.
- Krüger, Wibke, Sarah Vielreicher, Mario Kapitan, Ilse D. Jacobsen, et Maria Joanna Niemiec. 2019. « Fungal-Bacterial Interactions in Health and Disease ». *Pathogens* 8 (2). <https://doi.org/10.3390/pathogens8020070>.
- Kuruvilla, Merin E., F. Eun-Hyung Lee, et Gerald B. Lee. 2019. « Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease ». *Clinical reviews in allergy & immunology* 56 (2): 219-33. <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8712-1>.

- Leppänen, Hanna K., Martin Täubel, Balamuralikrishna Jayaprakash, Asko Vepsäläinen, Pertti Pasanen, et Anne Hyvärinen. 2018. « Quantitative Assessment of Microbes from Samples of Indoor Air and Dust ». *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* 28 (3): 231-41. <https://doi.org/10.1038/jes.2017.24>.
- Li, Naijian, Rihuang Qiu, Zhaowei Yang, Jing Li, Kian Fan Chung, Nanshan Zhong, et Qingling Zhang. 2017. « Sputum Microbiota in Severe Asthma Patients: Relationship to Eosinophilic Inflammation ». *Respiratory Medicine* 131: 192-98. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2017.08.016>.
- Li, Shuzhen, Ye Deng, Zhujun Wang, Zhaojing Zhang, Xiao Kong, Wenjun Zhou, Yanyun Yi, et Yuanyuan Qu. 2019. « Exploring the Accuracy of Amplicon-Based Internal Transcribed Spacer (ITS) Markers for Fungal Community ». *Molecular Ecology Resources*, octobre. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13097>.
- Lindahl, Björn D, R Henrik Nilsson, Leho Tedersoo, Kessy Abarenkov, Tor Carlsen, Rasmus Kjølner, Urmas Kõljalg, et al. 2013. « Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers – a user’s guide ». *The New Phytologist* 199 (1): 288–299. <https://doi.org/10.1111/nph.12243>.
- Loss, Georg J., Martin Depner, Alexander J. Hose, Jon Genuneit, Anne M. Karvonen, Anne Hyvärinen, Caroline Roduit, et al. 2016. « The Early Development of Wheeze. Environmental Determinants and Genetic Susceptibility at 17q21 ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 193 (8): 889-97. <https://doi.org/10.1164/rccm.201507-1493OC>.
- Marri, Pradeep Reddy, Debra A. Stern, Anne L. Wright, Dean Billheimer, et Fernando D. Martinez. 2013. « Asthma-Associated Differences in Microbial Composition of Induced Sputum ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131 (2): 346-352.e1-3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.11.013>.
- Martinez, Fernando D. 2019. « The State of Asthma Research: Considerable Advances, but Still a Long Way to Go ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 199 (4): 397-99. <https://doi.org/10.1164/rccm.201901-0013ED>.
- Masoli, Matthew, Denise Fabian, Shaun Holt, Richard Beasley, et Global Initiative for Asthma (GINA) Program. 2004. « The Global Burden of Asthma: Executive Summary of the GINA Dissemination Committee Report ». *Allergy* 59 (5): 469-78. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2004.00526.x>.
- Mathieu, Elliot, Unai Escribano-Vazquez, Delphyne Descamps, Claire Cherbuy, Philippe Langella, Sabine Riffault, Aude Remot, et Muriel Thomas. 2018. « Paradigms of Lung Microbiota Functions in Health and Disease, Particularly, in Asthma ». *Frontiers in Physiology* 9 (août). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01168>.
- Miletto, Marzia, et Steven E. Lindow. 2015. « Relative and contextual contribution of different sources to the composition and abundance of indoor air bacteria in residences ». *Microbiome* 3 (décembre). <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0128-z>.
- Mirtajani, SB, P Farnia, et M Hassanzad. 2017. « Geographical distribution of cystic fibrosis; The past 70 years of data analysis ». 2017. <http://www.bmbtrj.org/article.asp?issn=2588-9834;year=2017;volume=1;issue=2;spage=105;epage=112;aulast=Mirtajani>.
- Miskoff, Jeffrey A, Asa Dewan, et Moiuz Chaudhri. 2019. « Fractional Exhaled Nitric Oxide Testing: Diagnostic Utility in Asthma, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, or Asthma-Chronic Obstructive Pulmonary Disease Overlap Syndrome ». *Cureus*, juin. <https://doi.org/10.7759/cureus.4864>.
- Mutius, Erika von. 2016. « The Microbial Environment and Its Influence on Asthma Prevention in Early Life ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 137 (3): 680-89. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.12.1301>.
- Netgen, JM. 2011. « La mucoviscidose, un paradigme pour la médecine actuelle ». *Revue Médicale Suisse*. 2011. <https://www.revmed.ch/RMS/2011/RMS-290/La-mucoviscidose-un-paradigme-pour-la-medecine-actuelle>.

- Nevalainen, A., M. Täubel, et A. Hyvärinen. 2015. « Indoor Fungi: Companions and Contaminants ». *Indoor Air* 25 (2): 125–156. <https://doi.org/10.1111/ina.12182>.
- Nguyen, Linh D. N., Eric Viscogliosi, et Laurence Delhaes. 2015. « The lung mycobiome: an emerging field of the human respiratory microbiome ». *Frontiers in Microbiology* 6 (février). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00089>.
- Nguyen, Linh Do Ngoc, Pieter Deschaght, Sophie Merlin, Alexandre Loywick, Christophe Audebert, Sabine Van Daele, Eric Viscogliosi, Mario Vanechoutte, et Laurence Delhaes. 2016. « Effects of Propidium Monoazide (PMA) Treatment on Mycobiome and Bacteriome Analysis of Cystic Fibrosis Airways during Exacerbation ». *PLoS ONE* 11 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168860>.
- Nogueira, Filomena, Shirin Sharghi, Karl Kuchler, et Thomas Lion. 2019. « Pathogenetic Impact of Bacterial–Fungal Interactions ». *Microorganisms* 7 (10): 459. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100459>.
- Normand, Anne-Cécile, Stéphane Ranque, Carole Cassagne, Jean Gaudart, Kankoé Sallah, Denis-André Charpin, et Renaud Piarroux. 2016. « Comparison of Air Impaction and Electrostatic Dust Collector Sampling Methods to Assess Airborne Fungal Contamination in Public Buildings ». *The Annals of Occupational Hygiene* 60 (2): 161–175. <https://doi.org/10.1093/annhyg/mev075>.
- Oriano, Martina, Leonardo Terranova, Antonio Teri, Samantha Sottotetti, Luca Ruggiero, Camilla Tafuro, Paola Marchisio, et al. 2019. « Comparison of Different Conditions for DNA Extraction in Sputum - a Pilot Study ». *Multidisciplinary Respiratory Medicine* 14: 6. <https://doi.org/10.1186/s40248-018-0166-z>.
- Pavord, Ian D., Richard Beasley, Alvar Agusti, Gary P. Anderson, Elisabeth Bel, Guy Brusselle, Paul Cullinan, et al. 2018. « After Asthma: Redefining Airways Diseases ». *Lancet (London, England)* 391 (10118): 350-400. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30879-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30879-6).
- Peay, Kabir G., Peter G. Kennedy, et Jennifer M. Talbot. 2016. « Dimensions of Biodiversity in the Earth Mycobiome ». *Nature Reviews. Microbiology* 14 (7): 434–447. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.59>.
- Pekkanen, Juha, Maria Valkonen, Martin Täubel, Christina Tischer, Hanna Leppänen, Päivi M. Kärkkäinen, Helena Rintala, et al. 2018. « Indoor Bacteria and Asthma in Adults: A Multicentre Case-Control Study within ECRHS II ». *The European Respiratory Journal* 51 (2). <https://doi.org/10.1183/13993003.01241-2017>.
- Pendleton, Kathryn M, Gary B Huffnagle, et Robert P Dickson. 2017. « The significance of *Candida* in the human respiratory tract: our evolving understanding ». *Pathogens and Disease* 75 (3). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx029>.
- Pricope, D., E. Deneuville, S. Frain, S. Chevrier, S. Belaz, M. Roussey, et J.-P. Gangneux. 2015. « Exposition domiciliaire aux moisissures : quel impact sur le statut aspergillaire du patient atteint de mucoviscidose ? ». *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology* 25 (2): 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.03.005>.
- Quinn, Robert A., Katrine Whiteson, Yan-Wei Lim, Peter Salamon, Barbara Bailey, Simone Mienardi, Savannah E. Sanchez, Don Blake, Doug Conrad, et Forest Rohwer. 2015. « A Winogradsky-Based Culture System Shows an Association between Microbial Fermentation and Cystic Fibrosis Exacerbation ». *The ISME Journal* 9 (4): 1024-38. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.234>.
- Rafeeq, Misbahuddin M., et Hussam Aly Sayed Murad. 2017. « Cystic Fibrosis: Current Therapeutic Targets and Future Approaches ». *Journal of Translational Medicine* 15 (1): 84. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1193-9>.
- Reboux, Gabriel, Steffi Rocchi, Audrey Laboissière, Habiba Ammari, Martine Bochaton, Guillaume Gardin, Jean-Marc Rame, et Laurence Millon. 2019. « Survey of 1012 Moldy Dwellings by Culture Fungal Analysis: Threshold Proposal for Asthmatic Patient Management ». *Indoor Air* 29 (1): 5-16. <https://doi.org/10.1111/ina.12516>.

- « Reports GINA ». 2019. *Global Initiative for Asthma - GINA* (blog). 2019. <https://ginasthma.org/reports/>.
- Richardson, Miles, Neil Gottel, Jack A. Gilbert, Julian Gordon, Prasanthi Gandhi, Rachel Reboulet, et Jarrad T. Hampton-Marcell. 2019. « Concurrent measurement of microbiome and allergens in the air of bedrooms of allergy disease patients in the Chicago area ». *Microbiome* 7 (juin). <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0695-5>.
- Rocchi, Steffi, Bénédicte Richaud-Thiriez, Coralie Barrera, Frédéric Grenouillet, Jean-Charles Dalphin, Laurence Millon, et Gabriel Reboux. 2015. « Evaluation of Mold Exposure in Cystic Fibrosis Patients' Dwellings and Allergic Bronchopulmonary Risk ». *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society* 14 (2): 242–247. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.01.003>.
- Rocchi, Steffi, Benoit Valot, Gabriel Reboux, et Laurence Millon. 2017. « DNA Metabarcoding to Assess Indoor Fungal Communities: Electrostatic Dust Collectors and Illumina Sequencing ». *Journal of Microbiological Methods* 139 (août): 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.05.014>.
- Rosenbaum, Jennifer, Mykhaylo Usyk, Zigui Chen, Christine P. Zolnik, Heidi E. Jones, Levi Waldron, Jennifer B. Dowd, Lorna E. Thorpe, et Robert D. Burk. 2019. « Evaluation of Oral Cavity DNA Extraction Methods on Bacterial and Fungal Microbiota ». *Scientific Reports* 9 (février). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38049-6>.
- Rush, Stephen T., Christine H. Lee, Washington Mio, et Peter T. Kim. 2016. « The Phylogenetic LASSO and the Microbiome ». *arXiv:1607.08877 [q-bio, stat]*, juillet. <http://arxiv.org/abs/1607.08877>.
- Sanders, Don B., et Aliza Fink. 2016. « Background and Epidemiology ». *Pediatric clinics of North America* 63 (4): 567-84. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2016.04.001>.
- Scherer, Emeline, Steffi Rocchi, Gabriel Reboux, Stéphanie Vandentorren, Sandrine Roussel, Mallory Vacheyrou, Chantal Raheison, et Laurence Millon. 2014. « QPCR Standard Operating Procedure for Measuring Microorganisms in Dust from Dwellings in Large Cohort Studies ». *The Science of the Total Environment* 466-467 (janvier): 716-24. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.054>.
- Schleich, F., et R. Louis. 2012. « Intérêt de la mesure de l'inflammation en clinique dans l'asthme ». *EMC - Pneumologie* 9 (3): 1-10. [https://doi.org/10.1016/S1155-195X\(12\)60032-2](https://doi.org/10.1016/S1155-195X(12)60032-2).
- Shan, Yifan, Weidong Wu, Wei Fan, Tari Haahtela, et Guicheng Zhang. 2019. « House Dust Microbiome and Human Health Risks ». *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, janvier. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00057-5>.
- Sharma, Anukriti, et Jack A. Gilbert. 2018. « Microbial Exposure and Human Health ». *Current Opinion in Microbiology* 44: 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.08.003>.
- Sharma, Anukriti, Bharathi Laxman, Edward T. Naureckas, D. Kyle Hogarth, Anne I. Sperling, Julian Solway, Carole Ober, Jack A. Gilbert, et Steven R. White. 2019. « Associations between Fungal and Bacterial Microbiota of Airways and Asthma Endotypes ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, juillet. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.06.025>.
- Sharpe, Richard A., Nick Bearman, Christopher R. Thornton, Kerryn Husk, et Nicholas J. Osborne. 2015. « Indoor Fungal Diversity and Asthma: A Meta-Analysis and Systematic Review of Risk Factors ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135 (1): 110-22. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.002>.
- Shendure, Jay, et Hanlee Ji. 2008. « Next-Generation DNA Sequencing ». *Nature Biotechnology* 26 (10): 1135-45. <https://doi.org/10.1038/nbt1486>.
- Shin, Su-Kyoung, Jinman Kim, Sung-min Ha, Hyun-Seok Oh, Jongsik Chun, Jongryeul Sohn, et Hana Yi. 2015. « Metagenomic Insights into the Bioaerosols in the Indoor and Outdoor Environments of Childcare Facilities ». *PLoS ONE* 10 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126960>.

- Sullivan, Ashley, Eoin Hunt, John MacSharry, et Desmond M. Murphy. 2016. « “The Microbiome and the Pathophysiology of Asthma” ». *Respiratory Research* 17 (1): 163. <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0479-4>.
- Sverrild, Asger, Pia Kiilerich, Asker Brejnrod, Rebecca Pedersen, Celeste Porsbjerg, Anders Bergqvist, Jonas S. Erjefält, Karsten Kristiansen, et Vibeke Backer. 2017. « Eosinophilic Airway Inflammation in Asthmatic Patients Is Associated with an Altered Airway Microbiome ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 140 (2): 407-417.e11. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.10.046>.
- Tang, Jie, Iliyan D. Iliev, Jordan Brown, David M. Underhill, et Vincent A. Funari. 2015. « Mycobiome: Approaches to Analysis of Intestinal Fungi ». *Journal of immunological methods* 421 (juin): 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.04.004>.
- Tham, Rachel, Bircan Erbas, Shyamali C. Dharmage, Mimi Lk Tang, Fahad Aldakheel, Caroline J. Lodge, Paul S. Thomas, Philip E. Taylor, Michael J. Abramson, et Adrian J. Lowe. 2019. « Outdoor Fungal Spores and Acute Respiratory Effects in Vulnerable Individuals ». *Environmental Research* 178 (août): 108675. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108675>.
- Tipton, Laura, Elodie Ghedin, et Alison Morris. 2017. « The Lung Mycobiome in the Next-Generation Sequencing Era ». *Virulence* 8 (3): 334–341. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1235671>.
- Tonge, Daniel P., Catherine H. Pashley, et Timothy W. Gant. 2014. « Amplicon –Based Metagenomic Analysis of Mixed Fungal Samples Using Proton Release Amplicon Sequencing ». *PLoS ONE* 9 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093849>.
- Underhill, David M., et Iliyan D. Iliev. 2014. « The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system ». *Nature reviews. Immunology* 14 (6): 405–416. <https://doi.org/10.1038/nri3684>.
- Venkataraman, Arvind, Christine M. Bassis, James M. Beck, Vincent B. Young, Jeffrey L. Curtis, Gary B. Huffnagle, et Thomas M. Schmidt. 2015. « Application of a Neutral Community Model To Assess Structuring of the Human Lung Microbiome ». *mBio* 6 (1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02284-14>.
- Vesty, Anna, Kristi Biswas, Michael W. Taylor, Kim Gear, et Richard G. Douglas. 2017. « Evaluating the Impact of DNA Extraction Method on the Representation of Human Oral Bacterial and Fungal Communities ». *PloS One* 12 (1): e0169877. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169877>.
- Whiteson, Katrine L., Barbara Bailey, Megan Bergkessel, Douglas Conrad, Laurence Delhaes, Ben Felts, J. Kirk Harris, et al. 2014. « The Upper Respiratory Tract as a Microbial Source for Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis. Parallels from Island Biogeography ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 189 (11): 1309–1315. <https://doi.org/10.1164/rccm.201312-2129PP>.
- Whiteson, Katrine L., Simone Meinardi, Yan Wei Lim, Robert Schmieder, Heather Maughan, Robert Quinn, Donald R. Blake, Douglas Conrad, et Forest Rohwer. 2014. « Breath Gas Metabolites and Bacterial Metagenomes from Cystic Fibrosis Airways Indicate Active PH Neutral 2,3-Butanedione Fermentation ». *The ISME Journal* 8 (6): 1247-58. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.229>.
- « WHO | Integrated chronic disease prevention and control ». s. d. WHO. Consulté le 24 septembre 2019. [https://www.who.int/chp/about/integrated\\_cd/en/](https://www.who.int/chp/about/integrated_cd/en/).
- Wild, Christopher P., Augustin Scalbert, et Zdenko Herceg. 2013. « Measuring the Exposome: A Powerful Basis for Evaluating Environmental Exposures and Cancer Risk ». *Environmental and Molecular Mutagenesis* 54 (7): 480-99. <https://doi.org/10.1002/em.21777>.
- Wild, Christopher Paul. 2012. « The Exposome: From Concept to Utility ». *International Journal of Epidemiology* 41 (1): 24-32. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr236>.
- Willger, Sven D., Sharon L. Grim, Emily L. Dolben, Anna Shipunova, Thomas H. Hampton, Hilary G. Morrison, Laura M. Filkins, et al. 2014. « Characterization and Quantification of the



- Fungal Microbiome in Serial Samples from Individuals with Cystic Fibrosis ». *Microbiome* 2: 40. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-40>.
- Woerden, Hugo Cornelis van, Clive Gregory, Richard Brown, Julian Roberto Marchesi, Bastiaan Hoogendoorn, et Ian Price Matthews. 2013. « Differences in fungi present in induced sputum samples from asthma patients and non-atopic controls: a community based case control study ». *BMC Infectious Diseases* 13 (février): 69. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-69>.
- Wypych, Tomasz P., Lakshanie C. Wickramasinghe, et Benjamin J. Marsland. 2019. « The Influence of the Microbiome on Respiratory Health ». *Nature Immunology*, septembre, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0451-9>.
- Xu, Jianping. 2016. « Fungal DNA Barcoding ». *Genome* 59 (11): 913-32. <https://doi.org/10.1139/gen-2016-0046>.
- Yarza, Pablo, Pelin Yilmaz, Katrin Panzer, Frank Oliver Glöckner, et Marlis Reich. 2017. « A phylogenetic framework for the kingdom Fungi based on 18S rRNA gene sequences ». *Marine Genomics, Navigating the Future: Cross-sector Marine Genomics*, 36 (décembre): 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2017.05.009>.
- Yashiro, Erika, Dessislava Savova-Bianchi, et Héléne Niculita-Hirzel. 2019. « Major Differences in the Diversity of Mycobiomes Associated with Wheat Processing and Domestic Environments: Significant Findings from High-Throughput Sequencing of Fungal Barcode ITS1 ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16 (13). <https://doi.org/10.3390/ijerph16132335>.
- Yii, Anthony Ca, Mariko S. Koh, Therese S. Lapperre, Gan L. Tan, et Sanjay H. Chotirmall. 2017. « The Emergence of Aspergillus Species in Chronic Respiratory Disease ». *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)* 9: 127-38.
- Zemanick, Edith T., J. Kirk Harris, Brandie D. Wagner, Charles E. Robertson, Scott D. Sagel, Mark J. Stevens, Frank J. Accurso, et Theresa A. Laguna. 2013. « Inflammation and Airway Microbiota during Cystic Fibrosis Pulmonary Exacerbations ». *PloS One* 8 (4): e62917. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062917>.
- Zhao, Jiangchao, Patrick D. Schloss, Linda M. Kalikin, Lisa A. Carmody, Bridget K. Foster, Joseph F. Petrosino, James D. Cavalcoli, et al. 2012. « Decade-Long Bacterial Community Dynamics in Cystic Fibrosis Airways ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (15): 5809-14. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120577109>.
- Zoll, Jan, Eveline Snelders, Paul E. Verweij, et Willem J. G. Melchers. 2016. « Next-Generation Sequencing in the Mycology Lab ». *Current Fungal Infection Reports* 10: 37-42. <https://doi.org/10.1007/s12281-016-0253-6>.

# **ANNEXES**

# **ANNEXE 1**

# A metagenomic and whole genome sequencing comparative approach to study the impact of azole therapy on chronic colonization with *Aspergillus fumigatus* during cystic fibrosis

JP Gangneux<sup>a\*</sup>, LE Vandenberght<sup>b</sup>, B Bidon<sup>c</sup>, C. Belleguic<sup>d</sup>, E Deneuille<sup>e</sup>, H Guegan<sup>f</sup>, S Leroy<sup>g</sup>, B Laviolle<sup>h</sup>, A Horsley<sup>e</sup>, D Denning<sup>g</sup>, JP Bouchara<sup>a</sup>, C Cuomo<sup>d</sup>, L Delhaes<sup>b</sup>, N Papon<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Rennes Teaching Hospital, U1085-Irset, Rennes, FR; <sup>b</sup>Bordeaux Teaching Hospital, Bordeaux, U1045, FR; <sup>c</sup>Angers Teaching Hospital, GEIHP EA 3142, Angers, FR; <sup>d</sup>Nice Teaching Hospital, Nice, FR; <sup>e</sup>University Hospital of South Manchester, UK; <sup>f</sup>Broad Institute, Harvard University, USA.

## Objectives

The impact of early azole therapy during cystic fibrosis remains debated. The ATCF (Antifungal Therapy during Cystic Fibrosis) is a longitudinal phase III study with the following objectives :

- to assess the microbiological and clinical effects of azole therapy : negativization of sputum cultures for *Aspergillus fumigatus*, course and outcome of FEV1, clinical signs and quality of life, and the impact on co-prescription of antibiotic courses and steroid therapies.
- to study the impacts of azole treatment on the evolution of micro- and mycobiota and on genomic evolution of *A. fumigatus* isolates.

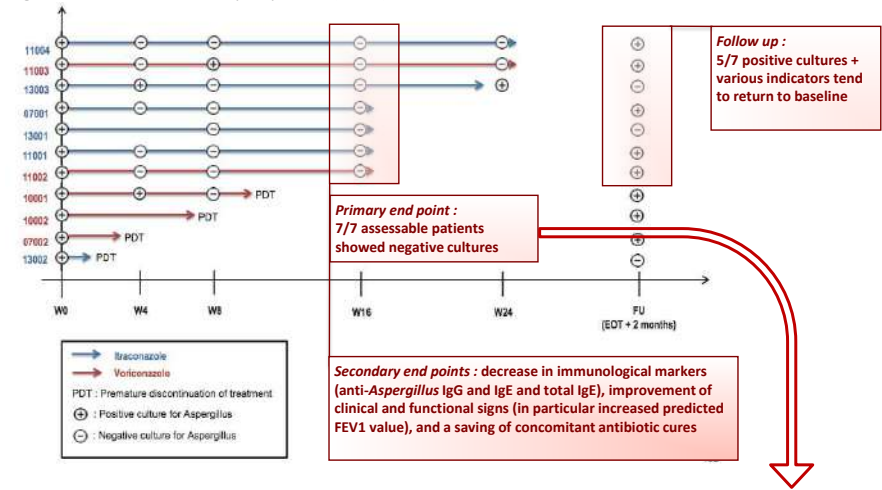
## Methods

The ATCF study followed 11 patients presenting with a chronic colonization of the airways by *A. fumigatus* and randomized to receive an early oral azole therapy with itraconazole (ITRA) or voriconazole (VORI) for 4 to 6 months in a phase III study. A long-term clinical and biological follow-up was conducted until 2 months after end of treatment (EOT) (Figure 1).

- ⇒ Sputa from 7 assessable patients were submitted to DNA extraction for further **metagenomic** approach to determine the fungal (ITS2 region of ribosomal DNA genes) mycobiota (MiSeq – Illumina); Analysis of sequencing data using the Metabiotec<sup>®</sup> pipeline) (Figures 2, 3, 4).
- ⇒ The genome of 20 *A. fumigatus* isolates from 3 patients that negativize after treatment and with a positivation 2 months after EOT was sequenced by **whole genome shotgun** technology. Reads were aligned on the reference genome of *A. fumigatus* Af293, through Genome Analysis ToolKit (GATK) from the Broad Institute (Harvard University, USA).

**Result 1. Clinical and biological evolution :** After 1 to 4 months of azole therapy, all assessable patients showed negative cultures with a decrease in immunological markers (*anti-Aspergillus* IgG and IgE and total IgE), an improvement of clinical and functional signs (in particular increased predicted FEV1 value), and a saving of concomitant antibiotic cures. However, 2 months after the end of treatment, most of assessment criteria were similar to the baseline values.

Figure 1. Inclusion and follow-up of patients (n = 11)



**Result 2. Microbiota analysis :** Fungal diversity tends to increase under treatment with azoles. However, the diversity returns to its baseline 2 months after the end of treatment indicating a phenomenon of resilience for the whole flora as well as for the specific population of *Aspergillus*.

Figure 2. Evolution of the alpha diversity indexes (Shannon indexes as box plots and per patient) of fungal communities in sputum of the 7 assessables patients during treatment (statistics : Wilcoxon test).

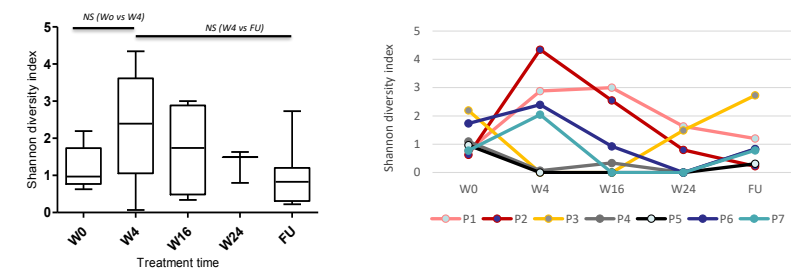


Figure 3. Fungal community's resilience for patients 1, 4 and 6 : Dendrogram of the fungal community structure based on Bray-curtis similarity from each patient.

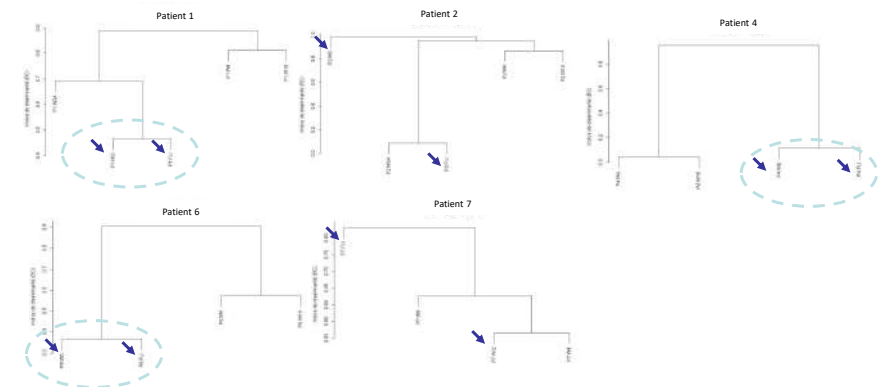
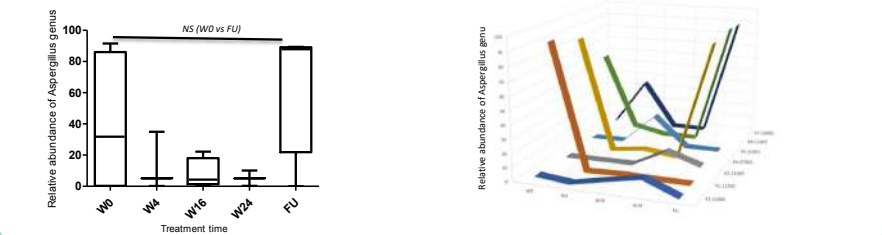
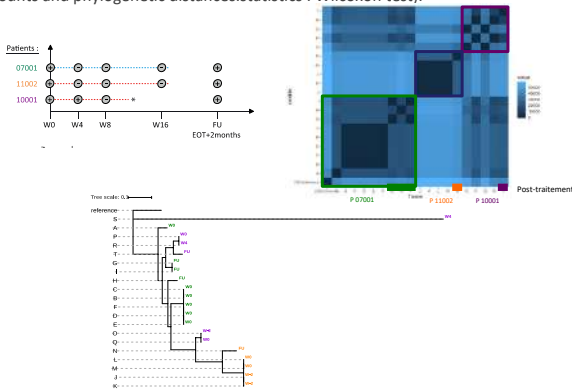


Figure 4. Evolution of the relative abundance of *Aspergillus* genus during treatment for each patient. (statistics : Wilcoxon test).



**Result 3. Genetic variations to the reference (both SNPs and InDels) :** Isolates from a given sputum but also from the same patient were closely related. By contrast, isolates collected 2 months after EOT (FU) were genetically different from the dominant genotype responsible for the primary infection, suggesting resurgence to be due to a new genotype.

Figure 5. Genomic comparison of *Aspergillus* isolates. Relative SNPs variation counts and phylogenetic distances. statistics : Wilcoxon test).



**Result 4. Resistance to azoles.** Isolate N from patient 11002 presented a pan-azole resistance. Genome analysis reveals for this isolate the TR34/L98H mutation in *CYP51A*, suggesting an environmental origin rather than an acquired resistance under azole drug pressure.

Table 1. *In vitro* susceptibility of the 5 isolates from patient 11002.

Isolat/treatment	Posaco	Varico	Itracon	Izavucon	
Before TTT (W-2)	J	0.125	0.125	0.5	0.25
Before TTT (W-2)	K	0.064	0.094	0.38	0.25
Before TTT (W0)	L	0.125	0.125	0.38	0.25
Before TTT (W0)	M	0.094	0.19	0.38	0.19
After TTT (FU)	N	2	1.5	16	3

## Conclusion.

- While only a limited number of patients were included, the strict and meticulous longitudinal phase III design of ATCF study underlines the need for azole therapy rationalization during CF because of its limited effect in time.
- When a chronic colonization with *A. fumigatus* is associated with clinical signs, early azole therapy can temporarily reduce airway infection and inflammation, thus extending the periods of stable disease status and stable lung function with a positive collateral consequence of antibiotic savings (data not shown).
- However, 2 months after the end of treatment, most of clinical and biological assessment criteria were similar to the baseline values.
- In a metagenomic perspective, despite important changes under azole therapy, the mycobiota was similar to baseline 2 months after EOT.
- Genetic characterization of strains showed that reinfection with new genotypes is more frequent than in host evolution under azole treatment.

## **ANNEXE 2**

1

2 **A European ECMM-ESCMID survey on goals and practices for**  
3 **mycobiota characterization using Next Generation Sequencing**

4

5 **Short title:** NGS for mycobiota characterization in Europe

6

7 **Jean-Pierre GANGNEUX<sup>1\*</sup>, H el ene GUEGAN<sup>1</sup>, Louise-Eva VANDENBORGHT<sup>2</sup>, Sylvie**  
8 **BUFFET-BATAILLON<sup>1</sup>, Raphael ENAUD<sup>2</sup>, Laurence DELHAES<sup>2</sup> ; for the ECMM-ESCMID**  
9 **NGS study group**

10

- 11 1. CHU Rennes, Univ Rennes, Inserm, Irset (Institut de Recherche en santé,  
12 environnement et travail) – UMR\_S 1085, F-35000 Rennes, France.
- 13 2. CHU de Bordeaux, Université de Bordeaux, Inserm, Center for Cardiothoracic  
14 Research of Bordeaux, U1045, CIC 1401, F-33076 Bordeaux, France

15

16

17

18 **Acknowledgments :** The authors want to warmly acknowledge colleagues who accepted to  
19 answer to the survey: the ECMM-ESCMID (ESGHAMI & EFISG) NGS study group (see  
20 appendice 1).

21

22 **Author contributions :** JPG, HG, LEV, SBB, RE, & LD contributed to the design of the survey  
23 and the analysis of the answers. JPG and LD wrote the paper.

24

25 **Conflict of interest statement:** The authors have no conflict of interest to declare.

26

27 **\*Corresponding author :**

28 JP Gangneux, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Rennes, 2 rue Henri le

29 Guilloux, 35000 Rennes, France. Jean-pierre.gangneux@chu-rennes.fr

30

31

For Peer Review

32 **Abstract**

33 Although substantial efforts have been made to investigate about the composition of the  
34 microbiota, fungi that constitute the mycobiota play a pivotal role in maintaining microbial  
35 communities and physiological processes in the body. Here, we conducted an international-  
36 survey focusing on laboratory's current procedures regarding their goals and practices of  
37 mycobiota characterization using NGS. We can therefore report a photography of mycobiota  
38 analysis in 26 laboratories from 18 countries, affiliated to working groups from ECMM (NGS  
39 study group) and ESCMID (ESGHAMI and EFISG study groups) and draw some conclusions  
40 of the diversity of approaches.

41

42 **Key words:** Microbiota, Mycobiota, fungi, Europe, Lung infections, Digestive tract infections

43

44



**45 Main text**

46 The human body hosts billions of commensal, symbiotic and pathogenic microorganisms,  
47 mainly bacteria, known as the human microbiota. In recent years, substantial efforts have been  
48 made to investigate about the composition of the microbiota in the different body sites [1,2].  
49 Although the contribution of fungi is limited to approximately 0.1 % of the total microbiome  
50 (Mycobiota has been evaluated at less than 0.1% in human feces upon the European MetaHIT  
51 project), it is thought that fungi play a pivotal role in maintaining microbial communities and  
52 physiological processes in the body [3]. Host-microbiome interactions are responsible for  
53 development of several disorders. It becomes clearer that microbiota, including fungi, are in  
54 balance with each other as well as with the host and that disturbance of this balance can be  
55 involved in numerous disease development including the Gut-Brain axis [4,5]. Next generation  
56 sequencing (NGS) techniques have clearly renewed methodology to characterize host-  
57 associated microbiota in a more comprehensively way, and have consequently revealed a  
58 much more diverse microbiota than was previously thought to exist [5-7]. Full characterization  
59 of the microbial community in different sites of the body can give indications on the severity of  
60 fungal infections [8].

61 As human microbiome has emerged as an important but complex trait influencing health and  
62 diseases, we aim at generating new efficient knowledge on mycobiome. Therefore, we  
63 constituted a panel of experts from the European Society of Clinical Microbiology and  
64 Infectious Diseases (ESCMID, ESGHAMI and EFISG study groups) and the European  
65 Confederation of Medical Mycology (ECMM). As a primary objective, we addressed an  
66 international-survey focusing on laboratory's current procedures regarding their goals and  
67 practices of mycobiota characterization using NGS. Secondly, we propose a prospective  
68 multicenter study, Stand-MYC project, that will address key points regarding fungal targeted  
69 metagenomics. Here we summarized the survey data.

70 The survey included twenty questions, was addressed by internet, and completed by a total of  
71 26 laboratories from 14 European countries (Figure 1), Iran, Mexico, Singapore and Thailand.

72 The laboratories reported their main reason of using NGS to study the mycobiota primary to  
73 understand the pathophysiology of a dysbiosis (N=20), at a second level, to contribute to a  
74 diagnosis (N=16), or to implement a therapeutic strategy (N=12)(Table 1). Other reported  
75 reasons were to evaluate the exposome (environmental studies) (N=10), or to investigate  
76 epidemics (N=8). The use of NGS to characterize the mycobiota was not in routine for most of  
77 the labs (N=23, 82%), while among the remaining (N=5, 18%) who were using it in routine,  
78 their main objective was to improve diagnosis. For about half of the labs (N=13, 46%), NGS  
79 was used in experimental studies on mycobiota mainly to improve diagnosis (N=12), or to  
80 implement a therapeutic strategy (N=7), to evaluate the exposome (N=7), and investigate  
81 epidemics (N=5).

82 Respiratory tract represented the most studied site, followed by the digestive tract, the  
83 distribution of the different diseases addressed by NGS in both lung and digestive tract are  
84 shown in Table 1, and were in agreement with the recent bibliography highlighting the NGS  
85 use in chronic respiratory diseases and inflammatory bowel disease. Sample originated in half  
86 of the laboratories from sputum (N=14), or from stool (N=12), broncho-alveolar lavage (N=11),  
87 environmental (N=6), oral wash (N=4) and skin (N=1). A majority of labs (N=22) considered  
88 that bacterial microbiota must be associated when studying the mycobiota, similarly for the  
89 viral microbiota, which they considered that should be associated as well (N=15).

90 Considering the technical level, our survey exhibited a huge diversity on molecular methods  
91 and protocols, as previously reported [7,9]. Target used for mycobiota analysis was equal  
92 among 18S rRNA (N=11), ITS1 (N=11) and ITS2 (N=11), while some centers used the shotgun  
93 approach (N=5). When asked about data analysis,, database used for alignment were mostly  
94 UnitE (N=8 labs), and both Genebank and CBS databases (N=7 labs), while 3 only labs  
95 reported that they excluded the reads shorter than 150 nucleotides from the bioinformatics  
96 analysis, as usually proposed [8, 10–12]. Finally, only one laboratory declared using propidium  
97 monazide pre-treatment. This last point underlined the weakly opened debate on valuable  
98 pretreatment and extraction methods in order to guarantee the best analysis of the results.

99 Therefore, the Stand-MYC study proposal was made by the ECMM NGS working group and  
100 ESCMID Fungal Infection Study Group (EFISG) & ESCMID Study Group for Host and  
101 Microbiota Interaction (ESGHAMI) study groups. The aims of the Stand-MYC study are: 1) to  
102 compare the DNA extraction protocols used by the different teams involved in the project on  
103 the same human samples as well as on an artificial community of fungi (fungal mock), and a  
104 negative control of DNA extraction, 2) to quantify differences in observed microbial community  
105 compositions according to the different extraction methods used, and ultimately 3) to  
106 recommend an efficient consensual DNA extraction protocol that will help to confidently assess  
107 the contributions of mycobiome to human health or diseases.

108 In conclusion, NGS to study mycobiota is a great challenge for understanding  
109 pathophysiological questions in experimental studies as well as for driving diagnostic  
110 strategies. Techniques will rapidly develop, moving from targeted NGS to shotgun  
111 approaches and whole genome sequencing will also be very useful in the next years in the  
112 field of mycology, but also for an holistic reasoning. Results of the Stand-MYC study will also  
113 help laboratories to standardize their protocol and to facilitate inter-laboratory comparisons of  
114 the results.

115

116 **Appendice 1** : The authors want to warmly acknowledge colleagues from the ECMM-ESCMID  
117 (ESGHAMI & EFISG) NGS study groups who accepted to answer to the survey (26 labs from  
118 18 countries) : **Austria** (Michaela Lackner, Innsbruck), **Czech Republic** (Tomas Freiburger,  
119 Brno), **Denmark** (Rasmus Hare, Copenhagen; Klaus Leth Mortensen, Aarhus), **Iran**  
120 (Mohammad T. Hedayati, Sari), **Ireland** (Gary Moran, Dublin), **Germany** (Maria Vehreschild,  
121 Cologne; Jörg Steinmann, Nueremberg), **France** (Laurence Delhaes, Bordeaux; Françoise  
122 Botterel, Paris; Jean-Pierre Gangneux, Rennes), **Greece** (Emmanuel Roilides, Athens), **Israel**  
123 (Ronen Ben-Ami, Tel Aviv), **Italy** (Giuliana Lo Cascio, Veneto), **Mexico** (Rogelio de Jesús  
124 Treviño-Rangel, Monterrey, Nuevo León), **Netherlands** (Jacques Meis & Willem Melchers,  
125 Nijmegen; Bastian Hornung, Leiden), **Portugal** (Raquel Sabino, Lisboa), **Serbia** (Aleksandra

126 Barac, Belgrade), **Singapore** (Sanjay H Chotirmall), **Spain** (Jordi Rello, Barcelona; M.Teresa  
127 Martin-Gomez, Barcelona; Ana Alastruey-Izquierdo, Madrid), **Thailand** (Thanwa Wongsuk,  
128 Bangkok), **Turkey** (Zeynep Ceren Karahan, Ankara)

129

130

For Peer Review

131 **References**

132

133 1. Human Microbiome Project C. Structure, function and diversity of the healthy human  
134 microbiome. *Nature*. 2012 ;486:207-214.

135

136 2. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat*  
137 *Rev Genet*. 2012 ;13:260-270.

138

139 3. Huffnagle GB, Noverr MC. The emerging world of the fungal microbiome. *Trends*  
140 *Microbiol*. 2013 ;21:334-341.

141

142 4. Kutikhin AG, Yuzhalin AE. Editorial: recent discoveries in evolutionary and genomic  
143 microbiology. *Front Microbiol*. 2015;6:323.

144

145 5. Enaud R, Vandeborghht L-E, Coron N, Bazin T, Prevel R, Schaeveerbeke T, Berger P,  
146 Fayon M, Lamireau T, Delhaes L. The Mycobioome: A Neglected Component in the Microbiota-  
147 Gut-Brain Axis. *Microorganisms* 2018; 6:E22.

148

149 6. Weinstock GM. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature*.  
150 2012;489:250-256.

151

152 7. Nguyen LDN, Viscogliosi E, Delhaes L. The lung mycobioome: an emerging field of the  
153 human respiratory microbiome. *Front. Microbiol*. 2015; 6: 89.

154

155 8. Bittinger K, Charlson ES, Loy E, Shirley DJ, Haas AR, Laughlin A, et al. Improved  
156 characterization of medically relevant fungi in the human respiratory tract using next-  
157 generation sequencing. *Genome Biol*. 2014;15:487.

158 9. Cui L, Morris A, Ghedin E. The human mycobiome in health and disease. *Genome*  
159 *Med.* 2013; 5: 63.

160

161 10. Delhaes L, Monchy S, Fréalle E, Hubans C, Salleron J, Leroy S, Prevotat A, Wallet F,  
162 Wallaert B, Dei-Cas E, Sime-Ngando T, Chabé M, Viscogliosi E. The airway microbiota in  
163 cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community--implications for therapeutic  
164 management. *PLoS One* 2012; 7: e36313.

165

166 11. Nguyen LDN, Deschaght P, Merlin S, Loywick A, Audebert C, Van Daele S, Viscogliosi  
167 E, Vaneechoutte M, Delhaes L. Effects of Propidium Monoazide (PMA) Treatment on  
168 Mycobiome and Bacteriome Analysis of Cystic Fibrosis Airways during Exacerbation. *PLoS*  
169 *One* 2016; 11: e0168860.

170

171 12. Botterel F, Angebault C, Cabaret O, Stressmann FA, Costa J-M, Wallet F, Wallaert B,  
172 Bruce K, Delhaes L. Fungal and Bacterial Diversity of Airway Microbiota in Adults with Cystic  
173 Fibrosis: Concordance Between Conventional Methods and Ultra-Deep Sequencing, and Their  
174 Practical use in the Clinical Laboratory. *Mycopathologia* 2018; 183: 171–183.

175

176

177

178

179

180

181 **Table 1.** Results of the survey on goals and practices for mycobiota characterization using  
 182 Next Generation Sequencing in European laboratories (N=26 laboratories in 18 countries).

Questions	Answers (%)
Goals of using NGS to study the mycobiota	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Understand the pathophysiology of a dysbiosis : 71%</li> <li>- Contribute to a diagnosis : 57%</li> <li>- Implement a therapeutic strategy : 43%</li> <li>- Evaluate the exposome (environmental studies) : 36%</li> <li>- Investigate epidemics : 33%</li> </ul>
Mycobiota sites studied or planned to be studied	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lower respiratory tract : 54%</li> <li>- Digestive tract : 39%</li> <li>- Upper respiratory tract : 36%</li> <li>- Environmental samples : 25%</li> <li>- Oral cavity : 11%</li> <li>- Skin : 3%</li> </ul>
Samples used for NGS processing	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sputum : 50%</li> <li>- Stool : 43%</li> <li>- Broncho-alveolar lavage : 39%</li> <li>- Environment samples : 21%</li> <li>- Oral wash : 11%</li> <li>- Skin 3%</li> </ul>
Lung diseases to be studied by NGS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cystic fibrosis : 50%</li> <li>- Lung transplantation : 32%</li> <li>- COPD : 29%</li> <li>- Asthma : 29%</li> <li>- Pneumonia : 29%</li> </ul>
Digestive tract diseases to be studied by NGS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Crohn disease : 18%</li> <li>- Pseudomembranous colitis : 14%</li> <li>- Chronic ulcerative colitis : 11%</li> <li>- Other (&lt;10%) : rheumatoid polyarthritis, diabetes mellitus, AIDS...</li> </ul>
Target used	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 18s rRNA : 40%</li> <li>- ITS1 : 40%</li> <li>- ITS2 : 40%</li> <li>- Shotgun approach : 18%</li> <li>- 28s rRNA : 0%</li> </ul>

183

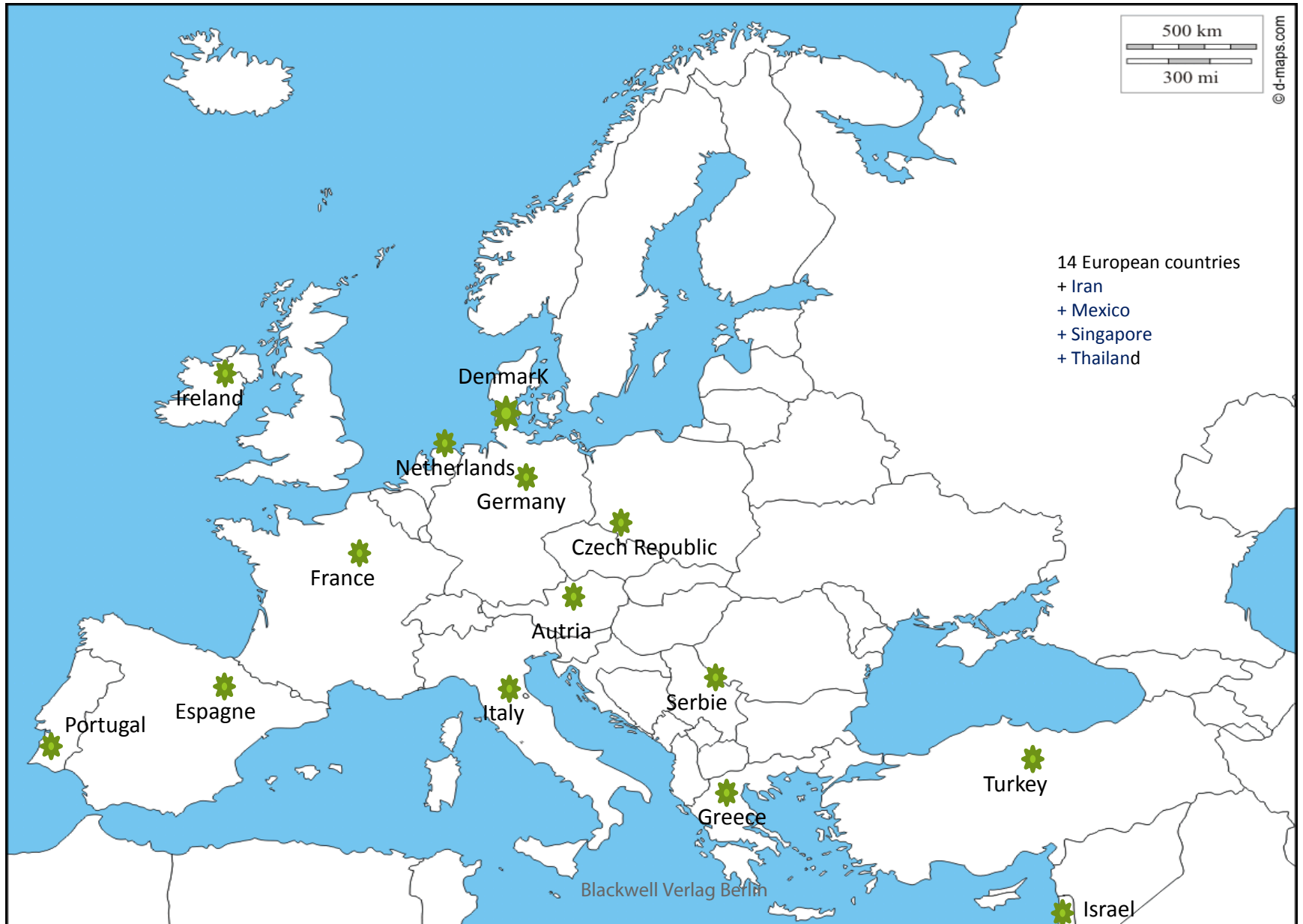
184

185 **Figure 1.** Map of the 14 European countries that participated in the ECMM-ESCMID survey.

186

For Peer Review





# **ANNEXE 3**

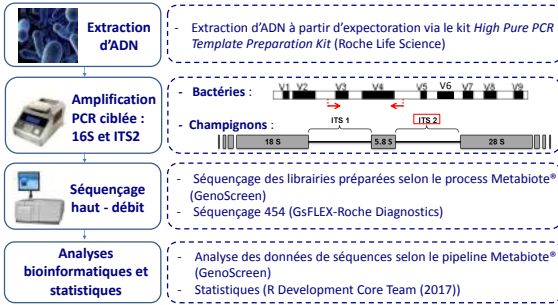
Louise-Eva VANDENBORGH<sup>1,2</sup>, Perrine SORET<sup>3,4</sup>, Noémie CORON<sup>1,5</sup>, Raphaël ENAUD<sup>1,6</sup>, Florence FRANCIS<sup>7</sup>, Thierry SCHAEVERBEKE<sup>8</sup>, Patrick BERGER<sup>1</sup>, Michael FAYON<sup>1</sup>, Rodolphe THIEBAUT<sup>3,4,7</sup> et Laurence DELHAES<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Université de Bordeaux, INSERM U1045 CRCTB, CIC 1401, 33 000 Bordeaux, France - <sup>2</sup>Société GENOSCREEN, Service Recherche et développement, 59 000 Lille, France - <sup>3</sup>Université de Bordeaux, INSERM UMR 1219 « Bordeaux Population Health », 33 000 Bordeaux, France - <sup>4</sup>INRIA SISTM Team, 33405 Talence, France - <sup>5</sup>Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Bordeaux, 33000 Bordeaux, France - <sup>6</sup>Service de pneumologie et gastro-entérologie pédiatriques et CRCM pédiatrique, CHU de Bordeaux, 33 000 Bordeaux, France - <sup>7</sup>Pôle santé publique, CHU de Bordeaux, 33000 Bordeaux, France - <sup>8</sup>Service de rhumatologie, CHU de Bordeaux, 33000 Bordeaux, France

## INTRODUCTION

La mucoviscidose est la maladie autosomique récessive grave la plus fréquente dans la population caucasienne. Les infections broncho-pulmonaires jouent un rôle critique dans le déclin de la fonction respiratoire des patients, se traduisant par des phénomènes d'exacerbation respiratoire aiguë. Le développement des technologies de séquençage haut-débit (NGS) permet aujourd'hui de caractériser les communautés polymicrobiennes ou microbiote pulmonaire de ces patients. Cependant, peu d'études se sont intéressées à la composante fongique co-présente, et aux interactions interrègnes (bactéries-champignons) lors de phénomènes d'exacerbation. Notre objectif est donc d'étudier les modifications et les interactions bactéries-micromycètes du microbiote pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose, et de corréler ce microbiote à leur état clinique, notamment lors des phénomènes d'exacerbation.

## METHODES



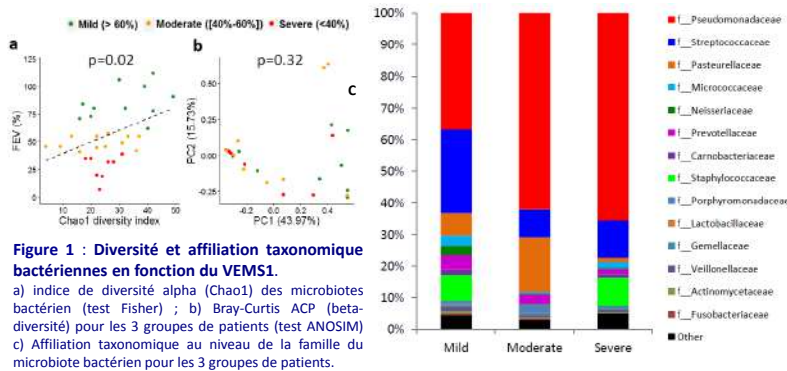
**ECHANTILLONS** : Trente trois patients atteints de mucoviscidose ont été inclus en fonction de la présence (n=17) ou non (n=16) d'une exacerbation pulmonaire.

**SEQUENÇAGE** : Les communautés bactériennes et fongiques des échantillons ont été analysées par NGS, ciblant la région V3-V4 de l'ADNr 16S bactérien et la région fongique inter-génique ITS2 à partir d'un procédé optimisé et standardisé par GenoScreen permettant la pyroséquençage selon la technologie 454. L'assignation des OTU (Operational Taxonomic Unit) a été réalisée avec les bases Greengenes v13.8 pour la cible 16S et Unite v12.11 pour la cible ITS2.

**ANALYSES DES DONNEES DE SEQUENÇAGE ET DES DONNEES CLINIQUES** : La composition microbienne des expectorations en fonction de l'état clinique a été analysée avec le logiciel R par différentes mesures : patient en exacerbation/état clinique stable et les valeurs de VEMS1 en % (volume expiratoire forcé durant la première seconde) exprimées en trois catégories (faible, modéré et sévère cf. Fig. 1). Afin d'étudier le dialogue interrègne, une matrice de corrélation a été générée grâce à la méthode bootstrap de permutation-renormalisation (ReBoot) (cf. Fig. 3).

## RESULTATS

### Diminution de la richesse bactérienne associée à une diminution du VEMS1

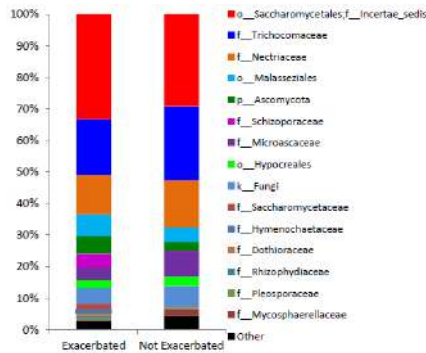


- ✓ Corrélation linéaire positive et significative entre les valeurs de VEMS1 et le Chao1 des communautés bactériennes (Fig 1a)
- ✓ Pas de cluserisation en ACP (Fig 1b) entre les 3 groupes de patients (selon le VEMS1) même si la famille des *Pseudomonadaceae* est en proportion plus élevée pour les groupes « modéré » et « sévère » (Fig 1c)

### Phénomène d'exacerbation et colonisation fongique

- ✓ Aucune différence significative de la diversité du mycobiote en fonction de l'exacerbation.
- ✓ Augmentation des *Malasseziales* et *Saccharomycetales* lors d'exacerbation, également mis en évidence au cours des poussées de maladies inflammatoires de l'intestin.

**Figure 2 : Affiliation taxonomique fongiques lors d'exacerbation ou non.**

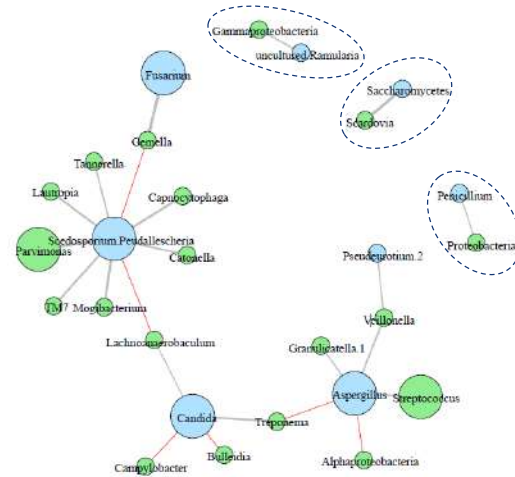


### Dialogue interrègne : Modèle écologique Climax-Attack

- ✓ La matrice de corrélation a permis de mettre en évidence **des interactions bactériennes avec les trois principaux genres fongiques** : *Candida*, *Aspergillus* et *Scedosporium*.
- ✓ Trois paires de microorganismes (Fig. 3, pointillés) dont deux impliquant des champignons environnementaux (*Ramularia sp.* et *Penicillium sp.*) suggèrent une colonisation d'origine environnementale, et présentent aussi des corrélations positives.

- ✓ Confirmation du modèle écologique **Climax/Attack** avec deux populations :

1. La population **Climax**, composée des populations microbes persistants, présents au cours de périodes stables et s'adaptant aux réponses immunitaires de l'hôte.
2. La population **Attack**, plus virulente transitoire, composée d'agents pathogènes et associée au phénomène d'exacerbation.



**Figure 3 : Représentation graphique du dialogue entre les communautés bactériennes et fongiques à partir d'une matrice de corrélation.** Les bactéries sont représentées par des cercles verts et les micromycètes par des cercles bleus. Les lignes grises relient les cercles présentant une corrélation positive et les lignes rouges une corrélation négative.

## CONCLUSION

L'analyse NGS des populations bactériennes et fongiques nous a permis d'investiguer les interactions interrègnes au cours d'exacerbations pulmonaires. Les résultats obtenus sont **concordants** avec ceux de la littérature et ont permis de proposer une nouvelle **version plus complète du modèle écologique Climax/Attack** décliné à l'arbre respiratoire dans la mucoviscidose: les éléments déclencheurs du déclin de la fonction respiratoire au cours des exacerbations pourraient être liés à l'**exposition environnementale** aux bactéries, virus et micromycètes appartenant à la population **Attack**. Puis au décours de l'exacerbation, on assiste soit à la réinstallation d'une population **Climax** identique à la population antérieure, soit à l'apparition d'une **néo-population Climax** souvent moins diverse, composée de micro-organismes tels que *Pseudomonas sp.* ou *Scedosporium sp.* **plus résistants** et capables de colonisations chroniques délétères pour la fonction respiratoire.

# **ANNEXE 4**

# LONG-TERM MONITORING OF INDOOR AIR MICROBIOME IN DWELLINGS: CAN WE PREDICT ASTHMA EXACERBATION ?

Louise-Eva VANDENBORGH<sup>1,2</sup>, Noémie CORON<sup>2,3</sup>, Raphaël ENAUD<sup>2,4</sup>, Charlotte URIEN<sup>3</sup>, Pierre-Olivier GIRODET<sup>2</sup>, Patrick BERGER<sup>2</sup>, Stéphanie FERREIRA<sup>1</sup> and Laurence DELHAES<sup>2,3</sup>



<sup>1</sup> GENOSCREEN, Research and Development, Microbiota team, 59 000 Lille, France – <sup>2</sup> University of Bordeaux, INSERM U1045 Cardiothoracic Research Center, 33 000 Bordeaux, France – <sup>3</sup> CHU of Bordeaux, Mycology-Parasitology laboratories, 33000 Bordeaux, France – <sup>4</sup> CHU of Bordeaux, Pneumology and gastroenterology service, 33 000 Bordeaux, France

## INTRODUCTION

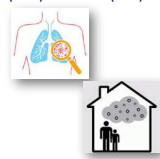
The microbial exposure is a daily universal experience for the human respiratory system. Indoor air microbial exposure seems to be associated with the onset and development of many chronic diseases such as asthma, a heterogeneous disease, usually characterized by chronic airway inflammation. The characteristics of indoor air microbiota and asthma status has been sparsely explored.

The aim of this study is to investigate the connection between indoor air microbiome (sampling by Electrostatic Dust Collector [EDC]) and pulmonary microbiota (sputum sample) of asthma patients.



## METHODS

- **SAMPLING**
  - Cohort COBRA (COhort of BRonchial obstruction and Asthma) 12 french academic centers, 1,080 patients (613 had severe asthma)
  - 49 severe asthma patients were sub-selected for this study
  - EDC was exposed during 10 weeks (from December 2017 to March 2018) in the bedroom of these 49 patients living in *Nouvelle Aquitaine*, the south-west French region
  - 25 sputa were collected from 22 of these 49 patients with either an exacerbated (EXA) or stable (STB) clinical status (one or two sputa per patient)
- **TARGETED AMPLICON SEQUENCING (MiSeq - Illumina)**
  - Bacterial communities: 16S rRNA gene framing the V3V4 hypervariable region
  - Fungal communities: ITS2 region of nuclear rDNA
  - Analysis of sequencing data using the Metabite<sup>®</sup> pipeline (GenoScreen, France)
- **STATISTICAL ANALYSIS**
  - Non-parametric tests for independent samples have been used (Mann-Whitney tests) ( $p < 0,05$ )



## RESULTS

### TAXONOMIC PROFIL OF THE TWO TYPES OF SAMPLES

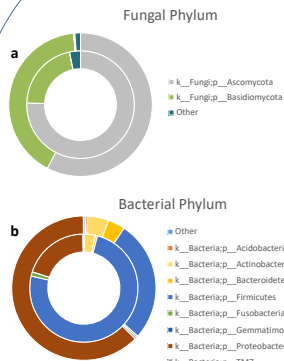


Figure 1: Mean relative abundance of taxa at the phylum level in EDC (external circle) and sputa (internal circle). a: Fungal phylum. b: Bacterial phylum

- **Fungal phylum:**
  - The basidiomycota phylum (green), mainly composed of environmental fungi is twofold higher in EDC (external circle) compared to sputa samples (internal circle) (Fig.1.a)
  - The ascomycota fungi (grey) is the most detected phylum in sputa (Fig.1.a)
- **Bacterial phylum:**
  - The proteobacteria phylum (orange) is threefold higher in EDC compared to sputa samples (Fig.1.b)
  - The firmicute bacteria (blue) is the most detected phylum in sputa (Fig.1.b)

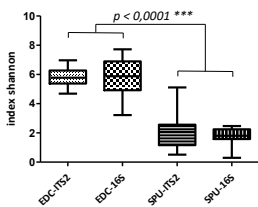


Figure 2: Alpha diversity index (Shannon) of fungal and bacterial communities in EDC and in sputa (SPU)

While a high fungal and bacterial diversity in EDC was observed, the diversity in sputa was significantly lower (Fig.2)

While these two environments (indoor air and pulmonary) are in continuous interaction, the taxonomic composition and the diversity of their bacterial and fungal communities present their own microbial signature

### PROPORTION OF COMMON FUNGAL TAXA BETWEEN EDC AND SPUTA

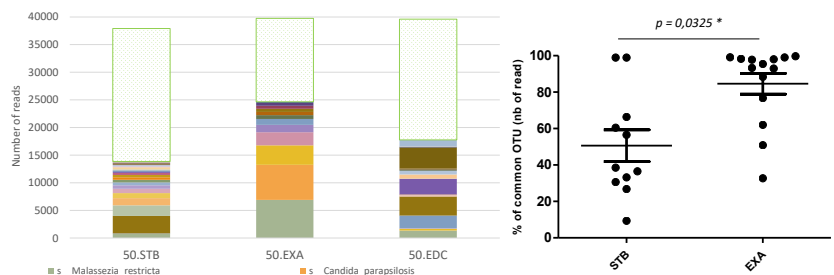


Figure 3: Histogram of the taxonomic composition of the mycobiota of two sputa and the EDC of the patient number 50. STB: sputum during stable clinical state; 50.EXA: sputum during exacerbation; 50.EDC: EDC of the patient 50. Green points correspond to the number of NON common read between sputa and EDC.

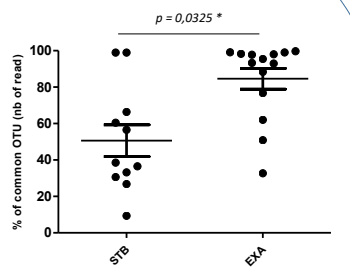


Figure 4: Proportion (%) of common fungal OTU (calculated in number of reads) between sputa and EDC in « stable sputa (STB) » (n=11) and « exacerbated sputa (EXA) » (n=14)

- On average, sputa have 69,6% of total reads corresponding to common fungal OTUs with EDC; on average, EDCs have 27,3% of total reads corresponding to common fungal OTUs with sputa (Fig.3 is an example for one patient)
- The proportion of common fungal OTU (number of reads) between EDC and sputa is significantly higher in sputa of patient during exacerbation (Fig.4)
- No significant difference is observed for common bacterial OTUs between EDC and sputa according to the clinical state of patient

The pulmonary mycobiota shares more fungal taxa with indoor air mycobiota during periods of exacerbation than during stable periods

### IDENTIFICATION OF COMMON FUNGAL TAXA BETWEEN EDC AND SPUTA

- Twenty-four species present in 20% of sputa and 90% of EDC composed the EDC-Sputum core (Fig.6):
  - Four species present in EDC and sputa are specific of stable clinical state
  - Five species specific of exacerbation state
- *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* and *Cladosporium* species found in the EDC-Sputum core were already described at higher concentrations in the house of patients with asthma symptoms in previous studies
- A meta-analysis of indoor fungal diversity and asthma shows that the presence of *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* and *Cladosporium* increased the exacerbation of current asthma symptoms (Sharpe and al. 2014; Cailaud and al. 2017)

Identification of fungal species present in EDC and in sputa, that could be implicated in a negative clinical evolution of asthma patients

OTU886: *s\_\_Alternaria\_brassicaceae*  
OTU785: *g\_\_Malassezia*  
OTU4712: *s\_\_Lewia\_infectoria*  
OTU3467: *s\_\_Cladosporium\_sphaerospermum*

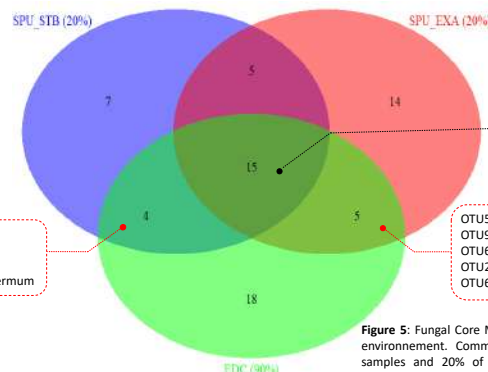


Figure 5: Fungal Core Mycobiota between Sputa and Indoor air environment. Common OTUs present in 90% of the EDC samples and 20% of the sputa samples. Distinction of the exacerbated sputa (SPU\_EXA) from the stable sputa (SPU\_STB)

OTU169: *s\_\_Saccharomyces\_cerevisiae*  
OTU1765: *s\_\_Malassezia\_restricta*  
OTU8230: *s\_\_Cladosporium\_cladosporioides*  
OTU9397: *s\_\_Debaryomyces\_hansenii*  
OTU4944: *s\_\_Sterium\_hirsutum*  
OTU3074: *s\_\_Aspergillus\_vitricola*  
OTU5486: *s\_\_Aspergillus\_domesticus*  
OTU1676: *s\_\_Malassezia\_globosa*  
OTU8055: *s\_\_Hyphodontia\_sp*  
OTU10611: *s\_\_Rhodocollybia\_butyracea*  
OTU7151: *s\_\_Cladosporium\_sphaerospermum*  
OTU3110: *s\_\_Epicoccum\_nigrum*  
OTU2668: *s\_\_basidiomycete\_sp\_OS\_S88*  
OTU2990: *s\_\_Trametes\_versicolor*  
OTU625: *s\_\_Coprinus\_sp*

## CONCLUSION

These results give us a first overview of sputa samples from asthma patients and their associated indoor air microbial environment. We observed an increase in fungal OTU during exacerbation that suggests the active involvement of the environment on the clinical evolution of asthma patient. The fungal species identified in EDC-Sputum core (indoor air and pulmonary) associated in the negative evolution of asthma patients is consistent with previous studies described in the literature. Further investigations, by focusing on the fungal-bacterial network could help us better understand the importance of microbial exposure as a risk factor for asthma patients.