



HAL
open science

Biomarqueurs endotypiques et réponses immunitaires aux infections respiratoires au cours d'une exacerbation sévère chez l'enfant asthmatique

Stéphanie Lejeune

► **To cite this version:**

Stéphanie Lejeune. Biomarqueurs endotypiques et réponses immunitaires aux infections respiratoires au cours d'une exacerbation sévère chez l'enfant asthmatique. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2021. Français. NNT : 2021LILUS017 . tel-03412701

HAL Id: tel-03412701

<https://theses.hal.science/tel-03412701v1>

Submitted on 3 Nov 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.

UNIVERSITE DE LILLE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE
THESE DE DOCTORAT

Pour l'Obtention du grade de :
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Domaine Scientifique : Département Biologie, Médecine et Santé
Spécialité : Physiologie, Biologie des organismes, Populations, Interactions

Présentée et Soutenue publiquement le Vendredi 18/06/2021

Par Stéphanie LEJEUNE GAUDET

**Biomarqueurs endotypiques et réponses immunitaires aux
infections respiratoires au cours d'une exacerbation
sévère chez l'enfant asthmatique**

Version Juin 2021

Equipe OpInFIELD : Infections opportunistes, Immunité,
Environnement et Maladies Pulmonaires

Centre d'infection et d'immunité de Lille, Dr Philippe Gosset
INSERM U1019 – CNRS UMR 9017 - Institut Pasteur de Lille

Directeurs de thèse : Pr Karine Faure (karine.faure@chru-lille.fr),
Dr Olivier Le Rouzic (olivier.lerouzic@chru-lille.fr)

Jury de thèse :

Président : Mr le Professeur Dominique TURCK
Rapporteurs : Mme le Professeur Lisa GIOVANNINI-CHAMI
Mme le Docteur Karine ADEL-PATIENT
Examineurs : Mr le Professeur Jean-Christophe DUBUS (excusé pour raison médicale)
Mr le Docteur Philippe GOSSET
Direction de thèse : Mme le Professeur Karine FAURE
Mr le Docteur Olivier LE ROUZIC
Invité : Mr le Docteur Antoine DESCHILDRE

Ce travail a été réalisé au sein de :

- Equipe OpInFIELD : Infections opportunistes, Immunité, Environnement et Maladies Pulmonaires, Centre d'infection et d'immunité de Lille, INSERM U1019 – CNRS UMR 9017 - Institut Pasteur de Lille
- Service de Pneumologie et Allergologie Pédiatriques, Hôpital Jeanne de Flandre, Univ. Lille, CHU de Lille
- Sean N Parker Center for Allergy and Asthma Research, Stanford University, United States of America.



Avec le soutien financier de :

- Bourse *I-Site* "MD-PhD"
- Bourse *Fulbright* – doctorants Hauts-de-France
- Bourse de Mobilité de la *Fondation du Souffle*
- Bourse de Mobilité *Astra Zeneca* de la *Société Pédiatrique de Pneumologie et Allergologie*
- Soutien à la mobilité de l'association *Anaforcal* (FMC en Allergologie)



Remerciements

Tout d'abord, j'adresse mes remerciements particuliers au Pr Giovannini-Chami, Dr Adel-Patient, Pr Dubus, Pr Turck qui ont accepté de juger mon travail aujourd'hui, malgré leurs emplois du temps chargés.

J'adresse toute ma reconnaissance à mes superviseurs dans ce travail, le Pr Karine Faure, le Dr Olivier Le Rouzic, le Dr Philippe Gosset, le Dr Muriel Pichavant et le Pr Cécile Chenivresse. Merci pour vos conseils et soutien tout au long de ce travail. J'espère sincèrement que cette thèse vous donnera entière satisfaction.

Je remercie mes collègues au laboratoire pour leurs commentaires, leur coopération et bien sûr leur amitié. Ce fut un plaisir de partager et d'apprendre au laboratoire à vos côtés.

I would like to thank Prof. Kari Nadeau, Dr Sharon Chinthrajah and the team at the Sean Parker Center at Stanford University for their warm welcome during the 2019-2020 year in the United States. I thank you for sharing your knowledge. I deeply appreciate your valuable support and our collaboration.

Je tiens à remercier mes collègues dans le service de Pneumologie et Allergologie Pédiatrique pour leur soutien durant ces années de thèse et leur compréhension dans les moments où j'ai dû réduire mon activité clinique. Je tiens tout particulièrement à remercier mon mentor dans le service, le Dr Antoine Deschildre, pour son aide précieuse, son soutien, ses conseils, et ses relectures méticuleuses de l'ensemble de mes travaux depuis de nombreuses années.

Je remercie mes parents, beaux-parents, les autres membres de ma famille et mes amis pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.

Enfin, je remercie tout particulièrement mon époux Alexandre pour son soutien indéfectible dans toutes les étapes de mon parcours professionnel et pour sa présence à mes côtés dans toutes les étapes de notre vie.

TABLE DES MATIERES

RESUME	7
ABSTRACT	9
RESUME GRAND PUBLIC	11
SUMMARY FOR THE GENERAL PUBLIC	12
ABREVIATIONS.....	13
INTRODUCTION	17
I- Définitions et facteurs associés au développement de l'asthme de l'enfant	18
Figure 1 : Facteurs associés au développement de l'asthme chez l'enfant	19
11. Premières années de la vie : une période cruciale pour le développement des voies aériennes et du système immunitaire	20
12. Le rôle des sensibilisations et des autres maladies allergiques	23
13. L'hypothèse microbienne	25
14. Le rôle des autres facteurs environnementaux	30
15. Interactions gène-environnement : le rôle de l'épigénétique	33
Tableau 1 : Exemples de variants génétiques (SNP) et épigénétiques associés à l'asthme	35
II – L'asthme de l'enfant	36
21. Epidémiologie	36
22. De l'asthme aux asthmes	37
23. Histoire naturelle	38
24. L'exacerbation : un évènement particulier dans l'histoire de l'asthme.....	39
25. L'asthme sévère : une entité distincte	40
26. Du phénotype à l'endotype : vers une réconciliation et la personnalisation du traitement	42
Figure 2 : Approches pour phénotyper et endotyper l'asthme de l'enfant	44
27. L'asthme préscolaire : une entité encore mal définie à une période cruciale de la vie 45 Figure 3 : L'âge préscolaire : une fenêtre d'opportunité pour des interventions précoces 47	47
III- Vue d'ensemble des réponses immunitaires au sein des voies aériennes	48
31. Réponse anti-infectieuse appropriée au sein des voies aériennes	48
Figure 4 : Réponses immunitaires adaptatives Th1 et Th2.....	51
32. Tolérance naturelle	52
Figure 5 : Mécanismes de tolérance aux antigènes : l'exemple du tube digestif.....	54
33. L'asthme : modèle de réponse inflammatoire Th2.....	55
Figure 6 : La réponse allergique au sein des voies aériennes	62

IV - Impact des virus dans le développement de l'asthme : l'œuf ou la poule ?	63
41. La reconnaissance des virus pendant la crise d'asthme est principalement médiée par les cellules épithéliales respiratoires (AEC) et les cellules dendritiques (DC)	63
42. Les réponses antivirales impliquent les peptides antimicrobiens et les interférons	64
43. Réponses cytokiniques et rôle des alarmines épithéliales (IL-25, IL-33 et TSLP) induites par l'infection virale	66
44. Spécificités virales : le rôle clé des RV et des RV-C en particulier	69
45. Le rôle potentiel du virome des voies aériennes	70
Tableau 2 : Principales études (population pédiatrique et adulte) évaluant les réponses immunitaires à une infection virale pendant une exacerbation d'asthme	72
Figure 7 : Résumé des principaux mécanismes favorisant le développement de l'asthme et impliqués dans la crise d'asthme.	76
V - Le rôle émergent des bactéries pathogènes et du microbiote dans le déclenchement de l'exacerbation et le contrôle de l'asthme	77
51. Relation entre bactéries et crise d'asthme	77
52. Dysbiose et impact sur l'histoire naturelle de l'asthme	78
Tableau 3 : Principales études humaines (population pédiatrique et adulte) évaluant l'impact des bactéries pathogènes et du microbiote pendant la crise et l'histoire naturelle de l'asthme pédiatrique	80
VI – Apport des approches de biologie systémique de type OMIQUES	82
61. Génomique	82
62. Epigénomique	82
63. Transcriptomique	83
64. Protéomique	83
65. Métabolomique	83
66. Microbiomique	84
67. Intégration des données	84
Figure 8 : L'apport des technologies OMICS	85
HYPOTHESE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL	86
RESULTATS	87
I. Facteurs associés à la sévérité de l'asthme chez l'enfant : Données de la cohorte française CobraPed	88
II. Les enfants asthmatiques préscolaires sévères ont une réponse cytokinique et antivirale altérée au moment d'une exacerbation	120

III. Relation entre les paramètres immunologiques au moment d'une exacerbation sévère chez des enfants suivis pour un asthme allergique et les paramètres de contrôle de l'asthme à un an d'évolution	159
IV. Par profilage métabolomique de plasma, nous avons identifié les stéroïdes androgéniques et les acides biliaires comme des métabolites clés pour distinguer les enfants atopiques des enfants non atopiques.....	174
DISCUSSION :	194
QUE RETIRER DE CES DONNEES SUR LA RELATION ENDOTYPE – PHENOTYPE - EXPOSOME A TRAVERS LES AGES DE L'ENFANCE, ET COMMENT LES TRADUIRE EN THERAPIES CIBLEES ?	194
I. La distinction asthme neutrophilique / asthme éosinophilique : des endotypes obsolètes ?	197
II. L'altération précoce des réponses anti-infectieuses : une caractéristique de certains enfants asthmatiques d'âge préscolaire qui pourrait être la cible de certains thérapies personnalisées.....	201
III. L'inflammation Th2 et l'atopie, associées au risque d'exacerbations : l'effet potentiel des biothérapies	206
IV. L'importance d'analyser l'exposome pour phénotyper les patients, en particulier à l'âge préscolaire.....	210
V. La compréhension du rôle précis des interactions hôte - microbiote : le chaînon manquant pour aboutir à une médecine personnalisée ?.....	214
PERSPECTIVES ET CONCLUSION	218
I. L'utilisation d'un modèle préclinique murin pour caractériser le défaut de réponse aux virus respiratoires et identifier des cibles thérapeutiques potentielles	219
II. La poursuite de l'analyse des profils de réponse inflammatoires et antivirales au moment de l'exacerbation chez les enfants de la cohorte VIRASTHMA 2	222
III. La poursuite des études omiques, en particulier transcriptomiques, métabolomiques et protéomiques, pour comprendre l'implication du microbiote, en collaboration avec l'université de Stanford	224
IV. L'analyse des trajectoires cliniques et fonctionnelles d'évolution des enfants inclus dans les cohortes CobraPed et VIRASTHMA 2.....	225
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	227
ANNEXE 1	261

RESUME

Les premières années de la vie sont marquées par un développement important des poumons et du système immunitaire, immatures à la naissance. Les défenses du poumon font intervenir en premier lieu, l'immunité innée qui, en période néonatale, contribue au déséquilibre de la réponse adaptative avec un biais inhérent en défaveur d'une immunité anti-infectieuse qui facilite une réponse allergique. La théorie hygiéniste suggère que le développement d'un asthme est, au moins en partie, attribuable à une dérégulation immunitaire, par manque d'exposition à certains microorganismes.

L'asthme, première maladie chronique de l'enfant, est favorisé par des facteurs de risque génétiques, épigénétiques et environnementaux. Différents profils d'évolution ont été décrits et les facteurs susceptibles d'influencer l'histoire naturelle sont multiples. Sur le plan lésionnel, le remodelage apparaît précocement, probablement entre 3 et 6 ans. L'âge préscolaire constitue donc une période cruciale pour caractériser les formes sévères et limiter des lésions irréversibles.

Plusieurs approches permettent de catégoriser les patients asthmatiques, soit par l'identification de caractéristiques cliniques spécifiques, définissant un "phénotype", soit par l'identification de processus physiopathologiques à l'origine de l'inflammation, définissant un "endotype". Les exacerbations constituent un événement particulier, fréquent chez le jeune enfant, propice à l'étude de la réponse inflammatoire.

Hypothèse : L'hétérogénéité des phénotypes d'asthme de l'enfant est la résultante de la variabilité interindividuelle de la réponse immune de la muqueuse bronchique, en partie prédéterminée génétiquement, et en partie influencée par les expositions environnementales, microbiennes en particulier. Mieux comprendre l'asthme de l'enfant en tenant compte des mécanismes pourrait permettre d'améliorer le traitement, pour prévenir l'altération fonctionnelle et les lésions anatomiques.

Objectifs et principaux résultats du travail de thèse :

1/ Décrire les facteurs associés à la sévérité dans l'asthme de l'enfant.

L'analyse des données de la cohorte nationale CobraPed suggère que les facteurs influençant la sévérité de l'asthme diffèrent selon l'âge : elle est associée à l'exposition au tabac et/ou aux moisissures à l'âge préscolaire, alors qu'elle est reliée aux maladies atopiques à l'âge scolaire.

2/ Corréler les endotypes et les phénotypes à l'âge préscolaire.

L'analyse de la réponse immunitaire au cours d'infections respiratoires (VIRASTHMA 2) a mis en évidence chez les enfants les plus sévères, exacerbateurs fréquents, des niveaux systémiques plus faibles de cytokines Th1 et Th2, pro et anti-inflammatoires et des réponses antivirales moins marquées pendant une exacerbation sévère viro-induite.

3/ Corréler les endotypes et les phénotypes d'évolution.

L'analyse de la réponse immunitaire en parallèle du profil d'évolution clinique à un an chez des enfants d'âge scolaire (VIRASTHMA) n'a pas mis en évidence de relation entre le profil cytokinique au moment de l'exacerbation et le risque futur de mauvais contrôle de l'asthme et/ou de récurrence des exacerbations.

4/ Générer des hypothèses sur les interactions entre microbiote et environnement atopique.

L'analyse du métabolome plasmatique par profilage non-ciblé chez les enfants des cohortes VIRASTHMA 1 et 2 a permis d'identifier un défaut d'acides biliaries secondaires associé à l'atopie, suggérant que ces métabolites, connus pour être générés par le microbiote intestinal et avoir des fonctions immunomodulatrices, pourraient jouer un rôle clé dans la tolérance pendant l'enfance.

Au total, ces travaux confirment l'intérêt de phénotyper les enfants asthmatiques et de décrire leur environnement. Le phénotype exacerbateur fréquent pourrait correspondre à un endotype distinct, caractérisé par un défaut de la réponse anti-infectieuse. Le microbiote joue également un rôle clé dans le développement de l'atopie et la pérennisation de l'asthme.

ABSTRACT

During the first years of life, the lung and airway grows and the immune system, immature at birth, develops. Innate immunity, as the first line of host defense, plays a key role and contributes to the imbalance of the neonatal adaptive response, characterized by an inherent bias against anti-infectious immunity that facilitates an allergic response. The hygiene hypothesis suggests that the development of asthma is, in part at least, attributable to immune dysregulation due to lack of exposure to certain microorganisms.

Asthma, the most frequent chronic disease in children, is favored by genetic, epigenetic, and environmental risk factors. Different evolutionary patterns have been described, and the factors likely to influence the natural history of asthma are multiple. In terms of structural damage, remodeling appears early in the natural history of asthma, probably between 3 and 6 years of age. The preschool age could therefore constitute a window of opportunity to characterize severe asthma and to prevent irreversible lesions.

Several approaches have made it possible to categorize asthma patients, either by identifying their specific clinical characteristics, named “phenotype”, or by the underlying pathophysiological process leading to inflammation, named “endotype”. Exacerbations are a particular event, frequent in young children, which is conducive to the study of the inflammatory response.

Hypothesis: The heterogeneity of asthma phenotypes in children is the result of inter-individual variability of the bronchial mucosa immune response, partly determined by genetic factors, and partly influenced by environmental, among which microbial exposures. A better understanding of childhood asthma, taking into account its mechanisms, could lead to improved treatment to prevent functional impairment and anatomical damage.

Objectives and main results of the PhD thesis:

1/ To describe factors associated with severity in asthmatic children.

The analysis of data from the French national CobraPed cohort suggests that factors influencing asthma severity may differ according to age: exposure to tobacco and/or molds is

associated with severity at preschool age, whereas atopic diseases are associated with severity at school age.

2/ To correlate endotypes and phenotypes at preschool age.

The analysis of the immune response during respiratory infections (VIRASTHMA 2) showed in the most severe children, prone to exacerbations, lower systemic levels of Th1 and Th2, pro- and anti-inflammatory cytokines and antiviral responses during a severe virus-induced exacerbation.

3/ To correlate endotypes and evolutionary phenotypes.

The analysis of the immune response in parallel with the clinical evolutionary profile at one year in school-age children (VIRASTHMA) did not display a relationship between the cytokine profile at the time of exacerbation and future risk of poor asthma control and/or recurrence of exacerbations.

4/ To generate hypotheses on the interactions between microbiota and atopy.

The analysis of untargeted profiling of the plasma metabolome from children from the VIRASTHMA 1 and 2 cohorts allowed to identify a defect in secondary bile acids associated with atopy, suggesting that these metabolites, known to be generated by the intestinal microbiota and with immunomodulatory functions, could play a key role in tolerance during childhood.

In conclusion, this thesis confirms the utility of phenotyping asthmatic children and describing their environment. Prone to exacerbation phenotype could correspond to a distinct endotype, characterized by a defect of the anti-infectious response. The microbiota also plays a key role in the development of atopy and the perpetuation of asthma.

RESUME GRAND PUBLIC

Les premières années de la vie sont marquées par un développement des poumons et du système immunitaire, immatures à la naissance. Avec l'évolution de nos modes de vie, une dérégulation du système immunitaire, moins exposé aux microbes, pourrait favoriser le développement de maladies inflammatoires.

L'asthme, qui débute dans la jeune enfance, est une maladie inflammatoire multifactorielle, dont les facteurs de risque associent des facteurs génétiques et environnementaux.

La médecine moderne cherche maintenant à catégoriser les patients, soit en les regroupant car ils ont des caractéristiques cliniques communes (par ex : sévérité, âge, etc), soit en les regroupant par les mécanismes biologiques à l'origine de la pathologie.

Notre hypothèse est que les différentes présentations cliniques observées chez le jeune enfant asthmatique pourraient être la résultante de mécanismes biologiques distincts, influencés par la prédisposition génétique et les rencontres avec différents microbes.

SUMMARY FOR THE GENERAL PUBLIC

The first years of life are characterized by the development of the lung and the immune system, which are immature at birth. With the evolution of our lifestyles, a deregulation of the immune system, less exposed to microbes, could favor the development of inflammatory diseases.

Asthma, which begins in early childhood, is a multifactorial inflammatory disease, whose risk factors combine genetic and environmental factors.

Modern medicine now seeks to categorize patients, either by grouping them together because they have common clinical features (*e.g.*, severity, age, etc.), or by grouping them by the biological mechanisms underlying the disease.

Our hypothesis is that the different clinical presentations observed in young asthmatic children could be the result of distinct biological mechanisms, influenced by genetic predisposition and encounters with various microbes.

ABREVIATIONS

AAG : Asthme aigu grave

AEC : Cellules épithéliales des voies respiratoires

ALSPAC : Avon Longitudinal Study of Parents and Children

AM : Macrophages alvéolaires

APC : Cellules présentatrices d'antigènes

APRIL : Early Administration of Azithromycin and Prevention of Severe Lower Respiratory Tract Illnesses in Preschool Children

ARNm : ARN messagers

AS : Asthme sévère

AVON : Avon Longitudinal Study of Parents and Children

BPCO : Bronchopneumopathie chronique obstructive

CAMP : Childhood Asthma Management Program

CCR3 : C-C Chemokine Receptor 3

CD : Cluster of differentiation

CD40L : Cluster of differentiation 40 Ligand

CDHR3 : Cadherin Related Family Member 3

CHILD : Canadian Healthy Infant Longitudinal Development

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CobraPed : Pediatric Cohort of Bronchial Obstruction and Asthma

COPSAC2010 : Copenhagen Prospective Studies on Asthma in Childhood 2010

CpG : Site dinucléotidique Cytosine – Phosphate - Guanine

CSI : Corticostéroïdes inhalés

CVF : Capacité Vitale Forcée

CXCL8 : C-X-C Motif Chemokine Ligand 8

DAMP (Damage-Associated Molecular Pattern) : Motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires

DC : Cellules dendritiques ; cDC : Cellules dendritiques conventionnelles ; pDC : Cellules dendritiques plasmacytoïdes ; MoDC : Cellules dendritiques dérivées des monocytes

EVW : Episodic viral wheeze

FcεRI : Récepteur de haute affinité des IgE

FeNO : Fraction exhalée du monoxyde d'azote

FOXP3 : Forkhead Box P3

γδT : lymphocytes T non conventionnels γδ

GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue) : Tissu lymphoïde associé au tube digestif

GATA : Trans-acting T-cell-specific transcription factor

GBD : Global Burden of Disease

GINA : Global Initiative for Asthma

GRAPP : Groupe de Recherche Sur les Avancées en PneumoPédiatrie

GWAS (Genome-Wide Association Study) : Etude d'association pangénomique

HLA : Human Leukocyte Antigen

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobulines

IL : Interleukine

ILC2 : Cellules lymphoïdes innées de type 2

IMC : Indice de Masse Corporelle

INEXAS : On-demand Inhaled Interferon Beta-1a in Severe Asthmatics

iNKT : Lymphocytes T natural killer invariants

INSEE : Institut National de la Statistique de des Etudes Economiques

ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule 1

IRF : Interferon Regulatory Factor

ISG : Interferon-Stimulated Genes

LB : Lymphocytes B

LBA : Lavages broncho-alvéolaires

LEAP : Learning Early About Peanut Allergy

LPS : Lipopolysaccharide bactérien

LT : Lymphocytes T

LTc : Lymphocyte T cytotoxique

MAAS : Manchester Asthma and Allergy Study

MAIT : Mucosal-Associated Invariant T cells

MAS : Multizentrische Allergie Studie

miRNA : MicroARN

MMP : Matrix metallopeptidase

MTW : multiple trigger wheeze

NDV : Newcastle disease virus

NFkB : Nuclear Factor kappa B

NK : Natural Killers

ORMDL3 : ORMDL Sphingolipid Biosynthesis Regulator 3

PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) : Motifs moléculaires associés aux pathogènes

PARIS : Pollution and Asthma Risk : an Infant Study

PASTURE : Protection against Allergy: Study in Rural Environments

PBMC (Peripheral blood mononuclear cells) : Cellules mononuclées du sang périphérique

PM (Particulate Matter) : Particules fines

Poly I:C : Acide polyinosinique-polycytidylique

PROSE : Preventative Omalizumab or Step-up Therapy for Severe Fall Exacerbations

PRR : Pattern recognition receptors

RCIU : Retard de croissance intra-utérin

RV : Rhinovirus

RV-C : Rhinovirus de sérotype C

SCFA (Short-Chain Fatty Acid) : Acide gras à chaîne courte

SIW : severe intermittent wheeze

SNP (Single-nucleotide polymorphism) : Polymorphisme nucléotidique

SOCS1 : Suppressor of cytokine signaling protein 1

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

STRA (Severe Therapy Resistant Asthma) : Asthme sévère résistant au traitement

TCR : Récepteur des cellules T

TEK : Thyrosine Kinase, Endothelial

TGF : Transforming Growth Factor

Tfh : Lymphocytes T auxiliaires folliculaires

Th : Réponse T helper de type

TIM3 : T-cell immunoglobulin mucin-3

TLR : Toll like receptors

TNF- α : Tumor necrosis factor- α

TSLP : Thymic Stromal Lymphopoietin

Treg : Lymphocytes T régulateurs

U-BIOPRED : Unbiased Biomarkers for the Prediction of Respiratory Disease Outcomes

VDRE : Vitamin D Response-Element

VEMS : Volume Expiratoire Maximal Seconde

VRS : Virus Respiratoire Syncytial

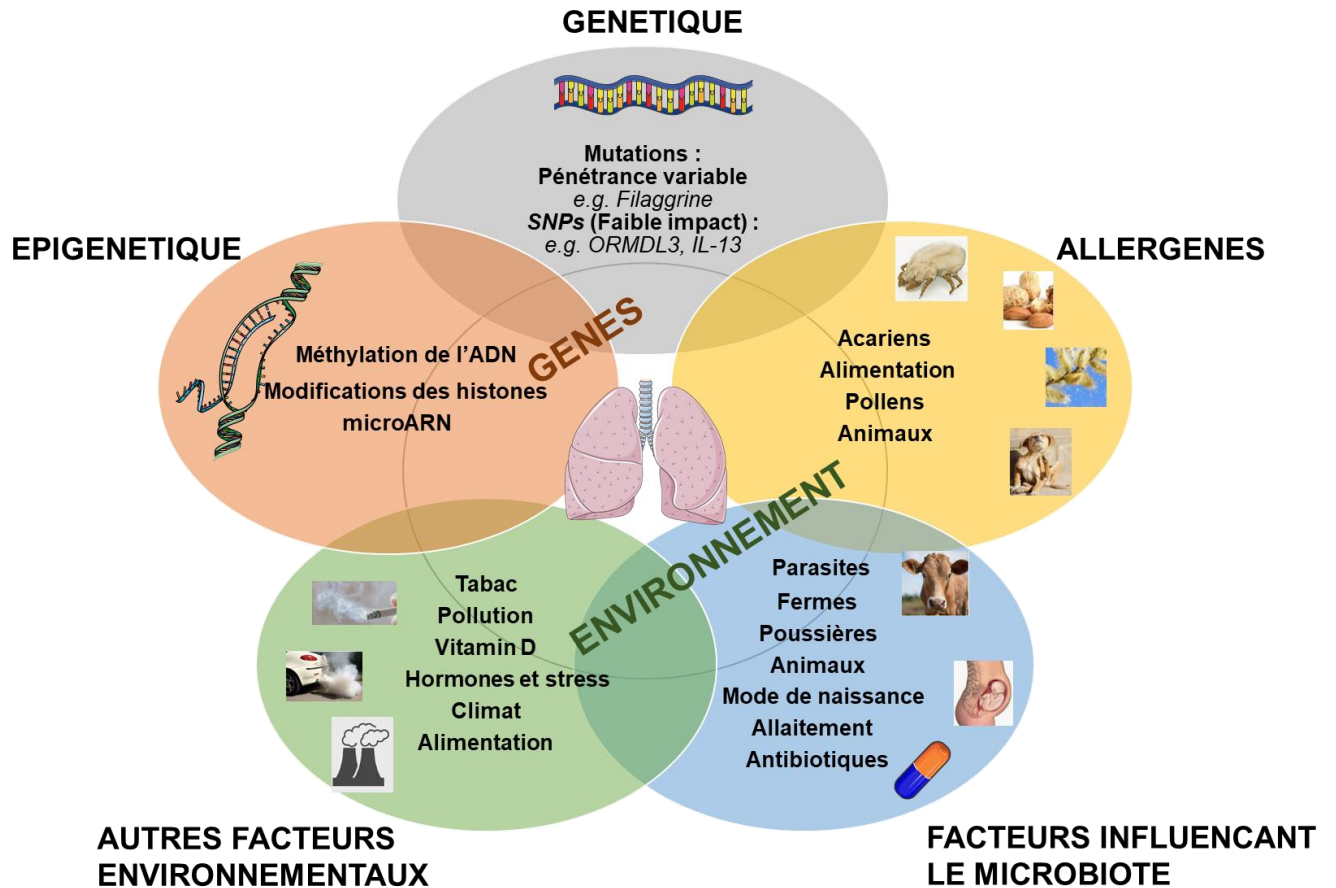
INTRODUCTION

I- Définitions et facteurs associés au développement de l'asthme de l'enfant

L'asthme est défini par une obstruction chronique réversible et diffuse des voies respiratoires distales, résultant d'une inflammation bronchique, d'une hypersécrétion de la muqueuse et d'une bronchoconstriction (1,2). L'asthme apparaît dans les premières années de la vie et touche 8-11% des enfants en France, constituant la première maladie chronique de l'enfant (3–6). Il s'agit d'une maladie multifactorielle, dont les facteurs de risque associent des facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux. L'augmentation soudaine des maladies allergiques au cours des dernières décennies suggère que les changements du mode de vie moderne (hygiène accrue, aliments transformés, utilisation d'antibiotiques, temps passé à l'intérieur, etc...) ainsi que les changements environnementaux (pollution urbaine, transmission facilitée de certains pathogènes, virus respiratoires, etc...) ont modifié la somme totale des expositions auxquelles un individu est confronté avant la naissance (*in utero*) et au cours de sa vie : l'exposome (7). Des interactions biaisées entre antigènes, environnement et hôte, conjuguées à des facteurs génétiques et épigénétiques, altèrent les mécanismes de régulation dans les premiers mois de vie et peuvent ainsi conduire à la perpétuation d'une inflammation T helper de type 2 (Th2), associée au développement de maladies inflammatoires comme l'asthme. L'ensemble de ces facteurs, dont les contributions relatives ne sont pas encore bien comprises, sont représentés à la **Figure 1**.

Figure 1 : Facteurs associés au développement de l'asthme chez l'enfant

Adaptée de Nadeau K, Lejeune S, et al. *Immunological mechanisms of allergic disorders*. William Paul's *Fundamental Immunology 8th Edition*, Flajnik M, Singh N, and Holland S (Wolters Kluwer, à paraître)



IL : Interleukine ; ORMDL3 : ORMDL Sphingolipid Biosynthesis Regulator 3 ; SNP (Single-nucleotide polymorphism) : Polymorphisme nucléotidique

Les facteurs de risque d'asthme comprennent des facteurs environnementaux (collectivement appelés exposome, c'est-à-dire l'ensemble des facteurs environnementaux auxquels un individu est exposé tout au long de sa vie). Les gènes affectent la susceptibilité génétique au risque d'asthme. Les études épigénétiques fournissent des informations précieuses sur la façon dont les facteurs environnementaux modifient l'expression des gènes.

11. Premières années de la vie : une période cruciale pour le développement des voies aériennes et du système immunitaire

Les premières années de la vie sont marquées par un développement important des poumons et des voies respiratoires, qui constituent un organe vulnérable (8). Les enfants qui développent une morbidité respiratoire à long terme pourraient avoir une fonction respiratoire anormale dès le début de leur vie (9,10). Les facteurs qui affectent le développement postnatal des voies respiratoires peuvent intervenir *in utero*. Ainsi, la prématurité et le retard de croissance intra-utérin (RCIU) sont des facteurs de risque de pathologies respiratoires, en particulier de sifflements récurrents et d'asthme à l'âge préscolaire (11), et sont associés à une altération de la fonction respiratoire au cours de l'enfance (12). Le surrisque d'asthme en cas de chorioamniotite est également bien décrit (11), et suggère le rôle majeur de l'inflammation prénatale sur la morbidité pulmonaire ultérieure. Des agressions postnatales précoces et/ou récurrentes, générant une inflammation, des dommages épithéliaux, et/ou un stress oxydatif, peuvent également impacter significativement et durablement le développement des voies aériennes (8). En plus d'une altération du développement alvéolaire et des structures vasculaires intrapulmonaires, plus propres aux phénomènes d'immaturation liés à la prématurité, des phénomènes de réparation défectueux peuvent intervenir. Ils sont désignés sous le terme de remodelage et impliquent une augmentation de la surface et de la contractilité du muscle lisse, générant une hyperréactivité, une altération de la signalisation au sein de la matrice extracellulaire, et une hypersécrétion de mucus (13). Cette absence de réparation *ad integrum* pourrait favoriser le développement et la persistance de pathologies respiratoires au cours de l'enfance. Ainsi, l'hypertrophie du muscle lisse chez les enfants avec sifflements récurrents à l'âge préscolaire a été identifiée comme facteur prédictif de la persistance d'un asthme après l'âge de 6 ans (14–16). Plusieurs facteurs pourraient favoriser ces phénomènes, en particulier l'activation de la voie cholinergique (8), mais aussi des lésions épithéliales avec altération de la fonction de barrière, combinés aux expositions et agressions

de l'environnement, qui vont entraîner la libération de différents médiateurs agissant sur le muscle lisse et la matrice extracellulaire (17,18).

En parallèle du développement pulmonaire, le système immunitaire, immature à la naissance, se développe rapidement pendant les 3 premiers mois de vie sous l'influence de multiples facteurs (19). Compte tenu d'une exposition limitée aux antigènes et de la complexité de la mise en œuvre de la réponse immunitaire adaptative, l'immunité innée, en 1^{ère} ligne des défenses de l'hôte, joue un rôle primordial (20). Cependant, à la naissance, les principales cellules immunitaires innées sont présentes en faible quantité, avec des phénotypes et/ou fonctions non matures. Les neutrophiles, en plus d'un déficit quantitatif, ont une capacité très faible de phagocytose et de l'activation des voies de signalisation en aval de la reconnaissance par les "pattern recognition receptors" (PRR) (19). Les cellules présentatrices d'antigènes (APC) des nouveau-nés induisent principalement une réponse anti-inflammatoire associée à une incapacité à développer une réponse Th1. Les cellules dendritiques (DC) néonatales, principales APC, explorées par les études sur sang de cordon, expriment moins le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, induisant un défaut d'activation de la réponse spécifique de l'antigène par les lymphocytes T (LT) et lymphocytes B (LB) (21). Le rapport DC plasmacytoïdes (pDC) / DC conventionnelles (cDC) est de 3:1, alors qu'il est de 1:3 chez l'adulte (22). Les DC néonatales produisent majoritairement des cytokines anti-inflammatoires comme l'interleukine (IL)-10 et le shift en faveur de la production de cytokines immuno-stimulatrices intervient plus tard, au cours de la première année de vie (23). Plus spécifiquement, les pDC néonatales ont un défaut profond de production d'interférons (IFN) de type I α/β , qui interviennent dans la réponse antivirale et l'inflammation Th1, et les cDC néonatales ont un défaut de production d'IL-12, qui stimule l'inflammation Th1 (24,25). Cette immaturité des DC, qui contribue au défaut de réponse Th1 à la naissance, est également mise en évidence dans les modèles murins, en particulier pour les DC résidentes au sein des voies respiratoires (26,27). Enfin, à la naissance, les cellules "Natural Killers" (NK) ont un défaut de cytotoxicité associé à un défaut quantitatif et qualitatif des granules

cytoplasmiques, conduisant à une diminution de la dégranulation (19,28). Les LT non conventionnels $\gamma\delta$ ($\gamma\delta$ T), qui interviennent dans la surveillance immune au sein des muqueuses, ont également un phénotype naïf avec une faible réponse à la stimulation antigénique (29).

Cette immaturité du système immunitaire inné néonatal s'associe à une orientation préférentielle de l'immunité adaptative vers une immunité Th2 (19). Les LT CD4+ qui quittent le thymus dans les premiers jours de vie sont majoritairement de phénotype naïf et non de type mémoire, en lien avec une immaturité du récepteur des cellules T (TCR) et une production cytokinique en faveur des cytokines Th2 : IL-4, IL-5 et IL-13 (19). Ceci est en partie lié à une hypométhylation du locus des cytokines Th2, situé sur le chromosome 5, permettant une transcription rapide (30). Par ailleurs, les LT de type Th17 sont quasi-inexistants au sein des cellules de cordon (19). Les LT régulateurs (Treg) naturels sont présents en grande quantité dans le sang de cordon et dans les ganglions lymphatiques néonataux, ce qui limite la capacité de réponse du fœtus aux stimulations antigéniques maternelles (31). Cependant, à la naissance, les LT naïfs ont un défaut de transformation en Treg suppresseurs induits après stimulation antigénique (32). Bien que les LB soient présents à la naissance, ils sont localisés dans des centres germinaux de petite taille, ils ont un phénotype naïf et un répertoire d'immunoglobulines (Ig) de surface limité, par manque de stimulation antigénique et d'activation par les LT CD4+ immatures (19).

Le développement de l'immunité néonatale est par ailleurs influencé par de multiples facteurs, notamment les cytokines maternelles, l'exposition aux antigènes, en particulier aux antigènes de l'environnement et du microbiote, la nutrition, ainsi que les divers facteurs plasmatiques anti-inflammatoires présents dans le sang du cordon (33). De plus, des modifications post-transcriptionnelles liées à l'âge pourraient intervenir dans les phénomènes de maturation, comme démontré dans des cohortes de jumeaux, où des divergences de réponses immunitaires, en particulier de différenciations lymphocytaires T et de réponses cytokiniques après stimulation, apparaissent au cours de l'enfance (34).

12. Le rôle des sensibilisations et des autres maladies allergiques

L'asthme allergique est le phénotype le plus commun d'asthme à l'âge adulte, sa prévalence augmentant avec l'âge avec une progression des sensibilisations pendant l'enfance et une stabilisation à l'adolescence, comme le montrent les données des cohortes néonatales (35–38). Ces mêmes études épidémiologiques ont confirmé l'importance des sensibilisations allergiques dans l'histoire naturelle de l'asthme, en particulier si elles sont précoces et multiples, avec une association au risque de récurrence des exacerbations, persistance de l'asthme, altération de la fonction pulmonaire à long terme. L'asthme allergique est défini lorsque les symptômes de l'asthme sont, au moins en partie, déclenchés par l'exposition à des allergènes en suspension dans l'air. En pratique, les mécanismes et facteurs de déclenchement se chevauchent souvent entre asthme allergique et non allergique.

Les cellules immunitaires innées des voies respiratoires sont en première ligne de la défense de l'hôte et sont les premières à être exposées aux aéro-allergènes environnementaux. Chez les sujets prédisposés, les allergènes peuvent stimuler le système immunitaire inné et induire une réponse adaptative de type Th2, mimant la réponse aux agents pathogènes, principalement par trois mécanismes. Premièrement, les allergènes peuvent perturber les barrières épithéliales par leur activité enzymatique intrinsèque et activer ces cellules par mobilisation des récepteurs PAR (protease activated receptor). Ainsi, certains allergènes présentent une activité cystéine ou sérine protéase (e.g. les allergènes des acariens, des blattes, des champignons, de *Felis domesticus* et des pollens d'ambrosie) ou une activité oxydase (e.g. le pollen d'ambrosie) (39). Deuxièmement, les allergènes et leurs composants solubles peuvent contenir des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) ou des motifs moléculaires associés à un danger (DAMP), tels que l'endotoxine, la chitine, les β -glycanes et la famille de liaison lipidique MD-2 (par exemple, Der p 2), qui sont reconnus par les PRR (par exemple, TLR4) sur les cellules tapissant les surfaces muqueuses (40). Enfin, certains allergènes, tels que l'allergène de l'acarien Der p 1, contiennent également des fragments d'hydrates de carbone qui peuvent stimuler les récepteurs de la

lectine de type C sur les DC, favorisant ainsi leur absorption pour activer les réponses immunitaires Th2 (41).

Le dialogue avec les autres interfaces de l'organisme est également essentiel. Le tractus gastro-intestinal, plus grande zone d'échange avec l'environnement extérieur, et la peau, plus grand "organe" du corps et première ligne de protection contre les "envahisseurs étrangers", constituent deux organes représentant un défi pour le système immunitaire, qui doit faire la distinction entre le soi et le non-soi, mais aussi entre le non-soi inoffensif et le non-soi menaçant (42). Au sein du tube digestif, des interactions complexes ont lieu entre les cellules non immunitaires et les cellules constituant le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT) dans les plaques de Peyer, l'appendice et les follicules lymphoïdes isolés. Comme nous le verrons dans le chapitre "**32. Tolérance naturelle**", les mécanismes de la tolérance orale aux protéines alimentaires sont étroitement liés à ceux responsables de la tolérance aux microbes commensaux (43). De la même façon, les antigènes (allergènes, pathogènes et microbiote) peuvent stimuler le système immunitaire s'ils sont capables de pénétrer la barrière cutanée, et ainsi se lier aux APC de la peau (cellules de Langerhans), phénomènes favorisés par l'irritation de la peau, les protéases contenues dans certains allergènes, ou des mutations de perte de fonction dans le gène de la *Filaggrine* (44,45). Une défaillance ou un manque de développement d'un processus tolérogène contre les particules étrangères que sont les allergènes pourraient donc conduire au développement d'autres maladies atopiques. La dermatite atopique et les allergies alimentaires, qui se développent également dans la jeune enfance, sont donc fréquemment associés à l'asthme, et pourraient influencer son histoire naturelle (46). C'est ce que suggère l'hypothèse de la marche atopique, qui définit une progression stéréotypée des pathologies allergiques avec une dermatite atopique et des sifflements récurrents dans les premiers mois de vie, suivis par l'apparition d'une allergie alimentaire, d'un asthme, ou d'une rhinite allergique dans les années suivantes (47). En pratique, le concept de marche atopique est battu en brèche, car l'atopie peut se présenter sous différents tableaux cliniques et les manifestations peuvent apparaître de façon

concomitante ou dans le désordre (48–50). L'hypothèse de la double exposition aux allergènes, complémentaire à celle de la marche atopique, suggère un dialogue entre les différentes interfaces avec l'idée que la tolérance aux antigènes chez le nouveau-né est induite par le biais d'une exposition orale à forte dose alors que la sensibilisation allergique se produit par le biais d'une exposition cutanée à faible dose (51,52). L'étude LEAP (Learning Early About Peanut Allergy) nous a démontré que l'introduction précoce d'arachide dans le régime alimentaire des nourrissons à haut risque d'allergie alimentaire pouvait prévenir le développement d'une allergie à l'arachide, confirmant que l'exposition précoce à des allergènes alimentaires pouvait induire des mécanismes de régulation conduisant à une tolérance à long terme (53).

13. L'hypothèse microbienne

Selon la théorie hygiéniste, les enfants exposés tôt dans leur vie à la diversité microbienne ainsi qu'aux helminthes sont moins susceptibles de développer des maladies atopiques, en particulier l'asthme, ou des maladies auto-immunes, ces infections contribuant au développement du système immunitaire en provoquant une forte réponse IgE conduisant à la désensibilisation des cellules effectrices comme les mastocytes (54). La maturation des mécanismes de l'immunité innée, en première ligne en cas d'infections, pourrait donc être altérée par l'absence de stimulations. Le fait qu'il existe plusieurs associations entre des polymorphismes nucléotidiques dans les gènes des "Toll like receptors" (TLR), principale famille de PRR, et le risque de maladie allergique conforte cette hypothèse. Par exemple, un polymorphisme dans la région codante du gène *TLR4*, entraînant une diminution de l'inflammation induite par les lipopolysaccharides bactériens (LPS) est associé au risque d'asthme allergique chez l'enfant (40,55). Ces réponses innées influencent ensuite l'activation de la réponse adaptative via les APC et la réponse lymphocytaire T. Les bactéries pathogènes peuvent jouer un rôle dans les processus physiopathologiques conduisant aux maladies atopiques et dans la marche atopique. Par exemple, dans la dermatite atopique, des

altérations de la barrière cutanée augmenteraient la colonisation par *Staphylococcus aureus* et diminueraient la diversité du microbiome, entraînant une réponse immunitaire biaisée de type Th2 (56). Une diminution de l'abondance relative des espèces de *Bifidobacterium* dans l'intestin et une augmentation du phylum des *Proteobacteria* dans les poumons (dont les bactéries pathogènes appartenant aux genres *Haemophilus*, *Moraxella* et *Neisseria*) ont été associées à l'asthme pédiatrique (57). Comme nous le verrons dans le chapitre dédié ("**IV- Impact des virus dans le développement de l'asthme**"), les virus peuvent aussi jouer un rôle dans la genèse d'une inflammation de type Th2, notamment au sein des voies respiratoires. Enfin, d'autres agents pathogènes comme les champignons peuvent interagir avec la réponse inflammatoire (58). Cependant, la théorie hygiéniste est dépassée et n'intègre pas la complexité des relations entre hôte et microbes.

Le dialogue avec les espèces commensales du microbiote est également essentiel pour le développement du système immunitaire et l'homéostasie des muqueuses et l'hypothèse des "vieux amis", ou hypothèse microbienne, a été proposée comme alternative à la théorie hygiéniste (59). Cette hypothèse suggère que l'augmentation des maladies atopiques est, au moins en partie, attribuable à une dérégulation immunitaire, résultant d'un manque d'exposition à certains microorganismes, qui dans l'évolution ont été conservés en parallèle de l'espèce humaine. Trois grands mécanismes ont été proposés pour cette hypothèse microbienne : (1) stimulation par les PAMP associés aux microbes ou aux pathogènes, en particulier l'endotoxine ou LPS ; (2) rôle de la charge et de la diversité microbienne totale ; et (3) effets immunomodulateurs de certains taxons microbiens spécifiques (60). Il est probable que les sujets atopiques reçoivent des stimulations quantitativement et qualitativement différentes du microbiote aux interfaces muqueuses (e.g. stimulations par les LPS, peptidoglycanes, antigènes mycobactériens) et que leurs APC ne parviennent pas à rediriger les réponses immunitaires vers des réponses Th1 ou Treg protectrices (42). Par ailleurs, au sein du tube digestif, des études suggèrent que certaines bactéries, plus particulièrement de la classe des *Clostridia*, peuvent favoriser le développement de la tolérance et prévenir les

allergies alimentaires (42). Parmi les enfants inclus dans l'étude Canadian Healthy Infant Longitudinal Development (CHILD), les nouveau-nés à risque d'asthme présentaient des altérations transitoires du microbiote intestinal, connues sous le nom de dysbiose (61). Plus précisément, l'abondance relative des genres bactériens commensaux *Lachnospira*, *Veillonella*, *Faecalibacterium* et *Rothia* était significativement réduite chez les enfants à risque d'asthme. En parallèle du microbiote intestinal, le microbiote respiratoire, comprenant les micro-organismes bactériens et viraux, se développe au cours des premières semaines de vie, avec l'apparition dans les voies aériennes d'un microbiote spécifique, où *Staphylococcus aureus* et *Corynebacterium* remplacent les bactéries colonisatrices initiales et deviennent les micro-organismes dominants (62). Les changements les plus importants se produisent au cours des deux premiers mois. Au cours des six mois suivants, le microbiote respiratoire poursuit sa maturation ; l'abondance relative de *S. aureus* diminue, et une augmentation de *Moraxella*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Dolosigranulum*, *Alloiococcus* et *Prevotella sp.* est observée. Des altérations du microbiote à cette période cruciale ont été impliquées dans le développement de l'asthme. En utilisant des techniques de culture bactérienne, il a été démontré, dans une population de nouveau-nés à risque avec un asthme maternel, que les nouveau-nés dont les voies aériennes supérieures étaient colonisées par *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* et/ou *H. influenzae* avaient un risque plus élevé de présenter un asthme à l'âge de 5 ans (63). Ceci était associé à une réponse immunitaire aberrante, avec une synthèse accrue d'IL-5 et d'IL-13 par les PBMC obtenues à l'âge de 6 mois (64).

Dans les pays occidentaux, plusieurs études ont montré des disparités dans la survenue d'asthme entre les enfants vivant à la ville et ceux vivant à la campagne. Des données provenant de cinq pays européens ont suggéré que les enfants élevés dans des fermes laitières présentaient des risques plus faibles de développer un asthme précoce et une sensibilisation allergique (65). Cet environnement agricole protecteur pourrait être lié à des facteurs cumulatifs, comme le contact précoce avec des animaux, l'exposition au foin, ou la consommation de certains produits laitiers au début de la vie. Aux États-Unis, la prévalence

de l'asthme est 4 à 6 fois plus faible chez les enfants Amish que chez les enfants Huttérites, deux communautés partageant le même terrain génétique et le même mode de vie, mais différant par leurs pratiques agricoles (66). Il a été démontré que les échantillons de poussière provenant de foyers Amish (aux pratiques agricoles traditionnelles) contenaient des niveaux plus élevés d'endotoxines et avaient une composition microbienne différente de celle des foyers Huttérites (aux pratiques agricoles industrialisées). Des différences dans les proportions et les phénotypes des cellules immunitaires innées ont également été constatées entre les deux groupes d'enfants. Enfin, l'administration de poussière provenant de maisons Amish dans un modèle expérimental murin d'asthme allergique entraînait un effet protecteur. Dans les premières années de la vie, la composition du microbiote de l'intestin, de la peau et des poumons peut jouer un rôle clé en influençant la réponse immunitaire et l'homéostasie des muqueuses. Une étude portant sur des enfants vivant dans la Carélie finlandaise ou russe, deux régions adjacentes présentant des différences socio-économiques contrastées, a mis en évidence des différences dans le microbiote cutané et les communautés fongiques de la muqueuse nasale entre les 2 groupes (67). Les enfants russes présentaient des niveaux d'*Acinetobacter* plus élevés que les enfants finlandais et un risque 10 fois plus faible d'asthme, de rhinite allergique, de dermatite atopique et de sensibilisation allergique. Des résultats similaires ont été observés récemment en comparant des enfants finlandais et estoniens (68). Dans une cohorte de naissance finlandaise, il a été montré, par modélisation des différences de composition du microbiote de la poussière domestique entre les foyers agricoles et non agricoles, que chez les enfants qui grandissent dans des foyers non agricoles, le risque d'asthme diminue à mesure que la similitude de la composition de leur microbiote bactérien domestique avec celui des foyers agricoles augmente (69). Le microbiote protecteur présentait une faible abondance de *Streptococcaceae*, indépendamment de la charge bactérienne totale et était associé à une réduction des réponses cytokiniques pro-inflammatoires contre les composants de la paroi cellulaire bactérienne *ex vivo*. Dans la cohorte de naissance Protection against Allergy: Study in Rural Environments (PASTURE),

constituée d'enfants Européens vivant dans des zones rurales, l'exposition à l'environnement de la ferme influençait la composition et la maturation du microbiote intestinal, pendant la période de 2 à 12 mois (70). Les communautés bactériennes ayant le potentiel de produire du butyrate, telles que *Roseburia* et *Coprococcus*, ont contribué à la protection contre l'asthme. Cette étude suggère donc que le microbiote intestinal peut contribuer à la protection contre l'asthme par le biais de métabolites, ce qui appuie le concept d'un axe intestin-poumons chez l'homme.

En parallèle, de nombreux facteurs peuvent influencer le développement et la composition du microbiote intestinal, cutané et pulmonaire, tels que le mode de naissance (par césarienne ou par voie vaginale), l'allaitement, l'exposition aux animaux domestiques et l'utilisation d'antibiotiques (71). La naissance par césarienne a été associée au développement de maladies atopiques chez les enfants et il a été démontré que la césarienne modifie totalement la composition du microbiote intestinal du nouveau-né en raison du manque d'exposition à la flore vaginale et fécale maternelle (72). L'utilisation d'antibiotiques altère également à la fois le microbiote en favorisant l'implantation à *posteriori* de bactéries pathogènes et modifie les mécanismes immunitaires conduisant à la tolérance et/ou à l'allergie (73). Il a également été démontré que la dysbiose intestinale induite par les antibiotiques facilitait le développement de l'asthme allergique dans des modèles murins expérimentaux et des études cliniques (74). Dans une cohorte en population générale, l'exposition aux antibiotiques avant et après la naissance était associée à un risque d'asthme plus élevé (75). Aucune différence significative dans la diversité bactérienne n'était observée entre les échantillons provenant de sujets asthmatiques ou de témoins sains. Dans la cohorte Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC), les enfants qui avaient reçu une antibiothérapie avant l'âge de 2 ans étaient plus susceptibles de présenter un asthme à l'âge de 7 ans, bien que le microbiote n'ait pas été caractérisé (76). De même, en Colombie-Britannique (Canada), l'utilisation "contrôlée" d'antibiotiques pendant la petite enfance a été associée à une réduction de l'incidence de l'asthme pédiatrique, en parallèle d'une

préservation des communautés microbiennes intestinales (73). Plusieurs études ont montré que l'exposition précoce aux animaux de compagnie, principalement chiens et chats, était associée à une diminution du risque d'asthme, rhinite allergique et/ou sensibilisation aux aéro-allergènes (77). Cet effet protecteur pourrait résulter d'une exposition précoce aux allergènes ou d'une augmentation de la charge microbienne dans les foyers avec des animaux de compagnie.

14. Le rôle des autres facteurs environnementaux

L'exposition aux **polluants** intérieurs, tels que la fumée de tabac, ainsi que la pollution extérieure, dérivée de la circulation et d'autres activités humaines, est associée à l'asthme. L'impact néfaste de ces expositions pourrait commencer dès la vie intra-utérine (78). De nombreuses études ont montré un impact significatif du tabagisme maternel *in utero* sur les coûts des soins de santé pour les enfants au cours de leurs premières années de vie, dont une part importante est liée aux maladies respiratoires, notamment un impact sur le risque d'asthme et sa sévérité, et en terme de réponse aux corticoïdes inhalés (79–81). Les mécanismes explicatifs pourraient comprendre un impact négatif de l'exposition *in utero* à certaines toxines, dont la nicotine, sur la croissance des poumons et des voies respiratoires du fœtus (10,82,83). L'impact du tabagisme environnemental post-natal sur la maladie asthmatique n'est plus à démontrer, avec une association forte au risque de survenue de l'asthme (84,85), d'exacerbations sévères (84,86) et d'asthme sévère (87,88). L'impact sur la croissance de la fonction respiratoire et sur le risque de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) du jeune adulte est également bien démontré (8,13,82,83,89,90).

En ce qui concerne la pollution particulaire, plusieurs travaux ont confirmé que l'augmentation des principaux polluants atmosphériques gazeux, NO₂, SO₂, CO et O₃, était associée à un risque accru d'asthme (91–93). Les particules fines (PM) de diamètre ≤10µm (par exemple, PM₁₀ et PM_{2,5}) sont particulièrement nocives car elles peuvent pénétrer profondément dans les voies aériennes distales. L'exposition aux particules peut contribuer

au développement de la sensibilisation aux allergènes aéroportés de l'asthme et de la rhinite allergique et peut exacerber un asthme préexistant (94). En effet, l'adsorption d'allergènes tels que les pollens sur des particules entraîne des modifications de ces protéines qui peuvent renforcer leur allergénicité (94,95). Des preuves croissantes montrent également un effet de l'exposition prénatale aux polluants sur le développement de maladies atopiques (78,96). Les changements climatiques, à l'origine d'une augmentation des vagues de chaleur, des orages, d'une plus grande variabilité des températures, d'une augmentation de la pollution atmosphérique, des sécheresses et inondations pourraient augmenter l'exposition à certaines particules et toxiques, contribuant à l'apparition et à l'aggravation des troubles allergiques, en particulier l'asthme et la rhinite allergique (97).

Il a été démontré que les **régimes alimentaires** influencent le développement des réponses inflammatoires et des maladies atopiques comme l'asthme. Les acides gras polyinsaturés oméga-6 induisent la production de médiateurs eicosanoïdes impliqués dans les mécanismes inflammatoires (98). Le poisson et l'huile de poisson sont des sources d'acides gras polyinsaturés oméga-3 à longue chaîne, qui présentent des effets biologiques opposés en ce qui concerne la synthèse des eicosanoïdes. Il a été démontré que la consommation d'huile de poisson par la mère induit des changements immunologiques au sein des cellules de sang de cordon, qui ont une réponse plus faible en cytokines Th2 après une stimulation allergénique (99). La consommation de poisson et d'huile de poisson par la mère pourrait avoir un effet protecteur sur la survenue d'un asthme à l'âge de 3 ans, mais aussi d'une dermatite atopique et de sensibilisations alimentaires (100). De plus, d'autres nutriments et un régime maternel sain et équilibré, contenant des prébiotiques et des probiotiques, pourraient influencer le développement immunitaire du fœtus et donc limiter le développement de maladies atopiques au cours des premières années de vie (101). Comme indiqué précédemment, la consommation de lait de vache non transformé contribue à l'environnement protecteur associé à la vie dans une ferme (65,102).

De plus en plus de travaux suggèrent également un effet protecteur de la supplémentation en **vitamine D** sur le risque de maladies allergiques (103). La vitamine D a de nombreux effets immunomodulateurs sur l'immunité innée et adaptative, via sa translocation vers le noyau des cellules cibles et l'activation de Vitamin D Response-Element (VDRE) dans les régions promotrices (104,105). Au sein des cellules immunitaires innées, comme les macrophages et les cellules épithéliales, la vitamine D peut moduler la réponse aux microbes en guidant la réponse pro-inflammatoire et la production de peptides antimicrobiens, comme la cathelicidine LL-37. De nombreuses études ont fait état de faibles taux de vitamine D chez les patients atopiques. En revanche, les études concernant l'effet préventif sur l'apparition de l'asthme, la progression ou l'amélioration des symptômes montrent des résultats contradictoires, avec peu ou pas de preuves d'un impact bénéfique (106,107).

Parmi les autres facteurs environnementaux, le **stress psychologique prénatal et en début de vie** peut augmenter le risque de maladies atopiques de l'enfant. Il est reconnu depuis longtemps que le stress peut entraîner des poussées de maladies allergiques. Chez certains asthmatiques exposés à un stress maternel depuis leur naissance, il a été montré un dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, entraînant une production moindre de cortisol en réponse au stress (108). Le stress peut augmenter l'activation des mastocytes, peut-être par le biais de l'hormone de libération de la corticotrophine, dont il a été démontré qu'elle augmente en cas de stress dans les poumons des patients asthmatiques (109) En outre, certains médiateurs dérivés des mastocytes, tels que l'histamine et l'IL-6, sont libérés en réponse au stress. Des recherches récentes ont également démontré un impact significatif du stress prénatal sur le développement de l'asthme, mais aussi de la dermatite atopique et de la rhinite allergique, avec un possible effet cumulatif de l'exposition au stress (96,110). Plusieurs études ont suggéré que les enfants exposés au stress prénatal peuvent présenter des niveaux d'IgA intestinales plus faibles que leurs homologues (111). Fournies par le lait maternel dans la petite enfance, les IgA sécrétoires jouent un rôle essentiel dans l'immunité de la muqueuse intestinale. De plus, le stress maternel peut modifier la composition

de la flore vaginale et/ou altérer leur capacité à allaiter, ce qui peut ensuite modifier la composition du microbiote de l'enfant et avoir des conséquences à long terme (112,113).

15. Interactions gène-environnement : le rôle de l'épigénétique

Les études sur des jumeaux nous permettent d'estimer qu'environ 25 % de la variabilité de la sévérité de l'asthme est déterminée par des facteurs génétiques, le reste étant déterminé par l'influence de l'environnement, de facteurs psychosociaux, de traits comportementaux et des comorbidités (114). Les études d'association pangénomique (GWAS) ont permis d'identifier des déterminants associés au risque d'asthme, en particulier des polymorphismes nucléotidiques (SNP), variations les plus courantes du génome (115) (**Tableau 1**). Les signaux d'association se trouvent souvent dans ou près des gènes impliqués dans les voies de la réponse immunitaire innée comme les PRR (e.g. le locus *TLR1*), l'homéostasie des cellules épithéliales (e.g. le locus *IL-33*, alarmine impliquée dans la réponse Th2), la réponse adaptative (e.g. le locus *Human Leukocyte Antigen (HLA)-DR*, impliqué dans la présentation des antigènes par les APC aux LT ; le locus *IL-13*, impliqué dans la réponse Th2 ; le locus *ORMDL Sphingolipid Biosynthesis Regulator 3 (ORMDL3)*, impliqué dans l'inhibition de la synthèse des sphingolipides et la modulation de l'effet des allergènes aéroportés), ou dans les changements structurels des voies aériennes (e.g. le locus *Thyrosine Kinase, Endothelial (TEK)*, impliqué dans le remodelage bronchique) (116,117).

Les modifications épigénétiques jouent un rôle clé dans les interactions gène-environnement qui influencent le développement de l'asthme à l'âge pédiatrique. Contrairement aux variations génétiques, les modifications épigénétiques peuvent se produire rapidement, fournissant une explication potentielle à l'augmentation rapide de la prévalence des maladies atopiques au cours des dernières décennies. Elles correspondent à des modifications biochimiques de la chromatine, affectant l'ADN ou les histones / le positionnement des nucléosomes, mais pas la séquence nucléotidique du génome (118,119). La méthylation de l'ADN se produit sur les sites dinucléotidiques cytosine - phosphate -

guanine (CpG), qui sont généralement situés dans les régions promotrices ou amplificatrices des gènes, de faibles niveaux de méthylation de l'ADN étant associés à une activité transcriptionnelle plus élevée du gène. Les modifications des histones comprennent la phosphorylation, l'ubiquitination, l'acétylation et la méthylation, générant un enroulement plus ou moins serré de l'ADN avec un impact sur son accessibilité à la machinerie transcriptionnelle. Parmi les autres modifications épigénétiques figurent les microARN (miRNA), qui exercent des effets d'interférence sur les ARN messagers (ARNm) qu'ils ciblent. Une association directe entre certains facteurs environnementaux et des altérations épigénétiques a été démontrée par plusieurs études dans l'asthme (**Tableau 1**). Par exemple, le mode de vie à la ferme, lié à un risque plus faible d'asthme chez l'enfant, pourrait être associé à une hypométhylation significative de régions contenant des gènes impliqués dans l'asthme (e.g. famille *ORMDL*) et la régulation des IgE (*IL-13* et *IL-4*) (120). Il a été démontré que de nombreux SNP associés à l'asthme sont situés dans les régions non codantes des gènes qui sont soumises à la méthylation de l'ADN, influencée par les particules de pollution, ce qui suggère que des modifications épigénétiques peuvent sous-tendre le lien entre la pollution atmosphérique et la susceptibilité génétique à l'asthme (121,122). Ainsi, une exposition accrue à la pollution atmosphérique serait associée à une hyperméthylation du locus *FOXP3*, à l'origine d'une altération des Treg (123). La transmission de la susceptibilité à l'asthme pourrait également résulter de variations épigénétiques ayant leurs origines *in utero*, comme le suggère un risque plus élevé d'asthme et d'allergies chez les enfants ayant des antécédents maternels d'asthme que chez ceux ayant des antécédents paternels (124). Ces différences pourraient se transmettre d'une génération à l'autre. Ainsi, il a été démontré un surrisque d'asthme chez les enfants ayant une grand-mère maternelle ayant fumé pendant la grossesse (125) Ces différences épigénétiques survenant *in utero* impliqueraient des profils différentiels de méthylation de l'ADN de plusieurs gènes de molécules clés des voies de régulation, liées aux processus de développement, métaboliques et inflammatoires qui peuvent contribuer à la pathogenèse de l'asthme (126).

Tableau 1 : Exemples de variants génétiques (SNP) et épigénétiques associés à l'asthme

Fonction	Gène	Risque associé	Références
Variants génétiques			
Remodelage des voies aériennes	TEK	Risque d'asthme Risque d'asthme allergique	<i>Hall R, et al. (116)</i> <i>Almoguera B, et al. (127)</i>
PRR	TLR1	Risque d'asthme allergique aux graminées	<i>Ferreira M, et al. (128)</i>
Alarmines épithéliales	IL-33	Risque d'asthme	<i>Moffatt MF, et al. (117)</i>
	TSLP	Risque d'asthme allergique aux graminées	<i>Ferreira M, et al. (128)</i>
Présentation antigénique	HLA-DR	Risque d'asthme Risque d'asthme allergique aux graminées	<i>Moffatt MF, et al. (117)</i> <i>Ferreira M, et al. (128)</i> <i>Deménais F, et al. (129)</i>
	HLA-DQ	Risque d'asthme	<i>Moffatt MF, et al. (117)</i> <i>Deménais F, et al. (129)</i>
Déséquilibre Th1 / Th2	IL-13	Risque d'asthme	<i>Hall R, et al. (116)</i>
	IL-4R	Risque d'asthme	<i>Hall R, et al. (116)</i> <i>Moffatt MF, et al. (117)</i> <i>Deménais F, et al. (129)</i>
	STAT6	Risque d'asthme	<i>Hall R, et al. (116)</i> <i>Moffatt MF, et al. (117)</i> <i>Deménais F, et al. (129)</i>
	GATA3	Risque d'asthme	<i>Hall R, et al. (116)</i> <i>Deménais F, et al. (129)</i>
	TIM3	Risque d'asthme pédiatrique (population Chinoise)	<i>Wu QW, et al. (130)</i>
Synthèse des sphingolipides	ORMDL3	Risque d'asthme Risque d'asthme avec début dans l'enfance	<i>Hall R, et al. (116)</i> <i>Moffatt MF, et al. (117)</i>
Altérations épigénétiques			
Déséquilibre Th1 / Th2	IL-13	Asthme : Hypométhylation associée à l'environnement protecteur de la ferme (locus des cytokines Th2)	<i>Michel S, et al. (120)</i>
Tolérance / Treg	FOXP3	Asthme : Hyperméthylation associée à augmentation pollution environnementale	<i>Nadeau KC, et al. (123)</i>
Synthèse des sphingolipides	ORMDL3	Asthme : Hypométhylation associée à l'environnement protecteur de la ferme (locus des cytokines Th2)	<i>Michel S, et al. (120)</i>

FOXP3 : Forkhead Box P3 ; GATA : Trans-acting T-cell-specific transcription factor ; HLA : Human Leukocyte Antigen ; IL : Interleukine ; ORMDL3 : ORMDL Sphingolipid Biosynthesis Regulator 3 ; SNP (Single-nucleotide polymorphism) : Polymorphisme nucléotidique ; STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription ; TEK : Thyrosine Kinase, Endothelial ; Th : Réponse T helper de type ; TIM3 : T-cell immunoglobulin mucin-3 ; TLR : Toll like receptors ; Treg : Lymphocytes T régulateurs ; TSLP : Thymic Stromal Lymphopoietin

II – L’asthme de l’enfant

21. Epidémiologie

L'étude "Global Burden of Disease" (GBD) a permis d'estimer que 358,2 millions de personnes souffraient d'asthme dans le monde, contribuant à hauteur de 1,1% à la totalité de la morbidité mondiale en 2015 (131). En Europe, la prévalence rapportée dans la population générale varie de 1,4% en Bosnie-Herzégovine à 20,6% en Suède (132). En France, l'asthme concernerait 3,5 millions de personnes, soit environ 7% des adultes (133). C'est la maladie chronique la plus fréquente de l'enfant. Sa prévalence, en augmentation, était estimée à 9% des enfants d'âge préscolaire (grande section de maternelle) en 2012-2013 ; à 8,8% des enfants d'âge scolaire (CM2) en 2006-2007 ; et à 7,4% des adolescents (classe de 3^{ème}) en 2006-2007 (6). Les exacerbations d'asthme restent un motif très fréquent d'hospitalisations, en particulier chez l'enfant, avec un taux annuel moyen d'hospitalisation en France de 30,1/10000 enfants en 2007-2009, et un taux supérieur à la moyenne nationale dans la région des Hauts-de-France (32/10000) (134).

L'asthme de l'enfant génère des dépenses importantes de santé publique, bien que peu de données soient disponibles en France sur les déterminants de ces coûts directs. En 2004, le coût annuel était estimé à 1,5 milliard d'euros (133). Par comparaison, en 2011-2012, au Royaume-Uni, le coût total de l'asthme pour le service de santé publique avait été estimé à environ 1 milliard de livres sterling, 74% de ce coût étant attribué aux soins primaires (exacerbations et hospitalisations) et aux médicaments (60% de prescriptions, 14% de consultations) (135). L'asthme peut également avoir un impact indirect, en particulier chez l'enfant, avec un absentéisme scolaire et une altération de la qualité de vie, avec limitation des activités quotidiennes et retentissement sur le sommeil (132).

22. De l'asthme aux asthmes

Au cours du 20^{ème} siècle, les coûts liés au fait de ne pas reconnaître et traiter correctement l'asthme ont déclenché l'élaboration de recommandations quant à sa prise en charge, et une augmentation progressive de la recherche sur l'asthme, motivée par la santé publique et l'économie de la santé (136). Plusieurs recommandations nationales ont été élaborées dans les pays industrialisés : recommandations de la Thoracic Society of Australia and New Zealand en 1989 (137), recommandations de la British Thoracic Society en 1990 (138), directives pratiques Canadiennes en 1990 (139), directives du ministère américain de la santé en 1991(140), puis mise en place de la Global Initiative for Asthma (GINA) en 1993 (141). L'asthme pédiatrique a été inclus dans le GINA dès le début, et les chapitres pédiatriques étaient majoritairement orientés vers la clinique, sur la base des meilleures preuves disponibles (141). En France, la prise en charge des crises d'asthme aiguës graves (AAG) de l'adulte et de l'enfant a fait l'objet d'une des premières conférences de consensus, organisée par la Société de réanimation de langue française en 1988, révisée en 2002 (142). Les premières recommandations spécifiques de l'enfant apparaîtront en 2007 avec les recommandations du Groupe de Recherche Sur les Avancées en PneumoPédiatrie (GRAPP) quant à la prise en charge de la crise d'asthme (143), puis en 2009 avec des recommandations spécifiques au nourrisson de moins de 36 mois (144). Ces publications ont permis d'améliorer la prise en charge médicale des enfants asthmatiques et de diffuser des recommandations thérapeutiques, en soulignant le rôle de l'inflammation dans le développement de la maladie, la nécessité d'obtenir un contrôle des symptômes et l'intérêt de la surveillance de la fonction respiratoire (141). Cependant, il est maintenant reconnu que l'asthme, en particulier à l'âge pédiatrique, est une affection hétérogène. Cette approche suggère qu'il y a de multiples étiologies qui peuvent nécessiter différentes méthodes diagnostiques et prises en charge thérapeutique, faisant de l'asthme une entité "syndromique" plutôt qu'une maladie homogène.

23. Histoire naturelle

La meilleure compréhension de l'histoire naturelle de l'asthme au cours de l'enfance a été rendue possible grâce aux cohortes néonatales. Différents profils d'évolution ont été décrits au cours de l'enfance, et les facteurs susceptibles d'influencer l'histoire naturelle de l'asthme sont multiples. Dans la cohorte historique de Tucson, le profil "sifflements à début précoce" était associé au tabagisme maternel, à l'absence d'atopie personnelle et familiale, et à une altération fonctionnelle précoce et persistante (145). Le profil "sifflements à début tardif" était associé au sexe masculin, aux antécédents maternels d'asthme, à l'atopie et à une rhinite allergique comme comorbidité. Le profil "sifflements persistants" cumulait les facteurs de risque des 2 précédents groupes, en particulier une dégradation précoce de la fonction respiratoire. Dans la cohorte néonatale en population générale Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC) au Royaume-Uni, six profils d'évolution étaient décrits, et les cinq profils avec sifflements étaient associés à l'asthme maternel alors que l'hyperréactivité bronchique était uniquement associée aux profils avec asthme persistant dans le temps (146). L'atopie était également associée aux profils d'asthme qui persistaient dans le temps, avec des profils de sensibilisation différents en fonction de l'âge de début. Dans la cohorte néonatale Manchester Asthma and Allergy Study (MAAS), le risque d'admission à l'hôpital pour exacerbation dans les 11 premières années de vie était le plus important pour les enfants avec un profil de sensibilisation précoce et multiple, et dans une moindre mesure avec une sensibilisation aux acariens (147). Les cohortes Multizentrische Allergie Studie (MAS), Protection against Allergy: Study in Rural Environments (PASTURE) et Pollution and Asthma Risk : an Infant Study (PARIS) ont également bien démontré le rôle des sensibilisations allergiques précoces et multiples dans le risque de récurrence des exacerbations, de la persistance de l'asthme, et de l'altération de la fonction respiratoire à long terme (36–38). D'autres travaux ont étudié l'évolution de la fonction respiratoire. Aux Etats-Unis, l'étude Childhood Asthma Management Program (CAMP) a permis d'étudier les profils de croissance de la fonction respiratoire jusque l'âge adulte (30 ans) chez des enfants

asthmatiques inclus entre 4 et 11 ans (10). Quatre groupes d'effectifs proches ont été mis en évidence : un profil de croissance normale de la fonction jusqu'à l'âge de 20 ans, puis un déclin physiologique à partir de l'âge de 30 ans et 3 profils d'évolution anormale : déclin précoce avant 30 ans ; croissance réduite n'atteignant pas 100% de la fonction théorique ; et croissance réduite associée à un déclin précoce. Ces 2 derniers profils étaient très significativement associés au risque de BPCO du jeune adulte (36% vs 8% si croissance normale). Un profil d'évolution fonctionnelle anormale était associé au tabagisme *in utero*. Le profil de croissance fonctionnelle réduite était associé au sexe masculin, à l'asthme à début précoce et à des altérations fonctionnelles déjà présentes à l'inclusion avec en plus l'atopie quand il était associé à un déclin précoce.

Sur le plan lésionnel, il est maintenant établi que le remodelage apparaît précocement dans l'histoire naturelle de l'asthme, probablement entre 3 ans et 6 ans (148–151). Il existe une corrélation entre l'âge et le remodelage, qui touche l'épaisseur de la membrane basale, la vascularisation et l'épaisseur du muscle lisse, avec un impact positif de l'atopie sur la prolifération du muscle, potentiellement *via* les récepteurs de haute affinité des IgE (FcεRI) présents sur le muscle bronchique (151).

L'ensemble de ces travaux suggère que l'histoire naturelle de l'asthme est influençable par de nombreux paramètres, et qu'il existe une fenêtre d'opportunité entre 1 et 3 ans, période pendant laquelle une intervention pourrait minimiser l'altération de la fonction respiratoire, prévenir l'installation d'un remodelage, et modifier l'histoire naturelle de l'asthme.

24. L'exacerbation : un évènement particulier dans l'histoire de l'asthme

Les exacerbations, ou crises d'asthme, constituent des événements clés dans l'histoire naturelle de l'asthme de l'enfant et sont un des marqueurs de l'asthme sévère, bien qu'elles puissent aussi survenir dans l'asthme léger (152). Cet événement, fréquent chez le jeune enfant, est marqué par une intensification de la réponse inflammatoire. Les mécanismes sous-jacents ne sont pas entièrement compris et peuvent varier au cours de l'enfance (2,153). Chez

les enfants d'âge scolaire, de multiples facteurs, tels que l'exposition à des allergènes, à des polluants intérieurs et extérieurs, les infections virales ou l'association de ces différents facteurs, peuvent entraîner une crise d'asthme caractérisée par une hypersécrétion de mucus, une éosinophilie des voies aériennes et une obstruction du flux d'air (2). Au cours des années préscolaires, les infections, surtout virales, sont les principaux déclencheurs alors que la contribution des autres facteurs est moins claire. Les traitements de fond conventionnels se sont révélés insuffisants pour prévenir les crises d'asthme chez les enfants d'âge préscolaire (154,155). Chez certains enfants, les crises d'asthme peuvent ne pas répondre aux traitements par stéroïdes oraux, notamment à l'âge préscolaire, raison pour laquelle d'autres stratégies utilisant des macrolides ont été proposées (156–158).

25. L'asthme sévère : une entité distincte

L'asthme est bien contrôlé pour la plupart des enfants avec des doses faibles à moyennes de corticostéroïdes inhalés (CSI) et lorsque les facteurs modifiables sont traités. L'asthme sévère (AS) de l'enfant est aujourd'hui une entité bien définie, différente de l'AS de l'adulte. En 2010, une première définition a été établie, basée sur la persistance de symptômes de mauvais contrôle de l'asthme (présence de symptômes d'asthme fréquents dans les 4 dernières semaines), d'exacerbations sévères (nécessitant une corticothérapie générale et/ou une hospitalisation), ou d'une obstruction bronchique persistante au décours d'un test aux corticoïdes, malgré une forte pression thérapeutique, définie par une corticothérapie inhalée à doses fortes ($\geq 800 \mu\text{g}/\text{jour}$ d'équivalent budésonide) associée à un deuxième traitement de fond (bronchodilatateur de longue durée d'action, antileucotriène, théophylline) ou la nécessité d'une corticothérapie générale au long cours (159,160). Cependant, une pression thérapeutique élevée, notamment de fortes doses de corticothérapie inhalées, voire générales, exposent l'enfant à des complications métaboliques à long terme avec un retentissement sur la croissance staturale à l'âge adulte. C'est pourquoi les sociétés savantes Européennes et Américaines ont révisé en 2014 ces recommandations, pour aboutir à la définition que nous utilisons aujourd'hui : (1) L'asthme sévère est également défini lorsque

le besoin d'une forte pression thérapeutique, comme définie précédemment, est nécessaire pour obtenir le bon contrôle de l'asthme (2). L'asthme sévère doit être distingué de l'asthme difficile, pour lequel s'ajoutent des facteurs modifiables participant au mauvais contrôle (comorbidités, exposition à un environnement délétère, mauvaise réalisation du traitement de fond), alors que l'asthme sévère est "intrinsèquement" résistant au traitement (161). Ces deux entités se regroupent sous le terme d'asthme problématique. A l'heure actuelle, les facteurs influençant la sévérité de l'asthme, et la mauvaise réponse aux traitements de fond standards pendant l'enfance restent mal compris (162). Les biothérapies, qui correspondent au palier 5 de traitement du GINA, sont à l'étude depuis quelques années, ouvrant des perspectives de traitement efficace dans ces situations difficiles. En 2021 en France, trois biothérapies sont disponibles en pédiatrie : l'omalizumab (anti-IgE) et le mepolizumab (anti-IL5) à partir de 6 ans, le dupilumab (anti-IL4R α , sous-unité commune du récepteur de l'IL-4 et de l'IL-13) à partir de 12 ans. Pour ces 2 dernières, nous manquons de recul sur leur efficacité en "vraie vie". De plus, les modalités de choix ou de relai entre ces nouvelles modalités thérapeutiques restent à préciser chez l'enfant. Certains patients avec un asthme non allergique, non éosinophilique resteront probablement non éligibles à ces nouvelles modalités thérapeutiques (163).

Mieux comprendre les caractéristiques de l'AS de l'enfant pourrait orienter ces choix thérapeutiques. Au cours des dernières années, certains travaux ont montré l'importance des exacerbations, fréquentes et volontiers sévères, de l'association avec l'atopie et avec des comorbidités atopiques (allergies alimentaires en particulier), et les altérations de la fonction respiratoire associées, non systématiques chez l'enfant (46,164,165). A l'avenir, il est probable que la compréhension des mécanismes physiopathologiques propres à l'AS, ou à certains sous-types d'AS, permettra de mieux comprendre les tableaux observés et de sélectionner des stratégies thérapeutiques ciblées.

26. Du phénotype à l'endotype : vers une réconciliation et la personnalisation du traitement

Au cours des 20 dernières années, plusieurs approches ont permis de catégoriser les patients asthmatiques, soit par des caractéristiques cliniques spécifiques, soit par le processus physiopathologique sous-jacent (136). Ces approches sont illustrées à la **Figure 2** (166).

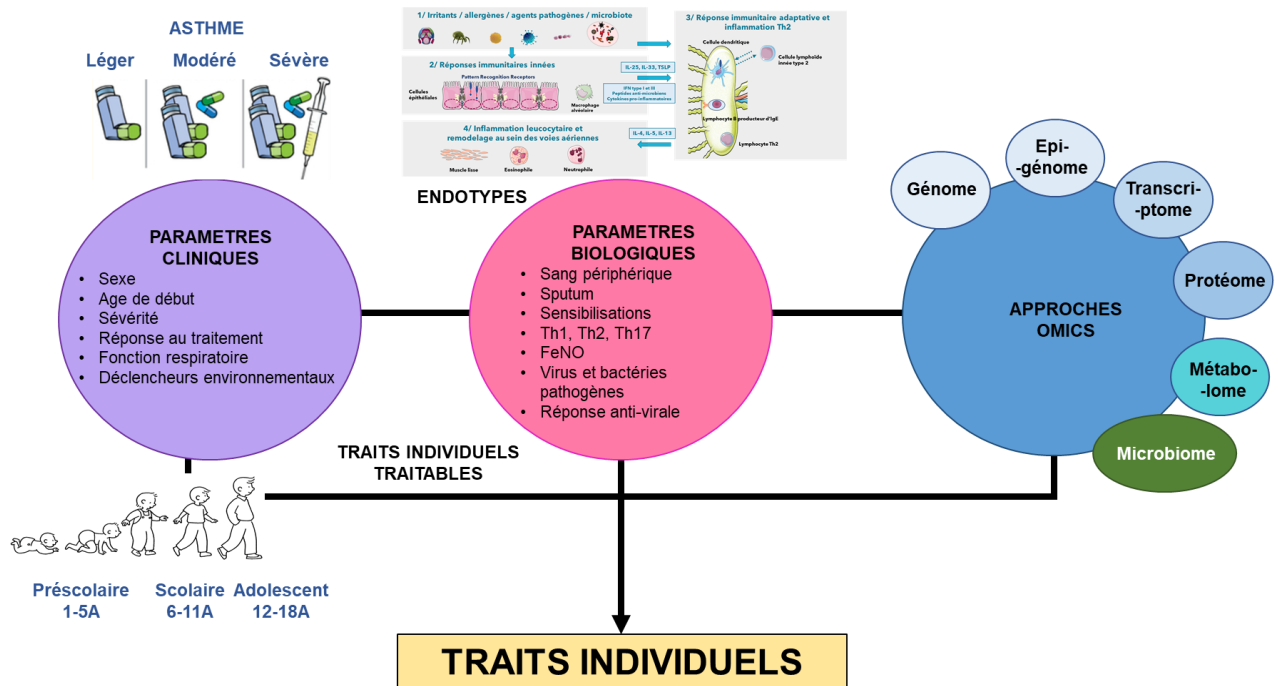
Une première façon de "déconstruire" l'asthme a été de recourir aux **phénotypes**, définis par l'ensemble des caractéristiques ou symptômes observables chez un patient (136,167). L'identification de phénotypes pourrait aider à sélectionner des médicaments qui améliorent la présentation clinique observée, pour sélectionner les "bons" des "mauvais" répondeurs et avoir une stratégie thérapeutique plus ciblée. L'avènement des études de cohortes pédiatriques a permis d'identifier des phénotypes spécifiques de l'enfant. A l'heure actuelle, les principaux critères cliniques intervenant dans ces phénotypes sont l'atopie, la sévérité, et la trajectoire d'évolution clinique et fonctionnelle, avec une distinction en fonction des groupes d'âge : préscolaire (1-5 ans), scolaire (6-11 ans) et adolescents (12-18 ans) (149,164,168,169). Les analyses en clusters nous ont permis de préciser certains de ces phénotypes. En France, les travaux de l'équipe de Jocelyne Just décrivant les enfants du programme de l'asthme à Trousseau ("Trousseau Asthma Program") ont été précurseurs. A l'âge scolaire, 3 principaux phénotypes ont ainsi été décrits : asthme léger ; asthme avec exacerbations sévères et allergies multiples (âge médian : 8,8 ans, taux élevés d'éosinophiles et de basophiles, sensibilisations multiples aux aéro-allergènes et aux allergènes alimentaires) ; et asthme sévère avec obstruction bronchique (âge médian : 10,3 ans ; taux élevés de neutrophiles, indice de masse corporelle (IMC) plus élevé) (169). Chez l'adolescent, les données de la cohorte néonatale de l'île de Wright ont permis d'identifier 6 phénotypes d'asthme : 1/ Garçons, début dans l'enfance, atopie, fonction respiratoire normale ; 2/ Début dans l'enfance, altérations de la fonction respiratoire ; 3/ Filles, début dans l'enfance, atopie, altérations sévères de la fonction respiratoire, tabac ; 4/ Filles, sifflements, asthmes non

diagnostiqués avant l'évaluation, tabac ; 5/ Filles, début tardif, fonction respiratoire normale ; 6/ Garçons, début tardif, atopie, altérations de la fonction respiratoire (170). Nous détaillerons les phénotypes décrits à l'âge préscolaire dans le chapitre dédié.

Une autre façon d'identifier des sous-groupes d'asthme est de recourir aux **endotypes**, c'est-à-dire aux différents mécanismes physiopathologiques sous-jacents. Constituer des groupes distincts de patients asthmatiques, identifiés par des biomarqueurs cellulaires ou moléculaires, a été en partie motivé par le développement de nouvelles modalités de traitements, agissant sur des voies physiopathologiques distinctes. Ces recherches sont en constante progression et certains sous-types d'asthme pourraient émerger ou être précisés dans les années à venir, et il est probable que les endotypes évolueront au fil du temps, à mesure que notre compréhension de la physiopathologie des voies respiratoires continuera de progresser. Le nouveau concept des "**traits individuels traitables**" intègre les 2 précédents, et est probablement un meilleur reflet de nos connaissances à l'heure actuelle. Ce concept englobe les phénotypes et les endotypes, en prenant en compte des caractéristiques cliniques, environnementales, fonctionnelles, biologiques et/ou les comorbidités (136,166,171).

Figure 2 : Approches pour phénotyper et endotyper l'asthme de l'enfant

Adaptée de Tyler SR, Bunyavanich S. *J Allergy Clin Immunol.* 2019 (166)



FeNO : Fraction exhalée du monoxyde d'azote ; Th : Réponse T helper de type

Actuellement, les approches pour sous-typer l'asthme chez l'enfant se basent sur 1/ Les caractéristiques cliniques ou biologiques de routine (phénotypes), 2/ Les mécanismes physiopathologiques sous-jacents (endotypes). A l'avenir, il est probable que les technologies OMICS permettront de préciser les sous-groupes et d'identifier des traits individuels qui permettront de choisir une stratégie thérapeutique ciblée.

27. L'asthme préscolaire : une entité encore mal définie à une période cruciale de la vie

L'asthme préscolaire apparaît comme une entité mal définie dans la littérature, les auteurs anglo-saxons, Nord-Américains en particulier, employant le terme de "sifflements récurrents" plutôt que d'"asthme" avant l'âge de 6 ans. L'une des causes principales est que les sifflements sont un symptôme fréquent avant 6 ans, et avant 3 ans en particulier, comme démontré dans la cohorte historique de Tucson, avec au moins un épisode de sifflement avant 6 ans chez près d'un enfant sur deux (145). Cependant, la récurrence des sifflements, ainsi que leur présence au-delà de l'âge de 3 ans, sont bien associés à la persistance de l'asthme à l'âge de 6 ans, montrant bien qu'on peut probablement regrouper les "sifflements récurrents et persistants" et l'"asthme préscolaire" sous la même entité. De plus, les cliniciens sont confrontés à la difficulté d'évaluer la fonction respiratoire à cette période de la vie et peuvent être limités pour poser le diagnostic, en l'absence de symptomatologie typique ou d'exacerbation.

La définition de phénotypes à l'âge préscolaire fait débat dans la littérature. En 2008, Brand, *et al* définissaient 2 grands phénotypes : asthme viro-induit (manifestations exclusivement liées aux infections virales, sans manifestation intercritique) et à facteurs déclenchant multiples (MTW : Multiple trigger wheeze : asthme persistant avec manifestations intercritiques et comorbidités allergiques fréquentes) (172,173). Cette distinction a depuis été largement remise en question (174), en particulier en lien avec l'absence de stabilité au cours du temps de ces 2 phénotypes, avec un passage possible de l'un à l'autre (175,176). De plus, en 2007, Bacharier, *et al.* ont identifié un phénotype distinct d'asthme viro-induit : l'asthme intermittent sévère (SIW : Severe intermittent wheeze), caractérisé par la répétition des exacerbations, souvent sévères et nécessitant une corticothérapie générale, séparées par des périodes sans symptôme (154). Ce phénotype, et en particulier le risque d'exacerbations, pourrait être peu influencé par les traitements de fond conventionnels comme les CSI. Jocelyne Just et son équipe, par analyse en clusters, ont proposé 3 phénotypes distincts :

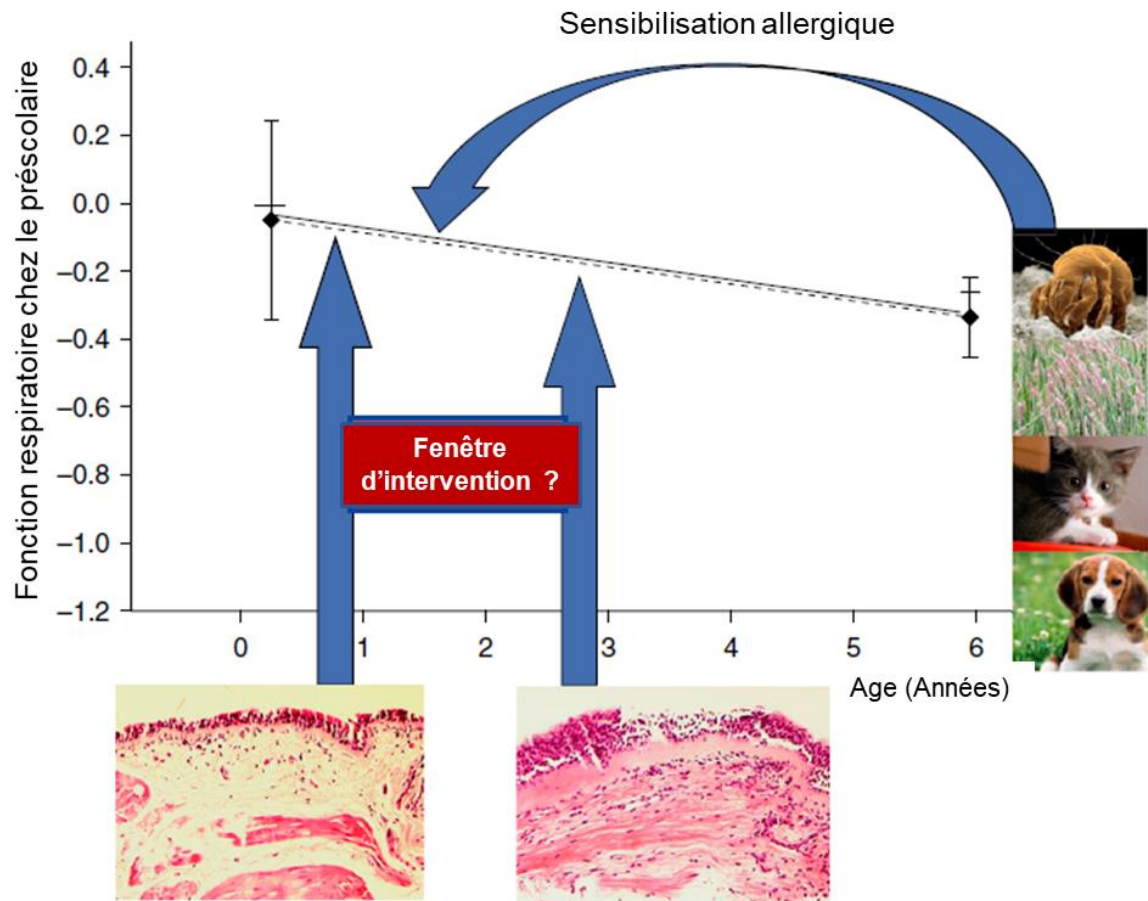
asthme léger viro-induit, asthme atopique à facteurs déclenchant multiples, asthme sévère cortico-résistant non-atopique (168). Finalement, la classification en phénotypes chez le jeune enfant asthmatique semble faire intervenir l'atopie, les éventuels facteurs déclenchant et la réponse au traitement, mais se heurte à l'absence de stabilité, le profil de ces jeunes enfants évoluant rapidement en fonction de multiples facteurs dynamiques.

Ces différents travaux suggèrent que l'âge préscolaire pourrait constituer une période cruciale d'installation de la pathologie, permettant d'envisager des interventions visant à modifier l'histoire naturelle de la maladie. En particulier, cela permettrait de modifier l'impact des sensibilisations allergiques sur le muscle bronchique et les phénomènes de remodelage, qui interviennent après 3 ans, et d'éviter les conséquences sur l'altération précoce de la fonction respiratoire (**Figure 3**) (15).

L'exacerbation constituant un moment particulier dans l'histoire de l'asthme, caractérisé par un "orage" cytokinique intense, la compréhension des voies physiopathologiques menant aux crises d'asthme, en particulier à l'âge préscolaire, pourrait nous permettre de comprendre l'hétérogénéité de la maladie et son évolution, par l'identification de profils différents. Ceci pourrait permettre de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques avec comme objectif, non seulement le contrôle des symptômes et des exacerbations, mais aussi la préservation de la fonction respiratoire.

Figure 3 : L'âge préscolaire : une fenêtre d'opportunité pour des interventions précoces

Issue de Saglani S, Bush A. Am J Respir Crit Care Med 2015 (15)



Les enfants avec un asthme qui évolue depuis l'âge préscolaire et persiste à l'âge scolaire ont une altération précoce de la fonction respiratoire, qui apparaît entre la naissance et 6 ans. Les changements structurels des voies respiratoires se développent parallèlement entre 1 et 6 ans chez les siffleurs préscolaires, et les changements structurels affectant le muscle lisse bronchique sont exacerbés chez les patients qui présentent des signes de sensibilisation allergique précoce. L'ensemble des données physiopathologiques suggère qu'il existe une fenêtre d'opportunité entre 1 et 3 ans, période pendant laquelle une intervention pourrait minimiser l'altération de la fonction respiratoire et modifier l'histoire naturelle de l'asthme.

III- Vue d'ensemble des réponses immunitaires au sein des voies aériennes

Le poumon est constamment exposé à des agents extérieurs qu'il doit contenir, voire éliminer afin de maintenir la fonction vitale de la respiration. Pour cela, différentes stratégies ont été développées, permettant une gradation de la réponse qui met en jeu successivement l'épuration mucociliaire et la barrière épithéliale, la réponse immune innée et enfin l'immunité adaptative. Dans ce chapitre, nous allons présenter brièvement les cellules et molécules qui interviennent dans la réponse anti-infectieuse au sein des voies aériennes, dans les mécanismes à l'origine de la tolérance et de la réaction inflammatoire dans l'asthme, en insistant sur l'immunité innée qui joue un rôle clé dans les premières étapes de la réponse anti-infectieuse et conditionne la réponse adaptative.

31. Réponse anti-infectieuse appropriée au sein des voies aériennes

Les cellules épithéliales des voies respiratoires (AEC) tapissant les voies aériennes supérieures et inférieures, sont les principales cibles cellulaires des agents pathogènes et agissent comme des cellules sentinelles en réponse à l'infection (177–179). Ces cellules de structure sont un élément central de la réponse immunitaire innée (180). Dans les voies aériennes supérieures et inférieures, elles sont des acteurs majeurs de la barrière physico-chimique complexe, via la présence de jonctions intercellulaires serrées et leur participation à l'épuration muco-ciliaire, permettant l'élimination des particules étrangères. Si les agents pathogènes ne sont pas éliminés, les PAMP présents à leur surface sont reconnus par les PRR de surface, en particulier les TLR et les hélicases à ARN intracellulaires, principalement pour les pathogènes intracellulaires. Bien que les AEC jouent un rôle précoce et central dans l'orchestration des défenses immunitaires innées, d'autres cellules immunitaires innées, comme les macrophages alvéolaires (AM) et les DC, en particulier les pDC, sont également impliquées dans les réponses immunitaires innées contre les agents pathogènes (181–185). L'activation des PRR sur les AEC et les cellules immunitaires innées déclenche diverses voies de signalisation, telles que les Interferon Regulatory Factor (IRF) 3 et 7, et la voie du Nuclear

Factor kappa B (NF- κ B). Cela conduit à la production de molécules antivirales telles que les IFN de type I et de type III, et les peptides antimicrobiens, dont les cathélicidines et les défensines ainsi que certains Interferon-Stimulated Genes (ISG) (186). Les peptides antimicrobiens ont des activités immunomodulatrices et peuvent modifier les réponses cellulaires de l'hôte. En particulier, LL-37, également appelé peptide antimicrobien cationique humain, est le seul peptide humain de la famille des cathélicidines et l'un des plus étudiés (187,188). Dans des modèles *in vitro*, LL-37 a la capacité de réduire la réplication virale, notamment pour le VRS (188,189). Les AEC produisent également des cytokines pro-inflammatoires impliquées dans le recrutement de monocytes / macrophages, DC, LT et de granulocytes, tels que les éosinophiles et les neutrophiles. Cela favorise la réponse immunitaire adaptative par la maturation des DC et leur migration vers les ganglions lymphatiques de drainage associés aux voies respiratoires.

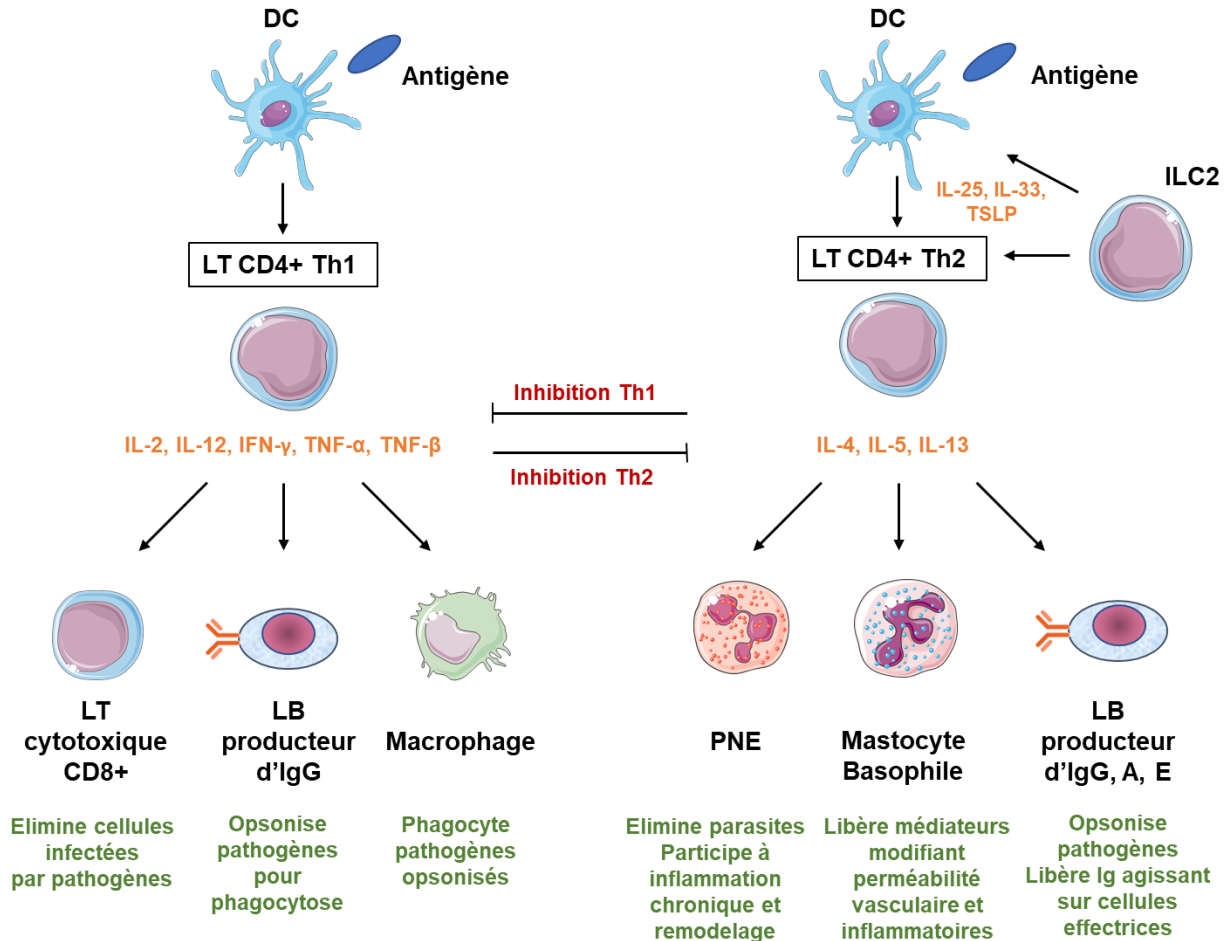
Les DC sont les principales cellules présentatrices d'antigènes (APC) et constituent le pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les autres APC sont les macrophages et les LB. Elles internalisent les antigènes, les transforment en fragments peptidiques et exposent ces peptides, liés à une molécule du CMH de classe II, sur leur surface cellulaire. Lorsque des pathogènes et/ou des antigènes pénètrent les voies aériennes, ils peuvent être endocytés par les APC résidentes, déjà présentes dans les tissus. Les AM sont les plus disponibles immédiatement, et éliminent rapidement les différents agents pathogènes pour maintenir l'homéostasie dans le poumon (190). Les cDC CD103+ CD11b+ β 7-intégrine et les DC dérivées des monocytes (MoDC), stimulées par l'inflammation, peuvent également prélever des antigènes en étendant leurs dendrites dans la lumière des voies aériennes, alors que les pDC ont une capacité limitée à prélever et à présenter des antigènes (191). Sous l'influence des interactions avec l'antigène ou de signaux de danger produits par les cellules environnantes en réaction à cet antigène, les DC subissent une maturation, au cours de laquelle elles perdent leur capacité à capter l'antigène et expriment plus de molécules du CMH et costimulatrices (CD80/86), ainsi que des chimiokines, devenant alors des APC

professionnelles. Ces DC, chargées d'antigènes, migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques de drainage et présentent des peptides sur les molécules du CMH de classe II aux TCR des LT CD4 naïfs. Les DC ont la capacité de polariser les LT vers un type de cellule Th1, Th2, Th17 ou Treg par la sécrétion de cytokines spécifiques, en fonction de leur lignée, de leur état de maturation et des molécules costimulatrices qu'elles expriment. En réponse aux agents infectieux viraux, la réponse appropriée est de type Th1, avec des cytokines comme IFN- γ , IL-2, TNF- α , TNF- β , et IL-12 (**Figure 4**). L'IFN- γ en particulier favorise l'activation et la prolifération des LT cytotoxiques (LTc) CD8+, qui éliminent les cellules infectées par le pathogène au sein des voies aériennes (192). Certaines cellules restent après la clairance virale pour devenir des LT CD8+ mémoire résidents dans les tissus, permettant une réponse immédiate lors de la prochaine infection par le même pathogène (193). L'IFN- γ et l'IL-2 activent également les macrophages qui phagocytent les débris des pathogènes, préalablement opsonisés. Dans les LB, l'IL-12 favorise le changement de classe des Ig vers les IgG1 et IgG4. Les IgG se fixent secondairement sur les particules infectieuses et permettent l'opsonisation. L'ensemble de cette réponse contribue à la clairance des particules infectieuses, à la résolution de l'infection et à l'homéostasie de la muqueuse respiratoire.

Figure 4 : Réponses immunitaires adaptatives Th1 et Th2

Adaptée de :

<http://what-when-how.com/rheumatology/introduction-to-the-immune-system-the-immune-system-in-health-and-disease-rheumatology-part-3/>



DC : Cellule dendritique ; Ig : Immunoglobuline ; IL : Interleukine ; IFN : Interféron ; ILC2 : Cellule lymphoïde innée de type 2 ; LB : Lymphocyte B ; LT : lymphocyte T ; PNE : Polynucléaire éosinophile ; TNF : Tumor Necrosis Factor ; TSLP : Thymic Stromal Lymphopoietin.

Les DC ont la capacité de polariser les cellules T vers un type de cellule Th1 ou Th2 par la sécrétion de cytokines spécifiques, en fonction de leur lignée, de leur état de maturation et des molécules costimulatrices qu'elles expriment. En réponse aux agents infectieux viraux, la réponse appropriée est de type Th1, avec des cytokines comme IFN-γ, IL-2, TNF-α, TNF-β, et IL-12. Dans un contexte atopique, sous l'influence des alarmines épithéliales IL-25, IL-33, TSLP et des ILC2, les DC induisent la polarisation Th2 des LT, avec la production d'IL-4, IL-5 et IL-13.

32. Tolérance naturelle

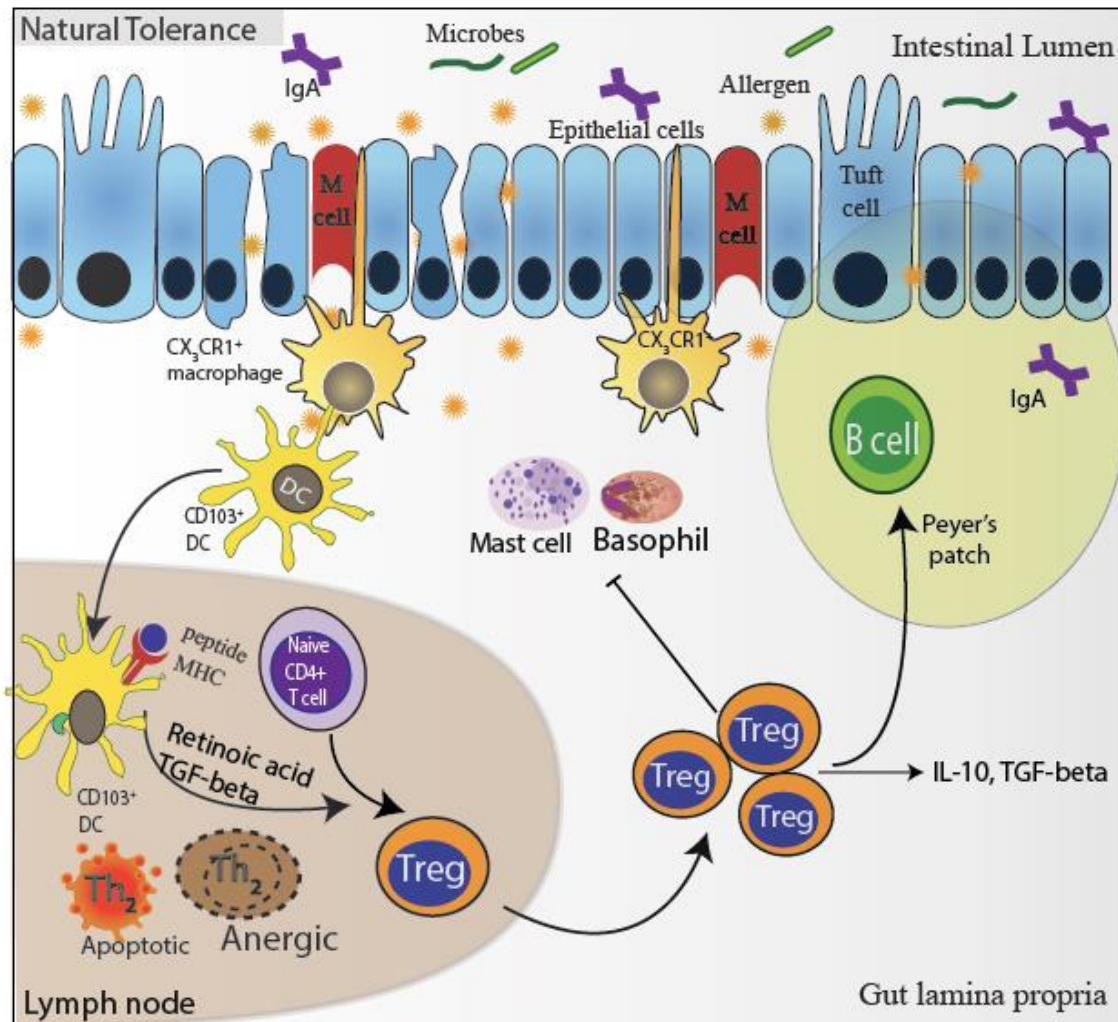
Le système immunitaire doit non seulement être capable de distinguer le soi du non-soi, mais aussi le non-soi inoffensif du non-soi menaçant. Dans une situation physiologique, les individus développent une absence de réponse immunitaire aux antigènes courants non infectieux (comme les allergènes), ou tolérance, par le biais de processus actifs. Les phénomènes de tolérance, représentant un défi unique pour le système immunitaire qui doit faire ces distinctions, ont été bien décrits au sein de la muqueuse gastro-intestinale (42). Comme développé précédemment, le microbiote joue un rôle fondamental dans l'éducation du système immunitaire de l'hôte (43). Dans la **Figure 5**, les mécanismes de tolérance sont représentés en prenant l'exemple du tube digestif.

La réponse initiale se produit avec l'absorption des antigènes par les cellules épithéliales, où elles rencontrent les macrophages et les DC résidentes, qui sont des capteurs précoces pour l'absorption et la reconnaissance des allergènes. Ces cellules peuvent étendre les processus cellulaires vers la lumière. Les immunoglobulines muqueuses IgA agissent soit comme des anticorps neutralisants qui se lient à l'antigène et bloquent sa reconnaissance, soit en permettant la transcytose sélective des antigènes de la lumière intestinale à travers les cellules M au niveau des plaques de Peyer. Les DC sont ensuite activées et deviennent des APC professionnelles (CD103+), migrant vers les ganglions lymphatiques où elles agissent comme régulateurs critiques de la tolérance centrale et périphérique. Elles présentent des antigènes aux LT naïfs et induisent leur différenciation en LT tolérogènes : Th1 et Treg. La tolérance est associée à une réponse prédominante de type Th1, avec production de cytokines telles que l'IFN- γ et le TNF- α . Dans les ganglions lymphatiques drainants, les DC peuvent également induire la différenciation des LT naïfs en Treg induits, exprimant des récepteurs de localisation tissulaire. Deux grandes catégories de Tregs sont décrites : les Tregs naturels CD4+ CD25+ FoxP3+ et les Tregs induits, qui sont induits après stimulation antigénique (194). Les Treg migrent ensuite vers les tissus, sous l'influence de cytokines à destination des tissus, comme le C-C chemokine receptor 9 (CCR9) et le CCR4,

et par les AM dans les poumons en présence d'IL-2 (195). Leur fonction principale est d'inhiber le développement et la fonction d'autres LT non régulateurs en produisant des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- β , ce qui entraîne l'apoptose ou l'anergie des cellules Th2. Ils exercent aussi des fonctions suppressives par le biais de contacts directs entre cellules, notamment avec d'autres LT, influençant ainsi leur activation ou peuvent induire la cytolysse des cellules cibles *via* des mécanismes dépendants des granzymes et des perforines (42,194,195). Ils peuvent également influencer les APC professionnelles et supprimer leur capacité à présenter l'antigène. Les Treg peuvent enfin inhiber directement la dégranulation des mastocytes et des basophiles, indépendamment du TGF- β et de l'IL-10.

Figure 5 : Mécanismes de tolérance aux antigènes : l'exemple du tube digestif

Issue de Nadeau K, Lejeune S, et al. *Immunological mechanisms of allergic disorders*. William Paul's *Fundamental Immunology 8th Edition*, Flajnik M, Singh N, and Holland S (Wolters Kluwer, à paraître)



CD: Cluster of differentiation, DC: dendritic cell; IgA: Immunoglobulin A; IL: Interleukin; MHC: major histocompatibility complex; TGF: transforming growth factor; Treg: regulatory T cell.

La réponse initiale se produit avec l'absorption des antigènes par les cellules épithéliales, où elles rencontrent les macrophages CX3CR1+, et les DC résidentes. Les Immunoglobulines muqueuses IgA, agissent soit comme des anticorps neutralisants qui se lient à l'antigène et inhibent leur absorption, soit en permettant la transcytose sélective des antigènes de la lumière intestinale à travers les cellules M. Les cellules dendritiques sont ensuite activées (CD103+) et migrent vers les ganglions lymphatiques. Elles présentent des antigènes aux cellules T naïves et induisent leur différenciation en Treg, exprimant des récepteurs de localisation tissulaire. Les Treg sont ensuite transportés vers les tissus, sous l'influence de cytokines à destination des tissus, comme le TGF- β , l'acide rétinoïque. Ils peuvent également inhiber le développement et la fonction d'autres LT non régulateurs en produisant des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- β , entraînant l'apoptose ou l'anergie des cellules Th2. Ils peuvent également modifier la sensibilisation par la régulation négative des fonctions de présentation de l'antigène par les DC et peuvent finalement inhiber la dégranulation des mastocytes et des basophiles.

33. L'asthme : modèle de réponse inflammatoire Th2

L'asthme a été longtemps considéré comme une maladie inflammatoire pulmonaire expliquée par un déséquilibre entre les LT CD4+ Th1 et Th2, et ce modèle est en particulier la réponse prédominante chez l'enfant. Avec la découverte d'autres sous-ensembles de LT et une meilleure compréhension de leur plasticité, cette vision initiale simpliste est complétée par un modèle plus complexe impliquant d'autres sous-ensembles de LT. Différents toxiques et antigènes d'origine infectieuse ou non infectieuse peuvent déclencher la réaction inflammatoire dans l'asthme et nous décrivons ici les principales étapes de acteurs impliqués.

En particulier, la réponse allergique respiratoire est définie comme la réaction immunitaire qui suit l'exposition à un aéro-allergène, normalement « inoffensif » chez des individus sensibilisés. La **figure 6** représente la réaction allergique « classique » au sein des voies aériennes. En plus d'une réaction allergique immédiate, appelée phase aiguë, correspondant à une réaction d'hypersensibilité de type I, il existe souvent une réaction ultérieure de phase tardive conduisant à une inflammation chronique lors de contacts persistants ou répétitifs avec l'allergène (**Figure 4**) (196). La sensibilisation allergique est une première étape qui prépare l'individu à un état allergique. Comme évoqué précédemment, elle est facilitée par une activité protéasique endogène de certains allergènes (e.g. activité cystéine ou sérine protéase de certains allergènes des acariens, des blattes, des champignons, de *Felis domesticus* et des pollens d'ambrosie) leur permettant de pénétrer et d'interagir avec les cellules immunitaires innées et les DC au sein de l'épithélium et de la sous-muqueuse.

Dans un environnement asthmatique et dans un contexte de rupture de la barrière épithéliale, la présence d'antigènes d'origine infectieuse ou non-infectieuse au sein de l'épithélium entraîne la libération de cytokines inflammatoires d'"alerte", IL-25, IL-33 et TSLP, collectivement appelées alarmines (197). Ces cytokines ont un rôle clé pour induire un environnement inflammatoire à tendance Th2 dans la muqueuse par l'intermédiaire des

cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2), favorisant l'activation et la maturation des DC. L'IL-25 est un membre de la famille des cytokines IL-17, également connu sous le nom d'IL-17E, et est libéré par des AEC, LT Th2, mastocytes, basophiles et éosinophiles activés, lors d'une exposition à des antigènes, en particulier en présence de protéases (198). L'IL-25 va notamment induire la libération de cytokines Th2 par les LT via son interaction avec son récepteur IL-25R. L'IL-25 est également antagoniste de la différenciation des cellules Th17. L'IL-33 est un membre de la famille des cytokines IL-1 et est produite par les AEC et les mastocytes lors de la détection de substances qu'ils perçoivent comme dangereuses. Elle est également produite, bien qu'en moindre quantité, par les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, les macrophages, les DC et les monocytes (199). Il existe 2 isoformes de l'IL-33 : isoforme longue et isoforme mature, que l'on retrouve à la fois dans l'espace nucléaire et extracellulaire. L'IL-33 se lie à un récepteur composé de deux protéines transmembranaires, dont l'IL-1R1 (appelée ST2) est l'unité principale, puis induit la production de cytokines de type 2, dont l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13, par les cellules hématopoïétiques et surtout par les ILC2. Elle induit également le dépôt de protéines de la matrice extracellulaire et une néoangiogenèse. Le TSLP fait partie de la famille des cytokines IL-2 produites par les AEC. Le TSLP se lie à son récepteur de haute affinité, exprimé sur les mDC, les LT CD4+ et CD8+, les Treg, les LB, les mastocytes, les NKT, les monocytes, les éosinophiles et les basophiles, les cellules musculaires lisses et les AEC. Le TSLP est essentiel au maintien de l'inflammation et induit une éosinophilie et des réponses bronchoconstrictrices dans les voies aériennes.

Une fois activées, les DC migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques de drainage. Elles initient alors la réponse immunitaire adaptative en présentant des peptides dérivés des allergènes aux LT naïfs à l'aide des molécules du CMH de classe II et en entraînant leur différenciation en cellules Th2 spécifiques des antigènes. Trois signaux sont nécessaires pour attirer et pousser les LT CD4 naïfs à devenir des LT Th2 spécifiques des antigènes : 1/ les interactions CMH-peptide-TCR, 2/ les signaux de costimulation et 3/ les cytokines de polarisation Th2 (200). De plus, les DC activées dans un environnement

favorisant les Th2 ne produisent pas d'IL-12, qui est important pour stimuler la réponse Th1 (200). Parmi les cytokines Th2, l'IL-4 joue un rôle critique dans l'induction de la réponse Th2. La source initiale de l'IL-4 semble être le plus vraisemblablement les basophiles et les ILC2, capables d'agir, en coopération avec les DC, en tant que cellules présentatrices d'antigènes pour amorcer les cellules Th2 (201–203). Les cellules NKT invariants (iNKT) pourraient être d'autres acteurs nécessaires à l'initiation de la réponse Th2, comme le suggèrent les modèles d'asthme chez les rongeurs (204).

Après activation, les LT Th2 sécrètent les cytokines Th2 IL-4, IL-13 et IL-5 (**Figures 4 et 5**). Leurs gènes sont adjacents les uns aux autres sur le locus Th2, sur le chromosome 5, et sont activés par des facteurs de transcription tels que *Trans-acting T-cell-specific transcription factor (GATA-3)*, le facteur déterminant de la lignée Th2 (205). L'IL-4 et l'IL-13 se lient au même récepteur, appelé IL-4R (206). L'IL-13 joue un rôle plus décisif dans la phase effectrice (207,208).

Dans les centres germinatifs des ganglions lymphatiques, l'IL-4 et l'IL-13 influencent les interactions entre les LT Th2 et les LB, *via* des signaux de costimulation tels que Cluster of Differentiation (CD40)-CD40 Ligand (CD40L) et CD80/86-CD28, aboutissant au changement de classes des Ig vers les IgG, IgA et IgE. Ces changements se déroulent aussi sous l'influence des LT auxiliaires folliculaires (Tfh) CD4+ CXCR5+. L'IL-4 et l'IL-13 activent également une population de macrophages, appelés macrophages alternativement activés ou cellules M2, qui favorisent la réparation de la matrice extracellulaire. De son côté, l'IL-5 favorise principalement la survie, l'activation et le recrutement systémique des éosinophiles dans la moelle osseuse, qui migrent ensuite dans les voies aériennes sous le contrôle de chimiokines (209–211). Ils contribuent également à la résolution des réponses immunitaires, notamment à la réparation des tissus (212).

Dans la situation de la réaction allergique, l'IL-4 et l'IL-13 favorisent l'expression du FcεRI sur les mastocytes humains. Les IgE spécifiques ou non spécifiques d'un allergène se lient ensuite aux récepteurs FcεRI de haute affinité sur les mastocytes résidant dans les tissus,

induisant une sensibilisation, permettant une réponse allergénique rapide (en quelques minutes) lors d'une exposition ultérieure à l'allergène (196). Lorsqu'un allergène se fixe aux IgE liées au FcεRI fixées à la surface des mastocytes et des basophiles chez les individus sensibilisés, il induit la libération de trois classes de produits biologiquement actifs : (1) ceux stockés dans les granules cytoplasmiques (par exemple, l'histamine, les sérines protéases telles que la tryptase), (2) les médiateurs dérivés des lipides (prostaglandine, leucotriènes), et (3) les cytokines, les chimiokines et les facteurs de croissance nouvellement synthétisés (213). Les granules cytoplasmiques et les médiateurs dérivés des lipides contribuent aux signes et symptômes associés à la réaction aiguë : vasodilatation (produisant un érythème), augmentation de la perméabilité vasculaire (conduisant à un œdème des tissus), contraction du muscle lisse bronchique (entraînant une bronchoconstriction), augmentation de la sécrétion de mucus (entraînant une obstruction bronchique), stimulation des nocicepteurs des nerfs sensoriels (responsables de réactions telles que prurit, éternuements, toux) (196). Les cytokines, chimiokines et facteurs de croissance nouvellement synthétisés ainsi que le recrutement de cellules immunitaires induit par la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire initient la réaction de phase tardive.

La réaction de phase tardive commence deux à six heures après l'exposition à l'antigène, reflétant le recrutement local et l'activation de cellules immunitaires, telles que les lymphocytes Th2, les éosinophiles et les neutrophiles, sous l'influence de chimiokines telles que le Tumor necrosis factor- α (TNF- α), le C-X-C Motif Chemokine Ligand 8 (CXCL8), libérés par les mastocytes et les LT, respectivement (196). Cette infiltration de cellules immunitaires peut se prolonger, notamment en cas d'exposition persistante à l'antigène, entraînant une inflammation chronique au sein des tissus.

Sous l'influence de l'IL-5 et des autres cytokines Th2, les éosinophiles expriment des molécules d'adhésion et sont recrutés au sein des voies aériennes. L'éotaxine, qui se lie spécifiquement au C-C Chemokine Receptor 3 (CCR3), fortement exprimé sur les éosinophiles, est considérée comme jouant un rôle central dans le recrutement des

éosinophiles et l'inflammation subséquente dans les tissus (209–211). Les cytokines Th2, en particulier l'IL-5, sont ensuite de puissantes inductrices de la libération des protéines des granules d'éosinophiles (214). Les granules d'éosinophiles stockent quatre protéines de base de bas poids moléculaire : la protéine basique majeure (MBP), la neurotoxine dérivée de l'éosinophile (EDN), la peroxydase de l'éosinophile (EPO) et la protéine cationique de l'éosinophile (ECP) (215). Les granules d'éosinophiles contiennent également un nombre variable de corps lipidiques qui contribuent à la formation de médiateurs eicosanoïdes et une source importante de cytokines, stockées dans des granules spécifiques au cytoplasme, notamment IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ et eotaxine. Tous ces médiateurs contribuent à la phase tardive de la réponse allergique, à l'inflammation chronique, au remodelage tissulaire et à la fibrose. Ils contribuent également à la résolution des réponses immunitaires (IL-10), notamment à la réparation des tissus (métalloprotéases, anti-protéases) (212).

Les neutrophiles sont également recrutés dans les voies aériennes, sous l'influence des cytokines Th17. Les LT Th17 sont des LT effecteurs qui se différencient sous l'influence de l'IL-1 β , de l'IL-6 et de l'IL-23, et produisent des cytokines telles que l'IL17A/F, l'IL-21 et l'IL-22. L'exposition à de nombreux déclencheurs connus des crises d'asthme, dont les bactéries à tropisme respiratoire, les virus respiratoires, les particules inhalées et l'ozone a été associée à une augmentation des cytokines Th17 (216,217). Les cytokines Th17 induisent donc l'accumulation de neutrophiles dans les voies aériennes, et peuvent amplifier l'hypersécrétion de mucus et la production de cytokines et de chimiokines par les cellules épithéliales (218). Dans l'asthme, une inflammation mixte neutrophile-éosinophile est courante et pourrait être liée à une activation mixte Th17/Th2 (219). A plus long terme, l'IL-17A peut contribuer au développement du remodelage des voies respiratoires pendant l'asthme en augmentant la production de cytokines profibrotiques, de facteurs proangiogéniques et de collagène (219,220). Ce remodelage affecte donc les cellules structurelles et la matrice extracellulaire,

entraînant un dysfonctionnement supplémentaire de la barrière, ce qui conduit à des symptômes chroniques et à la prolongation de la maladie.

Les LTc CD8+, cellules effectrices, sont également recrutés et jouent un rôle dans l'asthme aigu grave ou fatal, comme suggéré par des biopsies histopathologiques post-mortem, caractérisées par des infiltrats de LT CD8+ prédominants (221). Les cellules T CD8+ peuvent être activées par les antigènes, présentés de manière croisée par le complexe CMH I sur les DC, et/ou par les alarmines IL-33 et TSLP (222).

Après l'activation initiale, des LT mémoire résidents dans les tissus, de type CD4+ et CD8+, peuvent rester dans la muqueuse et les tissus lymphoïdes associés, conservant la capacité de répondre à des antigènes spécifiques lors d'une nouvelle exposition, comme mis en évidence dans des modèles murins d'asthme. Ces modèles murins d'asthme ont également suggéré que les cellules T CD4+ mémoire résidant dans les poumons persistent à long terme après une exposition aux acariens, et peuvent donc être réactivées lors d'une réexposition aux allergènes (223).

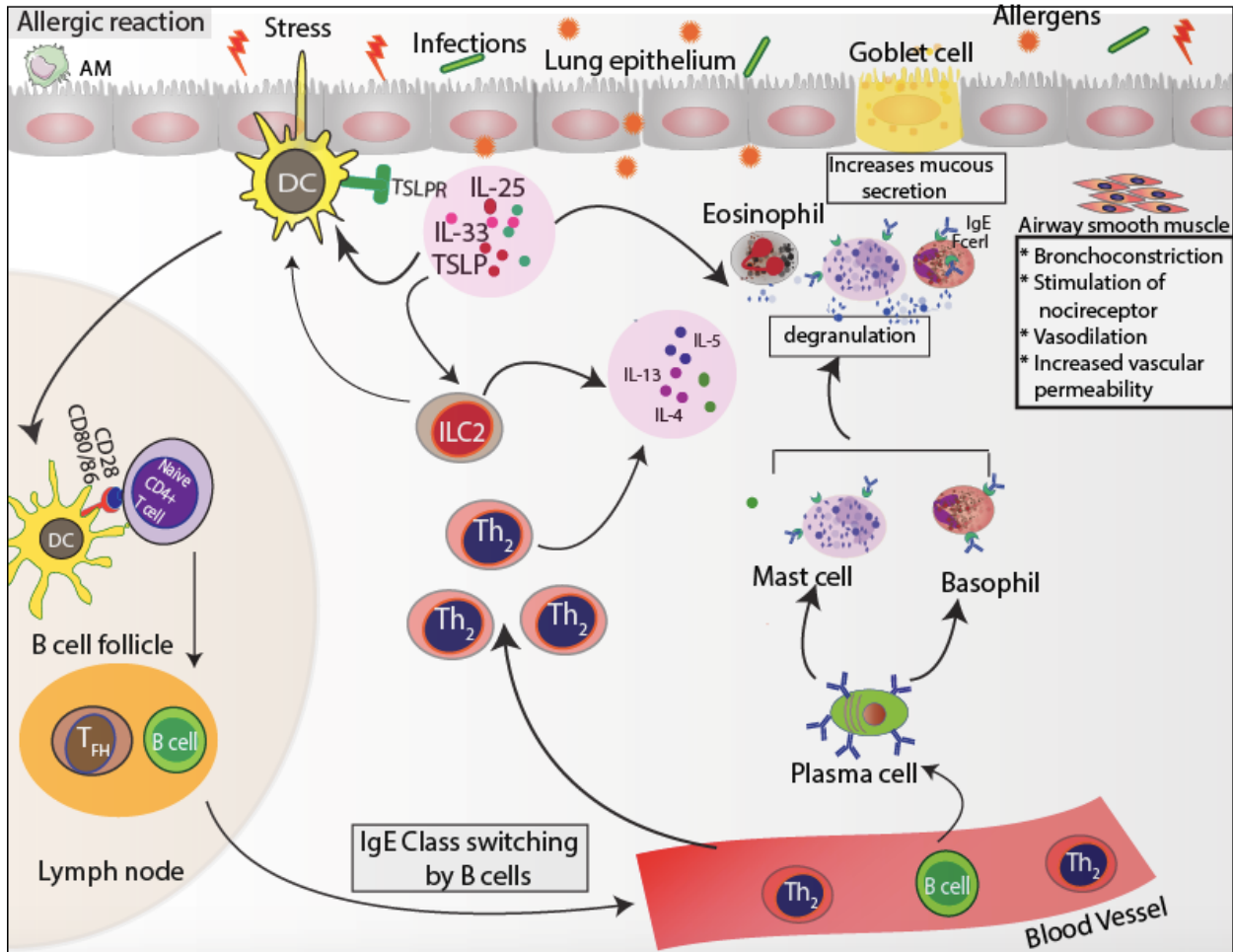
Enfin, les LT non conventionnels : iNKT et Mucosal-Associated Invariant T cells (MAIT), jouent également un rôle dans l'asthme. Les iNKT et MAIT expriment toutes deux des TCR de diversité limitée, constitués d'une chaîne TCR α invariante ainsi qu'un nombre très restreint de chaînes TCR β (204). Les iNKT sont principalement des cellules résidant dans les tissus dans la fonction principale est de protéger l'hôte contre les infections. Elles reconnaissent les glycosphingolipides du soi et du non-soi, ainsi que les antigènes α -galactosylcéramides de la paroi cellulaire microbienne (224). Des modèles rongeurs d'asthme ont montré que les cellules iNKT sont probablement activées par l'inflammation induite par un antigène protéique et qu'elles servent d'adjuvants de la réponse Th2 (204). Les MAIT représentent jusqu'à 10 % du compartiment des LT dans le sang périphérique (204). Les cellules MAIT produisant de l'IFN- γ , du TNF- α et de l'IL-17, peuvent présenter une activité cytotoxique dépendante de granzyme perforine. Elles sont capables de produire des niveaux faibles à modérés d'IL-4 et d'IL-13 lors d'une stimulation. Les patients asthmatiques semblent

présenter un déficit en cellules MAIT dans le sang, les expectorations et les biopsies bronchiques, et une augmentation de la fréquence des MAIT à l'âge d'un an a été associée à un rôle protecteur contre le développement de l'asthme (225,226). Les LT $\gamma\delta$ sont un petit sous-ensemble de LT qui expriment des TCR hétérodimériques, composés de chaînes γ et δ , par opposition aux LT conventionnelles qui expriment des TCR $\alpha\beta$, et reconnaissent des molécules de type CMH et des récepteurs de facteurs de croissance, déclenchant une réponse immunitaire innée et adaptative (227). Les LT $\gamma\delta$ sont une source majeure d'IL-9, une cytokine médiant l'inflammation de type Th2 (228). Elles peuvent contribuer spécifiquement à la régulation de la réponse IgE, comme le suggèrent des co-cultures avec des LB (229).

Afin de mieux appréhender l'impact des infections respiratoires dans la jeune enfance sur l'inflammation des voies aériennes à l'origine de l'asthme, nous avons poursuivi par une revue de la littérature pour décrire les études explorant les réponses immunitaires innées et adaptatives contre les virus et les bactéries dans l'asthme aigu. Les principaux points sont repris ci-dessous. La revue de la littérature est fournie en **Annexe 1** (230).

Figure 6 : La réponse allergique au sein des voies aériennes

Issue de Nadeau K, Lejeune S, et al. *Immunological mechanisms of allergic disorders*. William Paul's *Fundamental Immunology 8th Edition*, Flajnik M, Singh N, and Holland S (Wolters Kluwer, à paraître)



AM: Alveolar macrophage; CD: Cluster of differentiation; DC: dendritic cell; FcεRI: high affinity IgE receptor; IgE: Immunoglobulin E; IL: Interleukin; ILC2: type 2 innate lymphoid cells dendritic cells; MHC: major histocompatibility complex; TFH: T follicular helper cell; TSLP: Thymic stromal lymphopoietin.

Les cellules épithéliales respiratoires et les macrophages alvéolaires (AM) des voies aériennes sont les premiers à être exposés aux déclencheurs exogènes, notamment les allergènes environnementaux. En présence d'allergènes, les cellules épithéliales libèrent les alarmines IL-25, IL-33 et TSLP. Ces cytokines induisent un environnement inflammatoire Th2 dans la muqueuse, via les ILC2, favorisant l'activation et la maturation des DC, qui migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques de drainage. Elles initient alors la réponse immunitaire adaptative en présentant des peptides dérivés d'allergènes aux cellules T naïves à l'aide de molécules du CMH de classe II et en entraînant leur différenciation en cellules Th2 spécifiques des allergènes, sous l'influence de l'IL-4. Les cellules Th2 sécrètent ensuite l'IL-4 et l'IL-13 et interagissent avec les cellules B naïves. Sous l'influence de ces cytokines et des signaux de co-stimulation, les cellules Th2 favorisent le changement de classe des IgE par les cellules B. Les IgE spécifiques ou non spécifiques de l'allergène se lient alors aux récepteurs FcεRI de haute affinité sur les mastocytes et les basophiles résidant dans les tissus, sensibilisant ainsi l'individu à l'allergène. Chez ces individus sensibilisés, l'exposition ultérieure et la liaison de l'allergène aux IgE liées au FcεRI fixées à la surface des mastocytes et des basophiles active la libération de produits biologiquement actifs lors d'un processus appelé dégranulation. Cela entraîne une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire, une contraction du muscle lisse bronchique, une augmentation de la sécrétion de mucus, une stimulation des nocicepteurs des nerfs sensitifs, le tout contribuant aux symptômes de l'asthme allergique.

IV - Impact des virus dans le développement de l'asthme : l'œuf ou la poule ?

Jusqu'à présent, les mécanismes expliquant la susceptibilité de certains enfants à développer un asthme aigu lors d'une infection par un virus respiratoire, en particulier à rhinovirus (RV) et dans une moindre mesure à VRS (virus respiratoire syncytial), ont fait l'objet d'hypothèses étayées par des travaux sur modèle animal, *ex vivo* et *in vivo*. Les réponses peuvent varier selon les virus, mais les cellules résidentes (AEC, macrophages, DC) jouent un rôle central dans la mise en place des défenses contre les virus respiratoires.

Les études originales présentées ont été résumées dans le **tableau 2** (230). Les différentes altérations de la réponse anti-infectieuse observée dans l'asthme sont représentées à la **Figure 7**.

41. La reconnaissance des virus pendant la crise d'asthme est principalement médiée par les cellules épithéliales respiratoires (AEC) et les cellules dendritiques (DC)

Les études visant à explorer la reconnaissance par les PRR présents sur les AEC et les DC des enfants asthmatiques sont multiples mais hétérogènes. Sur des cultures d'AEC primaires d'enfants souffrant d'asthme sévère résistant au traitement (STRA), des niveaux d'expression de PRR extracellulaires et intracellulaires inférieurs à ceux des témoins sains ont été observés à l'état basal (231). L'expression des PRR était également diminuée en réponse à l'infection par le RV dans ces cultures et dans celles d'asthmatiques adultes, ce qui suggère un défaut persistant à l'âge adulte (231,232). Rupani, *et al.* ont également montré une réduction de l'expression de TLR7 par des AM de patients adultes après une infection par RV par rapport aux sujets sains, avec un effet potentiellement médié par les microARN (233). A l'inverse, dans des cultures *ex vivo* de cellules provenant de lavages broncho-alvéolaires (LBA) et de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) d'adultes souffrant d'asthme léger à modéré, aucune altération de l'expression des PRR (TLR, ARN-hélicases) n'a été observée (233). Cette divergence a également été illustrée par notre étude en vie réelle menée chez 72 enfants d'âge scolaire avec un asthme allergique et hospitalisés pour une

exacerbation sévère (VIRASTHMA), associée à une infection virale dans 64 % des cas (RV : 51 %) (211). Alors que l'infection virale n'a pas modulé l'expression et la fonction des PRR sur les PBMC par rapport à des patients asthmatiques non infectés, une expression réduite des PRR sur les cellules de l'expectoration a été signalée dans un sous-groupe d'enfants sujets à une réinfection par un autre virus à distance de l'exacerbation (état stable 8 semaines plus tard), et présentant une inflammation neutrophilique des voies aériennes (211,234).

Dans l'ensemble, ces données suggèrent que l'altération de la reconnaissance par les PRR chez les enfants asthmatiques pourrait être limitée à une sous-population de patients, plus sévères, et pourrait persister à l'âge adulte. Plutôt qu'une altération de l'expression ou de la synthèse de base des PRR, une régulation négative de l'expression et de l'activation des corécepteurs et/ou des enzymes impliqués dans la signalisation pourrait être déterminante. Des études longitudinales *in vivo* pourraient permettre de mieux comprendre ces mécanismes et d'étudier leur dynamique au cours de la maladie.

42. Les réponses antivirales impliquent les peptides antimicrobiens et les interférons

Dans une population de 77 enfants asthmatiques, Arikoglu, *et al.* ont montré que les enfants susceptibles de développer des crises d'asthme présentaient des taux sanguins de cathélicidines plus élevés et des taux de base de vitamine D plus faibles que des enfants dont l'asthme était contrôlé, suggérant un rôle des peptides antimicrobiens dans l'asthme aigu (235). Cependant, l'évolution de ces niveaux de base pendant les crises d'asthme et leur impact sur la réponse antivirale et inflammatoire reste inconnue.

La majorité des études menées chez les sujets asthmatiques ont eu pour objectif d'explorer la réponse IFN lors d'une infection virale. En réponse à RV, la plupart des études *ex-vivo* ont démontré une altération de la production d'IFN- α et d'IFN- β par les AEC d'enfants asthmatiques, par rapport aux niveaux observés chez des contrôles sains (231,236–238). Cette altération a également été démontrée avec des cellules adultes (239–241). Des

résultats similaires ont été observés au sein de cultures de PBMC. Dès 2002, Bufe, *et al.* ont montré dans un modèle *ex-vivo* une production défectueuse d'IFN- α par les PBMC d'enfants asthmatiques par rapport aux contrôles sains, lors d'une infection par le virus de la maladie de Newcastle (NDV), un virus respiratoire aviaire appartenant à la famille des Paramyxoviridae et bien connu pour être un puissant inducteur d'IFN- α (242). Ils ont ensuite étendu ces observations à des cultures de cellules de sang total, extraites sur des sujets asthmatiques adultes, lors d'une infection par le NDV ou le VRS (243). Par la suite, des résultats similaires ont été obtenus dans des études pédiatriques (244,245), et d'autres études chez l'adulte (231,246,247). Jusqu'à présent, seules quelques études ont été menées *in vivo* ou lors d'une infection naturelle. Dans une cohorte d'enfants d'âge préscolaire, les niveaux systémiques d'IFN- α étaient réduits au moment de l'exacerbation induite par le RV chez les asthmatiques, par rapport aux témoins sains lors d'une infection asymptomatique par le RV (248). Dans l'étude VIRASTHMA menée chez des enfants d'âge scolaire, nous n'avons pas observé d'altération des réponses IFN mesurées dans les expectorations, plasma et cultures de PBMC de patients présentant une exacerbation induite par un virus, par rapport à ceux présentant une exacerbation non induite par un virus (211). Sur des biopsies bronchiques d'adultes asthmatiques, un défaut significatif d'IFN de type I a été mis en évidence au sein de l'épithélium et sous-épithélium bronchiques, par rapport à des contrôles sains, après infection expérimentale par le RV-A16 (249). En revanche, Schwantes, *et al.* ont décrit des niveaux d'ARN d'IFN de type I élevés plutôt que faibles dans les expectorations de patients asthmatiques adultes, par rapport à ceux observés chez des sujets sains, au début d'une exacerbation induite par un virus (250).

Après leur découverte en 2003, les connaissances concernant l'implication des IFN de type III dans les réponses antivirales se sont accrues (251). Des études *ex-vivo* ont suggéré un déficit parallèle de la production d'IFN- λ 1 et d'IFN- λ 2/3 par les AEC lors de l'infection par le RV chez les patients pédiatriques (231,236,237), et ce déficit semblait persister chez les patients adultes (232,239). *In vivo*, cette réponse défectueuse n'a pas été observée au

moment de l'exacerbation dans les expectorations et/ou les PBMC d'enfants asthmatiques atopiques (211,248,252), ni chez les adultes (250,253), suggérant qu'il existe des mécanismes compensatoires ou d'autres sources d'IFN que ceux produits par les cellules résidentes.

Quelques études ont exploré les voies potentielles conduisant à un défaut de production d'IFN chez les patients asthmatiques. La régulation négative d'IRF3 ou IRF7, suite à une infection virale chez les asthmatiques, a été suggérée (237,239). Gielen, *et al.* ont également démontré le rôle de la molécule Suppressor of cytokine signaling protein 1 (SOCS1), exerçant un rétrocontrôle négatif sur la production d'IFN après une infection virale chez les enfants atteints de STRA (237).

Collectivement, ces études suggèrent un déficit potentiel de la réponse IFN antivirale, en particulier IFN de type I, pendant la crise d'asthme. Plutôt que d'être expliquée par l'immaturité des premières années de vie, cette réponse défectueuse pourrait être limitée à un sous-groupe de patients exacerbateurs fréquents, de la petite enfance à l'âge adulte. L'effet de l'âge, la cinétique de la réponse IFN après une infection virale et l'impact de la charge virale dans les voies respiratoires restent à étudier.

43. Réponses cytokiniques et rôle des alarmines épithéliales (IL-25, IL-33 et TSLP) induites par l'infection virale

Chez les sujets asthmatiques, les AEC vont produire massivement des cytokines pro-inflammatoires, notamment les alarmines IL-25, IL-33 et TSLP, lors d'une infection virale. Elles vont jouer un rôle majeur dans la polarisation des LT naïfs en cellules Th2, produisant IL-4, IL-5, IL-13. Cet environnement cytokinique spécifique chez les patients asthmatiques est responsable des caractéristiques physiopathologiques de l'asthme, notamment la mobilisation des éosinophiles, l'hypersécrétion de mucus, l'hyperplasie des muscles lisses et l'obstruction des voies aériennes (2,178,198,254).

Chez l'enfant, l'influence des virus respiratoires et des réponses immunitaires innées sur le développement de la réponse immunitaire adaptative implique la production d'alarmines, particulièrement dans un contexte Th2. Une étude récente a montré que les enfants atteints de bronchiolite à RV présentaient un rapport IL-4/IFN- γ plus élevé dans les aspirations nasopharyngées que les enfants avec une bronchiolite à autre virus (255). Lors d'une infection par le VRS, Lee, *et al.* ont observé une production plus élevée de TSLP par les AEC d'enfants asthmatiques par rapport aux témoins sains (256). Certains virus respiratoires pourraient donc induire une inflammation Th2 dans les voies aériennes chez l'enfant, et cette inflammation pourrait être différente dans un environnement asthmatique. Dans une cohorte d'enfants asthmatiques d'âge préscolaire, des marqueurs d'ILC, tels que la ST2 soluble, ont été induits *in vivo* après une infection par un virus respiratoire, et étaient corrélés aux taux d'IL-33 nasal (257). Dans l'étude VIRASTHMA chez des enfants d'âge scolaire, au moment de l'exacerbation, l'inflammation des voies aériennes (sputum induit) chez les patients infectés était caractérisée par des concentrations d'IL-5 et un nombre d'éosinophiles plus élevés que chez les patients non infectés (211). Ce phénomène n'est pas nécessairement spécifique de l'enfant, puisque Jackson, *et al.* ont également démontré une induction d'IL-4, IL-5 et IL-13 dans les LBA de sujets asthmatiques, après inoculation de RV, avec une association à la sévérité de l'exacerbation (258). D'autres expériences *in vitro* ont montré que l'IL-33 induisait directement la production de cytokines Th2 par les LT et les ILC2. Cependant, la production de cytokines Th2 induite par le RV pourrait être limitée au contexte asthmatique chez l'adulte, comme le suggère une étude reproduisant l'induction d'IL-4 et IL-13 par des PBMC d'asthmatiques après co-exposition avec du RV et de l'IL-33, mais ne montrant aucun effet sur des PBMC de donneurs sains (259). De plus, l'exposition aux virus respiratoires a également été associée à une augmentation des cytokines Th17, comme cela a été démontré dans des co-cultures d'AEC avec des LT infectés par le VRS (260).

La production d'IFN est également étroitement liée aux cytokines Th2 et pro-inflammatoires. Chez l'adulte, Parsons, *et al.* rapportent une diminution parallèle des IFN de

type III et de l'IL-6, CXCL8 et CXCL10 dans des cultures d'AEC asthmatiques adultes inoculées avec du RV (232). Dans un modèle murin d'asthme allergique, IRF3 contrôlait l'évolution parallèle des IFN et des cytokines Th2 pendant les épisodes aigus induits par l'exposition aux allergènes (261). Certaines études menées chez l'adulte ont montré des effets négatifs sur la réponse antivirale au cours d'une infection virale. Lors d'une infection par un virus de type RV, le prétraitement par des cytokines Th2 dans des cultures d'AEC peut altérer la voie de signalisation TLR3 et IRF3 (239), ou l'expression de l'IFN de type 1 et 3 (237). Une production plus faible d'IFN de type I, observée chez certains enfants, pourrait également réduire l'apoptose des cellules infectées voisines et augmenter les charges virales, amplifiant ainsi l'inflammation des voies respiratoires, la production de cytokines inflammatoires et donc la gravité de la crise d'asthme (238,240).

En réponse aux virus, d'autres cytokines, telles que les cytokines de type 17 : IL-17, IL-21, IL-22, peuvent également favoriser l'hypersécrétion de mucus et la production de cytokines et de chimiokines par les AEC. Elles vont favoriser le recrutement de neutrophiles, par l'induction de chimiokines C-X-C, conduisant à un état d'inflammation chronique (249). A plus long terme, l'IL-17 pourrait contribuer au développement du remodelage des voies aériennes au cours de l'asthme en augmentant la production de cytokines profibrotiques, de facteurs proangiogéniques, de protéases et de collagène (219,220).

En résumé, ces études confirment les interactions étroites et complexes entre les réponses immunitaires innées et adaptatives contre les virus dans un environnement asthmatique, à tout âge. Moduler l'inflammation des voies aériennes, en particulier l'inflammation Th2, pourrait donc moduler directement les réponses antivirales au cours des crises d'asthme chez certains enfants, et limiter les conséquences, liées non seulement à l'épisode aigu mais aussi à la pérennisation d'une réponse potentiellement délétère.

44. Spécificités virales : le rôle clé des RV et des RV-C en particulier

Bien que l'altération des réponses antivirales joue un rôle clé dans la crise d'asthme, les caractéristiques des micro-organismes sont également importantes. Tout d'abord, la pathogénicité des RV diffère fortement selon les sous-types, probablement en raison de l'implication de différentes cibles cellulaires. L'infection par les souches RV de sérotype C (RV-C), qui utilisent le Cadherin Related Family Member 3 (CDHR3) comme récepteur, peut être associée à une plus grande sévérité clinique (234,262), alors que les sérotypes B semblent être responsables de symptômes plus légers. Il est intéressant de noter qu'un SNP dans le gène *CDHR3*, qui influence l'efficacité du RV-C à infecter ses cellules cibles, a été associé à la susceptibilité à l'asthme pédiatrique (263). En outre, différentes souches virales pourraient avoir des taux de réplication différents et ainsi induire des charges virales plus élevées (264). Les souches de RV-C pourraient également moduler l'inflammation des voies aériennes et induire des niveaux plus élevés de cytokines Th2 et/ou Th17, comme cela a été démontré chez les enfants d'âge préscolaire présentant une respiration sifflante induite par le RV-C (265). Deuxièmement, une virémie systémique a déjà été observée chez des enfants infectés par des virus respiratoires, tels que le RV-C, et le jeune âge s'est avéré être un facteur de risque associé à la virémie (266). Cet état pourrait induire une inflammation accrue par l'interaction des virus avec les cellules immunitaires systémiques. Enfin, la co-infection virale est fréquemment observée lors des exacerbations chez les enfants asthmatiques (234,248,267) et les effets combinés de plusieurs virus dans les voies aériennes pourraient moduler les réponses innées et adaptatives.

Ces données démontrent que, chez les enfants prédisposés, la nature des virus respiratoires, leur propagation, ainsi que leurs interactions avec les cellules hôtes peuvent avoir un impact direct sur l'inflammation, le remodelage et la sévérité des exacerbations d'asthme.

45. Le rôle potentiel du virome des voies aériennes

Le rôle du portage viral et/ou de l'infection asymptomatique à l'état stable, c'est-à-dire en dehors d'une exacerbation, chez les patients asthmatiques, reste à déterminer. Plusieurs études pédiatriques ont montré une excrétion virale fréquente chez l'enfant en dehors de tout symptôme d'infection aiguë, avec des échantillons positifs pour le RV observés chez 19-29% d'une population d'enfants asthmatiques et chez 15-23% d'enfants sains (234,268–270). Dans la cohorte VIRASTHMA, chez 78 enfants d'âge scolaire, nous avons observé que 10 % avaient un prélèvement positif à RV lors de l'exacerbation et à l'état stable, et les sérotypes de RV étaient systématiquement différents aux deux temps, indiquant une réinfection plutôt qu'une persistance (234). Bergauer, *et al.* ont également observé 54 % de prélèvements positifs à RV à l'état stable dans une cohorte d'enfants asthmatiques d'âge préscolaire, contre 45 % chez des témoins sains (248). Le portage de RV chez les sujets asthmatiques et les témoins sains était associé à des niveaux plus élevés d'IFN de type III que chez les sujets non asthmatiques avec des prélèvements négatifs. Cette augmentation du portage viral pourrait persister à l'âge adulte. Ainsi, dans les cellules d'expectoration de 57 adultes asthmatiques, da Silva, *et al.* ont montré des niveaux de base plus élevés d'IFN et de molécules antivirales par rapport aux sujets sains (271). Finalement, on peut émettre l'hypothèse que la réinfection aux RV chez les patients asthmatiques pourrait induire un état pro-inflammatoire et/ou une désensibilisation des PRR, réduisant la réponse contre les pathogènes au sein des voies aériennes lors d'une infection.

Outre les RV, d'autres virus respiratoires pourraient prendre part à ces processus. Les analyses métagénomiques ont permis d'identifier des centaines d'espèces virales dans les voies respiratoires, constituant le virome des voies respiratoires (272). Dans une population d'enfants non asthmatiques, Wang, *et al.* ont mis en évidence de multiples infections à virus respiratoires épidémiques chez des enfants atteints d'une infection respiratoire aiguë sévère, alors que le virome était moins diversifié et principalement dominé par la famille des anelloviridae (Torque teno virus) chez des enfants sains (273). Les anellovirus sont des

composants majeurs du virome et présentent des propriétés immunomodulatrices affectant l'immunité innée et adaptative (274). Bien que leur présence ait été associée à une altération de la fonction respiratoire chez les enfants asthmatiques (275), à notre connaissance, aucune étude n'a évalué leur association avec les crises d'asthme. Ainsi, la contribution de ces virus et de leurs interactions avec les agents infectieux pathogènes, ainsi qu'avec les bactéries commensales du microbiote pulmonaire sur l'inflammation chronique et l'apparition de l'asthme aigu reste à déterminer.

En conclusion, l'ensemble de ces données soulignent l'importance des infections virales au cours de la crise d'asthme, probablement favorisées par un défaut de réponse antivirale chez certains patients, et leur rôle dans l'histoire naturelle, à tous les temps de l'expression de l'asthme, de son installation à ses manifestations au cours de l'enfance.

Tableau 2 : Principales études (population pédiatrique et adulte) évaluant les réponses immunitaires à une infection virale pendant une exacerbation d'asthme - Issu de Lejeune S, et al. 2020 (230)

Compartiment	Etude	Design et groupes d'âge	Principaux résultats
<i>In vitro et ex-vivo</i>			
AEC	Edwards M, et al. 2013 (231)	RV-A16 Enfants : <u>Asthme sévère résistant au traitement (STRA)</u> 11a (9-15a) vs contrôles sains	STRA : plus bas niveaux de base de TLR3, plus bas niveaux de TLR3, RIG-I, MDA5 après stimulation par RV ; Pas d'association avec : âge, taux d'IgE totales, réactivité allergénique, niveaux de neutrophiles / éosinophiles dans les LBA / sputum, fonction respiratoire
AEC	Parsons KS, et al. 2014 (232)	RV-B1 Adultes: <u>asthme</u> / Contrôles sains	Asthme : pas d'altération de l'expression de MDA5, TLR3 et diminution de la libération de CXCL-10
AEC	Contoli M, et al. 2015 (253)	RV-A16 Pré-traitement par IL-4 et IL-13 avant infection Adultes: <u>rhinite allergique</u> / contrôles sains non-atopiques	Cellules allergiques : défaut de réponse immunitaire à l'infection par RV-16 en présence d'L-4 et d'IL-13, via l'inhibition de l'expression et de la signalisation (IRF3) et de TLR3
AEC	Moskwa S, et al. 2018 (241)	PIV-3 / RV-B1 Adultes: <u>asthme allergique</u> / <u>asthme non-allergique</u> / contrôles sains	<u>Asthme allergique</u> : Après infection par PIV3 : niveaux d'expression d'IFN- λ 1, IFN- α , IFN- β et IRF7 plus élevés Après infection par RV1B : niveaux d'expression d'IFN- β plus élevés que chez les <u>asthmatiques non-allergiques</u>
AM	Rupani H, et al. 2016 (233)	RV-A16 Pré-traitement par Imiquimod (agoniste TLR7) Adultes: <u>asthme sévère</u> / contrôles sains	Asthme sévère : diminution de l'expression de TLR7, corrélation inverse avec le nombre d'exacerbations Augmentation des taux de 3 microARN (miR-150, miR-152, et miR-375) Restauration de l'expression de TLR7 après blocage de ces microARN par des oligonucléotides anti-miRNA
LBA et PBMC	Sykes A, et al. 2012 (246)	RV-A16 Adultes: <u>asthme allergique léger à modéré</u> vs contrôles sains	Asthme : pas d'altération de l'expression des PRR (TLR, hélicases à ARN), de leur protéines et de leurs facteurs de transcription en aval
<i>In vivo</i>			
Sputum Serum PBMC	Deschildre A, et al. 2017 (211)	Enfants d'âge scolaire 8.9a (6-16a) <u>Asthme allergique</u> : virus vs absence de virus Exacerbation sévère (64% virus, 51% RV) / état stable (8 semaines plus tard) (25% virus, 11% RV) / 24% virus aux 2 temps	Virus à l'exacerbation : niveaux d'expression de TLR3, RIG-I et MDA-5 sur monocytes sanguins et DC similaires à ceux observés chez les non-infectés, Concentrations d'IFN- β , IFN- γ , IFN- λ 1 dans sputum et plasma similaires, concentrations en IL-5 et éosinophilie bronchique (sputum) plus élevés que chez les patients non-infectés Virus aux 2 temps : modification de l'expression / fonction des PRR sur les PBMC, inflammation neutrophilique bronchique à l'état stable
Biopsies bronchiques	Zhu J, et al. 2019 (249)	Inoculation in vivo - RV-A16 Jeunes adultes : <u>asthme allergique</u> (23a \pm 1.4) vs contrôles sains non allergiques (27a \pm 2.3)	Asthme : Expression des PRR (TLR3, MDA5, RIG-I) non altérée à l'état basal; et induite après infection par RV dans l'épithélium et le sous-épithélium

<i>In vitro</i>			
AEC	Wark PA, et al. 2005 (240)	RV-A16 Adultes : <u>asthme</u> vs contrôles sains	Asthme : Défaut de réponse IFN- β , relargage tardif du virus et apoptose cellulaire tardive, défaut de réponse apoptotique
AEC	Edwards M, et al. 2013 (231)	RV-A16 Enfants : <u>asthme sévère résistant au traitement (STRA)</u> 11a (9-15a) vs contrôles sains	STRA : niveaux d'ARNm d'IFN- β , IFN- λ 1, IFN- λ 2/3 plus bas et charges virales de RV plus élevées Pas d'association avec : âge, taux d'IgE totales, réactivité allergénique, niveaux de neutrophiles / éosinophiles dans les LBA / sputum, fonction respiratoire
AEC	Gielen V, et al. 2015 (237)	RV-B1 / RV-A16 Pré-traitement par IL-4 / IL-13 Enfants : <u>STRA</u> 11a (9-15a), vs contrôles sains	STRA: augmentation de l'expression de SOCS1 en lien avec défaut de réponse IFN, augmentation de la réplication virale Suppression de l'activation par le RV du promoteur des IFN au sein des AEC par SOCS1, dépendant de sa translocation nucléaire
AEC	Parsons KS, et al. 2014 (232)	RV-B1 Adultes : <u>asthme</u> / contrôles sains	Asthme : défaut de libération d'IL-6, CXCL-8 et IFN- λ en réponse à RV, défaut de libération de CXCL-10
AEC	Kicic A, et al. 2016 (238)	RV-B1 / RV-B14 Enfants : <u>asthme</u> 8.2a (2.6-14.8) vs contrôles sains 8.4a (3.2-15.6)	Asthme : augmentation prolifération et relargage viral, diminution apoptose et réparation tissulaire (RV-B1), plus basses concentrations en IFN- β , augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires Ajout d'IFN- β : restauration de l'apoptose, suppression de la réplication virale et amélioration de la réparation épithéliale chez les asthmatiques, pas d'effet sur la production de cytokines inflammatoires
AM	Rupani H, et al. 2016 (233)	RV-A16 Pré-traitement par Imiquimod (TLR7) Adultes: <u>asthme sévère</u> / contrôles sains	Asthme sévère : diminution des réponses IFN Augmentation des taux de 3 microARN (miR-150, miR-152, et miR-375) Restauration de la production d'IFN après blocage de ces microARN par des oligonucléotides anti-miRNA
LBA	Sykes A, et al. 2012 (246)	RV-A16 Adultes : <u>asthme allergique léger à modéré</u> vs contrôles sains	Asthme : défaut et retard d'induction d'IFN de type I, associé à une hyperréactivité des voies aériennes
Biopsies bronchiques	Baraldo S, et al. 2012 (236)	RV-A16 Enfants, 5a \pm 0.5: <u>asthme allergique</u> / <u>asthme non-allergique</u> / <u>Atopie, sans asthme</u> / contrôles sains non allergiques	Dans tous les groupes vs contrôles : diminution de la production d'IFN de type I et III, augmentation de l'ARN viral de RV Taux d'IFN inversement corrélés à l'inflammation éosinophilique, IL-4, dommages épithéliaux, IgE totales (IFN type III)
Cultures sur sang total	Bufe A, et al. 2002 (242)	NDV Enfants : <u>Asthme allergique</u> / asthme non-allergique / rhinite allergique / contrôles sains	Asthme allergique : diminution de l'IFN- α induit par l'infection virale Asthme / rhinite allergique : production plus élevée d'IFN- γ
PBMC	Gehlhar K, et al. 2006 (243)	RSV-1A / NDV Adultes : <u>Asthme allergique</u> vs contrôles sains	Asthme allergique : réduction significative de l'IFN- α induit par l'infection virale, indépendamment du virus, pas d'influence du traitement (corticostéroïdes)
PBMC	likura K, et al. 2011 (244)	RV-B14 Sifflements / contrôles sains; Jeunes enfants : 2-6a; Enfants : 7-19a; Adultes : \geq 20a	Asthme (enfants) : plus basses concentrations en IFN- α Asthme (enfants et adultes): plus basses concentrations en IL-6, TNF- α , IL-10 et sFasL Sifflements (jeunes enfants) : plus basses concentrations en IL-10 associées à des sifflements persistant à 2 ans de suivi
PBMC	Sykes A, et al. 2012 (246)	RV-A16 Adultes: <u>asthme allergique léger à modéré</u> vs contrôles sains	Asthme : pas de défaut de production d'IFN de type I par PBMC, contrairement aux cellules des LBA

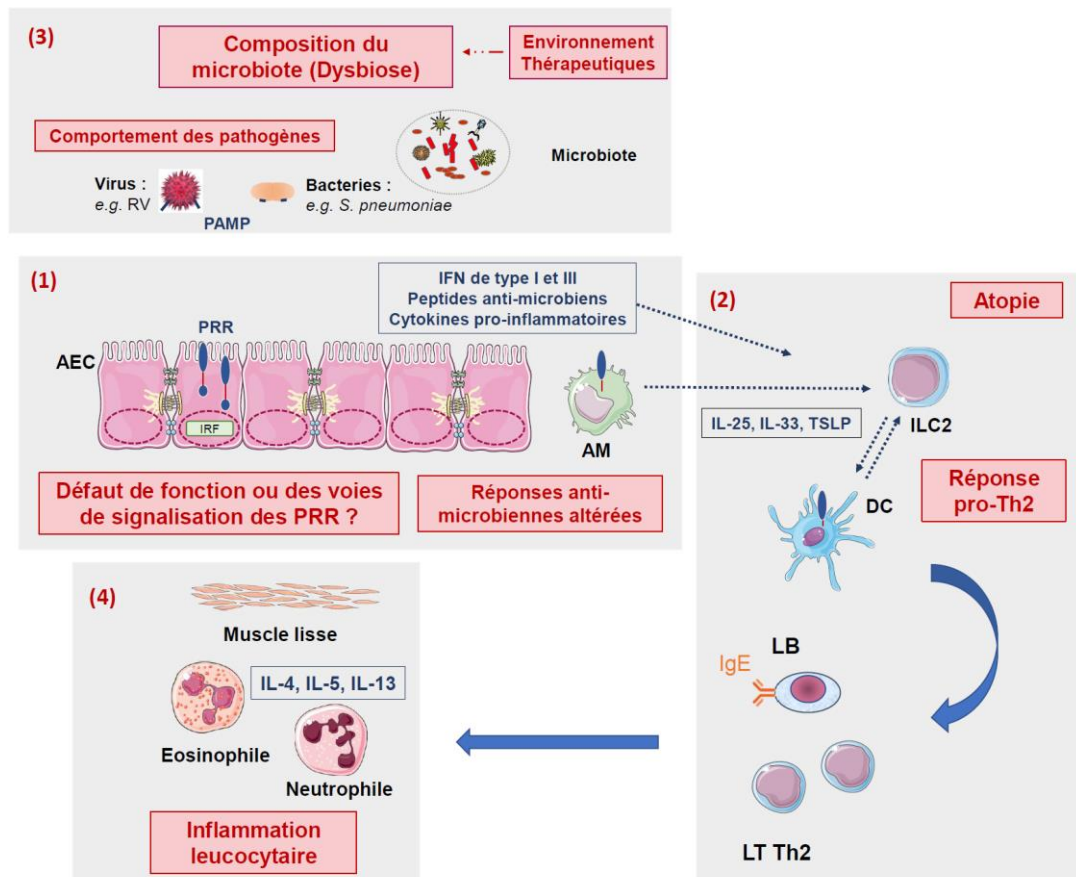
	PBMC	Durrani S, et al. 2012 (245)	RV-A16 Enfants 10-12a : <u>asthme allergique / asthme non-allergique / sensibilisation aero-allergènes sans asthme</u> / contrôles sains.	Asthme allergique : réponses IFN plus basses après cross-activation du récepteur FcεRI (vs groupe sensibilisation et vs groupe contrôle); expression de surface de FcεRI plus élevée sur pDC et mDC Relation inverse entre IgE totales et diminution de la secretion d'IFN, uniquement après cross-activation du récepteur FcεRI
	PBMC	Simpson J, et al. 2016 (247)	RV-B1 Adultes : <u>asthme</u> , 76% atopique. Phénotypes du sputum : éosinophilique / neutrophilique / paucigranulaire / granulaire	Asthme neutrophilique : diminution de la production d'IFN-α par PBMC après infection par RV par comparaison à asthme éosinophilique et paucigranulaire; IFN-α inversement corrélé aux taux d'IL-6 dans sérum et taux d'IL-1β dans sputum Neutrophiles dans sputum et doses de corticostéroïdes inhalés : prédicteurs indépendants des niveaux bas d'IFN-α
	In vivo			
IFN de type I et III	Biopsies bronchiques	Zhu J, et al. 2019 (249)	Inoculation in vivo - RV-A16 Jeunes adultes : asthme allergique (23a ± 1.4) vs contrôles sains non-allergiques (27a ± 2.3)	Asthme : déficit en IFNα/β dans l'épithélium, à l'état stable, et à J4 et J6 post-inoculation ; corrélé à la charge virale, et à la sévérité clinique Sub-épithélium : proportions de monocytes / macrophages exprimant IFNα/β après inoculation de RV plus faibles; neutrophiles du sub-épithélium sont la source d'IFNα/β
	LBA Monocytes et AM	Contoli M, et al. 2006 (253)	Inoculation in vivo - RV-A16 Adultes : <u>asthme sévère</u> (<i>ex vivo</i>) / asthme modéré sans traitement par corticoïdes (<i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i>) vs contrôles sains	Asthme / <i>Ex vivo</i> : Défaut d'induction et de production d'IFN de type III IFN-λ1 et IFN-λ2/3 dans les AEC et les AM, défaut d'induction d'IFN-λ après stimulation par LPS Asthme / <i>in vivo</i> : sévérité des symptômes, charge virale dans LBA, inflammation des voies aériennes, altération de la fonction respiratoire inversement corrélés à la production <i>ex vivo</i> d'IFN-λ
	Lavages nasaux	Miller EK, et al. 2012 (252)	Infection naturelle : 82% virus Enfants 5-18a Infection respiratoire haute; <u>Sifflements</u> / pas de sifflements RV chez 56% siffleurs / 37% non-siffleurs	Association spécifique entre infection à RV et exacerbation d'asthme, mais pas de différence en termes de titres viraux, espèces de RV, et molécules inflammatoires et de la réponse allergique entre les siffleurs RV+ et les RV- Chez les enfants siffleurs RV+ : niveaux d'IFN-λ1 plus élevés, qui augmentent en cas de symptômes plus sévères
	Lavages nasaux	Kennedy J, et al. 2014 (276)	Infection naturelle : 74 enfants (4-18a): sifflements aigus (57% RV) / rhinite (56% RV) / contrôles sains Inoculation (RVA-16): 24 jeunes adultes Asthme / contrôles sains	Infection naturelle : Pas de différence en termes de charge virale et de niveaux d'IFN-λ1 entre les sifflements et la rhinite aiguë; Chez enfants siffleurs : plus basses concentrations en sICAM-1 Inoculation : Pas de différence en termes de charge virale entre les groupes, concentrations en sICAM-1 corrélées aux charges virales en RV
	Lavages nasaux Sputum induits	Schwantes E, et al. 2014 (250)	Infection naturelle Adultes : <u>asthme</u> vs contrôles sains 17 exacerbations : 67% RV	Asthme, à l'exacerbation : niveaux d'ARN d'IFN-α1, IFN-β1 et IFN-γ dans sputum corrélés à l'exacerbation et au score le plus élevé d'Asthma Index, tôt dans l'histoire naturelle de l'infection, concentrations en IL-13, IL-10 plus élevées
	Serum PBMC	Bergauer A, et al. 2017 (248)	Inoculation ex vivo de RV-1B sur des cultures de PBMC Infection naturelle in vivo Asthme préscolaire 4-6a <u>Asthme</u> à l'état stable (54% RV) / Asthme à l'exacerbation (100% RV) vs contrôles sains	Ex vivo : induction de STAT1/STAT2 par le RV dans l'asthme / d'IRF9 dans contrôles / d'IRF1 chez les 2 Infection naturelle (état stable) : Pas d'augmentation de l'expression d'IFN-α chez les asthmatiques RV+ en comparaison aux contrôles sains RV+; augmentation des concentrations en IFN-λ avec le RV, chez les asthmatiques et chez les contrôles Infection naturelle (exacerbation) : Diminution des taux sériques d'IFN-α à l'exacerbation, par comparaison aux enfants contrôles sains RV+ à l'état stable
	Sputum Serum PBMC	Deschildre A, et al. 2017 (211)	Enfants d'âge scolaire 8.9a (6-16a) <u>Asthme allergique</u> : virus vs absence de virus Exacerbation sévère (64% virus, 51% RV) / état stable (8 semaines plus tard) (25% virus, 11% RV) / 24% virus aux 2 temps	Virus à l'exacerbation : concentrations en IFN-β, IFN-γ, IFN-λ1 dans sputum et plasma comparables aux patients Virus -, concentrations en IL-5 et éosinophiles dans sputum plus élevés Virus aux 2 temps : concentrations en IFN-γ plus basses dans plasma et sputum à l'exacerbation, plus d'inflammation neutrophilique dans sputum à l'état stable

Alarmines et cytokines	In vitro			
	Co-cultures AEC et LT	Qin L, et al. 2011 (260)	RSV-A2 AEC LT extraits à partir de PBMC adultes (volontaires sains)	Infection prolongée à VRS au sein des AEC Induction d'une différenciation des LT en LT Th2 et Th17, relarguant de l'IL-4, IFN- γ et IL-17, induite par l'exposition aux surnageants des AEC infectées par le VRS
	AEC	Lee HC, et al. 2012 (256)	RSV-A AEC d'enfants contrôles sains et enfants asthmatiques	Production de TSLP après infection des AEC par le VRS, via l'activation de voies de signalisation de l'immunité innée impliquant le retinoic acid induced gene I, l'interferon promoter-stimulating factor 1, et le nuclear factor- κ B. Concentrations en TSLP après infection à VRS plus élevées au sein des AEC des enfants asthmatiques qu'au sein des AEC des enfants contrôles
	PBMC	Jurak L, et al. 2018 (259)	Co-exposition RV-A16 et IL-33 Adultes avec <u>asthme allergique</u> vs contrôles sains	Au sein des cellules asthmatiques : Relargage d'IL-5 et d'IL-13 induite par le RV, augmenté par l'IL-33, expression de la protéine de surface ST2 induite par IL-33 Source principale d'IL-13 : ILC2 Au sein des cellules contrôles : pas d'effet de l'IL-33 sur la production d'IL-5 et d'IL-13
	In vivo			
	LBA PBMC	Jackson D, et al. 2014 (258)	Inoculation in vivo Etude ex vivo : AEC, PBMC (LT, ILC2) Adultes : <u>asthme léger à modéré</u> vs contrôles sains non allergiques	In vivo : IL-4, IL-5, et IL-13 induites par le RV dans les LBA d'asthmatiques Niveaux des cytokines de type 2 et d'IL-33 corrélés aux paramètres cliniques et aux charges virales Ex vivo : production d'IL-5 et d'IL-13 par les LT et les ILC2 directement induite par l'IL-33 des surnageants d'AEC infectées par le RV
	PBMC Serum Lavages nasaux	Haag P, et al. 2018 (257)	Asthme préscolaire 4-6a Etude ex vivo : inoculation RVB-1 In vivo : <u>asthme</u> (54% RV) / contrôles (45% RV) à l'état stable	Ex vivo : Induction des gènes d'ILC2 dans l'asthme après inoculation de RV In vivo : Down-régulation de sST2 dans les cellules de patients asthmatiques et les contrôles, par le RV Up-régulation de sST2 au sein des cellules asthmatiques RV-, associée à des concentrations faibles en 25(OH)-VitD3 Asthme : corrélation directe des concentrations de sST2 dans sérum avec concentrations nasales en IL-33
Aspirations naso-pharyngées	Yuan XH, et al. 2020 (255)	Enfants < 14a <u>Bronchiolite ou pneumonie</u> 19.7% RV, 35 bronchiolites et 31 pneumonies	Bronchiolites RV+ : augmentation d'IL-4/IFN- γ et diminution du ratio TNF- α /IL-10, par comparaison aux pneumonies RV+	

AEC: Cellules épithéliales des voies respiratoires; AM: Macrophages alvéolaires; LBA: Lavage broncho-alvéolaire; CCL: C-C motif ligand; CXCL: C-X-C motif ligand; Fc ϵ RI: Récepteur de haute affinité des IgE; IgE: Immunoglobuline E; IFN: Interferon; IL: Interleukine; ILC2: Cellules lymphoïdes innées de type 2; IRF: Interferon regulatory factor; mDC: Cellules dendritiques myéloïdes; LPS: Lipopolysaccharides ; MDA-5: Melanoma differentiation-associated protein 5; NDV: Newcastle disease virus; PBMC: Peripheral blood mononuclear cells; pDC: Cellules dendritiques plasmacytoïdes; PBMC: Peripheral blood mononuclear cells; PCR: Polymerase chain reaction; PIV3: Parainfluenza virus type 3; PRR: Pattern recognition receptor; RIGI-I: Retinoic-acid inducible gene I; RSV: Respiratory syncytial virus; RV: Rhinovirus; sFasL: Serum Soluble Fas Ligand; sICAM-1: Soluble intercellular adhesion molecule-1; siRNA: Small interfering RNA; SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1; sST2: Soluble suppression of tumorigenicity 2 (IL-33 receptor IL1RL1); STAT: Signal transducer and activator of transcription; STRA: Severe therapy resistant asthma; Th2: T helper 2; TLR: Toll like receptor; TNF: Tumor necrosis factor.

Figure 7 : Résumé des principaux mécanismes favorisant le développement de l'asthme et impliqués dans la crise d'asthme.

Issue de Lejeune S, et al. 2020 (230)



AM : Macrophages alvéolaires; AEC: Cellules épithéliales des voies respiratoires; DC: Cellules dendritiques; IFN: Interferon; IL: Interleukine; ILC2: Cellules lymphoïdes innées de type 2; IRF: interferon regulatory factor; PAMP: Pathogen-associated molecular pattern; PRR: pattern recognition receptor; RV: Rhinovirus; TSLP: Thymic stromal lymphopoietin.

Ces mécanismes (en rouge) impliquent : (1) L'altération des réponses immunitaires innées ; (2) L'influence du dialogue hôte-microbiote sur l'inflammation Th2 ; (3) Les caractéristiques de l'agent pathogène ; (4) L'inflammation leucocytaire des voies aériennes. Ces interactions dynamiques peuvent avoir un impact sur la présentation des crises d'asthme et des conséquences à long terme.

V - Le rôle émergent des bactéries pathogènes et du microbiote dans le déclenchement de l'exacerbation et le contrôle de l'asthme

Des données récentes soulignent le rôle des infections bactériennes dans la progression de l'asthme, comme le résume le **tableau 3**.

51. Relation entre bactéries et crise d'asthme

Les infections bactériennes contribuent potentiellement à la gravité des infections virales respiratoires et aux symptômes de crises d'asthme chez l'enfant. Il existe vraisemblablement des interactions bidirectionnelles entre virus et bactéries au sein des voies aériennes, qui vont influencer la sévérité des symptômes et la probabilité de développement d'une crise d'asthme (277). Des études pédiatriques ont montré que la colonisation des voies respiratoires supérieures par des bactéries du genre *Streptococcus*, *Haemophilus* et/ou *Staphylococcus* au cours d'une infection par le VRS ou le RV augmente le risque d'hospitalisation, indépendamment de l'âge et de la présence d'asthme (278,279). Chez des asthmatiques adultes, l'infection asymptomatique à RV a été associée à une abondance accrue de *Dolosigranulum* et de *Corynebacterium*, tandis que l'infection symptomatique à RV semblait liée à une fréquence plus élevée de *Moraxella* (280). Dans une autre étude menée chez l'adulte, la co-infection par un virus et une bactérie induisait des niveaux plus élevés de cytokines/chimiokines que l'infection bactérienne (281). Les concentrations circulantes de CCL2 et CCL5 étaient alors plus élevées chez les patients asthmatiques infectés que chez les patients non asthmatiques. Les espèces de Streptocoques peuvent également influencer le cours de l'exacerbation de l'asthme, comme l'ont montré Kama, *et al.* chez des enfants d'âge préscolaire (282). Les patients dont le microbiote pharyngé était colonisé par *S. pneumoniae* présentaient des épisodes de sifflements significativement plus courts et une inflammation pulmonaire réduite (notamment des niveaux plus faibles de TNF- α) par rapport à ceux non-colonisés.

En résumé, ces données suggèrent une capacité des bactéries à modifier la gravité des crises d'asthme et à moduler l'inflammation induite par les virus (ou inversement), en particulier chez l'enfant. Cibler les infections bactériennes au moment des crises d'asthme pourrait donc être une stratégie alternative chez certains enfants, en particulier chez les plus jeunes, ou en cas de résistance aux corticostéroïdes.

52. Dysbiose et impact sur l'histoire naturelle de l'asthme

La dysbiose précoce, en particulier du microbiote pulmonaire, pourrait avoir des conséquences à long terme sur l'histoire naturelle de l'asthme. Lors d'une infection virale chez des enfants de moins de deux ans, la détection de *Moraxella*, *Streptococcus*, ou *Haemophilus* a été associée au risque d'asthme à l'âge de 5 ans (283). Mansbach, *et al.* ont montré dans un modèle de prédiction de la bronchiolite, intégrant 16 paramètres clinico-biologiques, dont la présence d'un virus, qu'une abondance relative plus élevée d'espèces appartenant au genre *Moraxella* ou *Streptococcus*, 3 semaines après le premier jour d'hospitalisation pour bronchiolite sévère, était associée à un risque accru de sifflements récurrents ultérieurs (284).

Lorsque l'asthme est installé, plusieurs études montrent l'influence du microbiote sur l'histoire naturelle de la maladie. Chez des enfants asthmatiques d'âge scolaire, Zhou, *et al.* ont évalué par des mesures longitudinales la relation entre le microbiote nasal et la perte de contrôle de l'asthme ou le risque d'exacerbations sévères (285). Alors que le groupe *Corynebacterium / Dolosigranulum* caractérisait les patients présentant le risque le plus faible de mauvais contrôle de l'asthme, un changement vers le groupe *Moraxella* était associé au risque le plus élevé de survenue d'exacerbations sévères. Dans une autre cohorte d'enfants asthmatiques d'âge scolaire, un microbiote nasal dominé par les espèces de *Moraxella* était associé à un risque accru d'exacerbations et à l'activation des éosinophiles lors de l'exacerbation (286). Un microbiote dominé par les espèces de *Staphylococcus* ou de *Corynebacterium* était associé à une diminution du risque de pathologie respiratoire et d'exacerbations, tandis qu'une prédominance d'espèces de *Streptococcus* était associée au

risque d'infection à RV. Chez l'adulte, en utilisant une classification non biaisée, Abdel-Aziz, *et al.* ont récemment décrit deux clusters associés au microbiome, stables sur une période de 12 à 18 mois. Le cluster avec un profil déficient en espèces commensales, était associé à un asthme plus sévère et à une inflammation neutrophilique (287). Robinson, *et al.* ont évalué la composition du microbiote des voies aériennes inférieures en réalisant un LBA à l'état stable chez des enfants avec un asthme préscolaire sévère (288). Ils ont mis en évidence deux profils : un groupe avec une dysbiose et une prédominance de *Moraxella*, associé à une inflammation bronchique neutrophilique ; et un groupe caractérisé par un microbiote mixte, associé à une inflammation macrophagique et lymphocytaire, suggérant ainsi que les bactéries pourraient influencer les caractéristiques de l'inflammation pulmonaire. En revanche, au moment d'un épisode aigu, aucune différence significative dans la composition du microbiote n'a été observée entre le microbiote oro-pharyngé d'enfants âgés de 0 à 14 ans présentant un asthme aigu et des témoins sains (289).

Dans l'ensemble, ces données suggèrent qu'une dysbiose au sein des voies aériennes au début de la vie pourrait contribuer à la récurrence des sifflements et à la pérennisation de l'asthme, ainsi qu'à la gravité de la maladie. Parmi les espèces bactériennes, la présence précoce de *M. Catharralis* et *H. influenzae* pendant l'enfance semble être un marqueur de persistance et de sévérité, par la modulation de la réaction inflammatoire. A l'opposé, la colonisation par *S. pneumoniae* pourrait avoir des effets anti-inflammatoires. Cependant, le rôle des bactéries est souvent exacerbé ou modulé par des facteurs intrinsèques (atopie, caractéristiques de l'inflammation) ou extrinsèques, comme les infections virales et les antibiotiques.

Tableau 3 : Principales études humaines (population pédiatrique et adulte) évaluant l'impact des bactéries pathogènes et du microbiote pendant la crise et l'histoire naturelle de l'asthme pédiatrique - Issu de Lejeune S, et al. 2020 (230)

	Compartiment	Etude	Design et groupes d'âge	Principaux résultats
Asthme aigu	Nasopharynx	Mansbach JM, et al. 2016 (279)	Cohorte prospective MARC-35 composée de 1016 nourrissons (âge <1 an) hospitalisés pour bronchiolite et entrés dans un suivi prospectif avec évaluation de la survenue de sifflements récurrents	L'infection à VRS était associée à un profil de microbiote nasal caractérisé par une haute abondance de <i>Firmicutes</i> et <i>Streptococcus</i> et une faible abondance de <i>Proteobacteria</i> et des genres <i>Haemophilus</i> et <i>Moraxella</i> . L'infection à RV était associée à un profil caractérisé par une faible abondance de <i>Streptococcus</i> et une forte abondance de <i>Haemophilus</i> et <i>Moraxella</i> . La co-infection VRS/RV était associée à un profil d'abondance intermédiaire.
	Nasopharynx	De Steenhuijsen Pijters WA, et al. 2016 (278)	106 enfants âgés de moins de 2 ans avec une infection à VRS / 26 contrôles sains asymptomatiques	5 clusters de microbiote nasopharyngés ont été identifiés, caractérisés par des abondances élevées de <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Moraxella</i> , ou <i>Staphylococcus aureus</i> . L'hospitalisation pour infection à VRS était associée aux profils <i>H. influenzae</i> et <i>Streptococcus</i> L'induction des genes liés aux IFN par l'infection à VRS était indépendante du cluster microbiotique
	Nasopharynx	Kloepfer KM, et al. 2017 (280)	17 sujets adultes avec collection d'échantillons de mucus nasal toutes les semaines pendant 5 semaines d'affilée	Les infections asymptomatiques à RV étaient associées à une augmentation significative de l'abondance de <i>Dolosigranulum</i> et <i>Corynebacterium</i> . L'infection à RV précédait l'augmentation de la probabilité de détecter <i>Streptococcus</i> et <i>Moraxella</i> d'une semaine.
	Sang	Giuffrida LM, et al. 2017 (281)	14 patients adultes asthmatiques et 29 non-asthmatiques avec une infection aiguë des voies respiratoires 10 contrôles sains	Les patients asthmatiques infectés avaient des concentrations sanguines en CCL2 et CCL5 plus élevées que chez les patients infectés non asthmatiques. Les patients infectés, asthmatiques et non asthmatiques, avaient tous des concentrations sanguines élevées en cytokines.
	Pharynx	Kama Y, et al. 2020 (282)	Echantillons pharyngés de patients traités en ambulatoires et/ou hospitalisés avec un asthme aigu (n= 111) (âge médian : 2.8a/2.6a, respectivement)	Les 3 majeures bactéries pathogènes identifiées étaient <i>Streptococcus pneumoniae</i> (29.7%), <i>Moraxella catarrhalis</i> (11.7%), et <i>Haemophilus influenzae</i> (10.8%). Les patients avec une colonisation à <i>S. pneumoniae</i> avaient des épisodes de sifflements significativement plus courts et une inflammation pulmonaire réduite (notamment en termes de concentrations en TNF- α)
Histoire naturelle de l' asthme	Nasopharynx	Teo SM, et al. 2018 (283)	244 nourrissons avec une infection aiguë des voies respiratoires, suivis durant les 5 premières années de vie	Les clusters avec prédominance de <i>Moraxella</i> , <i>Haemophilus</i> et <i>Streptococcus</i> étaient associés à l'infection aiguë des voies respiratoires. Ce changement de composition a fréquemment précédé la détection des pathogènes viraux et la survenue de symptômes aigus. Ces changements étaient associés au développement au décours de sifflements récurrents et d'une sensibilisation allergique précoce.
	Microbiote nasal	Zhou Y, et al. 2019 (285)	Etude longitudinale avec 1 an de suivi chez des enfants d'âge scolaire avec un asthme persistant léger à modéré, traités par CSI quotidiennement (âge moyen 8.0a \pm 1.8a)	Les enfants avec un microbiote nasal dominé par les commensaux <i>Corynebacterium</i> / <i>Dolosigranulum</i> à l'état stable avaient les taux d'exacerbations et de progression de l'asthme les plus faibles. Un changement de microbiote avec une augmentation de <i>Moraxella</i> était associé à un risque plus élevé d'exacerbation sévère d'asthme.
	Microbiote nasal	Mansbach JM, et al. 2020 (284)	842 nourrissons hospitalisés pour bronchiolite et suivis jusqu'à 3 ans	Une abondance augmentée de <i>Moraxella</i> ou <i>Streptococcus</i> 3 semaines après le J1 de l'hospitalisation était associée à un risque augmenté de sifflements récurrents au cours du suivi. L'augmentation de l'abondance en espèces de <i>Streptococcus</i> l'été après l'hospitalisation était aussi associée à un risque augmenté de sifflements récurrents au cours du suivi.

Oropharynx	Cuthbertson L, et al. 2019 (289)	Des écouvillonnages oropharyngés ont été collectés chez 109 enfants hospitalisés pour sifflements aigus / 75 contrôles non siffleurs.	Pas de différence significative dans la diversité bactérienne entre les siffleurs et les contrôles sains. Chez les siffleurs, la garde en collectivité à l'âge préscolaire était associée à une augmentation de la diversité bactérienne, contrairement à l'infection à RV, associée à une moindre diversité.
Nasopharynx	McCauley K. et al. 2019 (286)	312 patients asthmatiques d'âge scolaire inclus dans un essai thérapeutique sur l'omalizumab, sécrétions nasales prélevées après la randomisation.	Les microbiotes nasaux avec prédominance d'espèces de <i>Moraxella</i> étaient associés à une augmentation du risque d'exacerbation et de l'activation des éosinophiles. Les microbiotes avec prédominance d'espèces de <i>Staphylococcus</i> ou <i>Corynebacterium</i> étaient associés à une réduction du risque de pathologies respiratoires et d'exacerbations. Les microbiotes avec prédominance d'espèces de <i>Streptococcus</i> augmentaient le risque d'infection à RV.
Sputum	Abdel-Aziz MI. et al. 2020 (287)	Sputum collectés chez 100 patients adultes asthmatiques sévères inclus dans la cohorte U-BIOPRED à l'état stable et après 12-18 mois de suivi.	2 clusters microbiens ont été identifiés, associés à des profils différents en termes d'âge de début de l'asthme, statut tabagique, traitement, fonction respiratoire, pourcentages de neutrophiles et macrophages dans les sputum. Les patients du cluster le plus sévère avaient un profil de microbiote bactérien déficient en espèces commensales et ceci était associé à des moins bons paramètres de l'asthme. Le suivi longitudinal a révélé une grande stabilité des clusters après 12-18 mois de suivi chez les asthmatiques sévères.
Poumons (LBA)	Robinson PFM, et al. 2019 (288)	Enfants : 35 siffleurs récurrents, classes en asthme épisodique viro-induit (EVW) ou asthme à facteurs déclenchant multiples (MTW) LBA collectés à un état stable	Il n'y avait pas de relation entre l'inflammation des voies aériennes inférieures, l'existence d'une infection et les phénotypes EVW / MTW. 2 groupes ont été identifiés : 1) Cluster avec une dysbiose et prédominance d'espèces de <i>Moraxella</i> , associé à une inflammation neutrophilique des voies aériennes; 2) Cluster avec un microbiote mixte, associé à une inflammation macrophagique et lymphocytaire des voies aériennes.

LBA : Lavage broncho-alvéolaire; EVW: Episodic Viral Wheeze, MTW : Multiple Trigger Wheeze.

VI – Apport des approches de biologie systémique de type OMIQUES

L'asthme est caractérisé par des interactions dynamiques complexes entre les stimuli environnementaux et le système immunitaire de l'hôte. De nombreux mécanismes physiopathologiques interviennent dans le développement de la pathologie, et les réponses inflammatoires varient d'un individu à l'autre, mais aussi au sein d'un même individu, en fonction des stimuli environnementaux ou des âges de la vie. Les progrès technologiques ont amené au développement des études de type "omiques", c'est-à-dire impliquant une investigation complète à haut débit et systématique des paramètres biologiques (290). Parmi les technologies omiques, citons la génomique, l'épigénomique, la transcriptomique, la protéomique, la métabolomique, et la microbiomique. Ces outils qui se développent rapidement permettent de générer une quantité massive de données reflétant l'état biologique des populations cellulaires à un moment donné. Ces dernières années, les approches de biologie des systèmes ont été de plus en plus utilisées pour étudier les mécanismes de l'asthme et faciliter la découverte de biomarqueurs associés au diagnostic et au pronostic (291) (**Figure 2** et **Figure 8**).

61. Génomique

Avec l'achèvement du projet génome humain et les vastes informations génétiques qu'il a rendues disponibles, on s'intéresse de plus en plus aux liens entre les phénotypes des maladies et les génotypes. Comme indiqué précédemment, les GWAS ont permis d'identifier des SNP associés à l'asthme (**Tableau 1**).

62. Epigénomique

Comme nous l'avons vu précédemment, les modifications épigénétiques sont des modifications biochimiques qui se produisent sur l'ADN ou les histones et qui influencent la fonction du génome sans changer la séquence nucléotidique elle-même (119). Parce qu'elles affectent les profils d'expression des gènes, ces modifications ont un rôle important dans le

développement de l'asthme, en lien avec certaines expositions environnementales (cf **Tableau 1**).

63. Transcriptomique

Les analyses transcriptomiques, qui visent à étudier tous les transcrits d'ARN dans un échantillon biologique, permettent d'identifier une grande quantité de gènes modulés dans une condition donnée. Une étude récente a décrit 94 modules d'expression génique distincts entre l'exacerbation induite par le virus et celle non induite par le virus dans les cellules nasales et les expectorations d'une grande cohorte d'enfants d'âge scolaire (292). Dans les crises d'asthme, cet outil peut également fournir des informations sur l'activation de voies de signalisation spécifiques impliquées dans la réponse inflammatoire et antimicrobienne (293,294). Le séquençage de l'ARN dans les cellules de lavage nasal d'enfants asthmatiques en exacerbation a également permis d'identifier des gènes tels que *IRF7* jouant un rôle central dans la réponse inflammatoire (293). Les analyses transcriptomiques ont également été utilisées pour identifier les gènes associés à différents phénotypes de patients asthmatiques (295).

64. Protéomique

La protéomique vise à mesurer toutes les protéines, qui assurent la plupart des fonctions dans les systèmes biologiques. Le plus souvent, les techniques de cytométrie en flux et de spectrométrie de masse permettent l'identification d'un nombre élevé de protéines, ou peptides.

65. Métabolomique

La métabolomique est la mesure systématique des métabolites (généralement de petites molécules) produit dans un système vivant, par l'hôte et par les espèces le colonisant, notamment les sucres, les lipides, les acides aminés, les acides gras, etc.,. Les identités et

les quantités de métabolites sont mesurées par résonance magnétique nucléaire ou par chromatographie liquide - spectrométrie de masse. Des métabolites provenant du plasma, du sérum, de l'urine et du condensat de l'haleine expirée ont été identifiés dans le contexte de l'asthme, reflétant divers processus biologiques (291). Certains métabolites microbiens et leurs récepteurs dans les cellules immunitaires de l'hôte ont été identifiés, bien que les études restent limitées jusqu'à présent (296).

66. Microbiomique

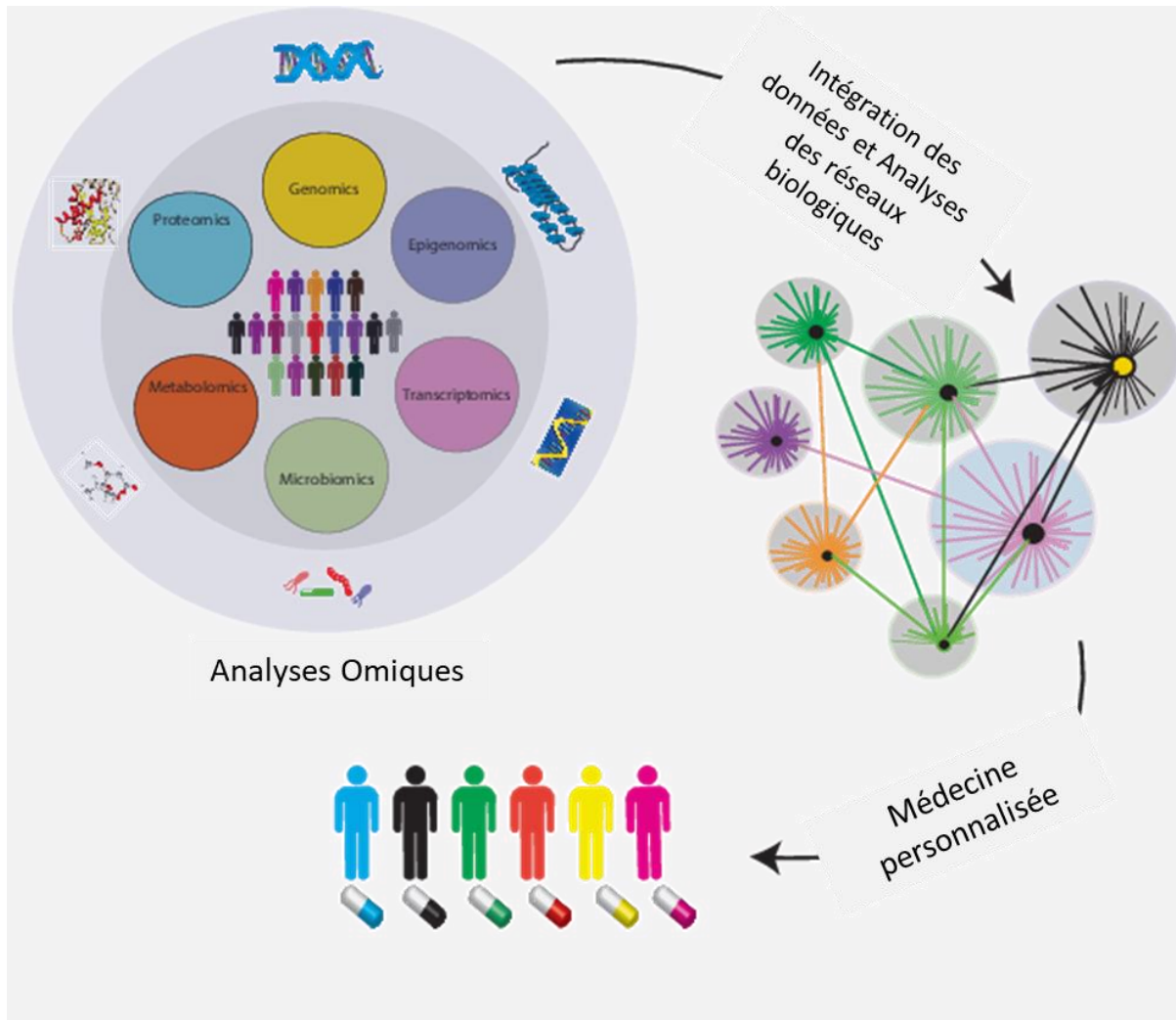
La microbiomique est la mesure de l'ADN, de l'ARN et des protéines des microbes associés à l'hôte. La principale technologie omique utilisée pour étudier le microbiote bactérien est le séquençage de l'ARN 16s (291). Une autre approche consiste à séquencer de manière impartiale l'ADN total présent dans un écosystème, puis à cartographier les gènes liés aux microbes, y compris les virus et les champignons. Ces méthodes nous permettent d'étudier le microbiote hébergé dans l'environnement de l'intestin, de la peau et des poumons et d'approfondir notre compréhension de leurs interactions avec le système immunitaire.

67. Intégration des données

La complexité et l'hétérogénéité de l'asthme font qu'il est très peu probable qu'un seul biomarqueur ou une seule approche omique suffise à servir de biomarqueur unique. L'intégration de données à des échelles multiples est nécessaire pour construire des modèles qui faciliteront notre compréhension des réseaux interactifs dynamiques qui sous-tendent les maladies allergiques et leurs différents phénotypes (297). Ce domaine est en constante évolution et les méthodologies doivent encore être affinées pour pouvoir extrapoler plus facilement ces données à la clinique. Dans l'ensemble, les approches de biologie systémique et les technologies omiques ont un grand potentiel d'application dans la recherche sur l'asthme pour faciliter notre compréhension du mécanisme de la maladie, et pour identifier des biomarqueurs pour le diagnostic et le pronostic.

Figure 8 : L'apport des technologies OMIQUES

Issue de Nadeau K, Lejeune S, et al. *Immunological mechanisms of allergic disorders*. William Paul's *Fundamental Immunology 8th Edition*, Flajnik M, Singh N, and Holland S (Wolters Kluwer, à paraître)



Grâce aux progrès des technologies omiques modernes à haut débit et des méthodes d'analyse des données, il est possible de générer une quantité massive d'informations à partir du profilage des produits biologiques de l'hôte, constituant la base d'une approche de biologie systémique. Ces techniques peuvent permettre la génération d'hypothèses, la détermination de phénotypes et endotypes dans la perspective d'une médecine de précision et thérapie ciblée.

HYPOTHESE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

Ces données montrent la diversité des facteurs influençant le développement et l'histoire naturelle de l'asthme de l'enfant, en particulier au cours de la période préscolaire. Parmi ces facteurs, les interactions entre la réponse immunitaire de l'hôte et son microbiote semblent être déterminantes pour déclencher cette maladie et orienter son évolution.

Hypothèse : L'hétérogénéité des phénotypes d'asthme de l'enfant est la résultante de la variabilité interindividuelle de la réponse immune de la muqueuse bronchique, en partie prédéterminée génétiquement, et en partie influencée par l'environnement et les expositions microbiennes. Préciser les mécanismes contrôlant l'asthme de l'enfant et identifier des marqueurs prédictifs de sévérité pourraient permettre d'améliorer le traitement, pour prévenir l'altération fonctionnelle et les lésions anatomiques.

Pour démontrer cette hypothèse, nous avons donc défini plusieurs objectifs :

1/ Identifier les phénotypes cliniques dans l'asthme préscolaire et scolaire sévère de l'enfant, en analysant les données de la cohorte nationale CobraPed (**Lezmi G, Lejeune S, et al. J Allergy Clin Immunol Pract 2020**)

2/ Corréler les endotypes et les phénotypes d'évolution, en mettant en parallèle la réponse immunitaire au moment d'un asthme aigu avec le profil d'évolution clinique à un an chez l'enfant d'âge scolaire (**Lejeune S, et al. Clin Exp Allergy 2020**)

3/ Corréler les phénotypes cliniques et les endotypes immunologiques, en étudiant l'immunité innée et adaptative aux infections respiratoires au cours d'un asthme aigu chez le jeune enfant asthmatique (**Lejeune S, et al. Pediatr Allergy Immunol 2020**)

4/ Générer des hypothèses sur les interactions entre microbiote et environnement atopique par profilage non-ciblé du métabolome plasmatique chez les enfants asthmatiques inclus au moment d'une exacerbation.

RESULTATS

I. Facteurs associés à la sévérité de l'asthme chez l'enfant : Données de la cohorte française CobraPed

L'asthme sévère (AS) chez l'enfant est une maladie complexe et hétérogène, associée à un fardeau considérable. Cependant, les facteurs influençant la sévérité de l'asthme sont mal décrits et peuvent différer selon l'âge. Pour décrire les facteurs associés à la sévérité dans l'asthme de l'enfant, nous avons analysé les données de la cohorte nationale CobraPed (Pediatric Cohort of Bronchial Obstruction and Asthma). Il s'agit de la première publication issue de la cohorte. J'ai travaillé sur l'analyse des données et rédigé l'article original, publié dans *The Journal of Allergy and Clinical Immunology : In Practice*, en co-1^{er} auteur. Notre objectif principal était de déterminer si les facteurs associés à la sévérité de l'asthme différaient entre les enfants d'âge préscolaire et les enfants d'âge scolaire.

Les données de la cohorte d'observation prospective multicentrique française d'enfants d'âge préscolaire (3-6 ans) et d'enfants d'âge scolaire (7-11 ans) présentant un asthme sévère (AS) et non sévère ont été analysées. Un total de 131 enfants d'âge préscolaire (92 AS et 49 asthmes non sévères) et 207 enfants d'âge scolaire (92 AS et 115 asthmes non sévères) ont été inclus. En analyse uni- et multivariée, à l'âge préscolaire, l'AS était associé au tabagisme parental (analyse multivariée : odds ratio [IC 95 %], 29,8 [3,57-3910]) et à l'exposition aux moisissures / à l'humidité au domicile (analyse multivariée : odds ratio [IC 95 %], 4,22 [1,25-18,2]) par rapport aux asthmes non sévères. À l'âge scolaire, les antécédents de dermatite atopique et d'allergie alimentaire étaient plus fréquents chez les enfants atteints d'AS que chez ceux avec un asthme non sévère. Une analyse multivariée a confirmé que l'AS était associé à des antécédents d'allergie alimentaire (odds ratio [IC 95 %], 5,01 [2,23-11,9]).

Nos données suggèrent donc que les facteurs influençant la sévérité de l'asthme peuvent différer selon l'âge. Chez les enfants d'âge préscolaire atteints d'AS, le tabagisme passif et l'exposition aux moisissures sont prédominants, tandis que la présence de comorbidités atopiques sont principalement associées à l'AS à l'âge scolaire.

Lezmi G[§], Lejeune S[§], Pin I, COBRAPed Study Group, et al. Factors Associated with Asthma Severity in Children: Data from the French COBRAPed Cohort. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021 May;9(5):1969-1979. doi: 10.1016/j.jaip.2020.12.027. Epub 2020 Dec 24. PMID: 33359443.

Version finale non formatée par éditeur ci-dessous

Factors associated with asthma severity in children: data from the French COBRAPed Cohort

Guillaume Lezmi, MD, PhD^{1,2§}, Stéphanie Lejeune, MD^{3,4§}, Isabelle Pin, MD⁵, Sylvain Blanchon, MD, PhD⁶, Naïm Bouazza, PhD⁷, Valérie Jolaine, MD⁷, Christophe Marguet, MD, PhD⁸, Véronique Houdoin, MD, PhD⁹, Patrick Berger, MD, PhD¹⁰, Michael Fayon, MD, PhD¹¹, Jean-Christophe Dubus, MD, PhD¹², Philippe Reix, MD, PhD¹³, Mathieu Pellan, MD¹⁴, Jacques Brouard, MD, PhD¹⁵, Raphael Chiron, MD¹⁶, Lisa Giovannini-Chami, MD, PhD¹⁷, Antoine Deschildre, MD^{3,4}, Jacques de Blic, MD, PhD^{1,2}, on behalf of the COBRAPed Study Group.

§ Both authors contributed equally to this work

¹ Université de Paris, Institut Necker Enfants Malades, Equipe Immunorégulation et Immunopathologie, Inserm UMR1151, CNRS UMR8253, F-75015, Paris France.

² Service de Pneumologie et Allergologie Pédiatriques, AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades, F-75015, Paris, France.

³Univ. Lille, CHU Lille, Pediatric pulmonology and allergy department. Hôpital Jeanne de Flandre, Lille, France.

⁴Univ. Lille, LIRIC UMR 995 Inserm, Clinical Investigation Center, CIC-1403-Inserm-CHU, Lille, France

⁵*Pédiatrie. CHU Grenoble Alpes; INSERM, Institute for Advanced Biosciences; Université Grenoble Alpes; Grenoble, France.*

⁶*Children Hospital, Pediatric Pulmonology and Allergology Unit CHU Toulouse, Toulouse, France*

⁷*Paris Descartes Necker - Cochin Clinical Research Unit, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France*

⁸*EA3830-GHRV, Rouen University, France, Pediatric Respiratory and Allergic Diseases, CF reference center, Rouen University Hospital-Charles Nicolle, Rouen, France*

⁹*Robert Debré Hospital, Pediatric Pulmonology and Allergology, University of Paris, Paris, France, University of Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, INSERM UMR S976, Paris, France.*

¹⁰*Univ. Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, INSERM, U1045, Bordeaux, France*

¹¹*CHU de Bordeaux, Unité de pneumologie pédiatrique, Centre d'Investigation Clinique (CIC 1401), Bordeaux, France*

¹²*Unité de pneumopédiatrie CHU Timone-Enfants, Aix-Marseille Université, IRD MEPHI, IHU Méditerranée-Infection, Marseille, France*

¹³*Service de Pneumologie, Allergologie et Mucoviscidose Pédiatrique, CHU de Lyon, Lyon, France. UMR 5558 (EMET), CNRS, LBBE, Université de Lyon, Villeurbanne, France.*

¹⁴*Service de Pédiatrie, CHU Jean Verdier, Bondy, France*

¹⁵*Service de Pédiatrie Médicale, CHU Caen, Caen, France. Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne (GRAM 2.0), Normandie Université, Caen, France*

¹⁶Pediatric department, Montpellier university Hospital, Montpellier, France

¹⁷Pediatric Pulmonology Department, L'Enval University Hospital, Nice, France

Dr. Lezmi reports personal fees from novartis pharma, personal fees from Astra zeneca, personal fees from YSSUP research, during the conduct of the study; personal fees from DBV technologies, personal fees from Aimune therapeutics, outside the submitted work; Dr. Lejeune reports grants from GSK, grants from Stallergènes, grants from Chiesi, grants from Novartis, grants from MundiPharma, grants from Chancellerie des Universités de Paris (legs Gaston Poix), during the conduct of the study; other from Novartis Pharma, grants from Astra Zeneca, personal fees from Mayoli-Spindler, personal fees from Icomed, personal fees from ALK-Abello, other from Novartis, outside the submitted work; Dr. PIN reports other from NOVARTIS, other from ASTRA ZENECA, non-financial support and other from AGIRàdom, outside the submitted work; Dr. BLANCHON has nothing to disclose; N. BOUAZZA reports grants from GSK, grants from Stallergènes, grants from Chiesi, grants from Novartis, grants from MundiPharma, grants from Chancellerie des Universités de Paris (legs Gaston Poix), during the conduct of the study; V.Jolaine reports grants from GSK, grants from Stallergènes, grants from Chiesi, grants from Novartis, grants from MundiPharma, grants from Chancellerie des Universités de Paris (legs Gaston Poix), during the conduct of the study; Pr. MARGUET reports personal fees and non-financial support from NOVARTIS, personal fees and non-financial support from ALK, non-financial support from GSK, personal fees and non-financial support from TEVA, personal fees from MYLAN (MEDA), during the conduct of the study; Dr. Houdouin reports grants from GSK, grants from Stallergènes, grants from Chiesi, grants from Novartis, grants from MundiPharma, grants from Chancellerie des Universités de Paris (legs Gaston Poix), during the conduct of the study; Dr. Berger reports grants from GSK, grants from Stallergènes, grants from Chiesi, grants from Novartis, grants from MundiPharma, grants from Chancellerie des Universités de Paris (legs Gaston Poix), during the conduct of the study; grants, personal fees and non-financial support from Novartis, personal fees and non-financial support from Chiesi, grants, personal fees and non-financial support from Boehringer Ingelheim, personal fees and non-financial support from AstraZeneca, personal fees and non-financial support from Sanofi, personal fees from Menarinni, personal fees from TEVA, personal fees from Clrcassia, outside the submitted work; Pr. FAYON reports grants from GSK, grants from Stallergènes, grants from Chiesi, grants from

Novartis, grants from MundiPharma, grants from Chancellerie des Universités de Paris (legs Gaston Poix), during the conduct of the study; Pr. Dubus reports grants from GSK, grants from Stallergènes, grants from Chiesi, grants from Novartis, grants from MundiPharma, grants from Chancellerie des Universités de Paris (legs Gaston Poix), during the conduct of the study; Dr. reix reports grants from GSK, grants from Stallergènes, grants from Chiesi, grants from Novartis, grants from MundiPharma, grants from Chancellerie des Universités de Paris (legs Gaston Poix), during the conduct of the study; Dr. Pellan reports grants from GSK, grants from Stallergènes, grants from Chiesi, grants from Novartis, grants from MundiPharma, grants from Chancellerie des Universités de Paris (legs Gaston Poix), during the conduct of the study; Pr. BROUARD has nothing to disclose; Dr. Chiron has nothing to disclose; Dr. Giovannini-chami reports personal fees from novartis pharma, grants and personal fees from Astra zeneca, from Stallergènes, personal fees from Sanofi, during the conduct of the study; Dr. DESCHILDRE reports personal fees and other from Novartis, personal fees and other from ALK, personal fees from TEVA, personal fees from GSK, grants and personal fees from stallergenes greer , personal fees and other from CHIESI, personal fees from Aimmune Therapeutics, personal fees and other from DBV Technologies, other from Astra Zeneca, other from Mylan , other from Nutricia , personal fees from Nestlé Health Science, outside the submitted work; Pr. de BLIC reports grants from GSK, grants from Stallergènes, grants from Chiesi, grants from Novartis, grants from MundiPharma, grants from Chancellerie des Universités de Paris (legs Gaston Poix), during the conduct of the study.

Funding information

This study was funded by the “Chancellerie des Universités de Paris (legs Gaston Poix)” and grants from GSK, Stallergènes, Chiesi, Novartis, and Mundi Pharma Laboratories.

Corresponding author:

Jacques de Blic, AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades, Service de Pneumologie et Allergologie Pédiatriques, Université Paris Descartes, Paris, France.

+33144494838

deblicj@gmail.com

Highlight Box

Environmental factors and allergic disorders are associated with the severity of pediatric severe asthma.

We found that factors associated with asthma severity in children may differ according to age. In preschoolers, environmental factors are predominant, whereas allergic disorders are mainly involved at school age.

Our results highlight the need to explore household exposure at least in preschoolers, and confirm the importance of controlling associated allergic disorders.

Key words: Severe asthma, preschool, school-age, phenotype

Word count: 2998

Abstract word count: 220

Number of figures: 2

Number of tables: 6

List of abbreviations

ACT: Asthma Control Test

AD: atopic dermatitis

AR: allergic rhinitis

BD: bronchodilator

BMI: body mass index

FA: food allergy

FeNO: fractional exhaled nitric oxide

FVC: forced vital capacity

GER: gastroesophageal reflux

GINA: Global Initiative for Asthma

ICS: inhaled corticosteroids

ICU: intensive care unit

FEV1: forced expiratory volume in the first second

LABA: long-acting β -agonist

LRTA: Leukotriene receptor antagonist

NSA: non-severe asthma

NSRW: non-severe recurrent wheeze

PAQLQ: Pediatric Asthma Quality-of-Life Questionnaire

SA: severe asthma

SRW: severe recurrent wheeze

SABA: short-acting β -agonist

SHS: second hand smoke

SPT: skin-prick test

WA: weeks of amenorrhea

Abstract

Background: Severe asthma (SA) in children is a complex, heterogeneous disease, associated with a considerable burden in children. However, factors influencing asthma severity are poorly described and may differ according to age.

Objective: To determine whether factors associated with asthma severity differ between preschoolers with severe recurrent wheeze (SRW) and school-age children with SA.

Patients and methods: Data from the French multicenter prospective observational cohort of preschool (3-6 years) children with SRW and non-severe recurrent wheeze (NSRW) and school-age (7-11 years) children with SA and non-severe asthma (NSA) (COBRAPed) were analyzed.

Results: 131 preschool children (92 SRW and 49 NSRW) and 207 school-age children (92 SA and 115 NSA) were included. In both univariable and multi-variable analysis, SRW was associated with SHS exposure (multi-variable analysis, OR [95%CI], 29.8 [3.57-3910]), and exposure to mold/dampness at home (multi-variable analysis: OR [95%CI], 4.22 [1.25-18.2]) compared with NSRW. At school-age, history of atopic dermatitis and food allergy were more frequent in children with SA than in those with NSA. Multi-variable analysis confirmed that SA was associated with a history of food allergy (OR: 5.01 [2.23-11.9]).

Conclusion: Our data suggest that factors influencing asthma severity may differ according to age. In preschool children with SRW, second-hand smoke and exposure to mold are predominant, whereas associated allergic disorders are mainly involved in SA at school age.

Introduction

Pediatric asthma is a heterogeneous condition with multiple phenotypes associated with different mechanisms or endotypes, both in preschool [1–4] and at school-age [5–8]. Asthma is well controlled for most children with low-to-medium doses of inhaled corticosteroids (ICS) and when modifiable factors are addressed. Severe asthma (SA) and severe recurrent wheeze (SRW) [9, 10], were defined by the need for high doses of ICS and an additional controller medication to maintain control or persistent poor control despite appropriate treatment [11]. Although those entities affect less than 5% of children with asthma, their burden in terms of symptoms, alteration of quality of life, and economic costs is disproportionately high [12–14]. Recent studies have described multiple phenotypes of SA and SRW, with variable degrees of allergic sensitization and different patterns of airway inflammation [15–17]. Factors influencing asthma severity throughout childhood are poorly understood [18], and it remains unclear whether SA and SRW are driven by common pathological processes.

Better characterization of the factors associated with asthma severity is crucial to improve the management of patients and move forward in precision medicine. The Pediatric Cohort of Bronchial Obstruction and Asthma (COBRAPed) is a French multicenter prospective observational cohort of preschool (3-6 years) and school-age children (7-12 years) with asthma, providing clinical, biological, and functional data with longitudinal follow-up. Design and inclusions were conducted in parallel with the adult COBRA cohort [19].

The main objectives of this cross-sectional exploratory analysis were to describe the baseline characteristics of the population and to identify factors associated with asthma severity in preschool and school-age children.

Patients and methods

COBRAPed is a prospective, observational cohort study initiated in France, between April 2014 and November 2017 (Figure 1). Institutional ethical approval (CPP Ile de France 1) and written informed consent from parents / caregivers of all participants were obtained. The study is registered in ClinicalTrial.gov (NCT02114034). Data presented in this article are those obtained at inclusion.

Cohorts

Two cohorts of preschool (3-6 years) and school-aged children (7-12 years) were enrolled in 12 pediatric tertiary care centers across France. Children were included consecutively during their follow-up. The diagnosis of asthma was made according to the GINA guidelines by specialized pediatric asthma physicians[20].

Preschool children with SRW and school-age children with SA were defined as those with persistent symptoms or requiring a short-acting β -agonist (SABA) ≥ 3 days a week for ≥ 3 months AND/OR frequent or severe exacerbations in the previous year (≥ 1 severe exacerbation requiring admission to an intensive care unit (ICU); ≥ 2 exacerbations requiring hospital admissions and intravenous medications, and/or a ≥ 3 -day course of oral steroids) AND/OR persistent airflow obstruction in school-age children (Forced Expiratory Volume in the first second (FEV1) $< 80\%$ and/or airway resistance $> 150\%$ of predicted values), despite being prescribed high doses of inhaled corticosteroids (ICS) (≥ 800 $\mu\text{g}/\text{day}$ budesonide or equivalent) and another controller therapy (long-acting β -agonist (LABA) or leukotriene receptor antagonist (LRTA)) [11].

Children under medium-to-high doses of ICS and omalizumab were also included in the SRW or SA groups. Preschool children with NSRW and school-age children with NSA were defined as children with ≤ 1 severe exacerbation (requiring a course of steroids) in the past year AND no hospital admission during the previous year AND no recurrent chronic symptoms AND normal lung function, with no more than low-medium doses of ICS (< 500 $\mu\text{g}/\text{day}$ budesonide or equivalent), with or without other controller medication.

All children with SRW and SA were followed for at least three months before inclusion to exclude other diagnoses, treat comorbidities, reduce environmental exposure, optimize asthma control, and assess medication adherence and inhalation technique.

Non-inclusion criteria were: asthma exacerbation within the previous four weeks, history of bronchopulmonary dysplasia, post-infection chronic lung disease, vocal cord dysfunction, lung malformation, tracheomalacia, cystic fibrosis, primary ciliary dyskinesia, immune deficiency, foreign body inhalation, or congenital cardiac disease. Children were not included if the physician-based assessment showed poor adherence and/or technique based on asthma history and demonstration of inhaler use.

Study assessments

Baseline data collected by physicians included: i) demographics and anthropometrics; ii) family history of allergic disorders, including atopic dermatitis (AD), asthma, food allergy (FA), allergic rhinitis (AR); iii) past medical history, including associated allergic disorders (AD, AR, FA), comorbidities (symptomatic gastro-oesophageal reflux), and history of hospitalization for at least one episode of bronchiolitis before the age of 2 years; iv) parental-reported environmental exposure,

including pre and post-natal smoke exposure, carpet, visible mold/dampness at home [21], pet ownership, fuel heat; v) current asthma history, including symptoms and medications. For asthma control, the Childhood Asthma Control Test (ACT) for children ≤ 12 years [22, 23] and Global Initiative for Asthma (GINA) criteria [24] were used. Assessment of quality of life for school-age children aged 7-12 years was performed with the specific Pediatric Asthma Quality-of-Life Questionnaire (PAQLQ) [25]. Adherence and inhalation techniques were assessed by physicians in charge of the child. Symptomatic gastroesophageal reflux (GER) was diagnosed on the basis of suggestive symptoms, AND/OR positive pH monitoring AND/OR endoscopy AND/OR positive response to anti-acid therapy.

Atopy was defined by the presence of at least one positive skin-prick test (SPT) (wheal diameter ≥ 3 mm) and/or specific IgE levels (≥ 0.35 Ku/l) against common airborne and/or food allergens.

Lung function was assessed in children aged ≥ 4 years. Measures were performed in accordance with ATS/ERS guidelines [26, 27]. The predicted values and Z-scores were calculated from the Global Lung function Initiative predictive equations [28]. Reversibility was assessed after administration of short acting bronchodilator (BD) (400 μ g Salbutamol) and defined as an increase in FEV1 $> 12\%$ between pre and post bronchodilator values. Fractional exhaled nitric oxid (FeNO) was measured in school-age children, and a minimum of two measurements were performed. Data were expressed as parts per billion (ppb).

Statistical analysis

R version 3.3.1 statistical software was used for statistical analysis (R Core Team (2016) Vienna, Austria). Continuous variables are presented as medians

[interquartile range], and categorical variables as numbers (%). Comparisons of quantitative data were performed using Wilcoxon-Mann-Whitney tests. Categorical variables were analysed using the chi-square test or Fisher exact test as appropriate. No imputation of missing data was performed. Multivariable logistic regression analyses were performed to assess risk factors for SRW and SA. Multi-variable models were first built with the inclusion of all variables not involved in the definition of SRW or SA (Asthma history in Table 1 and Sup Table) with univariate p-values < 0.1 (See Table 1, 3 and 4). Then, selection of the final variables with the best fit for each multi-variable model (*i.e.*, for preschool and school-age children) was achieved by backward stepwise elimination using Aikaiki's information criterion. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Subjects

Overall, 348 patients were recruited (male: 68%), including 141 (40.5%) preschool and 207 (59.5%) school-age children (Figure 2). Among preschool children, 92 (65.2%) had SRW and 49 (34.8%) had NSRW. Among school-age children, 92 (44.4%) had SA and 115 (56.6%) had NSA. Six pairs of siblings were included, amongst which three were included in the same age-matched and severity-matched cohort. Overall, baseline demographic characteristics were comparable between children with SRW and SA and those with milder disease (Table 1), except that school-age children with SA were slightly older at inclusion than those with NSA (10.0 [9.0-11.0] vs 9.0 [8.0-11.0] years, $p=0.017$) and breastfeeding during infancy was less frequent in SA than in NSA (61.1% vs 77.9%, $p=0.014$). The general characteristics of the children are summarized in Table 2.

Factors associated with severe recurrent wheeze in preschool children

Birth weight was lower in preschool children with SRW than in those with NSRW (3100 g [2685-3467] vs 3370 g [3100-3520], $p=0.011$) (Table 1). Prenatal smoke exposure did not differ between children with SRW and NSRW.

Exposure to second hand smoke (SHS) and visible mold/dampness was more frequent in preschool children with SRW than in those with NSRW (25.8% vs 2.0%, $p<0.001$; 28.3% vs 8.3%, $p=0.012$, respectively) (Table 3).

A family history of atopy was present in 85.3% of preschoolers. The family atopy status was not associated with severity, except for AD in siblings, which was more frequent in preschool children with SRW than in those with NSRW (41.0% vs 18.6%, $p=0.021$).

Atopy was common in preschool children (64.3%), and there was no difference in associated atopic disorders between SRW and NSRW (Table 4). No difference was observed in the frequency of symptomatic GER among preschoolers.

Multivariable logistic regression analysis showed an association between SRW and birth weight (OR [95%CI]: 0.34 [0.14-0.75] per unit, kg, increase), second-hand smoke exposure (OR [95%CI]: 29.8 [3.57-3910]), the presence of visible mold/dampness at home (OR [95%CI]: 4.22 [1.25-18.2]), and atopic dermatitis in siblings (OR [95%CI]: 3.02 [1.19-8.29]) (Table 5).

Factors associated with severe asthma in school-age children

No difference in prenatal environment and birth weight (Table 1), as well as postnatal environment (Table 3) was observed between SA and NSA.

A family history of atopy was also frequent in school-age children: 84.8%. The family atopy status was not associated with SA. The number of resident at home was higher in children with SA than in those with NSA (5 [4-6] vs 4 [4-5], $p < 0.01$).

Atopy was present in 83.0% of school-age children, and history of AD and FA were more frequent in SA than in those with NSA (48.9% vs 26.1%, $p < 0.01$; 31.1% vs 13.5%, $p < 0.01$, respectively). Symptomatic GER was more frequent in school-age children with SA than in NSA (21.7% vs 8.7%, $p = 0.014$) (Table 4).

Multivariable logistic regression analysis of school-age children showed an association between the number of residents at home (OR [95%CI]: 1.54 [1.18-2.06]), fuel-based heating (OR [95%CI]: 16.7 [2.76-322]), and history of food allergies (OR [95%CI]: 5.01 [2.23-11.9]) (Table 6).

Discussion

We initiated the first prospective French cohort of asthmatic children including preschoolers with SRW and school-age children with SA to identify factors associated with asthma severity in these two groups. We observed that factors influencing severity differed between preschoolers and school-age children. In preschoolers, SRW was preferentially associated with pejorative environmental factors, such as SHS exposure and mold/dampness at home, whereas at school age, SA was preferentially associated with allergic sensitization and comorbidities.

We observed that preschoolers with SRW were more frequently exposed to visible mold/dampness at home than those with NSRW, as supported by previous studies, showing that preschoolers exposed to dampness at home were at high risk of developing asthma symptoms, regardless of their atopy status [29]. Regarding SHS, several studies, among which a survey conducted in over 20,000 children (median age 4.4 years) have also shown that maternal smoking increased the risk of emergency-department visits for asthma [30]. Overall, our results highlight the potential effects of indoor factors and pollutants in the severity of preschool asthma and the need to explore household exposure in this population. Furthermore, preschoolers with SRW had lower birth weights than those with a milder disease, as opposed to comparable Z-scores for body mass index (BMI) at inclusion. Prenatal smoke exposure has previously been associated with increased airway responsiveness and reduced lung function in childhood [31, 32]. More experimental and epidemiologic studies are needed to determine the mechanisms underlying the influence of antenatal exposure, growth, and birth weight on the subsequent development of asthma and development of lung function.

Despite stringent inclusion criteria, preschoolers with SRW may be a heterogeneous group. Various evolution phenotypes of preschoolers with SRW may emerge during the prospective follow-up of the cohort. Preschoolers with a multiple and early sensitization phenotype have been previously identified to have a high-risk evolution profile, including severe exacerbations and hospital admissions for exacerbations [33]. Our results raise the hypothesis that this trajectory may also be influenced by early harmful environmental exposures.

At school-age, the magnitude of allergic sensitization against food or airborne allergens has been associated with asthma severity in previous studies [6, 34–36]. Furthermore, the association of allergic disorders, such as AR [37], IgE-mediated FA [38, 39], and AD [40], appears to increase asthma severity. Although our study was cross-sectionnal, our results also suggest that allergic mechanisms may worsen the clinical expression of asthma in school-age children with allergic disorders. Allergic rhinitis is a classical factor associated with asthma severity [12]. However, this was not the case in our study, possibly due to the high prevalence of AR in both SA and NSA. One could also hypothesize that the severity of AR, rather than its presence, may affect asthma severity [34, 37]. Although frequently observed in preschoolers with SRW, allergic disorders and sensitization were only associated with asthma severity at school age.

Our data support the hypothesis that factors associated with severity may differ between preschoolers and school-age children, or have a different impact depending on the age of children and the duration of the disease. Here, we described patients based on data collection at inclusion. The impact of an environmental risk factor and the phenotypic features may change over time [41]. New sensitizations and

comorbidities may develop in certain children. These distinct phenotypes may be associated with different baseline endotypes leading to varying severity between preschool and school-age children. The prospective follow-up that we initiated will provide further insights into the disease trajectory of these children and the evolution of allergic disorders, lung function, and asthma severity.

The burden of SRW and SA has been demonstrated in previous studies to be high in terms of symptoms and medication requirement [6, 12, 42]. Although children with SA were slightly older than those with NSA in our study, they had a more severe asthma trajectory, with more admissions for severe exacerbations or ICU admissions in childhood, and had worse lung function. It is therefore unlikely that this age difference affected the results. Hence, our data suggest that children with SRW/SA may display a more severe course of the disease than their counterparts throughout childhood. These findings are supported by observations from the SARP cohort, showing that a history of ICU admission or intubation was associated with SA at school-age [6], although not observed in the U-Biopred cohort [12]. Furthermore, it has been shown that asthmatic children with severe exacerbations in infancy display poorer lung function, not only in the preschool years but also later [43].

Our study had several limitations. First, we did not include healthy control subjects. However, we aimed to determine factors associated with severity. Thus, children with milder disease were appropriate controls. Because the recruitment was conducted in tertiary-care centers, the children with NSW and NSA in our study may not be representative of all children with mild/moderate recurrent asthma or wheeze followed in primary care. However, children with SRW and SA constituted a representative sample of French children with SRW/SA. We cannot exclude that certain preschool wheezers had transient symptoms and that certain patients with recurrent wheeze may

outgrow their condition, in particular among those with low exposure to environmental triggers and low sensitization rates. Transient wheeze is generally defined as beginning and ending before the age of three years [24, 44, 45]. The inclusion of children older than three years limited this potential bias. Moreover, the high proportion of sensitization observed in preschoolers with SRW increased their likelihood of having persistent symptoms [24, 46, 47]. SRW in preschoolers may not progress to SA in school-age children. In a previous study, we reported that preschoolers with SRW displayed persistent asthma at school-age in 72% of cases, but that asthma severity decreased over time [16]. Preschoolers with SRW and school-age children with SA may display distinct phenotypes and endotypes, as suggested by studies showing specific features in bronchial biopsies, such as the predominance of neutrophils in preschoolers with SRW [4]. Our findings that factors associated with SRW in preschoolers and SA in children may differ support this hypothesis. Furthermore, the definition of severity in the preschool years, based on the persistence of symptoms and/or exacerbations despite high doses of ICS and a second controller therapy, was chosen in accordance with the stepwise-approach guidelines. High-dose treatment was used as a feature to define SRW by extension of the the definition of the SA guidelines [11]. Although there is little evidence of a beneficial effect of medium-to-high doses of ICS in the preschool age, ICS dose escalation is still the recommended approach in asthma guidelines, including the possibility of a high-dose trials [11, 20, 24, 48].

Second, no objective measurements of indoor allergen, mold/dampness or outdoor pollution levels were performed during home visits. Our results were based on parental descriptions of exposure, which may not be accurate [11]. The impact of pollutants and their differential effects in subgroups of patients may have therefore been

misestimated. Furthermore, the number of children included varied among centers and there may have been a geographical bias for the assessment of air pollution, which differed between cities. In addition, adherence was not assessed with objective measures, which may have overestimated the frequency of SRW and SA. We limited this bias by not including cases with confirmed poor adherence / inhaler technique in those groups and by applying a strict definition for SRW and SA. Finally, we did not classify preschoolers according to previous classifications of wheezing phenotypes, such as early transient wheeze, persistent wheeze, late-onset wheeze, or episodic or multiple-trigger wheeze. Early transient wheeze was not adapted to our population consisting of children of ≥ 3 years of age. It has been reported that the episodic and multiple-trigger wheeze phenotypes may not be stable over time [20, 49]. Finally, it has been shown that viral wheezers and multiple-trigger wheezers display the same pattern of remodeling and airway inflammation and that multiple-trigger wheezers and severe intermittent wheezers have similar inflammatory profiles during acute exacerbations and eight weeks later [4, 50].

The COBRAPed study describes a subsequent and well-characterised sample of 2 clinical entities: preschool recurrent wheezing and school-age children with asthma in France. Our analysis of baseline characteristics suggests that factors influencing asthma severity may differ between preschoolers and school-age children. Some of them may be targets for prevention. Improving environmental factors, especially in the preschool years, and preventing the development of allergic disorders may therefore prevent or improve the prognosis of SRW and SA.

Members of the COBRAPed Study Group:

Dr Rola Abou-Taam (CHU Necker-Enfants Malades), Dr Muriel Le Bourgeois (CHU Necker-Enfants Malades), Dr Alice Hadchouel-Duvergé (CHU Necker-Enfants Malades), Dr David Drummond (CHU Necker-Enfants Malades), Pr Christophe Delacourt (CHU Necker-Enfants Malades), Dr Marie-Alexandra Alyanakian (CHU Necker-Enfants Malades), Pr Lucienne Chatennoud (CHU Necker-Enfants Malades), Dr Caroline Thumerelle (CHU Lille), Dr Clémence Mordacq (CHU Lille), Dr Irina Badiu-Decleyre (CHU Lille), Dr Cécile Bonnel (CHU Lille), Dr Laure Delbecque (CHU Lille), Dr Laurent Beghin, PhD (CHU Lille), Mrs Graziella Mingardi (CHU Lille), Mrs Caroline Tournegros (CHU Grenoble Alpes), Dr Léa Roditis (CHU Toulouse), Dr Stéphanie Wanin (Robert Debré Hospital, Paris), Dr Marie Noelle Lebras (Robert Debré Hospital, Paris), Dr Stéphane Debelleix (CHU Bordeaux), Dr Valérie Siao (CHU Bordeaux), Mrs Marine Servat (CHU Bordeaux, Hôpital Haut-Lévêque), Mr Guillaume Simon (CHU Bordeaux, Hôpital Pellegrin-Enfants), Dr Patricia El Boustany (CHU Marseille Timone-Enfants), Dr Emmanuelle Bosdure (CHU Marseille Timone-Enfants), Dr Julie Mazenq (CHU Marseille Timone-Enfants), Dr Isabelle Cabon (CHU Marseille Timone-Enfants), Dr Camille Ohlmann (CHU Lyon), Dr Stéphanie Vrielynck (CHU Lyon), Dr Virginie Jubin (CHU Lyon), Dr Sylvie-Anne André Gomez (CHU Lyon), Dr Marie-Christine Werck Gallois (CHU Lyon).

Acknowledgements

The authors would like to thank the patients and their families for their participation in the study, as well as all nurses, physicians and clinical research coordinators who were involved in the COBRAPed study group.

References

1. Saglani S, Payne DN, Zhu J, Wang Z, Nicholson AG, Bush A, Jeffery PK. Early detection of airway wall remodeling and eosinophilic inflammation in preschool wheezers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007; 176: 858–864.
2. Just J, Gouvis-Echraghi R, Couderc R, Guillemot-Lambert N, Saint-Pierre P. Novel severe wheezy young children phenotypes: boys atopic multiple-trigger and girls nonatopic uncontrolled wheeze. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012; 130: 103-110.e8.
3. Guiddir T, Saint-Pierre P, Purenne-Denis E, Lambert N, Laoudi Y, Couderc R, Gouvis-Echraghi R, Amat F, Just J. Neutrophilic Steroid-Refractory Recurrent Wheeze and Eosinophilic Steroid-Refractory Asthma in Children. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2017; 5: 1351-1361.e2.
4. Lezmi G, Gosset P, Deschildre A, Abou-Taam R, Mahut B, Beydon N, de Blic J. Airway Remodeling in Preschool Children with Severe Recurrent Wheeze. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2015; 192: 164–171.
5. Barbato A, Turato G, Baraldo S, Bazzan E, Calabrese F, Panizzolo C, Zanin ME, Zuin R, Maestrelli P, Fabbri LM, Saetta M. Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006; 174: 975–981.
6. Fitzpatrick AM, Teague WG, Meyers DA, Peters SP, Li X, Li H, Wenzel SE, Aujla S, Castro M, Bacharier LB, Gaston BM, Bleecker ER, Moore WC, National Institutes of Health/National Heart, Lung, and Blood Institute Severe Asthma Research Program. Heterogeneity of severe asthma in childhood: confirmation by cluster analysis of children in the National

- Institutes of Health/National Heart, Lung, and Blood Institute Severe Asthma Research Program. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 127: 382-389.e1-13.
7. Just J, Gouvis-Echraghi R, Rouve S, Wanin S, Moreau D, Annesi-Maesano I. Two novel, severe asthma phenotypes identified during childhood using a clustering approach. *Eur. Respir. J.* 2012; 40: 55–60.
 8. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat. Med.* 2012; 18: 716–725.
 9. Kaiser SV, Huynh T, Bacharier LB, Rosenthal JL, Bakel LA, Parkin PC, Cabana MD. Preventing Exacerbations in Preschoolers With Recurrent Wheeze: A Meta-analysis. *Pediatrics* 2016; 137.
 10. Bingham Y, Sanghani N, Cook J, Hall P, Jamalzadeh A, Moore-Crouch R, Bush A, Fleming L, Saglani S. Electronic adherence monitoring identifies severe preschool wheezers who are steroid responsive. *Pediatr. Pulmonol.* 2020; .
 11. Hedlin G, Bush A, Lødrup Carlsen K, Wennergren G, De Benedictis FM, Melén E, Paton J, Wilson N, Carlsen K-H, Problematic Severe Asthma in Childhood Initiative group. Problematic severe asthma in children, not one problem but many: a GA2LEN initiative. *Eur. Respir. J.* 2010; 36: 196–201.
 12. Fleming L, Murray C, Bansal AT, Hashimoto S, Bisgaard H, Bush A, Frey U, Hedlin G, Singer F, van Aalderen WM, Vissing NH, Zolkipli Z, Selby A, Fowler S, Shaw D, Chung KF, Sousa AR, Wagers S, Corfield J, Pandis I, Rowe A, Formaggio E, Sterk PJ, Roberts G, U-BIOPRED

- Study Group. The burden of severe asthma in childhood and adolescence: results from the paediatric U-BIOPRED cohorts. *Eur. Respir. J.* 2015; 46: 1322–1333.
13. Delmas M-C, Marguet C, Raheison C, Nicolau J, Fuhrman C. [Admissions for pediatric asthma in France]. *Arch Pediatr* 2013; 20: 739–747.
 14. Chipps BE, Zeiger RS, Borish L, Wenzel SE, Yegin A, Hayden ML, Miller DP, Bleecker ER, Simons FER, Szeffler SJ, Weiss ST, Haselkorn T, TENOR Study Group. Key findings and clinical implications from The Epidemiology and Natural History of Asthma: Outcomes and Treatment Regimens (TENOR) study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012; 130: 332-342.e10.
 15. Malmström K, Malmberg LP, O'Reilly R, Lindahl H, Kajosaari M, Saarinen KM, Saglani S, Jahnsen FL, Bush A, Haahtela T, Sarna S, Pelkonen AS, Mäkelä MJ. Lung function, airway remodeling, and inflammation in infants: outcome at 8 years. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2015; 114: 90–96.
 16. Lezmi G, Deschildre A, Abou Taam R, Fayon M, Blanchon S, Troussier F, Mallinger P, Mahut B, Gosset P, de Blic J. Remodelling and inflammation in preschoolers with severe recurrent wheeze and asthma outcome at school age. *Clin. Exp. Allergy* 2018; 48: 806–813.
 17. Lezmi G, Abou-Taam R, Garcelon N, Dietrich C, Machavoine F, Delacourt C, Adel-Patient K, Leite-de-Moraes M. Evidence for a MAIT-17-high phenotype in children with severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2019; 144: 1714-1716.e6.
 18. Ramratnam SK, Bacharier LB, Guilbert TW. Severe Asthma in Children. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2017; 5: 889–898.

19. 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.
20. Global Initiative for Asthma (GINA). 2020 Report: Global strategy for asthma management and prevention. <https://ginasthma.org/> (last accessed: August 2020). .
21. Jaakkola JJK, Hwang B-F, Jaakkola N. Home dampness and molds, parental atopy, and asthma in childhood: a six-year population-based cohort study. *Environ. Health Perspect.* 2005; 113: 357–361.
22. Nathan RA, Sorkness CA, Kosinski M, Schatz M, Li JT, Marcus P, Murray JJ, Pendergraft TB. Development of the asthma control test: a survey for assessing asthma control. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 113: 59–65.
23. Liu AH, Zeiger R, Sorkness C, Mahr T, Ostrom N, Burgess S, Rosenzweig JC, Manjunath R. Development and cross-sectional validation of the Childhood Asthma Control Test. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007; 119: 817–825.
24. 2012-GINA.pdf [Internet]. [cited 2020 Feb 12]. Available from: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2019/01/2012-GINA.pdf>.
25. Juniper EF, Guyatt GH, Feeny DH, Ferrie PJ, Griffith LE, Townsend M. Measuring quality of life in children with asthma. *Qual Life Res* 1996; 5: 35–46.
26. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Crapo R, Enright P, van der Grinten CPM, Gustafsson P, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Navajas

- D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J, ATS/ERS Task Force. Standardisation of spirometry. *Eur. Respir. J.* 2005; 26: 319–338.
27. Beydon N, Davis SD, Lombardi E, Allen JL, Arets HGM, Aurora P, Bisgaard H, Davis GM, Ducharme FM, Eigen H, Gappa M, Gaultier C, Gustafsson PM, Hall GL, Hantos Z, Healy MJR, Jones MH, Klug B, Lødrup Carlsen KC, McKenzie SA, Marchal F, Mayer OH, Merkus PJFM, Morris MG, Oostveen E, Pillow JJ, Seddon PC, Silverman M, Sly PD, Stocks J, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: pulmonary function testing in preschool children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007; 175: 1304–1345.
28. Quanjer PH, Stanojevic S, Cole TJ, Baur X, Hall GL, Culver BH, Enright PL, Hankinson JL, Ip MSM, Zheng J, Stocks J, ERS Global Lung Function Initiative. Multi-ethnic reference values for spirometry for the 3-95-yr age range: the global lung function 2012 equations. *Eur. Respir. J.* 2012; 40: 1324–1343.
29. Pekkanen J, Hyvärinen A, Haverinen-Shaughnessy U, Korppi M, Putus T, Nevalainen A. Moisture damage and childhood asthma: a population-based incident case-control study. *Eur. Respir. J.* 2007; 29: 509–515.
30. Farber HJ, Batsell RR, Silveira EA, Calhoun RT, Giardino AP. The Impact of Tobacco Smoke Exposure on Childhood Asthma in a Medicaid Managed Care Plan. *Chest* 2016; 149: 721–728.

31. Bjerg A, Hedman L, Perzanowski M, Lundbäck B, Rönmark E. A strong synergism of low birth weight and prenatal smoking on asthma in schoolchildren. *Pediatrics* 2011; 127: e905-912.
32. Cohen RT, Raby BA, Van Steen K, Fuhlbrigge AL, Celedón JC, Rosner BA, Strunk RC, Zeiger RS, Weiss ST, Childhood Asthma Management Program Research Group. In utero smoke exposure and impaired response to inhaled corticosteroids in children with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 126: 491–497.
33. Simpson A, Tan VYF, Winn J, Svensén M, Bishop CM, Heckerman DE, Buchan I, Custovic A. Beyond atopy: multiple patterns of sensitization in relation to asthma in a birth cohort study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010; 181: 1200–1206.
34. Pongracic JA, Krouse RZ, Babineau DC, Zoratti EM, Cohen RT, Wood RA, Khurana Hershey GK, Kercksmar CM, Gruchalla RS, Kattan M, Teach SJ, Johnson CC, Bacharier LB, Gern JE, Sigelman SM, Gergen PJ, Togias A, Visness CM, Busse WW, Liu AH. Distinguishing characteristics of difficult-to-control asthma in inner-city children and adolescents. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016; 138: 1030–1041.
35. Sharples J, Gupta A, Fleming L, Bossley CJ, Bracken-King M, Hall P, Hayward A, Puckey M, Balfour-Lynn IM, Rosenthal M, Bush A, Saglani S. Long-term effectiveness of a staged assessment for paediatric problematic severe asthma. *Eur. Respir. J.* 2012; 40: 264–267.
36. Just J, Saint-Pierre P, Gouvis-Echraghi R, Laoudi Y, Roufai L, Momas I, Annesi Maesano I. Childhood allergic asthma is not a single phenotype. *J. Pediatr.* 2014; 164: 815–820.

37. Togias A, Gergen PJ, Hu JW, Babineau DC, Wood RA, Cohen RT, Makhija MM, Khurana Hershey GK, Kercksmar CM, Gruchalla RS, Liu AH, Wang E, Kim H, Lamm CI, Bacharier LB, Pillai D, Sigelman SM, Gern JE, Busse WW. Rhinitis in children and adolescents with asthma: Ubiquitous, difficult to control, and associated with asthma outcomes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2019; 143: 1003-1011.e10.
38. Friedlander JL, Sheehan WJ, Baxi SN, Kopel LS, Gaffin JM, Ozonoff A, Fu C, Gold DR, Phipatanakul W. Food allergy and increased asthma morbidity in a School-based Inner-City Asthma Study. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2013; 1: 479–484.
39. Deschildre A, Marguet C, Salleron J, Pin I, Rittié J-L, Derelle J, Taam RA, Fayon M, Brouard J, Dubus JC, Siret D, Weiss L, Pouessel G, Beghin L, Just J. Add-on omalizumab in children with severe allergic asthma: a 1-year real life survey. *Eur. Respir. J.* 2013; 42: 1224–1233.
40. Fitzpatrick AM, Gaston BM, Erzurum SC, Teague WG. Features of severe asthma in school-age children: Atopy and increased exhaled nitric oxide. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 1218–1225.
41. Ross KR, Gupta R, DeBoer MD, Zein J, Phillips BR, Mauger DT, Li C, Myers RE, Phipatanakul W, Fitzpatrick AM, Ly NP, Bacharier LB, Jackson DJ, Celedón JC, Larkin A, Israel E, Levy B, Fahy JV, Castro M, Bleecker ER, Meyers D, Moore WC, Wenzel SE, Jarjour NN, Erzurum SC, Teague WG, Gaston B. Severe asthma during childhood and adolescence: A longitudinal study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2020; 145: 140-146.e9.
42. Teague WG, Phillips BR, Fahy JV, Wenzel SE, Fitzpatrick AM, Moore WC, Hastie AT, Bleecker ER, Meyers DA, Peters SP, Castro M, Coverstone AM, Bacharier LB, Ly NP, Peters

- MC, Denlinger LC, Ramratnam S, Sorkness RL, Gaston BM, Erzurum SC, Comhair SAA, Myers RE, Zein J, DeBoer MD, Irani A-M, Israel E, Levy B, Cardet JC, Phipatanakul W, Gaffin JM, et al. Baseline Features of the Severe Asthma Research Program (SARP III) Cohort: Differences with Age. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2018; 6: 545-554.e4.
43. Belgrave DCM, Buchan I, Bishop C, Lowe L, Simpson A, Custovic A. Trajectories of lung function during childhood. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2014; 189: 1101–1109.
44. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N. Engl. J. Med.* 1995; 332: 133–138.
45. Savenije OE, Granell R, Caudri D, Koppelman GH, Smit HA, Wijga A, de Jongste JC, Brunekreef B, Sterne JA, Postma DS, Henderson J, Kerkhof M. Comparison of childhood wheezing phenotypes in 2 birth cohorts: ALSPAC and PIAMA. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 127: 1505-1512.e14.
46. Sly PD, Boner AL, Björkstén B, Bush A, Custovic A, Eigenmann PA, Gern JE, Gerritsen J, Hamelmann E, Helms PJ, Lemanske RF, Martinez F, Pedersen S, Renz H, Sampson H, von Mutius E, Wahn U, Holt PG. Early identification of atopy in the prediction of persistent asthma in children. *Lancet* 2008; 372: 1100–1106.
47. Illi S, von Mutius E, Lau S, Niggemann B, Grüber C, Wahn U, Multicentre Allergy Study (MAS) group. Perennial allergen sensitisation early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study. *Lancet* 2006; 368: 763–770.

48. 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.
49. Raaymakers MJA, Brand PLP, Landstra AM, Brouwer ML, Balemans WAF, Niers LEM, Merkus PJFM, Boehmer ALM, Kluytmans JAJW, de Jongste JC, Pijnenburg MWH, Vaessen-Verberne AAPH. Episodic viral wheeze and multiple-trigger wheeze in preschool children are neither distinct nor constant patterns. A prospective multicenter cohort study in secondary care. *Pediatr. Pulmonol.* 2019; 54: 1439–1446.
50. Lejeune S, Pichavant M, Engelmann I, Beghin L, Drumez E, Le Rouzic O, Dessein R, Rogeau S, Beke T, Kervoaze G, Delvart C, Ducoin H, Pouessel G, Le Mée A, Boileau S, Roussel J, Bonnel C, Mordacq C, Thumerelle C, Gosset P, Deschildre A. Severe preschool asthmatics have altered cytokine and anti-viral responses during exacerbation. *Pediatr Allergy Immunol* 2020; .

Figure legends

Figure 1. Prospective follow-up of the children included in the COBRAPed study

SA: severe asthma, SRW: Severe recurrent wheeze, NSA: Non-severe asthma, NSRW: Non-severe recurrent wheeze, ACT: Asthma control test, PAQLQ: Pediatric Asthma Quality of Life, FeNO: fractional exhaled nitric oxide, SPT: skin prick tests. Data were collected if the exams were performed within the 3 months prior to inclusion.

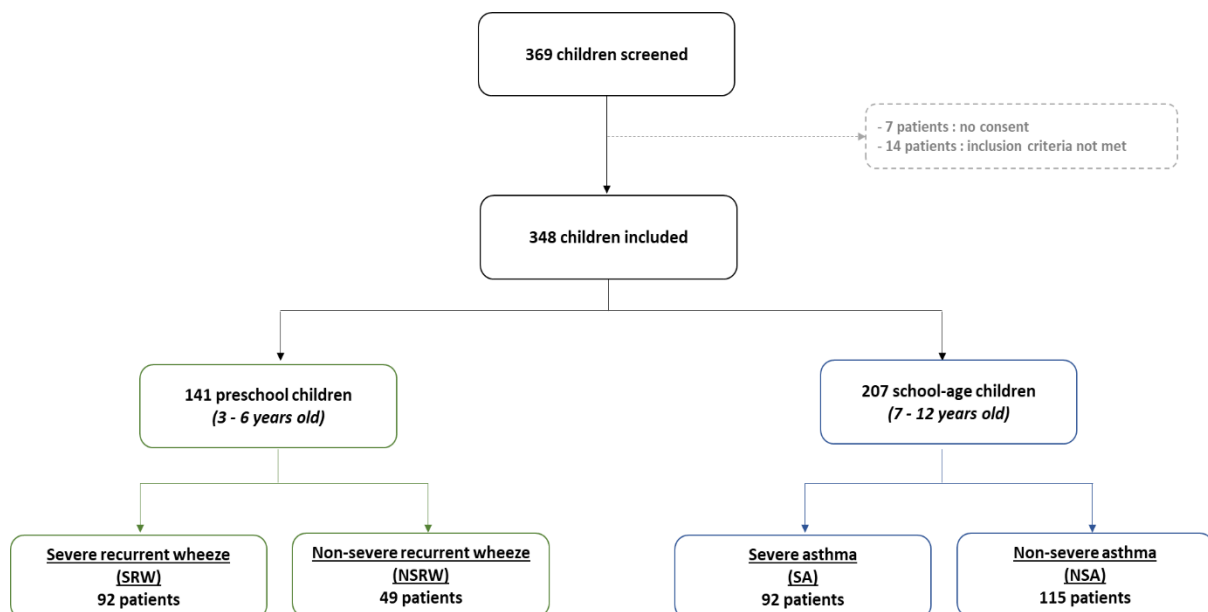
Figure 2. Flow-chart of the population

SA: Severe Asthma; NSA: Non-Severe Asthma, SRW: Severe recurrent wheeze, NSRW: Non-severe recurrent wheeze

Figure 1. Prospective follow-up of the children included in the COBRAPed study

	Inclusion	Follow-up		Visit 6-7 years	Visit 12 years	Visit 17-18 years
		SA and SRW: Every 6 months	NSA and NSRW: Every year			
All children						
Clinical assessment	X	X	X	X	X	X
ACT Questionnaire	X	X	X	X	X	X
PAQL Questionnaire	X	X	X	X	X	X
Lung function +- FeNO	X	X	X	X	X	X
SPT	X			X	X	X
Eosinophil count, vitamin D, total and specific IgE	X			X	X	X
ISAC® chip	X			X	X	X
Genomic DNA extraction	X			X	X	X
Children with SRW and SA						
Humoral immune status	X	According to: history, hospital center protocols and evolution				
Thoracic computerized tomography scan	X					
Ear, Nose and Throat Examination	X					
Sinus computerized tomography scan (after the age of 7 years)	X					
Intraesophageal pH measurement	X					
Bronchoscopy and bronchoalveolar lavage +- bronchial brushing	X					
Induced sputum	X					

Figure 2. Flow-chart of the population



II. Les enfants asthmatiques préscolaires sévères ont une réponse cytokinique et antivirale altérée au moment d'une exacerbation

Nous menons depuis 2015 une étude de recherche translationnelle dans le laboratoire, en collaboration avec les services de pneumologie pédiatrique du CHU de Lille et d'autres centres hospitaliers de la région Hauts-de-France (Arras, Lens, Roubaix, Tourcoing, Douai, Seclin, Béthune), les laboratoires de virologie et de bactériologie du centre de biologie pathologie du CHU de Lille, le laboratoire d'immunologie et le département de bio-statistiques du CHU (projet de recherche translationnelle VIRASTHMA-2 N° ID-RCB : 2014-A01687-40 – N° Clinical Trial : 03960359 - Promoteur : CHU Lille – Dr Antoine Deschildre). Je suis impliquée depuis 2015 dans cette étude à travers différents aspects. Je suis médecin investigateur à Lille et j'ai participé à l'inclusion et au suivi des enfants hospitalisés dans le service de pneumo-pédiatrie. J'ai réalisé la saisie informatique des données remplies manuellement par les investigateurs. J'ai également participé au traitement des échantillons au sein du laboratoire au cours de la phase initiale des inclusions, jusqu'en 2018. J'ai poursuivi le travail d'analyse de données au cours des années de thèse et rédigé l'article original présenté ici, publié dans la revue *Pediatric Allergy and Immunology*.

L'asthme préscolaire étant une affection hétérogène, l'objectif de cette première description de la cohorte était de comparer les profils cliniques, virologiques et inflammatoires / immunitaires au moment de l'exacerbation, entre les phénotypes d'asthme préscolaire : asthme à facteurs déclenchant multiples (MTW : multiple trigger wheeze), asthme viral épisodique (EVW : Episodic viral wheeze) et asthme intermittent sévère (SIW : severe intermittent wheeze).

La cohorte VIRASTHMA 2 est une cohorte multicentrique, prospective et observationnelle. Les enfants avec un asthme préscolaire (1-5 ans) ont été inclus pendant une hospitalisation pour une exacerbation sévère. Les antécédents et les données anamnestiques, le plasma et les échantillons nasaux ont été collectés au moment de

l'exacerbation et à l'état stable, 8 semaines plus tard, et les expectorations induites ont été réalisées à l'exacerbation.

Au total, 147 enfants ont été inclus, 37 (25%) présentaient un SIW, 18 (12,2%) un EVW et 92 (63%) un MTW. Ils étaient atopiques (47%), exposés aux moisissures (22%) et à la fumée de cigarette (50%), et sujets à des exacerbations (≥ 2 dans l'année précédente chez 70%). Lors de l'exacerbation, au moins un virus a été isolé chez 94% et un RV chez 75%, sans différence entre les phénotypes. Les enfants avec les phénotypes MTW et SIW présentaient des concentrations plasmatiques d'IFN- γ ($p=0,002$), d'IL-5 ($p=0,020$), de TNF- α ($p=0,038$), d'IL-10 ($p=0,002$), d'IFN- β ($p=0,036$) et de CXCL10 ($p=0,006$) et des taux d'IFN- γ ($P = 0,047$) plus faibles dans les expectorations au moment de l'exacerbation que les enfants avec le phénotype EVW. A l'état stable, ils présentaient également des taux plasmatiques plus faibles d'IFN- γ ($p=0,045$) et de CXCL10 ($P=0,013$).

Parmi les enfants asthmatiques d'âge préscolaire, les MTW et SIW, sujets aux exacerbations, présentent, lors d'une exacerbation sévère viro-induite, des niveaux systémiques plus faibles de cytokines Th1, Th2, pro- et anti-inflammatoires, ainsi que des facteurs associés à la réponse antivirale.

Lejeune S, Pichavant M, Engelmann I, Béghin L, Drumez E, Le Rouzic O, Dessein R, Rogeau S, Beke T, Kervoaze G, Delvart C, Ducoin H, Pouessel G, Le Mée A, Boileau S, Roussel J, Bonnel C, Mordacq C, Thumerelle C, Gosset P, Deschildre A. Severe preschool asthmatics have altered cytokine and anti-viral responses during exacerbation. *Pediatr Allergy Immunol.* 2020 Aug;31(6):651-661. doi: 10.1111/pai.13268. Epub 2020 May 17. PMID: 32352598.

Version finale, non formatée par éditeur, ci-dessous :

Severe preschool asthmatics have altered cytokine and anti-viral responses during exacerbation

Stéphanie Lejeune (MD)^{1,2}, Muriel Pichavant (PhD)², Ilka Engelmann (MD)³, Laurent Béghin (PhD)⁴, Elodie Drumez (Bst)⁵, Olivier Le Rouzic (MD, PhD)², Rodrigue Dessein (MD, PhD)^{2,6}, Stephanie Rogeau (PharmD)⁷, Timothee Beke (Bsc)², Gwenola Kervoaze (Bsc)², Celine Delvart (MD)⁸, Heloise Ducoin (MD)⁹, Guillaume Pouessel (MD)¹⁰, Armelle Le Mée (MD)¹¹, Sophie Boileau (MD)¹², Juliette Roussel (MD)¹³, Cecile Bonnel (MD)¹⁴, Clemence Mordacq (MD)^{1,2}, Caroline Thumerelle (MD)^{1,2}, Philippe Gosset (PharmD, PhD)^{2§}, Antoine Deschildre (MD)^{1,2§}

¹Univ. Lille, Pediatric Pulmonology and Allergy Department. Hôpital Jeanne de Flandre, CHU Lille, 59037 Lille cedex, France.

² Univ. Lille, INSERM Unit 1019, CNRS UMR 9017, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, Center for infection and immunity of Lille, 59019 Lille cedex, France.

³Univ. Lille, Virology laboratory, EA3610, Institute of Microbiology, CHU Lille, 59037 Lille cedex, France.

⁴Univ. Lille, CHU Lille, LIRIC UMR 995 Inserm, Clinical Investigation Center, CIC-1403-Inserm-CHU, F-59000 Lille, France.

⁵Univ. Lille, CHU Lille, ULR 2694 - METRICS : Évaluation des technologies de santé et des pratiques médicales, F-59000 Lille, France, CHU Lille, Department of Biostatistics, F-59000 Lille, France

⁶Univ. Lille, Bacteriology departement, Institute of Microbiology, CHU Lille, 59037 Lille cedex, France.

⁷Univ. Lille, Institute of Immunology, CHU Lille, Lille, 59037 Lille cedex, France.

⁸Pediatric departement, CH Arras, 62022 Arras cedex, France.

⁹Pediatric departement, CH Lens E. Schaffner, 62037 Lens cedex, France.

¹⁰Pediatric departement, CH Roubaix V. Provo, 59056 Roubaix cedex, France.

¹¹Pediatric departement, CH Tourcoing, 59208 Tourcoing, France.

¹²Pediatric departement, CH Douai, 59507 Douai cedex, France.

¹³Pediatric departement, CH Seclin, 59471 Seclin cedex, France.

¹⁴Pediatric departement, CH Bethune, 62408 Bethune cedex, France.

§ The senior authors contributed equally in this work

Running title: Immune responses during exacerbation in preschool asthma

Corresponding author: Antoine Deschildre

Pediatric Pulmonology and Allergy Department. Hôpital Jeanne de Flandre, CHU Lille, 59037 Lille cedex, France. antoine.deschildre@chru-lille.fr

Competing Interests

All authors have no conflict of interest regarding this study.

Financial support

This study was funded by “Conseil Régional Hauts-de-France” program 2014-2018 (Grant number: ARCiR 2015-284) and by a support grant from “Stallergen Greer™ (Antony, France).

Word count: 2,788

Word count for the abstract: 231

Number of tables: 5

Number of figures: 1

Abstract

Background: Preschool asthma / recurrent wheeze is a heterogenous condition. Different clinical phenotypes have been described, including episodic-viral wheeze (EVW), severe intermittent wheeze (SIW), and multiple-trigger wheeze (MTW).

Objective: To compare clinical, viral and inflammatory/immune profiling at exacerbation between MTW, SIW and EVW phenotypes.

Methods: Multicenter, prospective, observational cohort (VIRASTHMA-2). Children (1-5 years) with preschool asthma were enrolled during hospitalization for a severe exacerbation. History and anamnestic data, plasma and nasal samples were collected at exacerbation (T1) and at steady state, 8 weeks later (T2), and sputum samples were collected at T1.

Results: 147 children were enrolled, 37 (25%) had SIW, 18 (12.2%) EVW, and 92 (63%) MTW. They were atopic (47%), exposed to mold (22%) and cigarette smoke (50%) and prone to exacerbations (≥ 2 in the previous year in 70%). At exacerbation, at least one virus was isolated in 94%, rhinovirus in 75%, with no difference between phenotypes.

Children with MTW and SIW phenotypes displayed lower plasma concentrations of IFN- γ ($p=0.002$), IL-5 ($p=0.020$), TNF- α ($p=0.038$), IL-10 ($p=0.002$), IFN- β ($p=0.036$) and CXCL10 ($p=0.006$), and lower levels of IFN- γ ($p=0.047$) in sputum at exacerbation than children with EVW. At T2, they also displayed lower plasma levels of IFN- γ ($p=0.045$) and CXCL10 ($p=0.013$).

Conclusion: Among preschool asthmatic children, MTW and SIW, prone to exacerbations, display lower systemic levels of Th1, Th2 cytokines, pro and anti-inflammatory cytokines, and anti-viral responses during severe virus-induced exacerbation.

NCT: 03960359

Key Words: Asthma, Preschool children, Phenotype, Inflammation, Infection

Abbreviations

AD: Atopic dermatitis

AR: Allergic rhinoconjunctivitis

BMI: Body Mass Index

CSE: cigarette smoke exposure

CXCL: C-X-C motif chemokine ligand

EVW: Episodic-viral wheeze

FA: Food allergy

GINA: Global Initiative for Asthma

ICS: Inhaled corticosteroids

IFN: Interferon

IL: Interleukin

MTW: Multiple-trigger wheeze

PRAM: Preschool Respiratory Assessment Measure

PRR : Pattern Recognition Receptors

RSV: Respiratory Syncytial Virus

RV: Rhinovirus

RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SCORAD: Scoring Atopic Dermatitis severity score

SIW: Severe intermittent wheeze

SPT: skin prick tests

T1: Time 1 (exacerbation)

T2: Time 2 (steady state)

TNF: Tumor necrosis factor

TSLP: Thymic stromal lymphopoietin

Introduction

Preschool asthma / recurrent wheeze is now recognized as a specific entity (1). However, our understanding of its underlying mechanisms has to be improved. Despite maintenance treatment, many patients remain uncontrolled, prone to exacerbation, with a significant ongoing burden (2).

Up to now, different clinical phenotypes have been described. In 2008, Brand, *et al.* defined: episodic-viral wheeze (EVW: wheezing during discrete time periods, absence of symptoms between exacerbations) and multiple-trigger wheeze (MTW: wheezing during exacerbations but also symptoms between these periods) (3). Simultaneously, in 2007, Bacharier, *et al.* identified severe intermittent wheeze (SIW), characterized by frequent and severe exacerbations, separated by periods without symptoms (4).

Exacerbations are one of the main clinical markers of pediatric asthma, especially in preschoolers, most often triggered by viral infections (2,5).

During exacerbation, a cytokine burst is occurring, characterized by the release of Th2 cytokines, alarmins, inflammatory and anti-microbial responses (6). Previous studies have suggested that some asthmatic children may display a deficient antiviral response (2,7,8).

The VIRASTHMA-2 cohort focuses on preschool asthmatic children (< 5 years), assessed at the time of a severe exacerbation and at steady state. We conducted an exploratory study with the hypothesis that children with EVW, SIW and MTW phenotypes may display different levels of cytokines in blood and sputum at exacerbation.

After providing a description of the cohort, our primary objective was to analyze clinical, microbiological (virus identification) and immune profiling at exacerbation in EVW, MTW and SIW patients. Our secondary objective was to conduct the same analysis at steady state.

Methods

1. Study population

We initiated a multicenter, prospective, observational cohort study in eight pediatric hospital centers in the Hauts-de-France region, France, between 2015 and 2018. Preschool children (1-5 years), with a medical diagnosis of recurrent wheeze / asthma, according to the recommendations (1,9), were enrolled during hospitalization for a severe exacerbation (requiring a course of systemic steroids). Inclusions and sampling were performed within 48 hours following the admission and initiation of general corticosteroids.

The study was approved by ethics committee (CPP Nord-Ouest IV) and registered at ClinicalTrial.gov (NCT: 03960359). Written informed consent was obtained from parents/caregivers. Full inclusion criteria, study design and details on data and collection of biological samples are described in the Supporting information and Supp Table I.

2. Study design

Patients' data were collected at exacerbation (T1) and at steady state, at least 8 weeks after (T2). Blood samples to study immune profiling and virus identification were performed at both T1 and T2. Sputum samples were collected at T1.

3. Definitions

3.1. Phenotypes

Three groups of children were defined, according to previous recommendations: EVW: wheezing during discrete time periods (exacerbations), ≤ 1 severe exacerbation over the last 12 months, absence of symptoms between exacerbations; SIW: ≥ 2 severe exacerbations over the last 12 months, absence of interval symptoms; and MTW: wheezing during exacerbations and symptoms between these periods (3,4). Phenotype was defined at T2, and reviewed with the

principal investigator, based on parental report of symptoms after the parents / caregivers had received education on chronic symptoms. If the child was lost to follow-up and not assessed at T2, phenotype was defined according to parental reports of symptoms at T1.

3.2. History and anamnestic data

At T1, we recorded: history, demographics and anthropometrics, environment [cigarette smoke exposure (CSE), visible mold/moisture, pet ownership, urban living], family history, associated disorders defined according to guidelines, including atopic dermatitis (AD) (severity assessed with SCORAD: Scoring Atopic Dermatitis severity score (10)), allergic rhinoconjunctivitis (AR) (11), food allergy (FA) (12).

3.3. Asthma history and control

We assessed: age at first wheeze, current asthma medication, including inhaled corticosteroids (ICS) in $\mu\text{g}/\text{day}$ fluticasone or equivalent, chronic symptoms, number of severe exacerbations in the past 12 months (requiring a course ≥ 3 days of systemic steroids), day-to-day asthma control according to the Global Initiative for Asthma (GINA) criteria: well-controlled, partly controlled, uncontrolled (1). Features of the exacerbation were noted, including Preschool Respiratory Assessment Measure (PRAM) severity score at admission in the emergency room (13).

3.4. Atopy

Full allergy diagnosis work-up was performed at T2: skin prick tests (SPT) with a panel of airborne allergens and food allergens, and/or allergen specific IgE antibodies. Atopy was diagnosed if at least one SPT result was positive (diameter ≥ 3 mm) and/or at least one specific IgE was positive (≥ 0.35 kUA/l). Serum total IgE levels (kUI/l) and peripheral blood eosinophil counts ($/\text{mm}^3$) measured at T2 were also recorded.

4. Blood and sputum collection for immune profiling

Spontaneous or induced sputum (after nebulization of isotonic saline solution) were collected during a physiotherapy session (14). Plugs were isolated from the sputum, weighed and processed. Cytospins were prepared from the cell pellets and used for cell counts. All concentrations of cytokines were measured by customized multiplex assays (Luminex®, ThermoFisher Scientific) in plasma and sputum supernatants and expressed in pg/ml. Cytokines known as being involved in the immune reaction in acute asthma and in the anti-viral response were selected, based on previous relevant studies in our laboratory and in the literature (7,8,15). Levels of Th1 cytokines [IFN- γ], Th2 cytokines [IL-4, IL-5, IL-13], alarmins [IL-33, TSLP], Th17 cytokines [IL-17, IL-22], pro-inflammatory cytokines [Tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-6, C-X-C motif chemokine ligand (CXCL8)], anti-inflammatory cytokines [IL-10], anti-viral response including type I interferons [IFN- β], type III interferons [IL-29] and Interferon-stimulated genes [CXCL10] were assessed.

5. Virus identification

Nasal swab secretions were collected at T1 and T2 using a flocked swab and specialized culture medium (Labelians, UTM1MLN™). Samples were frozen (−80 °C) before RNA extraction. As previously described (7), nucleic acids were extracted using the Magstation System 12GC with the MagDEA® Viral DNA/RNA 200 (GC) kit (Precision System Science Co., Ltd.; Japan). Anyplex II RV16 Detection Kit (from start date to February 2016) and thereafter, Allplex Respiratory Panel 1, 2 and 3 (Seegene, Seoul, Korea) were used as multiplex reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) assays.

6. Data analysis

Categorical variables were reported as numbers (percentages) and continuous variables as median [interquartile range]. Normality was assessed graphically and using the Shapiro-Wilk test. Comparisons between the three groups (MTW, SIW and EVW) were conducted using Chi-square for categorical variables or Kruskal-Wallis test for continuous variables. Post-hoc pairwise comparisons were performed using Chi-square test for categorical variables or Dunn test for continuous variables, applying the Bonferroni correction to adjust for multiple comparisons. All statistical tests were performed at the two-tailed α level of 0.05 using SAS software, release 9.4 (SAS Institute, Cary, NC).

Results

1. Study Cohort

Collectively, 147 children (boys: 58.5%, median age of 30 months (23: 40)) were included: 37 (25.2%) with SIW, 18 (12.2%) with EVW and 92 (62.6%) with MTW. At T2, 135 (91.8%) children were assessed, 33 (24.4%) with SIW, 16 (11.9%) with EVW and 86 (63.7%) with MTW (Fig 1).

Parents reported visible mold/dampness at home in 22.4%, history of mother smoke during pregnancy in 21.8%, current CSE in 49.7% (Table I). Children presented with early onset wheeze, with a median age at first wheeze of 9 months (4; 25) and a median number of exacerbations in the previous year of 2 (1; 4). In all, 32.7% had a controller therapy with ICS before inclusion, with a median dose of 200 µg/day fluticasone equivalent (200; 200). At least one associated allergic disorder was found in 57%: AD in 37.4%, with an early onset (before 4 months of age) in 19.0%; AR in 20.4%; FA in 8.2%. Atopy was recorded in 47.1%, with sensitization to airborne allergens in 46.4% and to food allergens in 10.1%, polysensitization in 49.2% (Table II).

Exacerbations occurred all year long, most frequent in fall (40.1% in September-November) compared with winter (17.7% in December-February), spring (20.4% in March-May) and summer (21.8% in June-August). According to the PRAM severity score at admission to the emergency room, exacerbations were moderate attacks in 55.8% and severe attacks in 12.2%. All children were prescribed a controller therapy with ICS before hospital discharge.

At least one virus was isolated in 93.8% (RV:72.6%) (Supp Table II). In induced sputum (n=108), median total cell number was of 13.7×10^3 /mg (5.5; 28.0) with 32.0% of macrophages (19.0; 41.5), 54.0% of neutrophils (31.0; 71.5), 3.0 % of lymphocytes (1.5; 6.0)

and 1.0 of eosinophils (0.5; 2.5) (Table III). We observed detectable levels of Th1, Th2 cytokines, alarmins, Th17 cytokines, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, anti-viral molecules, in both plasma (n=137) and sputum (n=105) at T1, with inter-individual variations (Suppl Fig 1).

At T2, 49.6% had experienced at least another exacerbation and only 58.6% had reached day-to-day asthma control. At least one virus was isolated in 66.9% (RV: 49.6%). (Suppl Table II). We also observed detectable levels of cytokines in plasma (n=116), with inter-individual variations (Suppl Fig 1).

2. Comparison of clinical characteristics between MTW, SIW and EVW

Higher rates of CSE were observed in MTW compared with SIW and EVW (57.6% versus 32.4% and 44.4, respectively, $p=0.032$), without difference in antenatal CSE (Table I). Children with MTW and SIW were prone to exacerbation, with a median number of exacerbations in the past 12 months of 3.0 (1.0; 4.5) in MTW, 2.0 (1.0; 4.0) in SIW.

Children with MTW displayed less frequent history of early AD than SIW and EVW (10.9% vs 29.7% and 38.9%, respectively, $p=0.003$). Conversely, children with MTW had more frequent history of AR than SIW and EVW (27.2% vs. 10.8% and 5.6%, respectively, $p=0.028$). We did not observe any difference in the rates of FA, atopy, levels of serum total IgE, peripheral blood eosinophil and neutrophil counts (Table II).

At T1, clinical characteristics of exacerbations, including seasonal repartition, PRAM severity score and length of oxygen need were comparable within MTW, SIW and EVW (not shown).

3- Biologic characteristics at exacerbation and steady state according to phenotypes

There was no significant difference in the identification of viruses between phenotypes (Supp Table II). Sputum characteristics were similar, with the exception of higher levels of epithelial cells in sputum from MTW compared with SIW and EVW [4.5% (1.5; 12.0) versus 2.0 (1.0; 6.0) and 3.5 (2.0; 10.0), respectively, $p=0.042$] (Table III).

Compared with EVW, children with MTW and SIW displayed significantly lower plasma cytokine concentrations of IFN- γ ($p=0.002$) and IL-5 ($p=0.020$) and lower levels of IFN- γ ($p=0.047$) in sputum (Table IV), but no difference in IL-4, IL-13, and alarmins plasma and sputum concentrations. They also presented with lower blood concentrations of TNF- α ($p=0.038$), IL-10 ($p=0.002$), IFN- β ($p=0.036$) and CXCL10 ($p=0.006$). There was no difference regarding levels of Th17 cytokines.

At T2, there was no difference in virus identification between the three groups (Supp Table II). Regarding immune profiling, MTW and SIW displayed significantly lower plasma levels of IFN- γ than EVW ($p=0.045$) and MTW displayed lower plasma levels of CXCL10 than the two others ($p=0.013$) (Table V). Levels of Th2 cytokines, alarmins, Th17 cytokines, pro- and anti-inflammatory cytokines, type I and III IFNs were comparable.

Discussion

The VIRASTHMA-2 cohort enrolled a large population of preschool asthmatic children at the time of a severe exacerbation. Their characteristics highlight the early burden of asthma, especially the unmet needs in maintenance treatment and prevention of exacerbations (4,5,16,17). They were frequently atopic, exposed to mold and cigarette smoke and prone to exacerbations. At inclusion, at least one virus was isolated in 94%, RV in 75%, with no difference between phenotypes. Children with MTW and SIW phenotypes displayed lower plasma concentrations of IFN- γ , IL-5, TNF- α , IL-10, IFN- β and CXCL10, and lower levels of IFN- γ in sputum at exacerbation than children with EVW. At T2, they also displayed lower plasma levels of IFN- γ and for MTW, CXCL10.

In previous studies, early and multiple allergic sensitizations have not only been associated with severity but also with persistent asthma and long-term decline of lung function (18,19). The impact of the environment has also been shown in numerous studies, especially for CSE (20), molds (21), and pollution (22).

We observed higher rates of viral infections during exacerbations compared to relevant studies in older children and adults (23).

Rhinoviruses were confirmed as the main triggers (8,15). Viruses were also detected at steady state, as previously reported in both healthy and asthmatic children, with a higher frequency in the latter (23,24).

Our primary objective was to assess the differences between MTW, SIW and EVW phenotypes. They were similar in terms of most clinical and microbiological features, except for atopic comorbidities. Atopic dermatitis was more frequent in EVW and SIW children whereas rhinitis was more frequent in MTW, without differences in sensitizations. This could be related to a particular sensitivity of the skin or the respiratory mucosa. The high levels of epithelial cells in sputum from MTW may reflect epithelial damages in response to viruses

and/or inflammation (25). Additional data are needed in order to assess interactions between epithelial barriers, allergic diseases and asthma development. Airway, skin and intestinal microbiota may also be key players, as recently reported in a study conducted in preschool wheezers (26).

Regarding immune profiling, we observed that MTW and SIW displayed lower plasma concentrations of IFN- γ , IL-5, TNF- α , IL-10, IFN- β and CXCL10, and lower sputum levels of IFN- γ than EVW. These data suggest an overall defective response to viral infections in children with MTW and SIW, who are those prone to frequent exacerbation, with lower production of IFN- β and IFN-stimulated gene CXCL10, in response to viruses. Hence, levels of other cellular and soluble factors, such as IFN- γ , IL-5, TNF- α , were also lower in the most severe patients (MTW and SIW), compared to the EVW group. We cannot exclude that this reduced inflammatory response in the most severe patients may be influenced by concomitant treatment with ICS, although we did not observe a significant difference regarding treatment between phenotypes. We also observed lower circulating levels of IL-10, which could reflect an associated impairment of regulatory mechanisms. Previous studies, conducted in school-age children and adults, have shown conflicting results regarding the response to virus infection in asthmatic patients (2,8,27,28). In a study conducted in 72 school-aged children with allergic asthma, we have also reported an impaired anti-viral response during severe exacerbation in a subgroup of children prone to viral carriage at steady state and displaying modifications of PRRs (7). Although we did not observe any difference in viruses at steady state in the present study, we observed lower circulating levels of IFN- γ in MTW and SIW and lower levels of CXCL10 in MTW, which might reflect an underlying defect of virus sensors' expression and/or function at baseline. Other studies have suggested differential baseline levels of airway cytokines, including IL-4, IL-13 and CXCL10 in patients with severe asthma compared with non-severe asthma (29). Children prone to exacerbation despite ICS maintenance

treatment constitute a distinct phenotype, that may be associated with altered inflammatory and anti-viral response, alongside allergic sensitization and underlying airway inflammation (30). New treatment strategies targeting this distinct phenotype are urgently needed.

There are some limitations to our study. We selected a population of children on the occurrence of a severe exacerbation, leading to hospitalization, thus not representative of all preschool children with recurrent wheeze / asthma. We defined clinical phenotypes: EVW, MTW and SIW, which have been questioned in the past years (31), although these definitions remained in use in recent studies on preschool asthma (26). Persistence of phenotypes over time is another issue that we will address with data obtained after long-term follow-up and the analysis of the clinical and functional trajectories in the upcoming years. Due to its design as a study conducted in real-life practice, we did not include healthy controls. However, we included EVW patients with a milder phenotype. Another bias could be related to the sampling in some children with pre-existing maintenance treatment, and after initiation of systemic corticosteroids. All the samples were collected within 48 hours from the start of systemic corticosteroids and the enrolled children received the same treatment modalities at exacerbation. Finally, due to its exploratory design, no formal sample size calculation was conducted. Therefore, we cannot exclude that some differences between the phenotypes could be overlooked due to a lack of adequate statistical power. Although we included a limited number of patients compared with studies conducted in adults and older children, it remains one of the most important cohort of preschool children assessed during an acute exacerbation and at steady state, with limited number of lost to follow-up and missing data. Another strength of our study is its prospective and multi-center design. We also confirmed that sputum collection is feasible in preschool children (14).

In conclusion, our study not only highlights the burden of asthma in preschoolers, but also show that severe cases, who are prone to exacerbation may display impaired inflammatory and

anti-viral response at exacerbation. Further studies assessing preschool wheeze/asthma heterogeneity through various endotypes are urgently needed in order to anticipate the future morbidity risk and hence develop new treatment strategies.

Acknowledgements

The authors would like to thank the patients and their families for their participation in the study, Lille University Hospital as study sponsor, all nurses, chest physiotherapists, laboratory technicians and physicians who were involved in enrollment, sampling, and follow-up, in particular Mrs Cécile EVRARD (Clinical Investigation Center, LIRIC UMR 995 INSERM) for patient management, Dr Patrick GELE (CRB-CIC-1403-INSERM-CHU) for biological sample storage management and traceability, Mrs Eva VILAIN (CIIL, INSERM U1019) for sample processing.

Authors' contributions

- Stéphanie Lejeune: significant involvement in conceptualization, data curation, investigation, methodology, visualization and writing the manuscript (original draft and review / editing)
- Philippe Gosset, Antoine Deschildre: significant involvement in conceptualization, data curation, funding acquisition, investigation, methodology, project administration, supervision, validation, visualization and writing the manuscript (original draft and review / editing)
- Muriel Pichavant, Ilka Engelmann, Rodrigue Dessen, Olivier Le Rouzic, Clemence Mordacq, Caroline Thumerelle: significant involvement in conceptualization, data curation, investigation, validation and writing the manuscript (original draft and review / editing)
- Elodie Drumez: significant involvement in conceptualization, formal analysis, methodology, validation and writing the manuscript (original draft and review / editing)
- Laurent Béghin: significant involvement in conceptualization, data curation, investigation, project administration

- Stephanie Rogeau, Timothee Beke, Gwenola Kervoaze, Celine Delvart, Heloise Ducoin, Guillaume Pouessel, Armelle Le Mée, Sophie Boileau, Juliette Roussel, Cécile Bonnel: significant involvement in data curation and investigation.

Impact statement

The characterization of the VIRASTHMA-2 cohort of preschool asthmatic children highlights the burden of exacerbations in early asthma. Among them, those prone to exacerbation, multiple-trigger wheezers and severe intermittent wheezers, display lower levels of cytokines and anti-viral responses during exacerbation.

Figures legends

Figure 1: Flow chart of the population

T1: Time 1 (at exacerbation); T2: Time 2 (at steady state); EVW: Episodic-viral wheeze; SIW: Severe intermittent wheeze; EVW: Non-severe intermittent wheeze; MTW: Multiple-trigger wheeze.

Tables

TABLE I: Demographic and environmental data

	Total population n=147	MTW† n=92	SIW‡ n=37	EVW§ n=18	Global p-value
Demographics and anthropometrics:					
Median age (in months)	30.0 (23.0; 40.0)	30.5 (24.5; 38.0)	29.0 (21.0; 42.0)	28.5 (26.0; 38.0)	0.92
Male	86 (58.5)	53 (57.6)	21 (56.8)	12 (66.7)	0.75
Z score for BMI¶	-0.8 (-1.3; -0.1)	-0.8 (-1.4; -0.1)	-0.8 (-1.2; 0.1)	-0.6 (-1.0; -0.2)	0.63
Personal history:					
Birth weight (in g)	3300 (3020; 3650)	3200 (2980; 3590)	3430 (3130; 3700)	3453 (3200; 3780)	0.083
Mother smoke during pregnancy	32 (21.8)	21 (22.8)	7 (18.9)	4 (22.2)	0.89
Breastfeeding	88 (59.9)	54 (58.7)	23 (62.2)	11 (61.1)	0.93
Environment:					
Inner-city	119 (81.0)	73 (79.3)	30 (81.1)	16 (88.9)	0.64
Visible mold / dampness at home	33 (22.4)	23 (25.0)	6 (16.2)	4 (22.2)	0.56
Dog and/or cat ownership	61 (41.5)	40 (43.5)	18 (48.6)	3 (16.7)	0.064
Cigarette smoke exposure	73 (49.7)	53 (57.6) ^a	12 (32.4) ^a	8 (44.4)	0.032
Sibling in child care facility	55 (37.9)	33 (36.7)	15 (40.5)	7 (38.9)	0.92
Participant in child care facility	77 (52.7)	50 (54.9)	19 (51.4)	8 (44.4)	0.70
Parental employment and education:					
Father employed	127 (87.6) (<i>n</i> '=145)	75 (83.3) (<i>n</i> '=90)	34 (91.9)	18 (100.0)	0.10
Mother employed	94 (64.4) (<i>n</i> '=146)	56 (60.9) (<i>n</i> '=92)	27 (75.0) (<i>n</i> '=36)	11 (61.1)	0.31
Father completed higher education	65 (52.4) (<i>n</i> '=124)	34 (45.3) (<i>n</i> '=75)	21 (67.7) (<i>n</i> '=31)	10 (55.6)	0.11
Mother completed higher education	80 (61.1) (<i>n</i> '=131)	45 (55.6) (<i>n</i> '=81)	26 (76.5) (<i>n</i> '=34)	9 (56.3) (<i>n</i> '=16)	0.10

Values are reported as frequency (percentage) or median (interquartile range). Comparisons between the three groups (MTW, SIW and EVW) were conducted using Chi-square test for categorical variables or Kruskal-Wallis test for continuous variables. ^a identify the significant pairwise post-hoc comparisons after Bonferroni's correction.

†MTW: Multiple-trigger wheeze; ‡SIW: Severe intermittent wheeze; §EVW: non severe intermittent wheeze; ¶BMI: Body Mass Index.

TABLE II: Asthma history and associated allergic disorders

	Total population n=147	MTW† n=92	SIW‡ n=37	EVW§ n=18	Global p-value
Family atopy status:					
Atopy in one or 2 parents or sibling	109 (74.1)	69 (75.0)	27 (73.0)	13 (72.2)	0.95
Asthma in one or 2 parents or sibling	78 (53.1)	51 (55.4)	18 (48.6)	9 (50.0)	0.75
Asthma history:					
Age at first wheeze (in months)	9.0 (4.0; 25.0)	9.0 (4.5; 23.5)	10.0 (6.0; 27.0)	8.0 (4.0; 25.0)	0.51
Number of exacerbations in the previous 12 months	2.0 (1.0; 4.0)	3.0 (1.0; 4.5) ^b	2.0 (1.0; 4.0) ^c	0.0 (0.0 ; 0.0) ^{b,c}	<0.001
≥ 2 courses of oral steroids in the previous 12 months	103 (70.1)	66 (71.7) ^{a,b}	37 (100.0) ^{a,c}	0 (0.0) ^{b,c}	<0.001
Asthma day-to-day control before inclusion (GINA¶):					
Well-controlled	75 (51.0)	20 (21.7)	37 (100.0)	18 (100.0)	NA†††
Partly controlled	45 (30.6)	45 (48.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Uncontrolled	27 (18.4)	27 (29.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Controller therapy with ICS†† before inclusion					
Doses of ICS†† (µg/day fluticasone)	48 (32.7)	35 (38.0)	11 (29.7)	2 (11.1)	0.076
	200 (200.0; 200.0)	200 (200.0; 200.0)	200 (200.0; 200.0)	725.0 (200.0; 1250)	NA†††
Associated allergic disorders:					
At least one associated allergic disorder	83 (56.5)	53 (57.6)	18 (48.6)	12 (66.7)	0.42
Atopic Dermatitis	55 (37.4)	28 (30.4)	17 (45.9)	10 (55.6)	0.061
Early atopic dermatitis (< 4 months of age)	28 (19.0)	10 (10.9) ^{a,b}	11 (29.7) ^a	7 (38.9) ^b	0.003
SCORAD§§ score if current lesions	14.0 (7.8; 23.3) (n'=30)	21.5 (9.5; 29.0) (n'=14)	11.0 (7.1; 16.4) (n'=11)	15.0 (7.8; 16.0) (n'=5)	NA†††
Allergic rhino conjunctivitis	30 (20.4)	25 (27.2)	4 (10.8)	1 (5.6)	0.028
Food allergy	12 (8.2)	6 (6.5)	3 (8.1)	3 (16.7)	0.26
Atopy¶¶					
Sensitization to airborne allergens	65 (47.1) (n'=138)	39 (44.3) (n'=88)	15 (44.1) (n'=34)	11 (68.8) (n'=16)	0.18
Sensitization to food allergens	64 (46.4) (n'=138)	39 (44.3) (n'=88)	15 (44.1) (n'=34)	10 (62.5) (n'=16)	0.39
Poly-sensitization	14 (10.1) (n'=138)	8 (9.1) (n'=88)	3 (8.8) (n'=34)	3 (18.8) (n'=16)	0.53
Serum total IgE levels (kuia/l)	32 (23.2) (n'=138)	18 (20.5) (n'=88)	8 (23.5) (n'=34)	6 (37.5) (n'=16)	0.33
	54.0 (13.9; 179.0) (n'=125)	64.2 (14.2; 172.0) (n'=78)	40.2 (13.5; 179.0) (n'=31)	68.5 (14.1; 319.5) (n'=16)	0.63
Peripheral blood eosinophil counts (T2) (cells/mm³)					
	400 (200; 800) (n'=99)	400 (100; 800) (n'=60)	300 (200; 900) (n'=25)	300.0 (100.0; 700.0) (n'=14)	0.96
Peripheral blood neutrophil counts (T2) (cells/mm³)					
	2950 (2300; 3900) (n'=99)	3000 (2200; 4400) (n'=60)	2700 (2300; 3800) (n'=25)	3300 (2500; 4300) (n'=14)	0.88

Values are reported as frequency (percentage) or median (interquartile range). Comparisons between the three groups (MTW, SIW and EVW) were conducted using Chi-square test for categorical variables or Kruskal-Wallis test for continuous variables. a, b, c identify the significant pairwise post-hoc comparisons after Bonferroni's correction.

†MTW: Multiple-trigger wheeze; ‡SIW: Severe intermittent wheeze; §EVW: non severe intermittent wheeze; ¶GINA: Global Initiative for Asthma; ††ICS: Inhaled corticosteroids; §§SCORAD: Scoring Atopic Dermatitis severity score; ¶¶Atopy: at least one positive skin prick test (diameter ≥ to 3 mm) and/or specific IgE antibodies (≥ 0.35 kuia/l); NA†††: not available (n<8)

TABLE III: Analysis of cells in sputum at exacerbation (T1)

	Total population n=147	MTW† n=92	SIW‡ n=37	EVW§ n=18	Global p-value
Sputum					
Weight (mg)	195.0 (100.0; 350.0) (n'=111)	190.0 (100.0; 360.0) (n'=67)	200.0 (105.0; 425.0) (n'=28)	175.0 (95.5; 200.0) (n'=16)	0.48
Cells (n x 10 ³ /mg)	13730 (5509; 28043) (n'=108)	12174 (5421; 28000) (n'=65)	16000 (7000; 30000) (n'=27)	14688 (5409; 24566) (n'=16)	0.64
% Macrophages	32.0 (19.0; 41.5) (n'=103)	33.0 (21.0; 45.0) (n'=61)	30.0 (17.0; 41.0) (n'=27)	24.0 (18.0; 34.0) (n'=15)	0.28
% Neutrophils	54.0 (31.0; 71.5) (n'=103)	49.5 (26.0; 66.5) (n'=61)	55.0 (44.0; 72.0) (n'=27)	65.0 (37.5; 75.0) (n'=15)	0.12
% Lymphocytes	3.0 (1.5; 6.0) (n'=103)	3.0 (2.0; 6.0) (n'=61)	2.5 (1.5; 5.0) (n'=27)	3.5 (2.5; 5.0) (n'=15)	0.44
% Eosinophils	0.5 (0.0 ; 1.5) (n'=103)	0.5 (0.0 ; 1.5) (n'=61)	1.0 (0.0 ; 2.5) (n'=27)	0.5 (0.5 ; 1.5) (n'=15)	0.088
Basophils > 0%, n (%)	3 (2.9)* (n'=103)	2 (3.2) (n'=61)	1 (3.7) (n'=27)	0 (n'=15)	NA¶
% Epithelial cells	3.5 (1.0; 10.0) (n'=101)	4.5 (1.5; 12.0) (n'=59)	2.0 (1.0; 6.0) (n'=27)	3.5 (2.0; 10.0) (n'=15)	0.042

Values are reported as median (interquartile range) excepted otherwise indicated. Comparisons between the three groups (MTW, SIW and EVW) were conducted using Kruskal-Wallis test.

* Only 3 positive values were found: 0.5 (MTW), 0.5 (SIW), 1.0 (MTW).

†MTW: Multiple-trigger wheeze; ‡SIW: Severe intermittent wheeze; §EVW: non severe intermittent wheeze; ¶NA: not applicable (n<8)

TABLE IV: Inflammatory and immune profile in blood and sputum at exacerbation (T1)

	Total population n=147	MTW† n=92	SIW‡ n=37	EVW§ n=18	Global p-value
Plasma	<i>n</i> '=137	<i>n</i> '=88	<i>n</i> '=33	<i>n</i> '=16	
IFN- γ	1.3 (0.0; 47.0)	0.0 (0.0; 38.9) ^b	1.3 (0.0; 37.5)	52.5 (12.2; 169.5) ^b	0.002
IL-4	7.5 (4.9; 17.7)	6.4 (4.3; 12.2)	7.4 (5.8; 14.0)	15.1 (8.8; 29.4)	0.060
IL-5	7.7 (0.0; 26.6)	4.9 (0.0; 20.2)	10.8 (0.9; 21.7)	26.2 (9.4; 37.1)	0.020
IL-13	4.7 (1.3; 9.1)	4.5 (0.1; 8.7)	4.7 (1.5; 9.0)	6.6 (3.9; 13.7)	0.084
IL-33	1.9 (0.0; 22.9)	1.3 (0.0; 21.4)	3.5 (0.0; 13.5)	9.0 (0.3; 56.7)	0.21
TSLP	14.1 (6.0; 29.9)	13.9 (6.0; 34.0)	15.1 (8.9; 25.6)	14.6 (1.0; 40.9)	0.88
IL-17	3.7 (1.0; 15.2)	2.9 (0.2; 12.9)	4.0 (1.2; 14.1)	11.1 (2.2; 23.4)	0.090
IL-22	25.1 (9.3; 75.8)	24.5 (4.6; 62.0)	20.1 (8.9; 75.8)	37.0 (16.8; 104.7)	0.41
TNF- α	7.5 (3.3; 15.2)	6.7 (3.0; 13.7)	9.0 (3.3; 17.4)	13.3 (8.5; 19.6)	0.038
IL-6	7.7 (0.0; 19.5)	5.3 (0.0; 19.5)	9.3 (0.0; 16.5)	14.7 (6.3; 29.4)	0.087
CXCL8	5.7 (1.5; 11.5)	5.3 (0.2; 10.4)	5.9 (3.9; 10.3)	8.3 (3.8; 18.8)	0.16
IL-10	0.0 (0.0; 1.0)	0.0 (0.0; 0.9) ^b	0.0 (0.0; 0.4) ^c	1.3 (0.2; 4.1) ^{b, c}	0.002
IFN- β	0.0 (0.0; 2.7)	0.0 (0.0; 0.5)	0.0 (0.0; 2.9)	2.6 (0.0; 5.3)	0.036
IL-29	136.0 (72.4; 269.2)	136.0 (71.0; 211.7)	136.0 (71.4; 282.7)	189.4 (78.0; 332.4)	0.47
CXCL10	71.1 (11.9; 230.0)	21.8 (10.2; 194.0) ^b	89.5 (9.5; 259.6)	202.8 (123.7; 355.5) ^b	0.006
Sputum	<i>n</i> '=105	<i>n</i> =65	<i>n</i> =26	<i>n</i> =14	
IFN- γ	7.7 (0.6; 31.0)	3.0 (0.0; 28.0)	10.2 (1.3; 24.9)	21.6 (12.2; 37.5)	0.047
IL-4	7.5 (3.7; 30.2)	2.5 (0.0; 8.7)	3.2 (1.1; 8.3)	3.5 (2.2; 8.3)	0.72
IL-5	11.4 (4.4; 21.9)	11.4 (3.7; 21.8)	15.6 (7.4; 26.6)	10.8 (5.3; 23.9)	0.60
IL-13	4.1 (2.8; 6.9)	3.4 (1.4; 5.7)	4.6 (3.5; 7.9)	3.9 (3.3; 6.2)	0.12
IL-33	4.2 (0.0; 17.6)	4.3 (0.0; 17.6)	4.1 (0.0; 17.6)	0.7 (0.0; 17.7)	0.99
TSLP	11.6 (6.1; 18.1)	12.0 (6.6; 18.1)	9.0 (6.0; 20.4)	6.1 (4.3; 15.6)	0.35
IL-17	2.7 (0.2; 8.3)	5.4 (3.3; 32.8)	8.1 (5.1; 18.4)	13.8 (8.8; 26.9)	0.27
IL-22	69.3 (38.3; 137.4)	64.2 (36.9; 137.7)	88.0 (38.3; 176.7)	65.6 (42.1; 99.8)	0.79
TNF- α	13.3 (7.2; 24.8)	13.7 (6.1; 25.0)	13.5 (7.2; 30.5)	10.8 (7.2; 18.9)	0.61
IL-6	92.8 (34.7; 214.2)	104.6 (38.8; 227.8)	98.6 (24.7; 321.1)	41.3 (15.8; 164.8)	0.41
CXCL8	525.1 (395.3; 729.0)	515.7 (414.3; 680.0)	601.3 (402.4; 776.8)	515.9 (325.9; 1029)	0.85
IL-10	0.0 (0.0; 0.8)	0.0 (0.0; 0.5)	0.3 (0.0; 1.1)	0.2 (0.0; 0.8)	0.34
IFN- β	0.0 (0.0; 4.5)	0.0 (0.0; 1.4)	0.0 (0.0; 5.7)	3.5 (0.0; 5.2)	0.061
IL-29	95.7 (46.7; 174.9)	95.7 (44.9; 179.9)	91.6 (46.7; 236.2)	102.8 (72.4; 136.0)	0.81
CXCL10	820.0 (293.7; 2657)	816.4 (293.7; 2312)	627.0 (188.7; 2789)	1815 (722.2; 2810)	0.25

All concentrations were measured by multiplex assays (Luminex®, ThermoFisher Scientific) and expressed in pg/ml.

Values are reported as median (interquartile range). Comparisons between the three groups (MTW, SIW and EVW) were conducted using Kruskal-Wallis test. a, b, c identify the significant pairwise post-hoc comparisons after Bonferroni's correction. †MTW: Multiple-trigger wheeze; ‡SIW: Severe intermittent wheeze; §EVW: Non-severe intermittent wheeze; IFN: Interferon; IL: Interleukin; TSLP: Thymic stromal lymphopoietin; CXCL: C-X-C motif chemokine ligand.

TABLE V: Inflammatory and immune profile in blood at steady state (T2)

	Total population n=147	MTW† n=92	SIW‡ n=37	EVW§ n=18	Global p-value
Plasma	<i>n'=116</i>	<i>n'=72</i>	<i>n'=31</i>	<i>n'=13</i>	
IFN- γ	11.4 (0.0; 35.1)	0.2 (0.0; 31.8)	11.6 (0.0; 34.3)	34.3 (11.6; 176.5)	0.045
IL-4	8.5 (4.5; 12.6)	8.2 (4.9; 12.6)	7.9 (2.3; 11.4)	8.8 (3.7; 52.6)	0.40
IL-5	9.1 (1.8; 20.6)	10.8 (2.6; 18.1)	7.4 (1.4; 19.3)	19.0 (5.1; 42.1)	0.35
IL-13	4.1 (1.3; 6.9)	3.7 (0.7; 6.6)	4.1 (1.7; 6.9)	5.8 (3.6; 15.2)	0.14
IL-33	2.5 (0.0; 22.9)	2.2 (0.0; 18.7)	2.5 (0.0; 22.9)	7.7 (0.0; 43.2)	0.48
TSLP	15.5 (6.8; 31.7)	17.9 (5.6; 28.6)	15.1 (7.7; 35.4)	15.7 (7.7; 47.8)	0.83
IL-17	4.0 (1.5; 14.1)	3.9 (1.1; 12.8)	4.8 (2.2; 11.8)	10.7 (1.9; 23.6)	0.41
IL-22	25.2 (9.3; 86.1)	25.2 (8.2; 98.0)	23.7 (9.7; 62.5)	45.8 (17.1; 64.1)	0.81
TNF- α	8.1 (3.7; 15.3)	8.1 (3.3; 16.0)	7.2 (4.3; 12.9)	11.1 (7.4; 15.7)	0.37
IL-6	7.5 (0.0; 14.0)	7.3 (0.0; 13.6)	7.3 (0.0; 11.8)	14.0 (2.6; 25.2)	0.23
CXCL8	3.8 (1.2; 8.7)	3.81 (0.02; 9.36)	3.57 (1.11; 5.72)	5.33 (2.43; 13.05)	0.51
IL-10	0.0 (0.0; 0.7)	0.0 (0.0; 0.6)	0.0 (0.0; 0.5)	0.0 (0.0; 2.5)	0.45
IFN- β	0.0 (0.0; 2.9)	0.0 (0.0; 2.4)	0.0 (0.0; 2.9)	0.0 (0.0; 4.7)	0.34
IL-29	116.7 (64.7; 296.4)	126.3 (64.7; 305.5)	102.0 (54.1; 184.9)	170.8 (74.7; 341.6)	0.64
CXCL10	83.0 (10.1; 202)	14.5 (7.5; 182.7)	140.5 (12.8; 259.6)	200.1 (90.8; 266.2)	0.013

All concentrations were measured by multiplex assays (Luminex®, ThermoFisher Scientific) and expressed in pg/ml.

Values are reported as median (interquartile range). Comparisons between the three groups (MTW, SIW and EVW) were conducted using Kruskal-Wallis test. a, b, c identify the significant pairwise post-hoc comparisons after Bonferroni's correction.

†MTW: Multiple-trigger wheeze; ‡SIW: Severe intermittent wheeze; §EVW: Non-severe intermittent wheeze;
IFN: Interferon; IL: Interleukin; TSLP: Thymic stromal lymphopoietin; CXCL: C-X-C motif chemokine ligand.

References

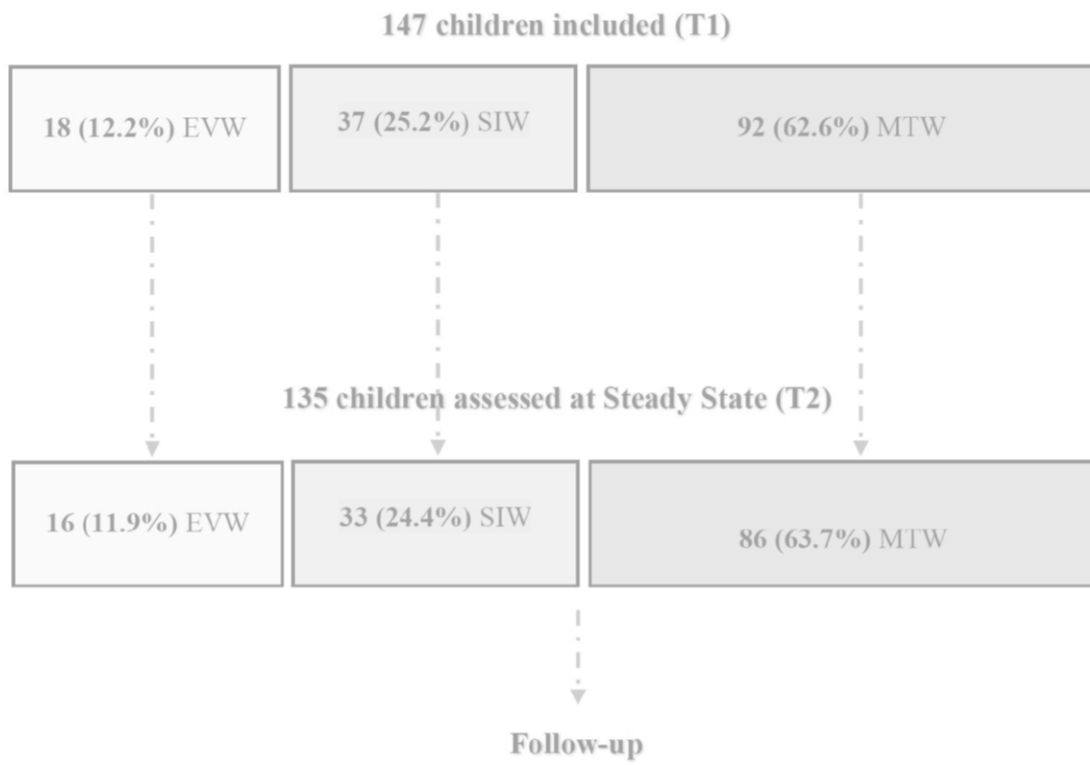
1. GINA_Report_2015_Aug11-1.pdf. https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2016/01/GINA_Report_2015_Aug11-1.pdf (accessed 11 Feb2020).
2. Saglani S, Fleming L, Sonnappa S et al. Advances in the aetiology, management, and prevention of acute asthma attacks in children. *Lancet Child Adolesc Health* 2019; **3**:354–364.
3. Brand PLP, Baraldi E, Bisgaard H et al. Definition, assessment and treatment of wheezing disorders in preschool children: an evidence-based approach. *Eur Respir J* 2008; **32**:1096–1110.
4. Bacharier LB, Phillips BR, Bloomberg GR et al. Severe intermittent wheezing in preschool children: a distinct phenotype. *J Allergy Clin Immunol* 2007; **119**:604–610.
5. Bloom CI, Nissen F, Douglas IJ et al. Exacerbation risk and characterisation of the UK's asthma population from infants to old age. *Thorax* 2018; **73**:313–320.
6. Bush A. Cytokines and Chemokines as Biomarkers of Future Asthma. *Front Pediatr* 2019; **7**:72.
7. Deschildre A, Pichavant M, Engelmann I et al. Virus-triggered exacerbation in allergic asthmatic children: neutrophilic airway inflammation and alteration of virus sensors characterize a subgroup of patients. *Respir Res* 2017; **18**:191.
8. Bergauer A, Söpel N, Kroß B et al. IFN- α /IFN- λ responses to respiratory viruses in paediatric asthma. *Eur Respir J* 2017; **49**. doi:10.1183/13993003.00969-2016
9. [asthme_de_lenfant_de_moins_de_36_mois_-_serie_de_criteres_de_qualite.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2010-03/asthme_de_lenfant_de_moins_de_36_mois_-_serie_de_criteres_de_qualite.pdf). https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2010-03/asthme_de_lenfant_de_moins_de_36_mois_-_serie_de_criteres_de_qualite.pdf (accessed 11 Feb2020).

10. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatol Basel Switz* 1993; **186**:23–31.
11. Brożek JL, Bousquet J, Agache I et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines-2016 revision. *J Allergy Clin Immunol* 2017; **140**:950–958.
12. Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K et al. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy* 2014; **69**:1008–1025.
13. Chalut DS, Ducharme FM, Davis GM. The Preschool Respiratory Assessment Measure (PRAM): a responsive index of acute asthma severity. *J Pediatr* 2000; **137**:762–768.
14. Mussaffi H, Fireman EM, Mei-Zahav M et al. Induced sputum in the very young: a new key to infection and inflammation. *Chest* 2008; **133**:176–182.
15. Jackson DJ, Makrinioti H, Rana BMJ et al. IL-33-dependent type 2 inflammation during rhinovirus-induced asthma exacerbations in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; **190**:1373–1382.
16. Fleming L, Murray C, Bansal AT et al. The burden of severe asthma in childhood and adolescence: results from the paediatric U-BIOPRED cohorts. *Eur Respir J* 2015; **46**:1322–1333.
17. Papadopoulos NG, Čustović A, Cabana MD et al. Pediatric asthma: An unmet need for more effective, focused treatments. *Pediatr Allergy Immunol Off Publ Eur Soc Pediatr Allergy Immunol* 2019; **30**:7–16.
18. Gabet S, Just J, Couderc R et al. Early polysensitization is associated with allergic multimorbidity in PARIS birth cohort infants. *Pediatr Allergy Immunol Off Publ Eur Soc Pediatr Allergy Immunol* 2016; **27**:831–837.
19. Hose AJ, Depner M, Illi S et al. Latent class analysis reveals clinically relevant atopy phenotypes in 2 birth cohorts. *J Allergy Clin Immunol* 2017; **139**:1935-1945.e12.

20. Wang Z, May SM, Charoenlap S et al. Effects of secondhand smoke exposure on asthma morbidity and health care utilization in children: a systematic review and meta-analysis. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol* 2015; **115**:396-401.e2.
21. Karvonen AM, Hyvärinen A, Korppi M et al. Moisture damage and asthma: a birth cohort study. *Pediatrics* 2015; **135**:e598-606.
22. Rancièrè F, Bougas N, Viola M et al. Early Exposure to Traffic-Related Air Pollution, Respiratory Symptoms at 4 Years of Age, and Potential Effect Modification by Parental Allergy, Stressful Family Events, and Sex: A Prospective Follow-up Study of the PARIS Birth Cohort. *Environ Health Perspect* 2017; **125**:737–745.
23. Engelmann I, Mordacq C, Gosset P et al. Rhinovirus and asthma: reinfection, not persistence. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; **188**:1165–1167.
24. Principi N, Zampiero A, Gambino M et al. Prospective evaluation of rhinovirus infection in healthy young children. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 2015; **66**:83–89.
25. Barbato A, Turato G, Baraldo S et al. Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; **174**:975–981.
26. Robinson PFM, Pattaroni C, Cook J et al. Lower airway microbiota associates with inflammatory phenotype in severe preschool wheeze. *J Allergy Clin Immunol* 2019; **143**:1607-1610.e3.
27. Wark PAB, Johnston SL, Bucchieri F et al. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J Exp Med* 2005; **201**:937–947.
28. Sykes A, Edwards MR, Macintyre J et al. Rhinovirus 16-induced IFN- α and IFN- β are deficient in bronchoalveolar lavage cells in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2012; **129**:1506-1514.e6.

29. Fitzpatrick AM, Higgins M, Holguin F et al. The molecular phenotype of severe asthma in children. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **125**:851-857.e18.
30. Denlinger LC, Heymann P, Lutter R et al. Exacerbation-Prone Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2020; **8**:474–482.
31. Brand PLP, Caudri D, Eber E et al. Classification and pharmacological treatment of preschool wheezing: changes since 2008. *Eur Respir J* 2014; **43**:1172–1177.

Figure 1: Flow chart of the population



1 **Severe preschool asthmatics have altered cytokine and anti-viral responses during**
2 **exacerbation – Supporting information**

3 **Appendix S1**

4 **1. Study population**

5 We initiated a multicenter, prospective, observational cohort study in eight pediatric hospital
6 centers in the Hauts-de-France region, France, between 2015 and 2018. We enrolled preschool
7 children aged 1 to 5 years, with a medical diagnosis of asthma, according to the
8 recommendations, i-e with at least 3 episodes of wheezing since birth or with symptoms of
9 asthma between episodes (1,9), during hospitalization for a severe exacerbation (requiring a
10 course of general steroids). Inclusions and sampling were performed within 48 hours after
11 admission and initiation of general corticosteroids. Non-inclusion criteria were: children with
12 a history of chronic disease other than asthma, a history of preterm birth (< 36 weeks of
13 amenorrhea).

14 The study was approved by the ethics committee (CPP Nord-Ouest IV) and registered at
15 ClinicalTrial.gov (NCT: 03960359). Written informed consent was obtained from
16 parents/caregivers.

17

18 **Study design**

19 The study design of the VIRASTHMA-2 study is shown in Suppl Table 1. Patients' data were
20 collected at exacerbation (T1) and at steady state at least 8 weeks after the exacerbation (T2).
21 Blood samples to study immune profiling and virus identification were performed at both T1
22 and T2. Sputum samples were only collected at T1 to assess immune profiling and bacterial
23 identification. Patients will then be followed up until the age of 7. A sub-population of patients
24 in Lille University Hospital Center will be followed-up until the age of 17, with an intermediate
25 assessment at 12.

26

27 **2. Definitions**

28 **3.1. Phenotypes**

29 Three groups of children were defined, according to previous recommendations: Episodic-
30 Viral Wheeze (EVW): wheezing during discrete time periods (exacerbations), ≤ 1 severe
31 exacerbation over the last 12 months, absence of symptoms between exacerbations; Severe
32 Intermittent Wheeze (SIW): ≥ 2 severe exacerbations over the last 12 months; and Multiple-
33 trigger wheeze (MTW): wheezing during exacerbations but also symptoms (cough, exercise-
34 induced symptoms,...) between these periods (3,4). Phenotype was defined after 2 months of
35 follow-up, at T2 and reviewed with the principal investigator of the study, based on parental
36 report of symptoms after the parents / caregivers had received education on chronic symptoms.
37 Phenotype was then applied retrospectively at T1. If the child was lost to follow-up and not
38 assessed at T2, phenotype was defined according to parental reports of symptoms at T1.

39

40 **3.2. History and anamnestic data**

41 At T1, history and anamnestic data included: demographics and anthropometrics, environment,
42 family history, associated disorders, features of the exacerbation.

43 - Anthropometry:

44 Body mass index (BMI) Z-score were generated using French growth data by Rolland-Cachera.

45 - Environment:

46 Questionnaires were performed to assess inborn and outborn exposure, based on the declaration
47 of the parents: cigarette smoke exposure (CSE), visible mold/moisture exposure, pet
48 ownership, urban living.

49 - Associated atopic disorders:

50 History of atopic dermatitis (AD) was noted. In case of current AD, its severity was assessed
51 with SCORAD: Scoring Atopic Dermatitis severity score (10). Allergic rhinoconjunctivitis
52 (AR) was retained in case of one or more chronic symptoms including sneezing, itching, nasal
53 congestion and rhinorrhea (11). Food allergy (FA) was retained if a patient presented with
54 history of clinical manifestations of immediate hypersensitivity (skin, respiratory, circulatory
55 or digestive) following ingestion of food(12).

56

57 **3.3. Asthma history and control**

58 Past history of asthma exacerbations and age at first wheeze were recorded. We assessed:
59 current asthma medication, including inhaled corticosteroids (ICS) in $\mu\text{g}/\text{day}$ fluticasone or
60 equivalent, presence of chronic symptoms, number of severe exacerbations in the past 12
61 months (requiring a course ≥ 3 days of systemic steroids), day-to-day asthma control based on
62 symptoms (breath, cough, breathlessness, impact on activity and social behavior) and classified
63 according to the GINA (Global Initiative for Asthma) criteria: well-controlled, partly
64 controlled, uncontrolled (1). Features of the exacerbation were noted, including severity,
65 assessed using the PRAM (Preschool Respiratory Assessment Measure) score at admission in
66 the emergency room (before treatment), to distinguish mild asthma (score of 0-3), moderate
67 asthma (score of 4-7) or severe asthma (score of 8-12) (13). Length of stay and oxygen need
68 were also recorded (in days).

69 **3.4. Atopy**

70 For each patient, full allergy diagnosis work-up was performed at T2: skin prick tests (SPT)
71 with a panel of airborne allergens (house dust mite, cat and dog dander, birch and grass pollens,
72 *Alternaria*, other allergen depending on the environment, *ALK Abello*) and food allergens
73 (cow's milk, egg, other allergens in cases of suspicion of FA, *ALK Abello*), allergen specific
74 IgE antibodies in blood. Atopy was diagnosed if at least one SPT result was positive (diameter

75 ≥ 3 mm) and/or at least one specific IgE was positive (≥ 0.35 kUA/l). Serum total IgE levels
76 (kU/l), peripheral blood eosinophil counts (cells/mm³), measured at T2, were also recorded.
77 In a sub-population of patients (in Lille University Hospital center) ImmunoCAP™ ISAC
78 (ThermoFischer Scientific) were also performed (data not shown).

79

80 **3. Blood and sputum collection for immune profiling**

81 Sputum and blood samples were collected within the first 2 days of exacerbation. Spontaneous
82 or induced sputum samples (after nebulization of isotonic saline solution) were collected
83 during a physiotherapy session. Biological samples were quickly routed to the laboratory and
84 processed within 4 hours. After processing (as follows), all resulting samples (plasma, RNAs,
85 cultures supernatants) were stored and frozen at -80°C for later use.

86 Plasma processing:

87 Plasma from blood samples were used to measure cytokine concentrations. Peripheral Blood
88 mononuclear cells (PBMC) were also extracted and isolated using a Ficoll-Paque density
89 gradient (7). After washings and resuspension, cells were used for cell cultures (24 hours),
90 immediate phenotypic characterization by flow cytometry and RNA extractions (data not
91 shown).

92 Sputum processing:

93 Spontaneous or induced sputum samples (after nebulization of isotonic saline serum) were
94 collected during a physiotherapy session (14). Plugs were isolated from the sputum, weighted
95 and processed. They were diluted with sputolysin (VWR) and then, sputum fluids and cells
96 were separated by centrifugation. The cell pellets were used for differential cell counts
97 analyzed on cytopins, phenotypic characterization by flow cytometry and RNA extractions
98 (data not shown) and the supernatants for cytokine measurements.

99 Cytokine measurements:

100 All concentrations were measured by customized multiplex assays (Luminex®, ThermoFisher
101 Scientific) in plasma and supernatants and expressed in pg/ml. Cytokines known as being
102 involved in the immune reaction in acute asthma and in the anti-viral response were selected,
103 based on previous relevant studies in our laboratory and in the literature (7,8,15). Levels of
104 Th1 cytokines [IFN- γ], Th2 cytokines [IL-4, IL-5, IL-13], alarmins [IL-33, TSLP], Th17
105 cytokines [IL-17, IL-22], pro-inflammatory cytokines [IL-1 β , Tumor necrosis factor (TNF)- α ,
106 IL-6, C-X-C motif chemokine ligand (CXCL8)], anti-inflammatory cytokines [IL-10], anti-
107 viral response including type I interferons [IFN- β], type III interferons [IL-29], and Interferon-
108 stimulated genes [CXCL10], chemokines (CCL5, CCL20) in plasma, sputum fluids and
109 supernatants from cultures of PBMC were assessed. Levels of IL-1 β , CCL5, CCL20 in plasma
110 and sputum fluids as well as levels of all cytokines in supernatants from cultures of PBMC are
111 not shown.

112

113 **4.2 Virus identification**

114 Nasal swab secretions were performed for each patient at T1 and at T2 using a flocced swab
115 and specialized culture medium (Labelians, UTM1MLN™).

116 Samples were frozen (-80 °C) before RNA extraction. As previously described, nucleic acids
117 were extracted from 200 μ L of each specimen using the Magtration System 12GC with the
118 MagDEA® Viral DNA/RNA 200 (GC) kit (Precision System Science Co., Ltd.; Japan) (7).
119 Commercially available multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)
120 assays were used to screen for a panel of respiratory viral pathogens including influenza virus
121 A and B, respiratory syncytial virus (RSV) A and B, human adenovirus (HAdV), human
122 metapneumovirus, coronaviruses 229E, NL63 and OC43, parainfluenzavirus 1-4, rhinovirus
123 (RV) A/B/C, human enterovirus, and bocavirus 1-4. From the beginning of the study to

124 February 8th, 2016 the Anyplex II RV16 Detection Kit (Seegene, Seoul, Korea) was used.

125 Thereafter, Allplex Respiratory Panel 1, 2 and 3 (Seegene, Seoul, Korea) was used.

126

127 **4. Data analysis**

128 Categorical variables were reported as numbers (percentages) and continuous variables as

129 median [interquartile range (IQR)]. Normality was assessed graphically and using the Shapiro-

130 Wilk test. Comparisons between the three groups (MTW, SIW and NSIW) were conducted

131 using Chi-square for categorical variables or Kruskal-Wallis test for continuous variables.

132 Post-hoc pairwise comparisons were performed using the Chi-square test for categorical

133 variables or the Dunn test for continuous variables, applying the Bonferroni correction to adjust

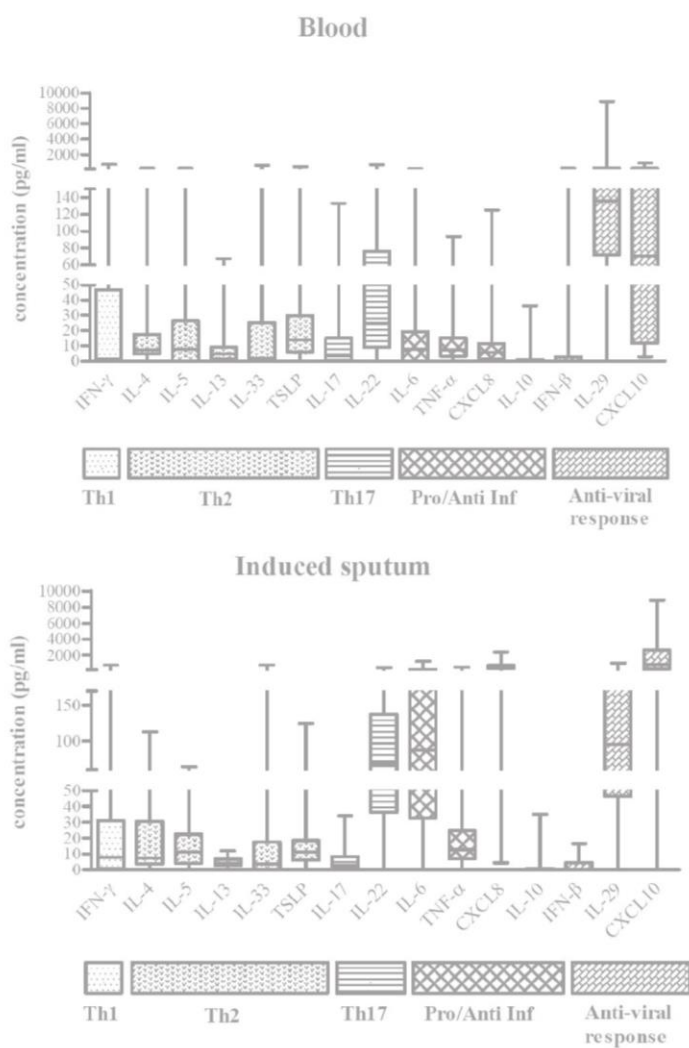
134 for multiple comparisons. All statistical tests were performed at the two-tailed α level of 0.05

135 using SAS software, release 9.4 (SAS Institute, Cary, NC).

136

137

138 **Supplemental Figure 1:**
 139 **Levels of Th1 cytokines, Th2 cytokines and alarmins, Th17 cytokines, pro- and anti-**
 140 **inflammatory cytokines, anti-viral response in plasma (upper panel, n=137) and sputum**
 141 **fluids (lower panel, n=105) at exacerbation.**
 142
 143 IFN: Interferon; IL: Interleukine; TNF- α : Tumor necrosis factor alpha; Thymic stromal lymphopoietin; CXCL:
 144 C-X-C motif chemokine ligand; Pro / anti inf: pro and anti-inflammatory cytokines.
 145 *All concentrations were measured by multiplex assays (Luminex®, ThermoFisher Scientific) and expressed in*
 146 *pg/ml*
 147



Supp TABLE 1: Study design – VIRASTHMA-2

Exacerbation (T1): Hospitalisation	8 weeks later (T2): Steady state
<ul style="list-style-type: none"> - Past history - Environmental exposure - Asthma history, medication and control (GINA[†]) - Anthropometry - Clinical features of exacerbation - Blood sample: <ul style="list-style-type: none"> > Immune profiling (levels of cytokines in plasma, preparation of PBMCs[‡] for flow cytometry, culture, RNA) - Induced sputum: <ul style="list-style-type: none"> > Immune profiling (levels of cytokines in supernatants, preparation of cells for flow cytometry, RNA) > Bacterial identification (culture) - Nasal swab sample: <ul style="list-style-type: none"> > Virus identification (RT-PCR§) 	<ul style="list-style-type: none"> - Recent medical history - Asthma medication and control (GINA) - Anthropometry - Definition of phenotype: <ul style="list-style-type: none"> > Episodic-Viral Wheeze (EVW¶) > Severe Intermittent Wheeze (SIW^{††}) > Multiple-Trigger Wheeze (MTW^{‡‡}) - Full allergy diagnosis work-up: <ul style="list-style-type: none"> > SPT§§ with a panel of airborne and food allergens > Allergen specific IgE antibodies in blood > Serum total IgE level (KUII) > Peripheral blood eosinophil counts (cells/mm³) > ImmunoCAP[™] ISAC (<i>sub-population</i>) - Blood sample: <ul style="list-style-type: none"> > Immune profiling (levels of cytokines in plasma, preparation of PBMCs for flow cytometry, culture, RNA) - Nasal swab sample: <ul style="list-style-type: none"> > Virus identification (RT-PCR§)

[†]GINA: global initiative for asthma; [‡]PBMCs: peripheral blood mononuclear cells; [§]RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction; [¶]EVW: episodic viral wheeze; ^{††}SIW: severe intermittent wheeze; ^{‡‡}MTW: multiple-trigger wheeze; ^{§§}SPT: skin prick tests

Supp TABLE II: Microbiological characteristics at exacerbation (T1) and at steady state (T2)

	Total population n=147	MTW [†] n=92	SIW [‡] n=37	EVW [§] n=18	Global p-value
Virus identification at T1 (PCR[¶]):					
At least one isolated virus	n=146	n=91	n=37	n=18	
RV	137 (93.8)	84 (91.3)	37 (100.0)	16 (94.1)	0.19
RSV	106 (72.6)	64 (69.6)	30 (81.1)	12 (70.6)	0.41
Bocavirus	11 (7.5)	7 (7.6)	2 (5.4)	2 (11.8)	0.72
Enterovirus	20 (13.7)	13 (14.1)	5 (13.5)	2 (11.8)	0.97
Adenovirus	11 (7.5)	7 (7.6)	3 (8.1)	1 (5.9)	1.00
Influenza virus A or B	12 (8.2)	7 (7.6)	5 (13.5)	0 (0.0)	0.25
Coronavirus	2 (1.4)	2 (2.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	NA ^{**}
Another virus	3 (2.1)	1 (1.1)	2 (5.4)	0 (0.0)	NA ^{**}
	11 (7.5)	6 (6.5)	4 (10.8)	1 (5.9)	0.80
Virus identification at T2 (PCR[¶]):					
At least one isolated virus	n=127	n=80	n=33	n=14	
RV ^{††}	85 (66.9)	52 (65.0)	23 (69.7)	10 (71.4)	0.83
RSV ^{†††}	63 (49.6)	37 (46.3)	18 (54.5)	8 (57.1)	0.61
Bocavirus	6 (4.7)	3 (3.8)	1 (3.0)	2 (14.3)	NA
Enterovirus	15 (11.8)	9 (11.3)	3 (9.1)	3 (21.4)	0.54
Adenovirus	9 (7.1)	5 (6.3)	3 (9.1)	1 (7.1)	0.87
Influenza virus A or B	14 (11.0)	9 (11.3)	2 (6.1)	3 (21.4)	0.27
Coronavirus	2 (1.6)	2 (2.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	NA ^{**}
Another virus	12 (9.4)	7 (8.8)	3 (9.1)	2 (14.3)	0.73
	20 (15.8)	13 (16.3)	5 (15.2)	2 (14.3)	0.98

Values are reported as frequency (percentage). Comparisons between the three groups (MTW, SIW and EVW) were conducted using Chi-square test.
[†]MTW: Multiple-trigger wheeze; [‡]SIW: Severe intermittent wheeze; [§]EVW: non severe intermittent wheeze; [¶]PCR: Polymerase Chain Reaction; ^{††}RV: Rhinovirus; ^{†††}RSV: Respiratory Syncytial Virus; ^{**}NA: not available (n<8).

III. Relation entre les paramètres immunologiques au moment d'une exacerbation sévère chez des enfants suivis pour un asthme allergique et les paramètres de contrôle de l'asthme à un an d'évolution

Chez 72 enfants d'âge scolaire avec un asthme allergique (VIRASTHMA 1), inclus entre 2008 et 2012, nous avons précédemment rapporté des altérations de la réponse antivirale au cours d'une exacerbation sévère, le plus souvent viro-induite (62%) (211,234). Cette réponse défectueuse était plus prononcée dans un groupe de patients avec une inflammation neutrophilique et sujets à une réinfection virale à l'état stable.

Au cours de ma thèse d'université, j'ai participé à l'analyse des données d'évolution de la cohorte. L'objectif de cette étude, menée pendant ma thèse d'université, publiée en tant que lettre de recherche dans la revue *Clinical and Experimental Allergy*, était d'explorer la relation entre la réponse inflammatoire et antivirale au moment de l'inclusion et le contrôle de l'asthme au cours de l'année qui a suivie.

A 1 an de suivi, 40 patients (65%) ont été classés comme "bons répondeurs" ou "répondeurs partiels" : ≤ 1 exacerbation sévère, contrôle partiel / total (GINA), et 22 patients (35%) comme "mauvais répondeurs" : ≥ 2 exacerbations sévères et/ou asthme non contrôlé.

Lors de l'exacerbation, la présence de virus était moins fréquemment détectée chez les mauvais répondeurs [10 (45%) contre 30 (75%) ; $p=0,020$], les compositions cellulaires dans les expectorations, en particulier le nombre d'éosinophiles, n'étaient pas significativement différentes entre les deux groupes. Les taux sanguins et dans l'expectoration induite d'IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-22, IL-29, IFN- γ , IFN- β et CCL5 n'étaient pas différents entre les mauvais répondeurs et les autres. À l'état stable, des valeurs plus faibles de VEMS pré- $\beta 2$, VEMS / CVF pré et post- $\beta 2$ ont été notés chez les mauvais répondeurs. Le pourcentage d'éosinophiles dans les expectorations et la présence de virus n'étaient pas différents entre les groupes, mais les taux sanguins d'IL-22 étaient plus élevés chez les mauvais répondeurs.

En conclusion, nous n'avons pas observé de relation entre le profil cytokinique dans le sang et les expectorations au moment de l'exacerbation et le risque de mauvais contrôle de

l'asthme et / ou d'exacerbations dans l'année suivante. Nous avons observé des taux plus élevés d'IL-22 à l'état stable chez les mauvais répondeurs, ce qui pourrait refléter un degré plus élevé de remodelage des voies respiratoires.

Lejeune S, Mordacq C, Drumez E, et al. Relationship between immune parameters during a severe exacerbation in allergic asthmatic children and asthma outcomes in the following year. Clin Exp Allergy. 2020 Mar;50(3):406-411. doi: 10.1111/cea.13570. Epub 2020 Feb 3. PMID: 31955476.

Version finale, non formatée par éditeur, ci-dessous :

Relationship between immune parameters during a severe exacerbation in allergic asthmatic children and asthma outcomes in the following year.

Stéphanie Lejeune (MD)^{1,2}, Clémence Mordacq (MD)^{1,2}, Elodie Drumez (Bst)³, Sarah Brisset (MD)¹, Guillaume Pouessel (MD)^{1,4}, Muriel Pichavant (PhD)², Ilka Engelmann (MD)⁵, Laurent Béghin (PhD)⁶, Irina Decleyre-Badiu (MD)^{1,7}, Véronique Neve (MD)⁷, Philippe Gosset (PharmD, PhD)², Antoine Deschildre (MD)^{1,2}.

¹Univ. Lille, CHU Lille, Paediatric Pulmonology and Allergy Department. Hôpital Jeanne de Flandre, 59037 Lille cedex, France.

²Lung infection and innate immunity, Center for infection and immunity of Lille, INSERM Unit 1019, CNRS UMR 8204, Institut Pasteur de Lille, Univ. Lille, 59019 Lille cedex, France.

³Univ. Lille, CHU Lille, EA 2694 - Santé publique: épidémiologie et qualité des soins, Department of Biostatistics, F-59000 Lille, France.

⁴Pediatric departement, CH Roubaix V. Provo, 59056 Roubaix cedex, France.

⁵Univ. Lille, CHU Lille, Virology laboratory, EA3610, Institute of Microbiology, 59037 Lille cedex, France.

⁶Univ. Lille, CHU Lille, LIRIC UMR 995 Inserm, Clinical Investigation Center, CIC-1403-Inserm-CHU, F-59000 Lille, France.

⁷Univ. Lille, CHU Lille, Pulmonary Function Testing Department, CHU Lille, F59000 Lille, France

Corresponding author: antoine.deschildre@chru-lille.fr

Acknowledgements

The authors would like to thank the patients and their families who participated in the study, all the nurses, chest physiotherapists, laboratory technicians and doctors who participated in the enrollment, sampling, and follow-up of patients, in particular Dr Patrick GELE (CRB-CIC-1403-INSERM-CHU) for biological sample storage management and traceability, Mrs. Eva VILAIN and Gwenola KERVOAZE (CIIL, INSERM U1019) for their excellent technical assistance. We also thank Hélène Bauderlique for her help and advice on flow cytometry (BICel Cytometry Platform, Institut Pasteur de Lille, France).

Conflict of interest statement

All authors state have no conflict of interest directly related to this work.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

Funding statement

The VIRASTHMA research program was supported by the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais, the Société Française d'Allergologie, and the Comité National contre les Maladies Respiratoires. Lille University Hospital was the regulatory trial sponsor (2007/0725).

Key words: asthma, innate immunity, virus, exacerbation, outcomes

Word count: 1,667

Number of tables: 2

Abbreviations

RV: Rhinovirus

IFN: Interferon

PRR: Pattern recognition receptors

PBMC: Peripheral blood mononuclear cell

GINA: Global Initiative for Asthma

ACT: Asthma control test

ERS: European Respiratory Society

ATS: American Thoracic Society

RT-PCR: Reverse transcription–polymerase chain reaction

IL: Interleukin

CCL: C-C motif chemokine ligand

TLR3: Toll-like receptor 3

MDA5: Melanoma Differentiation-Associated protein 5

RIG-I: Retinoic acid-inducible gene I

DC: Dendritic cell

IQR: Interquartile range

FEV1: Forced Expiratory Volume in the first second

FVC: Forced Vital Capacity

BAL: Bronchoalveolar lavage

ICS: inhaled corticosteroids

LABA: Long-acting Beta Agonists

MFI: Mean fluorescence intensity

To the Editor,

Despite improvement in asthma maintenance treatment, exacerbations remain important issues. They are markers of severe asthma but can also occur in mild asthma (1). Viruses, and mainly Rhinoviruses (RVs), are the main triggers and they may interact with immunoinflammatory pathways related to responses to aeroallergens in atopic patients (2,3). Some studies have suggested that these episodes could be related to an alteration of innate immune defenses and particularly a defective production of type I and III interferons (IFN) (4). Most of them were *ex-vivo* studies, consisting of the inoculation of different viral strains on cultures of bronchial epithelial cells extracted and cultured from various asthma patients, with various ranges of ages, disease severity and atopy background (5,6). In 72 school-aged children with allergic asthma, we previously reported an impaired anti-viral response during severe exacerbation, mostly triggered by a virus (62%), analyzing levels of cytokines in supernatants from sputum and plasmas and pattern recognition receptors (PRR) expression/function on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (7). This defective response was more pronounced in a subgroup of patients prone to viral re-infection at steady state. These preliminary findings need to be confirmed by other studies assessing the global immune response to viruses and further determining the characteristics and age ranges of patients who may have an impaired response (8). Long term consequences are also to be determined and to our knowledge, no study has assessed yet the relationship between inflammatory and antiviral response during severe exacerbations and future asthma outcomes.

The aim of this study was to explore this relationship in the first year following severe exacerbation in our previously cited cohort of school-aged children (7). We also compared asthma characteristics recorded at baseline and asthma outcomes at one year.

Full description of the population, methods and immune parameters has been previously published (2, 7). Briefly, school-aged (6-16 years) children with atopic asthma were included

during severe exacerbation (exacerbation), defined by the need for hospitalization and a course of systemic corticosteroids (prednisolone, methylprednisolone), then assessed 8 weeks later (steady state: absence of ongoing exacerbation and course of general steroids) and every 4 to 6 months, including a visit at one year (one year), according to the guidelines. Following the exacerbation, maintenance treatment was prescribed or adjusted according to the guidelines. Adherence and inhaler technique were assessed at each visit. Control was rated and classified into the following categories: well-controlled, partly-controlled or uncontrolled, according to the Global Initiative for Asthma (GINA) guidelines and Asthma control tests (ACTs) / pediatric ACTs (< 12 years) (well controlled asthma if score ≥ 20) (8). During follow-up, severe exacerbations, defined by the need for systemic corticosteroids and/or hospitalization, were recorded. Lung function tests were performed at steady state and one-year visits, according to European Respiratory Society (ERS) / American thoracic Society (ATS) recommendations. As previously described, during exacerbation (within 48 hours following the hospitalization and initiation of general corticosteroids) and at steady state, plasma samples, nasal secretions and spontaneous or induced sputum were collected (7). Virus identification was performed using a commercially available multiplex reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR). Levels of Interleukin (IL) IL-5, IL-22, C-C motif chemokine ligand (CCL) CCL5 (R&D Systems, Abingdon, UK), IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-23, IL-29 (Procartaplex, eBiosciences, San Diego, CA) and IFN- β (Elabsciences Biot., Wuhan, China) in plasma and sputum fluids were measured by ELISA. To analyze the activation and the expression of PRR: Toll-like receptor 3 (TLR3), Melanoma Differentiation-Associated protein 5 (MDA5) and Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) within blood dendritic cells (DCs) and monocytes, PBMC were incubated with isotype-matched control antibodies for lymphocytes and granulocytes, DCs and monocytes. The expression of TLR3, MDA5 and RIG-I (Santa-Cruz

Biotechnology, Dallas, TX) was estimated after intracellular indirect staining and analyzed by flow cytometry.

At one-year visit, patients were classified into three groups according to asthma outcomes: 1. Good responders: no exacerbation during follow-up and well controlled asthma according to GINA guidelines; 2. Partial responders: no more than one severe exacerbation during follow-up and/or partly controlled asthma; 3. Poor responders: ≥ 2 severe exacerbations during follow-up and/or uncontrolled asthma.

Qualitative variables were reported as the number or the percentage and continuous variables as median [interquartile range (IQR)]. Normality was assessed graphically and via the Shapiro-Wilk test. Poor responders were compared to the others (partial and good responders) by using the chi-square test or Fisher's exact test for qualitative variables and by using Mann-Whitney test for continuous variables. All statistical tests were done at the two-tailed α level of 0.05 using SAS software, release 9.4 (SAS Institute, Cary, NC).

This study was approved by the regional investigational review board (Comité de Protection des Personnes Nord Ouest, ref.: 08/07) and parental written informed consents were obtained. Full characteristics of the population are reported in table 1. Among the 72 patients [median age =8.7 years (IQR, 7.6 ; 11.4)] included at exacerbation, 62 (86%) were followed-up and assessed at one-year visit. More than one severe exacerbation was reported in 22 (36%), and more than two in 11(18%). At one-year visit, asthma was partially controlled in 27 (44%) and uncontrolled in 13 (21%), ACT scores were < 20 in 14 (23%). Omalizumab was prescribed during the initial exacerbation (inclusion) for one patient who was classified as "partial responder" at one-year visit. It was initiated in eight patients (15%) during the year of follow-up because of ≥ 2 severe exacerbations and/or uncontrolled asthma despite high doses of maintenance treatment. These patients were classified accordingly as "poor responders".

Finally, 40 patients were classified as “good responders” [16 (26%)] or “partial responders” [24, (39%)] and 22 as “poor responders” (35%) at one-year visit.

At baseline, allergic comorbidities were not significantly different between poor responders and the others. In poor responders, maintenance treatment at inclusion was more frequently recorded (64% versus 38%; $p=0.048$) and duration of initial hospitalization was significantly higher. At exacerbation, presence of virus was less frequently detected in poor responders [10 (45%) versus 30 (75%); $p=0.020$], levels of sputum cells, especially eosinophil counts, were not significantly different between the two groups. Regarding immune and inflammatory response, blood and sputum levels of IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-22, IL-29, IFN- γ , IFN- β , and CCL5 were not significantly different between poor responders and the others (table 2). Of note, IL-17A and IL-23 were undetectable in about 70% of patients. Expression of TLR3 and RIG-I on blood myeloid and plasmacytoid DCs were similar.

At steady state, lower levels of pre β_2 Forced Expiratory Volume in the first second (FEV1), lower levels of pre and post β_2 FEV1/ Forced Vital Capacity (FVC) were recorded in poor responders (table 1). Cell numbers, eosinophil percentages in sputum and presence of virus were not significantly different between the groups. Regarding inflammatory response, blood levels of IL-22 were significantly higher in poor responders (table 2). We observed no difference in other plasma and sputum parameters, including expression of PRRs on DCs.

In the present work, we reported that the occurrence of a hospitalization for a severe exacerbation in allergic asthmatic children was associated in one quarter with a subsequent poor response to maintenance treatment during the following year, highlighting the importance of such an event in asthma history. These children may display the features of a difficult, resistant to treatment asthma, conducting in 8/22 (36%) of them to omalizumab initiation. We also observed that control and lung function evaluated 8 weeks after an asthma exacerbation might be predictive of future asthma outcomes.

Poor control and history of exacerbation are known risk factors of future exacerbation (9). Fielding et al have recently confirmed the link between altered lung function and poor asthma control and risk of exacerbation (10). Thus, improving the identification of patients at risk of exacerbations, remains an urgent unmet need in childhood asthma (11).

To our knowledge, this study is the first to report on the lack of relationship between cytokine profiles in blood and sputum as well as PRR expression in blood DCs at exacerbation and asthma outcomes in the following year. There was no difference between good/partial responders to maintenance treatment and poor responders at one-year, neither in cell characteristics nor in levels of cytokines in both blood and sputum. Similarly, Jackson et al reported no difference in levels of Th1, Th2 and pro-inflammatory cytokines in the bronchoalveolar lavages (BAL) collected during RV16-induced exacerbations in 28 volunteer adult asthmatic patients classified according to asthma control, although uncontrolled patients presented higher virus loads in both nasal fluids and BAL (12). Considering small sample size, particularly for uncontrolled patients, they could not draw mechanistic conclusions. Of note, we observed higher blood levels of IL-22 at steady state in poor responders. Interleukin-22 is known to promote inappropriate lung tissue remodeling and epithelium activation. Thus, we could hypothesize that these patients might develop a more intense airway remodeling following exacerbation, as reported in severe asthmatic children (13). Further studies need to describe the characteristics of tissue remodeling in uncontrolled asthmatic children and might benefit from measuring other immunologic parameters, including levels of alarmins (IL-25, IL-33, TSLP), which play a decisive role in the development of Th2 responses in the airway (9).

There are some limitations to our study, including small size and heterogeneity of the population, assessment of adherence based on parental/patients oral reports, dosage of a limited and preselected panel of cytokines. Another bias could be the collection of samples at

exacerbation after the initiation of systemic corticosteroids. However, this study was conducted in real-life practice and patients were naturally infected by viruses.

In conclusion, we did not observe any relationship between profile of preselected cytokines in blood and sputum at exacerbation and future risk of poor asthma control and/or recurrence of exacerbations at one-year in a cohort of allergic asthmatic children. Notably, we observed higher levels of IL-22 at steady state in poor responders, possibly reflecting a higher degree of airway remodeling. Improving our understanding of the pathophysiological mechanisms leading to asthma outcomes following a severe exacerbation is urgently needed in order to improve treatment strategy, especially in severe asthmatic patients.

References:

1. Bloom CI, Nissen F, Douglas IJ, Smeeth L, Cullinan P, Quint JK. Exacerbation risk and characterisation of the UK's asthma population from infants to old age. *Thorax*. 2018;73:313-320.
2. Engelmann I, Mordacq C, Gosset P, et al. Rhinovirus and asthma: reinfection, not persistence. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188:1165-1167.
3. Subrata LS, Bizzantino J, Mamessier E et al. Interactions between innate antiviral and atopic immunoinflammatory pathways precipitate and sustain asthma exacerbations in children. *J Immunol*. 2009;183:2793-800.
4. Wark PA, Johnston SL, Bucchieri F, et al. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J Exp Med*. 2005;201:937-947.
5. Edwards MR, Regamey N, Vareille M, et al. Impaired innate interferon induction in severe therapy resistant atopic asthmatic children. *Mucosal Immunol*. 2013;6:797-806.
6. Sykes A, Edwards MR, Macintyre J, et al. TLR3, TLR4 and TLRs7-9 Induced Interferons Are Not Impaired in Airway and Blood Cells in Well Controlled Asthma. *PLoS One*. 2013;8:e65921.
7. Deschildre A, Pichavant M, Engelmann I, et al. Virus-triggered exacerbation in allergic asthmatic children: neutrophilic airway inflammation and alteration of virus sensors characterize a subgroup of patients. *Respir Res*. 2017;18:191.
8. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Available from: www.ginasthma.org
9. Edwards MR, Strong K, Cameron A, Walton RP, Jackson DJ, Johnston SL. Viral infections in allergy and immunology: How allergic inflammation influences viral infections and illness. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140:909-920.

10. Fielding S, Pijnenburg M, de Jongste JC, et al. Change in FEV1 and Feno Measurements as Predictors of Future Asthma Outcomes in Children. *Chest*. 2019;155:331-341.
11. Pavord ID, Beasley R, Agusti A, et al. After asthma: redefining airways diseases. *Lancet*. 2018;391:350-400.
12. Jackson DJ, Trujillo-Torralbo MB, del-Rosario J, et al. The influence of asthma control on the severity of virus-induced asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136: 497-500.
13. Chang Y, Al-Alwan L, Risse PA, et al. Th17-associated cytokines promote human airway smooth muscle cell proliferation. *FASEB J*. 2012;26:5152-60.

TABLE 1: Population characteristics according to one-year outcomes

	Total population n = 62	Good and partial responders (n = 40)	Poor responders (n = 22)	p*
Characteristics at baseline				
Age (years)	8.7 (7.6; 11.4)	8.7 (7.6; 10.4)	9.5 (7.6; 12.6)	0.19
Male	44 (71.0)	29 (72.5)	15 (68.2)	0.72
Age at asthma diagnosis	2.0 (1.0; 5.7)	1.5 (1.0; 5.0)	2.0 (0.5; 6.0)	0.99
Allergic rhinitis	42 (67.7)	26 (65.0)	16 (72.7)	0.53
Food allergy	10 (16.1)	8 (20.0)	2 (9.1)	0.47
Atopic Dermatitis	26 (41.9)	15 (37.5)	11 (50.0)	0.34
≥2 severe exacerbations in the past year	25 (40.3)	14 (35.0)	11 (50.0)	0.25
Maintenance treatment:	29 (46.7)	15 (37.5)	14 (63.6)	0.048
ICS dose (fluticasone eq, µg/day)	400 (250; 500)	400 (250; 500)	500 (250; 1000)	0.37
LABA	24/28 (85.7)**	13/15 (86.7)	11/13 (84.6)**	NA
Exacerbation				
Duration of hospitalization (days)	4.0 (3.0; 5.5)	4.0 (3.0; 5.0)	5.0 (3.5; 6.0)	0.046
Duration of oxygen therapy (days)	2.5 (1.0; 4.5)	2.5 (1.0; 4.0)	3.0 (2.0; 5.0)	0.35
Virus:	40 (64.5)	30 (75.0)	10 (45.5)	0.020
Rhinovirus	33 (53.2)	26 (65.0)	7 (31.8)	0.012
Number of cells in sputum (n x 10 ³ /mg):	6.3 (3.4; 20.0)	5.9 (3.5; 16.9)	10.3 (2.5; 23.4)	0.76
Neutrophils	56.5 (39.0; 70.0)	68.0 (45.5; 71.0)	47.5 (32.5; 68.5)	0.25
Eosinophils	2.5 (1.0; 8.0)	2.5 (1.5; 10.0)	2.0 (1.0; 4.3)	0.26
Steady state				
Maintenance treatment:				
ICS dose (fluticasone eq, µg/day)	400 (200; 500)	250 (200; 500)	500 (250; 1000)	0.021
LABA	50 (80.6)	31 (77.5)	19 (86.4)	0.51
Asthma control (GINA):				
Well controlled	20 (32.2)	17 (42.5)	3 (13.6)	0.006
Partly controlled	25 (40.3)	17 (42.5)	8 (36.4)	
Uncontrolled	17 (27.4)	6 (15.0)	11 (50.0)	
ACT score:	22.0 (20.0; 25.0)	23.0 (21.0; 25.0)	20.0 (17.0; 22.0)	<0.001
ACT score < 20	14 (23.0)	4 (10.3)	10 (45.5)	0.002
Lung function:				
Pre β2 agonist FEV1 (% of PV)	81.5 (75.0; 86.0)	83.0 (79.0; 88.0)	75.5 (72.0; 84.0)	0.007
Post β2 agonist FEV1 (% of PV)	88.0 (82.0; 91.0)	89.0 (84.0; 92.0)	85.0 (78.0; 89.0)	0.020
FEV1/FVC pré β2 agonist (%)	96.5 (86.0; 108.0)	100.0 (92.0; 110.0)	88.0 (79.0; 99.0)	0.041
FEV1/FVC post β2 agonist (%)	109.0 (100.0; 115.0)	109.0 (102.0; 114.0)	108.5 (92.0; 119.5)	0.79
Virus:	21 (35.6)	14 (37.8)	7 (31.8)	0.64
Rhinovirus	9 (42.9)	6 (46.2)	3 (37.5)	1.00
Number of cells in sputum (n x 10 ³ /mg):	4.0 (2.3; 14.6)	5.5 (2.4; 19.6)	3.0 (1.5; 6.7)	0.17
Neutrophils	25.8 (18.5; 56.0)	26.0 (18.5; 57.5)	25.0 (21.5; 34.0)	0.53
Eosinophils	1.0 (0.5; 6.5)	1.0 (0.5; 8.0)	1.0 (0.5; 5.0)	0.67
One year follow up visit				
Asthma control (GINA):				<0.001
Well controlled	22 (35.5)	18 (45.0)	4 (18.2)	
Partially controlled	27 (43.5)	22 (55.0)	5 (22.7)	
Uncontrolled	13 (21.0)	0	13 (59.1)	
≥ 1 severe exacerbation during the year	22 (35.5)	6 (15.0)	16 (72.7)	<0.001
≥ 2 severe exacerbations during the year	11 (17.7)	0	11 (50.0)	<0.001
ACT score:	23.0 (21.0; 25.0)	23.0 (21.0; 25.0)	21.5 (17.0; 25.0)	0.052
ACT score < 20	9 (16.4)	1 (2.9)	8 (40.0)	<0.001
Lung function:				
Pre β2 agonist FEV1 (% of PV)	82.0 (75.0; 85.0)	82.0 (78.0; 86.0)	77.5 (70.5; 82.0)	0.035
Post β2 agonist FEV1 (% of PV)	87.0 (79.0; 90.0)	87.0 (81.0; 91.0)	85.0 (76.0; 89.0)	0.16
FEV1/FVC pré β2 agonist (%)	97.0 (85.0; 110.0)	99.0 (89.0; 110.0)	92.0 (80.0; 106.0)	0.15
FEV1/FVC post β2 agonist (%)	106.0 (96.0; 115.0)	107.0 (100.0; 115.0)	102.5 (94.0; 115.0)	0.35
Maintenance treatment				
Doses of ICS (fluticasone eq µg/day)	500.0 (250.0; 500.0)	450.0 (225.0; 500.0)	750.0 (250.0; 1000.0)	0.026
LABA	51 (82.3)	31 (77.5)	20 (90.9)	0.30
Omalizumab	9 (14.5)	1 (2.5)	8 (36.4)	<0.001

Values are reported as frequency (percentage) for qualitative variables or median (interquartile range) for continuous variables. GINA: Global Initiative for Asthma; ACT: Asthma control test; FEV1: Forced Expiratory Volume in the first second; FVC: Forced Vital Capacity; ICS: inhaled corticosteroids; LABA: Long-acting Beta Agonists; NA: not applicable. *: good /partial responders were compared with poor responders; **: 1 missing data

TABLE 2: Comparison of immune parameters according to one-year outcomes

	Good and partial responders n = 40	Poor responders n = 22	p
Exacerbation			
<i>Levels in plasma (pg/ml)</i>			
	n'=38	n'=22	
IL-1 β	2.0 (2.0; 36.0)	2.0 (1.0; 19.0)	0.35
IL-6	2.0 (1.0; 8.0)	10.0 (1.0; 25.0)	0.26
IL-5	32.0 (6.0; 92.0)	40.5 (8.0; 64.0)	0.59
IL-22	107.0 (29.5; 173.5)	104.0 (52.0; 161.0)	0.77
IFN- γ	361.5 (113.0; 679.0)	385.5 (62.0; 1211)	0.98
IFN- β	41.0 (23.0; 99.0)	26.5 (20.5; 75.5)	0.36
IL-29	639.0 (404.0; 1160)	412.0 (213.0; 954.0)	0.27
CCL5	1193 (623.0; 2107)	1374 (872.0; 2212)	0.76
<i>Expression of PRR on mDCs (MFI)</i>			
	n'=37	n'=20	
TLR3	32.5 (17.9; 63.9)	23.7 (22.0; 61.1)	0.32
RIG-I	59.5 (32.2; 85.9)	63.5 (36.9; 114.0)	0.67
<i>Expression of PRR on pDCs (MFI)</i>			
	n'=37	n'=20	
TLR3	36.5 (24.2; 62.1)	39.2 (21.3; 54.0)	0.98
RIG-I	59.5 (32.2; 85.9)	67.4 (30.9; 95.0)	0.50
<i>Levels in sputum (pg/ml)</i>			
	n'=28	n'=17	
IL-1 β	49.0 (12.0; 102.0)	4.0 (2.0; 145.0)	0.23
IL-6	20.0 (2.0; 70.0)	21.0 (1.0; 84.0)	0.85
IL-5	50.0 (6.0; 215.0)	12.5 (2.0; 112.0)	0.32
IL-22	93.0 (5.0; 271.0)	88.5 (5.0; 373.0)	0.92
IFN- γ	2.0 (1.0; 61.0)	7.5 (2.0; 41.0)	0.56
IFN- β	5.0 (5.0; 19.0)	5.0 (5.0; 21.2)	0.66
IL-29	5.0 (5.0; 40.5)	7.5 (5.0; 40.0)	0.82
CCL5	5.0 (5.0; 153.8)	5.0 (5.0; 131.0)	0.92
Steady state (8 weeks post exacerbation)			
<i>Levels in plasma (pg/ml)</i>			
	n'=37	n'=21	
IL-1 β	11.0 (2.0; 88.5)	2.0 (1.0; 19.0)	0.19
IL-6	2.0 (2.0; 5.0)	2.0 (1.0; 2.0)	0.08
IL-5	36.0 (7.0; 89.0)	30.0 (15.5; 74.0)	0.95
IL-22	105.0 (17.0; 137.0)	151.5 (76.0; 228.5)	0.040
IFN- γ	181.0 (47.0; 801.0)	163.0 (80.0; 722.0)	0.91
IFN- β	53.0 (19.5; 117.5)	34.6 (9.5; 78.0)	0.27
IL-29	803.5 (361.0; 1204)	678.0 (343.0; 1203)	0.92
CCL5	1002 (660.0; 1765)	1053 (634.0; 1649)	0.58
<i>Expression of PRR on mDCs (MFI)</i>			
	n'=37	n'=20	
TLR3	37.7 (19.5; 56.0)	40.5 (22.9; 57.0)	0.82
RIG-I	49.0 (24.0; 80.4)	63.3 (35.0; 75.1)	0.36
<i>Expression of PRR on pDCs (MFI)</i>			
	n'=37	n'=20	
TLR3	40.7 (27.6; 58.0)	49.3 (25.5; 68.0)	0.45
RIG-I	41.7 (23.3; 70.1)	38.8 (21.2; 57.2)	0.69
<i>Levels in sputum (pg/ml)</i>			
	n'=16	n'=8	
IL-1 β	63.0 (2.0; 394.0)	34.0 (2.0; 206.0)	0.50
IL-6	2.0 (1.0; 2.0)	1.5 (0.8; 39.0)	0.94
IL-5	16.5 (1.0; 34.0)	36.0 (3.0; 279.0)	0.33
IL-22	165.0 (8.0; 553.0)	6.5 (5.0; 456.0)	0.34
IFN- γ	2.0 (1.5; 9.5)	2.0 (2.0; 87.5)	0.51
IFN- β	5.0 (5.0; 21.6)	12.6 (5.0; 24.1)	0.78
IL-29	74.0 (11.5; 202.0)	130.0 (10.0; 198.0)	1.00
CCL5	32.1 (5.0; 245.7)	5.0 (5.0; 216.9)	0.58

Values are reported as median (interquartile range). IL: Interleukin; IFN: Interferon; CCL: C-C motif chemokine ligand; PRR: Pattern recognition receptors; DC: Dendritic cell; MFI: Mean fluorescence intensity; TLR3: Toll-like receptor 3; RIG-I: Retinoic acid-inducible gene I.

IV. Par profilage métabolomique de plasma, nous avons identifié les stéroïdes androgéniques et les acides biliaires comme des métabolites clés pour distinguer les enfants atopiques des enfants non atopiques

Ma troisième année de thèse a été effectuée lors d'une mobilité hospitalo-universitaire au sein de l'équipe du Pr Kari Nadeau et du Dr Sharon Chinthrajah (Sean N Parker Center for Allergy and Asthma Research, Université de Stanford, Etats-Unis). Je présente ici une version partielle de l'article, sans la partie « discussion », qui sera soumis prochainement dans une revue internationale à comité de relecture.

J'ai poursuivi le travail sur les échantillons issus des cohortes régionales VIRASTHMA 1 et VIRASTHMA 2 (enfants d'âge préscolaire) à la recherche de biomarqueurs associés au profil d'asthme, en particulier à l'atopie grâce à l'intégration des échantillons d'enfants américains suivis à l'université de Stanford, incluant des enfants avec un asthme allergique, un asthme non allergique, une autre maladie allergique (allergie alimentaire, dermatite atopique), et des contrôles sains. Nous avons émis l'hypothèse qu'il existe un profil métabolomique distinct chez les enfants atopiques par rapport aux enfants non atopiques.

Mon premier travail a donc d'abord porté sur le choix des échantillons américains à inclure dans l'étude puis sur la préparation des échantillons pour les analyses. Au total, j'ai regroupé 470 plasma d'enfants atopiques et non-atopiques de moins de 13 ans. L'atopie était définie en cas de sensibilisation cutanée et/ou sérique, et/ou d'IgE totales ≥ 173 Kua/l. Nous avons ensuite étudié le profil métabolique sanguin non-ciblé, par spectrométrie de masse (analyses réalisées au sein de l'entreprise Metabolon Inc, North Carolina, USA). J'ai ensuite débuté l'analyse des résultats par techniques de bio-informatique.

186 enfants ont été classés comme atopiques et 284 enfants comme non-atopiques. En analyse en composante principale, la PC1 était négativement influencée par l'atopie en

corrélation linéaire ($R=-0,2$, $p<0,001$) et les IgE totales ($R=-0,28$, $p<0,001$). La PC2 était également influencé négativement par l'atopie ($R=-0,09$, $p<0,05$) et les IgE totales ($R=-0,14$, $p<0,01$). Les métabolites d'intérêt ont été identifiés comme ceux présentant des scores positifs ou négatifs élevés dans les PC associés à l'atopie. Leur association avec l'atopie a persisté dans la sous-analyse des échantillons des cohortes VIRASTHMA et VIRASTHMA 2 pris isolément. L'analyse discriminante des moindres carrés partiels a confirmé ces métabolites d'intérêt parmi les meilleurs scores VIP du modèle. Enfin, des analyses univariées par tests T de Student ont été réalisées entre les métabolites d'intérêt et l'atopie / les IgE totales. Nous avons identifié 2 catégories principales de lipides significativement associées à l'atopie après correction pour comparaison multiple : (1) les stéroïdes androgènes ; et (2) les acides biliaires secondaires.

En conclusion, par profilage métabolomique sanguin, nous avons identifié les stéroïdes androgènes, connus pour supprimer la réponse Th1/Th2/Th17, et les acides biliaires, connus pour être traités par le microbiote intestinal et présentant des fonctions immunomodulatrices, comme des métabolites clés pour distinguer les enfants atopiques des enfants non atopiques.

Des analyses complémentaires sont toujours en cours, visant à : 1/ Confirmer par un modèle de machine learning par Extreme Gradient Boosting ("xgboost") l'influence des principaux métabolites associés à l'atopie ; 2/ Préciser l'influence de l'asthme en identifiant les métabolites spécifiquement associés à l'asthme, puis à l'asthme allergique vs non-allergique.

Version provisoire du 29/6/2021, non-soumise, non formatée par éditeur, ci-dessous :

Plasma metabolomic profiling identifies androgenic steroids and bile acids as key metabolites to distinguish between atopic and non-atopic children

Stéphanie Lejeune^{1,2,3}, Kévin Contrepois⁴, Abinhav Kaushik¹, Sharon Chinthrajah¹, Michael Snyder⁴, Manisha Desai⁵, Philippe Gosset³, Monali Manohar¹, Mary Prunicki¹, Antoine Deschildre^{2,3}, Kari Nadeau¹

Collaborators:

VIRASTHMA 2 Study Group: Patrick Gelé, Stephanie Rogeau, Muriel Pichavant, Ilka Engelmann, Rodrigue Dessen, Laurent Beghin, Caroline Thumerelle, Clémence Mordacq, Elodie Drumez, Celine Delvert, Heloïse Ducoin, Guillaume Pouessel, Armelle Le Mée, Sophie Boileau, Juliette Roussel, Cécile Bonnel

We thank Dr Robert Hamilton (Reference Laboratory for Dermatology, Allergy and Clinical Immunology, The Johns Hopkins University School of Medicine) and Dr Stephanie Rogeau (Univ. Lille, CHU Lille, Institut d'Immunologie, Lille, France) for total IgE measures.

¹*Department of Medicine, Sean N. Parker Center for Allergy and Asthma Research, Stanford University School of Medicine, Stanford, California.*

²*Univ. Lille, Pediatric Pulmonology and Allergy Department. Hôpital Jeanne de Flandre, CHU Lille, 59037 Lille cedex, France.*

³*Univ. Lille, INSERM Unit 1019, CNRS UMR 9017, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, Center for infection and immunity of Lille, 59019 Lille cedex, France.*

⁴*Department of Genetics, Stanford University School of Medicine, Stanford, California.*

⁵*Quantitative Science Unit, Department of Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, California.*

Abstract

Metabolomics is the study of the expression of a large number of tightly-regulated end-products in living systems (human and microbiota), allowing to identify novel biomarkers linked to pathophysiological mechanisms. We hypothesized that there is a distinct metabolomic profile in atopic children compared with non-atopic children.

Methods: Baseline non-fasted intravenous plasma samples from 470 atopic and non-atopic children < 13 years were obtained. Atopy was defined in case of skin and or serum sensitization, and/or total IgE \geq 173 Kua/l. Non-targeted global metabolomic profiles were generated through Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectroscopy.

Results: 186 children were classified as atopic and 284 children as non-atopic. In Principal Component Analysis (PCA), PC1 score was found to be negatively influenced by atopy in linear correlation ($R=-0.2$, $p<0.001$) and total IgE ($R=-0.28$, $p<0.001$). PC2 score was also negatively influenced by atopy ($R=-0.09$, $p<0.05$) and total IgE ($R=-0.14$, $p<0.01$). Metabolites of interest were identified as those with high positive or negative scores in atopy-associated PCs. Partial Least Square Discriminant Analysis confirmed these metabolites of interest among top VIP scores in the model. Finally, T test univariate analyses were performed between the metabolites of interest and atopy / total IgE. We identified 2 main categories of lipids significantly associated with atopy after correction for multiple comparison: (1) Androgenic steroids; and (2) Secondary Bile Acids.

Conclusion: Blood metabolomic profiling identifies androgenic steroids, known to suppress Th1/Th2/Th17 response, and bile acids, known to be processed by gut microbiota and displaying immunomodulatory functions, as key metabolites to distinguish between atopic and non-atopic children.

Introduction

In preschool children, recurrent wheezing is a frequent and heterogenous condition (145). As shown by latent-class analyses, one of the main factors that may account for the heterogeneity of preschool recurrent wheeze is atopy (168,298). Atopy may not be a factor accounting for asthma severity in the preschool years (46,299) but it could drive response to treatment. Indeed, it has been shown that non-atopic preschoolers may not benefit from a long-term maintenance treatment with inhaled corticosteroids, especially in terms of prevention of exacerbations (2,300). Thus, the coexistence of other atopic disorders and/or biological sensitization may reflect underlying pathophysiological mechanisms, called endotypes and may constitute key determinants influencing the natural history of the disease (47,301). Biological sensitization, especially if early and multiple, is indeed among the main factors associated with long-term asthma risk (recurrence of exacerbations, persistence of asthma, impaired lung function) in neonatal cohorts, including MAAS (Great Britain), MAS (Germany), PARIS (France), PASTURE (Europe) (18,35,36,38). Numerous predictive scores, considering the existence of associated atopic disorders and early allergic sensitizations, have been proposed to identify children bound to become asthmatic early on, such as the Asthma Predictive Index (302) and the Prevention and Incidence of Asthma and Mite Allergy Index (303). However, these clinical scores have shown to be insufficient in predicting the subsequent development of asthma and its severity. As shown by the LEAP study (Learning Early About Peanut Allergy), consisting in the early introduction of peanuts in the diet of at-risk infants to prevent the development of a peanut allergy, early diagnosis and interventions in children bound to develop the disease can induce regulatory mechanisms leading to long-term tolerance (53). Preschool years might constitute a window of opportunity to alter the natural history of atopy. Thus, further assessment of biomarkers is crucial to develop effective therapeutic and/or preventive measures, in the era of precision medicine (304,305). One approach could involve omics profiling (306).

“Metabolomics” is the study of the expression of a large number of metabolites produced in living systems (human and microbiota) in response to pathophysiological stimuli, by means of spectroscopic techniques and appropriate bioinformatic tools. These approaches allow hypothesis-free profiling of biomarkers and enables the identification of different metabolite profiles in groups of individuals, when comparing to well-established database (307). These techniques have recently been used to identify novel biomarkers linked to pathophysiological mechanisms, to improve the diagnosis, phenotyping and monitoring of asthma, atopic dermatitis (AD) and food allergies (FA). Plasma can be useful to provide a ubiquitous metabolomic profile for atopic diseases. Furthermore, plasma is an appropriate sample for this approach, as it is simple to collect as part of current practice, and easier to process and store than PBMCs.

However, most studies aiming at identifying metabolites associated with childhood asthma were performed based on volatile components and urine samples (304,305,308–316). Few studies have used plasma samples, but were mostly conducted in adult subjects (317–321). Using a targeted metabolomic approach, Checkley, *et al.* identified lower concentrations of some metabolites, among which ascorbic acid, 2-isopropylmalic acid, shikimate-3-phosphate, and 6-phospho-d-gluconate and glutathione, in asthmatic children, compared to healthy controls (322). In FA, the study by Lee-Sarwar, *et al.* has identified a protective effect of *de novo* sphingolipids on food allergy in stool samples of food sensitized patients (323). Studies using plasma have mostly been conducted in specific FA cases: peanut-allergic patients (324,325), cow’s milk allergic patients (326) or profilin-allergic patients (327). In AD, Huang, *et al.* identified differential metabolites associated with AD : leukotriene B₄, prostaglandins, and conjugated bile acids, using an untargeted approach in serum samples (328). Their abundances were associated with inflammatory responses. Of note, a

comprehensive review has been recently published summarizing the existing evidence from metabolomics studies of childhood atopic diseases (329).

To our knowledge, very few studies have assessed metabolomic profiles associated with atopic background in children with one or multiple atopic disorder within the AD / FA / asthma spectrum. In the recent study by Crestani, *et al.* aiming to identify metabolites associated with FA in children aged less than 12 years, the authors performed an interesting comparison of children with FA alone, asthma alone, FA and asthma and non-atopic controls. FA subjects exhibited a disease-specific plasma metabolomic signature as compared to both control subjects and asthmatics. FA uniquely associated with a marked decrease in sphingolipids, as well as a number of lipid metabolites. After specific comparison of FA and asthma, differences were identified in the microbiota-sensitive aromatic amino acid and secondary bile acid metabolism.

Finally, the influence of age and age-related post-transcriptional modifications has previously been shown in studies conducted in twin cohorts, showing an increased diversity of cell population frequencies, cytokine responses, and serum proteins with age (34). A recently published study in our center has also identified 6 main aging trajectories throughout life that were associated with key metabolic pathways such as progesterin steroids, xanthine metabolism, and long-chain fatty acids (330).

The aim of our study was to identify metabolites associated with the atopic background in children aged less than 13 years, using samples from different sites in France and the US. We hypothesized that there is a distinct metabolomic profile in atopic children compared with non-atopic children. Secondly, we aimed at assessing the specific influence of asthma on the abundance of the identified metabolites.

Method

1. Study design and participants

Samples from 470 children aged less than 13 years were obtained from participants enrolled in previously described cohorts from 3 different sites: Site 1 (Hauts-de-France, France), 162 children with atopic and non-atopic preschool wheeze / school-age asthma (211,331,332); Site 2 (Stanford, CA, USA), 69 children with food allergies and non-atopic healthy controls (330,333,334); and Site 3 (Fresno, CA, USA), 239 children with and without atopy (91) (**Sup Fig 1a**). Data were collected prospectively prior to enrollment in any interventional study.

All participants' parents/caregivers consented via an institutional review board-approved protocol (CPP Nord-Ouest IV for Site 1 and Stanford University for Site 2 and 3).

Demographical data included history of physician-diagnosed atopic disorders, *e.g.* atopic dermatitis, recurrent wheeze in children < 6 years old / asthma in children ≥ 6 years old, and allergic rhinitis in children ≥ 6 years old. Food allergy diagnosis was retained in case of medical diagnosis, based on history of clinical manifestations of immediate hypersensitivity (skin, respiratory, circulatory or digestive symptoms) following ingestion of food and sensitization to food and/or in case of positive oral food challenge. Data on medication, including use of inhaled corticosteroids (ICS), was available. Other demographical data included gender and BMI, which was considered as percentile for age and gender, using French BMI calculator for children from Site 1 (335), and CDC BMI calculator for children from Site 2 and 3 (336). Levels

of specific and total IgE were determined using ImmunoCAP assays (Thermo Fisher Scientific/Phadia).

Children were classified as atopic or non-atopic. Atopy was defined in case of positive skin prick test (SPT), *i.e.* diameter \geq 3 mm, and/or positive specific Immunoglobulin E (sIgE), *i.e.* \geq 0.35 kUA/l, and/or total IgE \geq 173 kua/l. A ROC curve was plotted to assess the performance of total IgE levels for the diagnosis of atopy in 236 children from the study with SPT and/or sIgE available. The area under the curve (AUC) was of 0.87 and optimal Yuden index was found for a total IgE value of 173 kua/l. (**Sup Fig 1b**). This threshold was also consistent with previous total IgE thresholds for atopy described in the literature (337–339). Children were secondly classified into 2 age-range groups: preschool age (1- \leq 5 years); school-age (6- \leq 13 years).

2. Blood collection and plasma preparation

Samples were collected at baseline, *i.e.* at least 4 weeks apart from an acute event, and children with an active infection, history of inflammatory disease or cancer, or treatment with oral steroids or immunomodulators within 1 month prior to sampling were excluded.

Non-fasted intravenous whole-blood samples were collected in EDTA-vacutainer tubes and kept at room temperature prior to processing. Samples were then prepared in each laboratory site (Lille Pasteur Institute, France for Site 1 and Stanford University, CA, USA for Sites 2 and 3) within 2-24 hours, following centrifugation at 2,200 to 3,000 rpm for 20 min at 24°C. The top layer plasma was pipetted off, aliquoted, and immediately frozen at -80°C . Aliquots were de-identified and secondly transported on a frozen state to Metabolon facilities (Research Triangle, NC, USA).

3. Untargeted metabolomics profiling by UPLC-MS/MS

Non-targeted global metabolomic profiles were generated through Metabolon using plasma samples (Research Triangle, NC, USA). To remove protein, dissociate small molecules bound to protein or trapped in the precipitated protein matrix, and to recover chemically diverse metabolites, proteins were precipitated with methanol under vigorous shaking for 2 min (Glen Mills GenoGrinder 2000) followed by centrifugation. Several types of quality assurance / quality control samples were analyzed in concert with the experimental samples. Values for instrument and process variability met Metabolon's acceptance criteria.

Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectroscopy (UPLC-MS/MS) was performed using a Thermo Scientific Q-Exactive high resolution/accurate mass spectrometer interfaced with a heated electrospray ionization (HESI-II) source and Orbitrap mass analyzer. Four methods were used to process samples: (1) Reverse-Phase (RP)/UPLC-MS/MS with acidic positive ion conditions, chromatographically optimized for more hydrophilic compounds; (2) RP/UPLC-MS/MS with acidic positive ion conditions, chromatographically optimized for more hydrophobic compounds; (3) RP/UPLC-MS/MS with basic negative ion optimized conditions; (4) Hydrophilic liquid chromatography elution (HILIC)/UPLC-MS/MS with negative ion mode electrospray.

4. Data preparation and curation (Sup Fig 2a)

Data pre-processing: Data was extracted, peak-identified and quality control processed using Metabolon's hardware and software.

Data preparation and curation: Compounds were removed and/or identified by comparison to library entries using the retention time/index (RI), mass to charge ratio (m/z), and

chromatographic data (including MS/MS spectral data). Peaks were quantified using area-under-the-curve.

Data transformation: All analyses were then conducted using R software (version 4.0.3) (340). Metabolites with values missing for more than 33% of samples were removed. A minimum value imputation was performed for remaining missing values. Log 2 transformation and batch correction were then performed for data normalization.

To study influencing parameters, variance partition was performed using the “variancePartition” package in R (v1.20.0) (341). Total IgE were log2 transformed. Imputation of missing data was performed using a random value with the R Hmisc package (v4.4-2) (342). Body mass index (BMI) was considered continuous variable whereas age-group, gender and study site were considered categorical variables. **Sup Fig 2b** shows the results of variance partition and **Sup Fig 2c** represents the correlation matrix between these parameters.

Following results from the variance partition, the data was then adjusted on these influencing parameters, following a step-by-step approach. First, study site effect was adjusted using an empirical Bayesian framework using the ComBat function from the sva package (v3.38.0) in R (343,344), resulting in *Model 1* dataset. Using the ComBat function, this model was further adjusted for age-group, generating a *Model 2* dataset, and for gender, generating a *Model 3* dataset. *Model 1* was also further adjusted for BMI, resulting in *Model 4* dataset, using a linear regression model included in the “affy” package (v.1.68.0) (345). Comparison between all adjusted models were then performed. Because the study site was found to have the highest influence on results, analyses were also performed separately on each dataset resulting from each site to ensure reproducibility of results. Further analyses were then conducted on *Model 1* (site-adjusted) dataset.

5. Multivariate models

Log 2 metabolite abundances of all 764 detected metabolites (rows) in 470 individuals (columns) were plotted as a heatmap using the R package “pheatmap” (v1.0.12) (346).

Principal component analysis was performed using the R package “PCAtools” (v2.2.0) (347). In order to identify the principal components (PCs) most strongly associated with age, gender, BMI, recurrent wheeze / asthma, atopic dermatitis, allergic rhinitis, food allergy, atopy and total IgE, we applied linear regression models between PC scores and each variable for each of the first ten PCs, using the “eigencor plot” function. We then retained PCs negatively or positively associated with atopy and/or total IgE with a p-value < 0.05.

Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) was conducted using Metaboanalyst 5.0. (348). Variable Importance in Projection (VIP) was calculated as the weighted sum of squares of the PLS loadings taking into account the amount of explained Y-variation in each dimension.

Metabolites associated with atopy were then compared between models to identify top metabolites, constantly isolated in all models (**Table 2**).

6. Univariate analyses between identified metabolites and atopy / total IgE levels.

T test univariate analyses to study correlation between the metabolites of interest and atopy / total IgE were conducted using the “matrixTests” package in R (v0.1.9) (349). *p* values were adjusted for multiple comparisons using Benjamini and Hochberg correction (350).

To further study the diagnosis value of each metabolite, ROC curve analyses and boxplots were plotted for the top metabolites using Metaboanalyst 5.0. (348).

Linear regression analyses of metabolite association with log₂ total IgE levels were performed using the “tidyverse” R package.

7. Pathway analyses.

Pathway analysis was generated using Metaboanalyst 5.0. (348). The structure of biological pathways represent current knowledge about the complex relationships among molecules. The pathway topology analysis uses two well-established node centrality measures to estimate node importance - degree centrality and betweenness centrality. Degree centrality is defined as the number of links occurred upon a node.

Since we tested many pathways at the same time, the statistical *p* values from enrichment analysis were further adjusted for multiple testings. Thus, the Raw *p* is the original *p* value calculated from the enrichment analysis; the Holm *p* is the *p* value adjusted by Holm-Bonferroni method; the FDR *p* is the *p* value adjusted using False Discovery Rate; the Impact is the pathway impact value calculated from pathway topology analysis.

8. Machine Learning Model using XGBoost.

Extreme Gradient Boosting (XGBoost) is an optimized distributed gradient boosting library implementing machine learning algorithms, including both linear model solver and tree learning algorithms under the Gradient Boosting framework. We used the “xgboost” (v1.4.1.1) package in R (351).

Results

1. Description of the population

470 children aged less than 13 years old, 206 aged between 0 and 5 years, i.e. Preschool children, and 264 aged between 6 and 13 years, i.e. School-age children were included in the analysis. 186 children were classified as atopic and 284 children as non-atopic. **Table 1** shows the demographical data between the 2 groups. Atopic children were significantly older than non-atopic children (median age of 7.8 [4.3; 8.8] in atopic children vs 7.7 [3.6; 8.3] in non-atopic children, *p*=0.008). There were significantly more boys among atopic children (gender ratio of 0.54 in atopic children vs 1.01 in non-atopic children, *p*=0.002). BMI percentiles were lower in atopic children (median BMI percentile of 0.50 [0.21; 0.76] in atopic children vs 0.73 [0.40; 0.89] in non-atopic children, *p*<0.0001). Recurrent wheeze or asthma, atopic dermatitis (AD), food allergy (FA) and atopic rhinitis (AR) were found in 78.3%, 48.9%, 41.4% and 35.7% of atopic children, respectively.

2. Metabolite profiling and Multivariate models

Main results were obtained using Site-adjusted dataset (*Model 1*).

2a. Heatmap of metabolite abundance

Log 2 metabolite abundances of all 764 detected metabolites (rows) in 470 individuals (columns) were plotted as a heatmap (**Fig 1a**). Hierarchical clustering displayed a even distribution of atopic and non-atopic children among columns.

2b. Principal Component Analysis

The first principal component (PC1) explained the highest amount of the variability of the data (8.91%). The second principal component (PC2) explained 7.3%, the third (PC3) explained 4.8%, the 4th explained 3.37% and the 5th explained 2.69% of the variability. The PC loadings were compared across different levels of total IgE and represented in **Fig 1b**.

2c. Pearson linear correlation between main PCs and clinical parameters

Linear correlation between PC scores and clinical parameters was calculated, and Pearson R scores are represented in **Fig 3c**. Atopy was found to be negatively associated with PC1 ($r=-0.28$, $p<0.001$) and PC2 ($r=-0.14$, $p<0.01$) and positively associated with PC3 ($r=-0.09$, $p<0.05$). Total IgE levels were found to be negatively associated with PC1 ($r=-0.2$, $p<0.001$) and PC2 ($r=-0.09$, $p<0.05$). Age was also negatively associated with PC1 ($r=-0.7$, $p<0.001$) and PC2 ($r=-0.31$, $p<0.001$). Of note, gender was not found to be associated with the distribution of the data in the PCA.

The top metabolites associated with high positive or negative scores in PCs associated with atopy were then listed and summarized in **Table 2**. In *model 1*, metabolites influencing atopy-associated PCs were:

- Androgenic Steroids: Androstenediol (3alpha, 17alpha) monosulfate (3), Androstenediol (3beta, 17beta) disulfate (1), Androstenediol (3beta,17beta) monosulfate (1), Androsterone sulfate, Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), Epiandrosterone sulfate
- Secondary Bile Acids: Deoxycholate, Glycodeoxycholate 3-sulfate, Glycolithocholate, Glycolithocholate sulfate*, Lithocholate sulfate (1)
- Xenobiotics: 3-phenylpropionate (hydrocinnamate), Piperine, Caffeine, Cinnamoylglycine, Theobromine

As shown in **Table 2**, the same metabolites were identified with PCA after step-by-step correction in *Model 2*, *Model 3* and *Model 4*. The metabolites were also identified as key metabolites when comparing atopic and non-atopic children within each site dataset.

2d. Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA)

Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) was conducted in *Model 1* dataset. **Fig 2a** represents the score plot between the selected PCs and shows discriminance between atopic and non-atopic groups. The following metabolites were among the top 25 VIP scores (**Fig 2b**):

- Androgenic Steroids: Androstenediol (3alpha, 17alpha) monosulfate (3), Androstenediol (3beta, 17beta) disulfate (1), Androstenediol (3beta,17beta) monosulfate (1), Androsterone sulfate, Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), Epiandrosterone sulfate
- Secondary Bile Acids: Glycolithocholate sulfate*, Lithocholate sulfate (1)

- Xenobiotics: 3-phenylpropionate (hydrocinnamate), Caffeine, Cinnamoylglycine, Theobromine

3. Confirmation by univariate analyses between identified metabolites, atopy and total IgE levels.

T test univariate analyses were conducted between the metabolites of interest and atopy. Boxplots and ROC curves are shown in **Fig 3**. P-values and padjust values are summarized in **Table 2**. The following metabolites were found to be associated with atopy :

- Androgenic Steroids: Androstenediol (3alpha, 17alpha) monosulfate (3) ($p < 0.001$; padjust = 0.009); Androstenediol (3beta, 17beta) disulfate (1) ($p < 0.001$; padjust = 0.012); Androstenediol (3beta,17beta) monosulfate (1) ($p < 0.001$; padjust = 0.005); Androsterone sulfate ($p < 0.001$; padjust = 0.004); Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) ($p < 0.001$; padjust = 0.002); Epiandrosterone sulfate ($p < 0.001$; padjust = 0.001)
- Secondary Bile Acids: Glycolithocholate ($p = 0.021$; padjust = 0.170); Glycolithocholate sulfate* ($p = 0.003$; padjust = 0.057); Lithocholate sulfate (1) ($p < 0.001$; padjust = 0.011)
- Xenobiotics: 3-phenylpropionate (hydrocinnamate) ($p < 0.001$; padjust = 0.008); Caffeine ($p = 0.033$; padjust = 0.209); Cinnamoylglycine ($p = 0.002$; padjust = 0.038); Theobromine ($p = 0.011$; padjust = 0.130)

Linear regression analyses of metabolite of interest association with log2 total IgE levels is shown in **Fig 4**. Androgenic steroids : Androstenediol (3alpha, 17alpha) monosulfate (3); Androstenediol (3beta, 17beta) disulfate (1); Androstenediol (3beta, 17beta) monosulfate (1); dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S); epiandrosterone sulfate were positively correlated with levels of total IgE. Some secondary bile acids were positively correlated with levels of total IgE : glycolithocholate; Glycolithocholate sulfate*; and others were negatively correlated: Lithocholate sulfate (1); tauroolithocholate 3-sulfate. Cinnamoylglycine, a xenobiotic, was positively correlated with total IgE.

4. Pathway analyses

Enrichment analyses for the main pathways, Steroid hormones and Bile acids, are shown in **Fig 5**. Enrichment analyses showed that both Steroid hormones and Bile acids pathways were associated with atopy, with p-value of $1.8 \cdot 10^{-5}$ (Holm padjust = 0.0010121, FDR padjust = $5.15 \cdot 10^{-4}$) and 0.003245 (Hom padjust = 0.16874, FDR padjust = 0.030828), respectively. The pathway impact value was estimated to be 0.03761 for Steroid Hormones and 0.04275 for Bile Acids.

Tables

Table 1. Description of the 2 groups

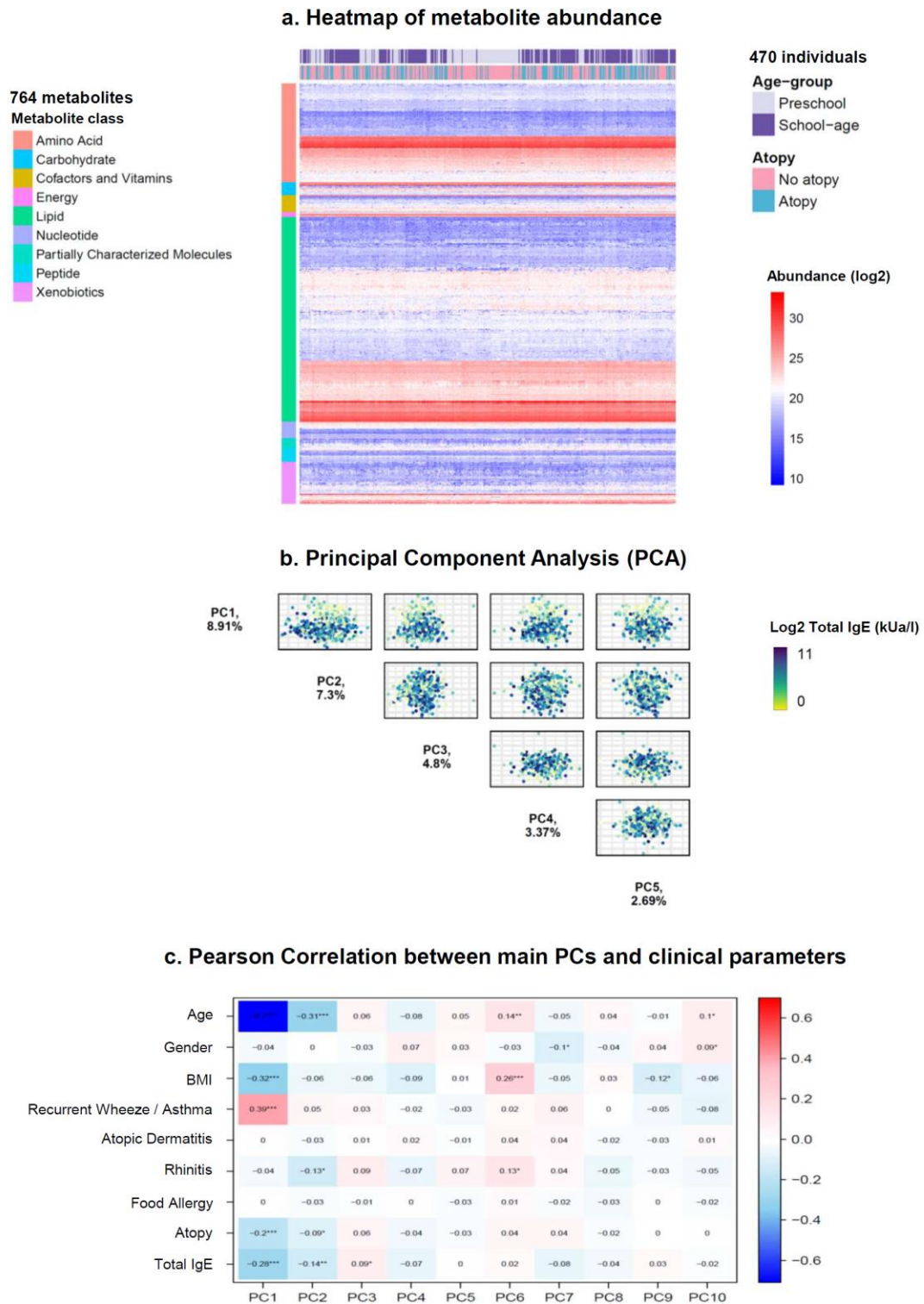
	No Atopy N=284	Atopy N=186	P-value*
Age	7.7	7.8	0.008
Median [Q1;Q3]	[3.6; 8.3]	[4.3; 8.8]	
Gender (female/male ratio)	1.01	0.54	0.002
Total IgE	8.0	427.5	<0.0001
Median [Q1;Q3]	[22.4; 63.4]	[175.8; 853.8]	
BMI percentile	0.73	0.50	<0.0001
Median [Q1;Q3]	[0.40; 0.89]	[0.21; 0.76]	
recurrent wheeze / Asthma /	74/205 (36.1%)	144/184 (78.3%)	<0.0001
AD	19/205 (9.3%)	90/184 (48.9%)	<0.0001
FA	0/205 (0%)	77/186 (41.4%)	<0.0001
AR	1/195 (0.5%)	60/168 (35.7%)	<0.0001

* Mann-Whitney test for quantitative variables, χ^2 test for categorical variables

Table 2: Key metabolites associated with atopy in different models

	PCA: high positive or negative scores in atopy-associated PCs							PLS-DS: high VIP scores	T test:	
	Model 1: Site correction	Model 2: Site and age- group correction	Model 3: Site and BMI correction	Model 4: Site and gender correction	Within Site 1 (HDF, France)	Within Site 2 (Stanford, USA)	Within Site 3 (Fresno, USA)		p-value	p-adjust
Lipids: Androgenic Steroids										
Androstenediol (3alpha, 17alpha) monosulfate (3)	x	x	x	x	x		x		< 0.001	0.009
Androstenediol (3beta, 17beta) disulfate (1)	x	x	x	x	x		x	x	< 0.001	0.012
Androstenediol (3beta,17beta) monosulfate (1)	x	x	x	x		x	x	x	< 0.001	0.005
Androsterone sulfate	x	x	x	x	x	x	x	x	< 0.001	0.004
Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S)	x	x	x	x	x	x	x	x	< 0.001	0.002
Epiandrosterone sulfate	x	x	x	x	x	x	x	x	< 0.001	0.001
Lipids: Secondary Bile Acids										
Deoxycholate	x	x	x	x		x	x		0.754	0.940
Glycodeoxycholate 3-sulfate	x	x	x	x		x	x		0.806	0.948
Glycolithocholate	x	x	x	x	x		x	x	0.021	0.170
Glycolithocholate sulfate*	x	x	x	x	x	x	x	x	0.003	0.057
Lithocholate sulfate (1)	x	x	x	x	x	x	x	x	< 0.001	0.011
Taurolithocholate 3-sulfate		x	x			x			0.081	0.321
Xenobiotics										
3-phenylpropionate (hydrocinnamate)	X	x	x	x	x	x	x		< 0.001	0.008
Piperine	x	x	x	x		x	x		0.376	0.707
Caffeine	x	x	x	x	x		x		0.033	0.209
Cinnamoylglycine	x	x	x	x		x	x	x	0.002	0.038
Theobromine	x	x	x	x	x	x	x	x	0.011	0.130

Fig 1. Metabolite profiling and Principal Component Analysis on Model 1



1a. Heatmap of metabolite abundance. Log₂ metabolite abundances of all 764 detected metabolites (rows) in 470 individuals (columns) were plotted as a heatmap.

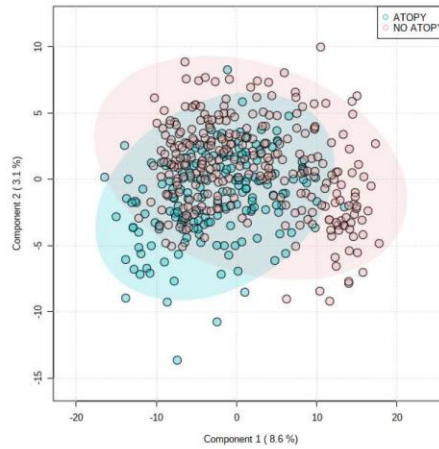
1b. Principal Component Analysis. The first principal component (PC1) explained the highest amount of the variability of the data (8.91%). The second principal component (PC2) explained 7.3%, the third (PC3) explained 4.8%, the 4th explained 3.37% and the 5th explained 2.69% of the variability. The PC loadings were compared across different levels of total IgE.

1c. Pearson linear correlation between main PCs and clinical parameters. Linear correlation between PC scores and clinical parameters was calculated, and Pearson R scores are represented in this figure.

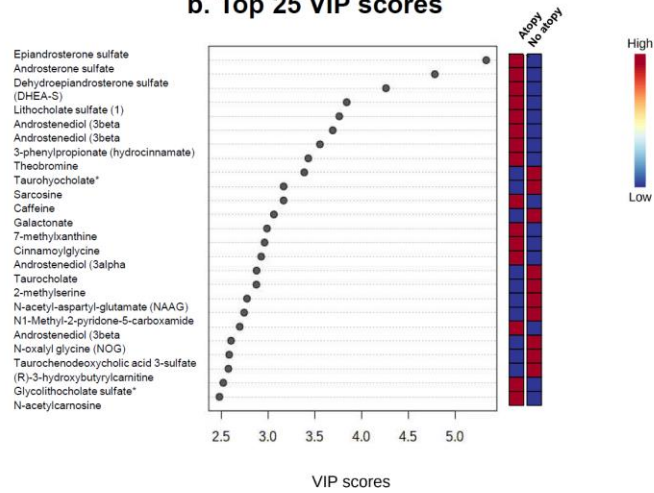
IgE: Immunoglobulin BMI: Body mass index; PC: principal component

Fig 2. Partial Least Square Discriminant Analysis(PLS-DA)

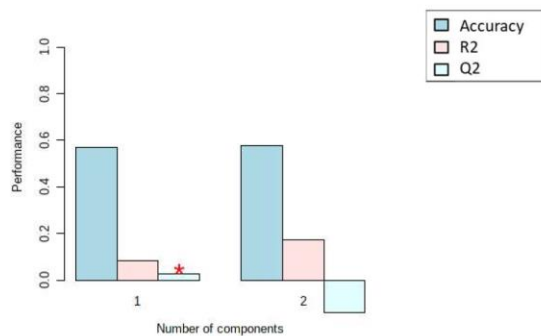
a. Score plots



b. Top 25 VIP scores



c. Cross Validation



2a. Score plot between the selected PCs. The explained variances are shown in brackets.

2b. Top 25 Variable Importance in Projection (VIP): important features identified by PLS-DA. The colored boxes on the right indicate the relative concentrations of the corresponding metabolite in each group: Atopy / No atopy.

2c. Cross validation. PLS-DA classification using different number of components. The red star indicates the best classifier.

Fig 3. Diagnosis value of identified metabolites for atopy: ROC curves and boxplots

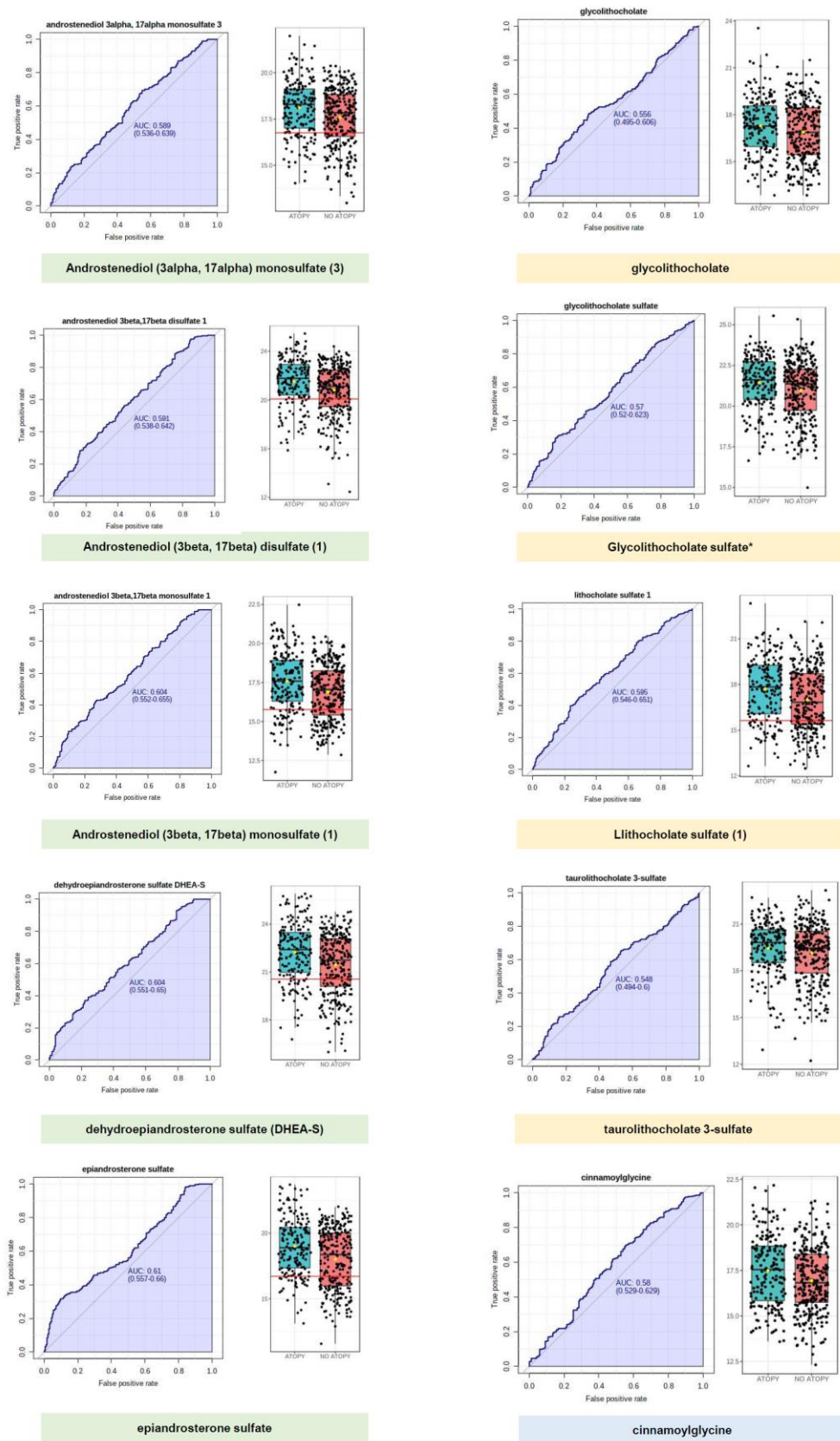
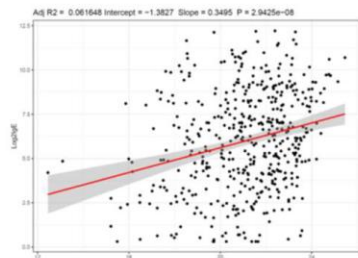
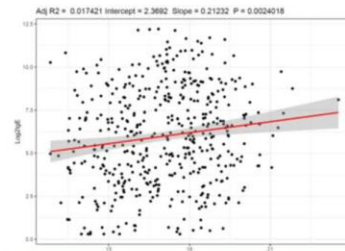


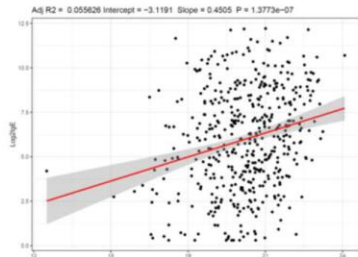
Fig 4. Correlation between identified metabolites and total IgE



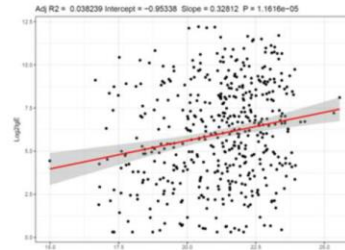
Androstenediol (3alpha, 17alpha) monosulfate (3)



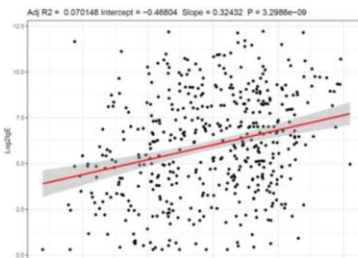
glycolithocholate



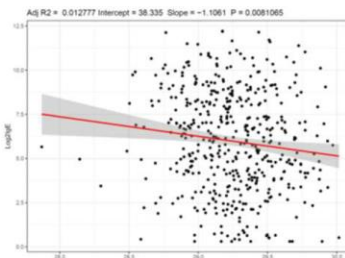
Androstenediol (3beta, 17beta) disulfate (1)



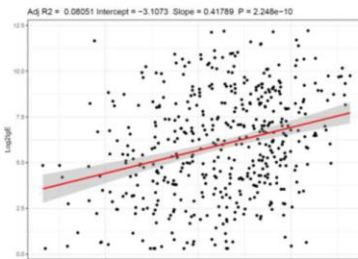
Glycolithocholate sulfate*



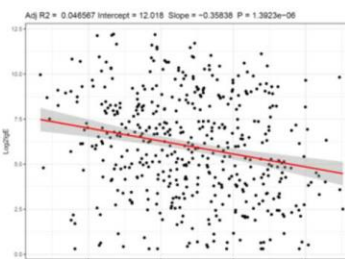
Androstenediol (3beta, 17beta) monosulfate (1)



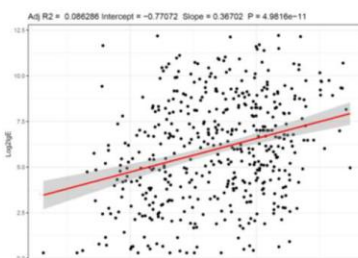
Lithocholate sulfate (1)



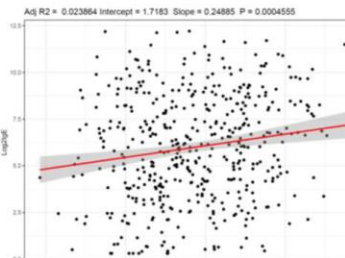
dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S)



tauroolithocholate 3-sulfate



epiandrosterone sulfate



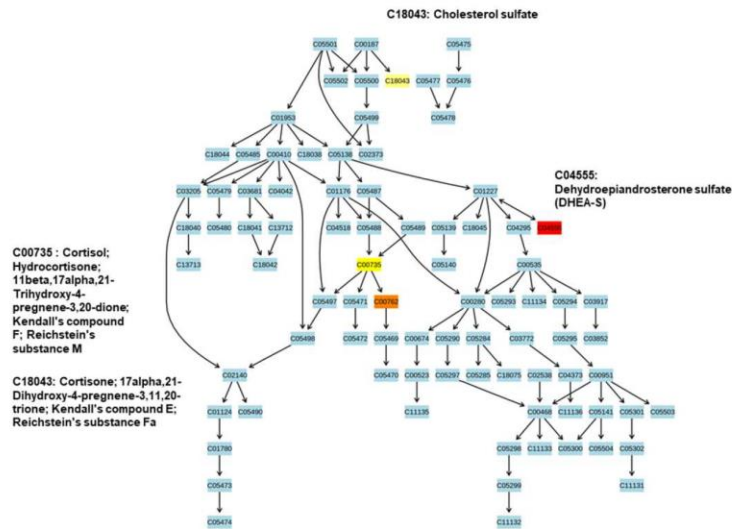
cinnamoylglycine

Fig 5. Pathway analysis

a. Overview

Pathway	p	Holm p	FDR	Impact
Steroid Hormones	1.8 10 ⁻⁵	0.0010121	5.15 10 ⁻⁴	0.03761
Primary Bile Acids	0.003245	0.16874	0.030828	0.04275

b. Steroid Hormones Biosynthesis



c. Bile Acids Biosynthesis

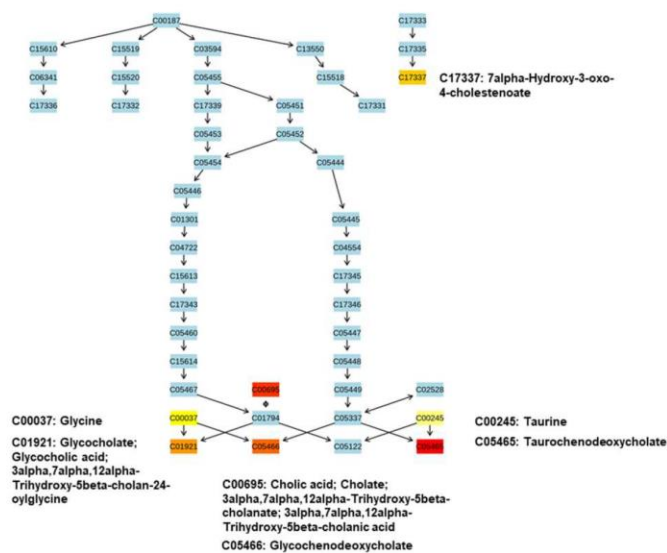
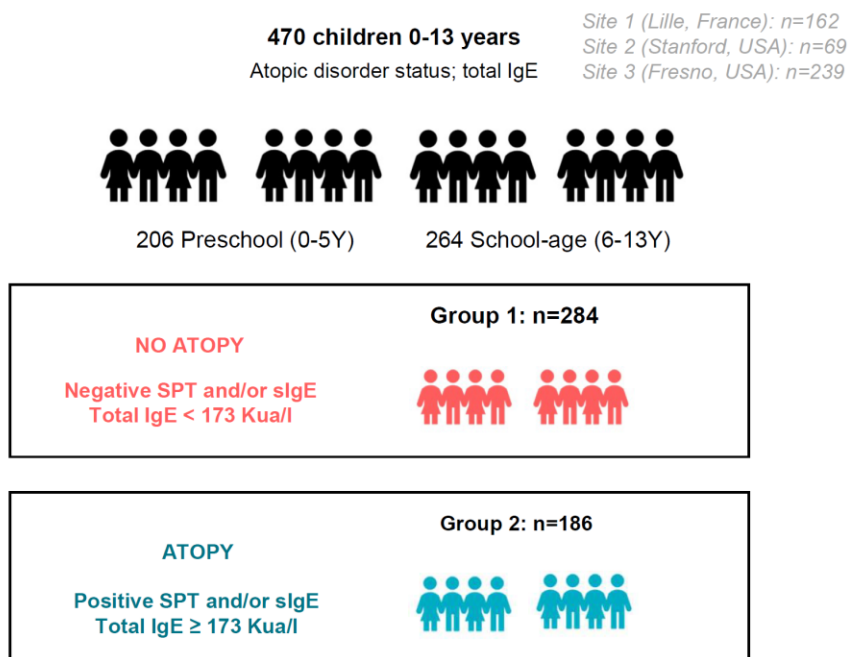


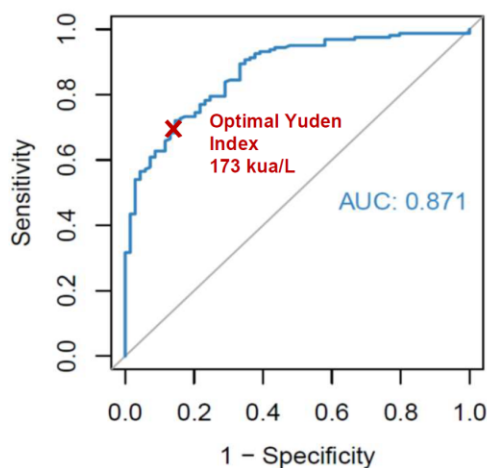
Fig 5a. The table shows the detailed results from the pathway analysis. Since we are testing many pathways at the same time, the statistical p values from enrichment analysis are further adjusted for multiple testings. In particular, the Raw p is the original p value calculated from the enrichment analysis; the Holm p is the p value adjusted by Holm-Bonferroni method; the FDR p is the p value adjusted using False Discovery Rate; the Impact is the pathway impact value calculated from pathway topology analysis. **Fig 5b and 5c.** Color code: light blue represent metabolites that not in the data and are used as background for enrichment analysis; other colors represent metabolites in the data, with colors varying from yellow to red because of different levels of significance.

Sup Fig 1. Description of the population

a. Flow diagram



b. ROC curve: Performance of total IgE for the diagnosis of Atopy



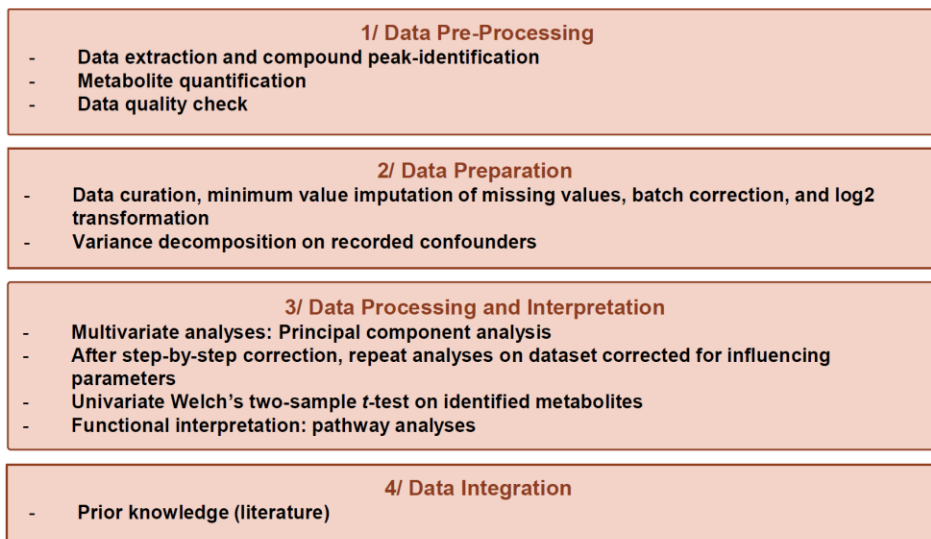
Sup 1a. Flow diagram. 470 children aged less than 13 years old, 206 aged between 0 and 5 years, i.e. Preschool children, and 264 aged between 6 and 13 years, i.e. School-age children were included in the analysis. They came from 3 initial sites: Cohort 1 (Virasthma and Virasthma 2, Lille, France) constituted of 162 children with preschool wheeze and school-age asthma, Cohort 2 (Stanford, CA, USA) constituted of 69 healthy controls and children with food allergies, and Cohort 3 (Fresno, CA, USA) constituted of 239 children with various atopic disorders and healthy controls. Atopy was defined in case of positive SPT and/or sIgE and/or total IgE above 173 Kua/l. 186 children were classified as atopic and 284 children as non-atopic.

Sup 1b. ROC curve. Performance of total IgE for the diagnosis of atopy. Among 236 children, the performance of total IgE levels for the diagnosis of atopy was assessed using a ROC curve, with an area under the curve of 0.87. Optimal Yuden index, defined as the maximum value of Sensitivity + Specificity - 1 was found for a value of total IgE of 173 kua/l.

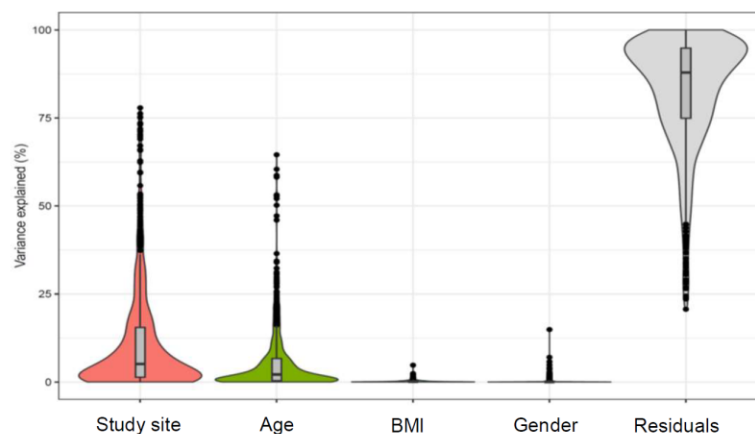
AUC: area under the curve ; SPT: skin prick test; sIgE: specific Immunoglobulin E.

Sup Fig 2. Data preparation and analysis

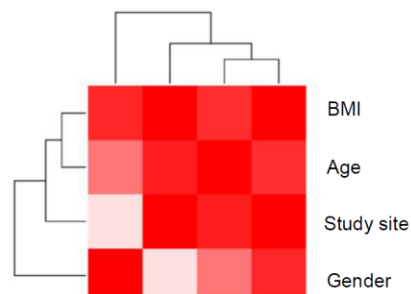
a. Overall strategy for the analysis



b. Variance partition



c. Correlation matrix of influencing parameters



**DISCUSSION : QUE RETIRER DE CES DONNEES SUR LA
RELATION ENDOTYPE – PHENOTYPE - EXPOSOME A TRAVERS
LES AGES DE L'ENFANCE, ET COMMENT LES TRADUIRE EN
THERAPIES CIBLEES ?**

Nos travaux confirment que les mécanismes sous-tendant l'asthme au cours de l'enfance sont différents, soulignant le fait que les asthmes de l'enfant d'âge préscolaire et scolaire sont des entités distinctes. Nous avons confirmé ou identifié certaines caractéristiques associées à des profils d'enfants asthmatiques à ces périodes de la vie. D'abord, l'analyse des données de la cohorte nationale CobraPed suggère que les facteurs influençant la sévérité de l'asthme diffèrent selon la catégorie d'âge : elle est associée à l'exposition au tabac et / ou aux moisissures à l'âge préscolaire, alors qu'elle est reliée aux maladies atopiques à l'âge scolaire. Ensuite, l'analyse de la réponse immunitaire au cours d'infections respiratoires chez l'enfant d'âge préscolaire (VIRASTHMA 2) a mis en évidence chez les enfants les plus sévères, exacerbateurs fréquents, des niveaux systémiques plus faibles de cytokines Th1 et Th2, pro et anti-inflammatoires et des réponses antivirales moins marquées pendant une exacerbation sévère viro-induite. Chez des enfants d'âge préscolaire, nous avons rapporté des altérations de la réponse antivirale au cours d'une exacerbation sévère, le plus souvent viro-induite, qui s'avérait plus prononcée dans un groupe de patients avec une inflammation neutrophilique et sujets à une réinfection virale à l'état stable (211). Dans un travail complémentaire, nous n'avons pas mis en évidence de relation entre le profil cytokinique au moment de l'exacerbation et le risque futur de mauvais contrôle de l'asthme et/ou de récurrence des exacerbations. Chez l'enfant préscolaire et scolaire, les profils phénotypiques et endotypiques pourraient ne pas persister dans le temps, et il nous reste à élucider leurs trajectoires d'évolution et leur caractère dynamique à court, moyen et long terme. De plus, l'ensemble de l'exposome, et le microbiote en particulier, pourraient influencer ces trajectoires. Ce lien pourrait se faire pour le microbiote intestinal *via* des métabolites ayant des fonctions immunomodulatrices comme le suggère le travail mené au cours de la mobilité. En effet, l'analyse du métabolome plasmatique par profilage non-ciblé chez les enfants des cohortes VIRASTHMA 1 et 2 a permis d'identifier un défaut d'acides biliaires secondaires associé à l'atopie, suggérant que ces métabolites, connus pour être générés par le microbiote intestinal, pourraient jouer un rôle clé dans la tolérance pendant l'enfance.

Au total, parmi les points qui émergent, on retiendra l'absence de pertinence des endotypes neutrophilique / éosinophilique dans l'asthme de l'enfant, le rôle majeur des défenses antivirales et de l'inflammation Th2, et la nécessité d'évaluer et de caractériser l'exposome et le microbiote afin de mieux appréhender la réponse du patient au traitement.

I. La distinction asthme neutrophilique / asthme éosinophilique : des endotypes obsolètes ?

L'asthme neutrophilique est classiquement opposé à l'asthme éosinophilique et est distingué comme un endotype distinct chez l'enfant. Chez l'adulte, cet endotype est bien décrit, associé à la sévérité de l'asthme, et possiblement impliqué dans l'insensibilité aux corticostéroïdes (219). Les neutrophiles sont recrutés au sein des voies aériennes principalement sous l'influence des cytokines Th17, en particulier l'IL17A/F et l'IL-22 (214). A plus long terme, ces cytokines contribuent au remodelage des voies aériennes dans l'asthme en augmentant la production de cytokines profibrotiques, de facteurs proangiogéniques et de collagène (219,220). Chez les asthmatiques adultes sévères, la neutrophilie des voies aériennes a également été associée à une moindre diversité du microbiote dans le LBA (287,352). Chez l'enfant, plusieurs études ont remis en question cet endotype, l'association entre la neutrophilie des voies aériennes et la sévérité de l'asthme n'étant pas constante (16,353–356). Elle peut apparaître précocement, dès l'âge préscolaire (357), mais ne persiste pas forcément au cours de l'histoire naturelle de la maladie (300,353). Chez l'enfant, la neutrophilie des voies aériennes pourrait être plutôt liée à la présence de virus respiratoires. L'infection expérimentale par un RV chez des sujets asthmatiques adultes induit directement une neutrophilie au sein de la muqueuse bronchique (358). Dans la cohorte d'enfants d'âge scolaire VIRASTHMA, les enfants sujets à une réinfection en dehors d'une exacerbation (état stable 8 semaines plus tard) présentaient une inflammation neutrophilique des voies aériennes à l'état stable mais n'étaient pas affectés par une sévérité accrue (211,234). En parallèle, les patients infectés aux 2 temps avaient également une expression réduite de certains PRR au moment de l'exacerbation et à l'état stable, suggérant une altération de la réponse antivirale. Comme indiqué précédemment, la neutrophilie des voies aériennes a également été associée à une réponse IFN différente au moment de la crise d'asthme, tant chez les adultes (247,271), que chez les enfants (211). De plus, la présence d'une neutrophilie au cours de l'enfance ne semble pas influencer négativement l'histoire de la maladie. Ainsi,

chez les enfants inclus dans l'étude VIRASTHMA, nous n'avons pas montré de lien entre la neutrophilie des voies aériennes au cours de l'exacerbation ou l'état stable et la mauvaise réponse au traitement à un an de suivi (331). Il n'y avait aucune différence entre les bons/partiels répondeurs au traitement d'entretien et les mauvais répondeurs, ni dans les caractéristiques des cellules, ni dans les niveaux de cytokines dans le sang et les expectorations. Bien que les études divergent sur ce point, la présence d'une neutrophilie à l'âge préscolaire pourrait même être associée à une meilleure évolution fonctionnelle dans les années ultérieures (16,359). Les neutrophiles présents dans les voies aériennes des enfants asthmatiques sévères pourraient cependant avoir un phénotype particulier avec une survie accrue et des fonctions pro-inflammatoires augmentant l'inflammation basale (360). D'autres cellules stimulant une inflammation Th17, comme les MAIT, pourraient également être impliqués dans les mécanismes de l'asthme sévère et dans la survenue d'exacerbations sévères (356). De façon intéressante, nous avons observé dans notre étude de suivi à un an que les mauvais répondeurs au traitement de fond avaient des taux sanguins plus élevés d'IL-22 à l'état stable que les autres. L'IL-22 est connue pour favoriser le remodelage inapproprié du tissu pulmonaire et l'activation de l'épithélium. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que ces patients pourraient développer un remodelage plus intense des voies aériennes après une exacerbation, comme cela a été rapporté chez des enfants asthmatiques sévères (361).

En opposition à l'asthme neutrophilique, l'asthme éosinophilique est classiquement décrit chez l'enfant. En effet, l'éosinophilie des voies aériennes est très fréquente chez les enfants asthmatiques. Elle a été observée dans l'asthme sévère et non sévère, et est souvent mais pas toujours associée à la réponse aux CSI, ce qui souligne la diversité des profils éosinophiles dans l'asthme pédiatrique (16,355,357). Récemment, l'éosinophilie sanguine a été associée au risque d'hospitalisation pour crise d'asthme, et aux taux élevés d'IgE totales à l'âge préscolaire dans une cohorte française d'enfants asthmatiques sévères (362). Cependant, dans nos travaux, nous n'avons pas observé de lien entre l'éosinophilie sanguine

et l'asthme sévère chez les préscolaires et scolaires inclus dans la cohorte CobraPed (299), ou entre les différents phénotypes d'asthme à l'âge préscolaire dans la cohorte VIRASTHMA 2 (332). De plus, l'éosinophilie du sang périphérique, actuellement utilisée comme base de sélection des produits biologiques ciblant les éosinophiles, peut ne pas être représentative de l'éosinophilie des voies aériennes chez les enfants (363). Des modèles de souris et des études sur les adultes ont suggéré un rôle de l'éosinophilie des voies aériennes induite par l'IL-5 comme régulateur positif du récepteur des RV InterCellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) sur les AEC, et comme régulateur négatif des PRR et des réponses antivirales (364,365). Cependant, chez les enfants, on ne sait toujours pas si les éosinophiles des voies aériennes sont impliqués dans la physiopathologie de l'asthme sévère et dans la propension à développer des crises d'asthme (300). Il a été signalé que l'éosinophilie n'était pas nécessairement associée à des niveaux plus élevés de cytokines Th2 (355), et que d'autres cellules, telles que les ILC2 stimulées par les alarmines, pouvaient avoir une plus grande importance biologique dans la physiopathologie des crises d'asthme (366). En parallèle, les éosinophiles pourraient également avoir des effets bénéfiques dans l'asthme pédiatrique, car ils présentent des fonctions régulatrices et contribuent à la réparation des poumons et à l'homéostasie des muqueuses (212). Ainsi, à l'adolescence, l'éosinophilie du sang périphérique a été identifiée comme un biomarqueur prédisant la diminution de la sévérité de l'asthme (367). Enfin, il reste à déterminer si les produits biologiques ciblant les éosinophiles, comme le mepolizumab anti-IL-5, maintenant disponible chez les enfants de plus de 6 ans atteints d'asthme éosinophilique en Europe et aux États-Unis (368), sont efficaces pour réduire les crises d'asthme chez les enfants (369). Des études chez l'adulte suggèrent qu'il pourrait avoir un effet modificateur sur la réponse inflammatoire induite par le RV. Un essai contrôlé par placebo a été mené chez des patients adultes souffrant d'asthme léger, randomisés pour recevoir du mepolizumab contre un placebo, suivi d'une inoculation de RV-16 (370). Les auteurs ont montré que le mepolizumab diminuait le nombre d'éosinophiles sanguins de base et leur état d'activation, mais qu'il n'empêchait pas l'activation des

éosinophiles restants lors d'une infection à RV. Après l'infection, le groupe mepolizumab avait des nombres augmentés de LB et AM au sein des voies aériennes, et une modulation des taux de CCL20 et d'IL-1RA dans le LBA.

Globalement, contrairement aux adultes, la neutrophilie et l'éosinophilie des voies aériennes n'apparaissent pas comme les biomarqueurs préférentiels pour classer les patients pédiatriques ni pour évaluer leur risque d'asthme. De plus, la nature de l'inflammation peut varier au cours du temps chez l'enfant (371). Nos travaux, ainsi que les données de la littérature des 15 dernières années, suggèrent que la réponse immunitaire anti-infectieuse, l'inflammation Th2 associée à l'atopie, et la prise en compte de l'exposome sont des paramètres mieux adaptés à l'hétérogénéité de l'asthme à l'âge pédiatrique.

II. L'altération précoce des réponses anti-infectieuses : une caractéristique de certains enfants asthmatiques d'âge préscolaire qui pourrait être la cible de certaines thérapies personnalisées

Dans notre cohorte d'enfants asthmatiques préscolaires VIRASTHMA 2, présentant une exacerbation viro-induite, nous avons confirmé le rôle majeur des infections virales, observées chez la quasi-totalité des enfants à l'inclusion (RV : 73%) et chez plus de 2/3 des enfants à l'état stable (RV : 51%), mais aussi identifié la présence de bactéries pathogènes (332,372). Dans cette population, les enfants les plus sévères, exacerbateurs fréquents, présentaient des concentrations plasmatiques d'IFN- β plus faibles au moment de l'exacerbation que les autres, suggérant un défaut de production en réponse aux virus limité à cette sous-population (332). Chez ces enfants, nous avons observé simultanément une production plus faible de cytokines Th1 (IFN- γ), de cytokines Th2 (IL-5), de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α), de cytokines régulatrices (IL-10) et d'IFN de type 1 (IFN- β) pendant l'exacerbation. Nos résultats suggèrent donc un défaut de réponse antivirale et inflammatoire au moment de l'exacerbation chez les patients les plus sévères, exacerbateurs fréquents. Comme nous l'avons présenté dans la revue de la littérature, de nombreuses études suggèrent qu'il existe un défaut de réponse anti-infectieuse, antivirale en particulier, chez certains patients asthmatiques. Ce défaut pourrait même être en partie déterminé par des mécanismes constitutionnels, comme suggéré par une cohorte de naissance d'enfants à haut risque d'atopie (373). Après exposition à l'acide polyinosinique-polycytidylique (Poly I:C), un ARN double brin qui imite les PAMP viraux, des cellules du sang du cordon ombilical ont été testées pour leur capacité à produire de l'IFN. Un groupe de faibles producteurs de réponse IFN de type I et III après stimulation représentant 24 % des patients a été identifié. Ils avaient un risque plus élevé d'infection des voies respiratoires inférieures et d'asthme à l'âge de 5 ans.

Il reste maintenant à mieux identifier ces patients, et les outils numériques ou les approches biologiques intégrées pourraient nous permettre d'avancer dans cette démarche.

Par exemple, Custovic, *et al.* ont utilisé des techniques de "Machine Learning" dans un modèle *in vitro* d'infection RV-A16 sur des PBMC prélevées chez des enfants de 11 ans et ont décrit 6 groupes de réponses cytokiniques à l'infection (374). L'un de ces groupes, composé de patients dont les PBMC présentaient de faibles réponses IFN, des cytokines pro-inflammatoires élevées, de faibles réponses Th2 et des réponses régulatrices modérées, était associé à un asthme précoce et au risque le plus élevé d'exacerbations de l'asthme et d'hospitalisations pour une infection des voies respiratoires inférieures.

L'identification de biomarqueurs associés à ce défaut de réponse antivirale pourrait permettre de mieux cibler les patients qui pourraient bénéficier de thérapies ciblées, ciblant les réponses anti-infectieuses, dans une démarche de médecine personnalisée. Les lysats bactériens, stimulant les PRR, les peptides anti-microbiens exogènes et la supplémentation en IFN pourraient donc représenter des stratégies thérapeutiques particulièrement intéressantes dans l'asthme pédiatrique (375). Les lysats bactériens mécaniques polyvalents (PMBL®) et le Broncho-Vaxom (OM-85) contiennent des lysats de 8 bactéries pathogènes, dont *H. influenzae* et *S. pneumoniae*. L'administration de PMBL® ou d'OM-85 BV a été efficace pour prévenir les infections des voies respiratoires chez les adultes et les enfants suivis pour bronchites chroniques et/ou ayant des antécédents d'infections chroniques récurrentes (376–380). Dans un essai mené chez des patients âgés atteints de BPCO, Ricci, *et al.* ont observé une réduction du nombre de séroconversions contre de nombreux pathogènes viraux chez les patients traités avec PMBL®, ainsi qu'un meilleur contrôle du nombre d'épisodes infectieux et d'exacerbations de la BPCO, ce qui suggère que l'effet préventif de PMBL® sur les infections aiguës ne concerne pas seulement les infections bactériennes, mais aussi les infections virales (381). Chez 152 enfants d'âge scolaire suivis pour asthme allergique, Emeryk, *et al.* ont décrit une réduction du nombre d'exacerbations après 12 semaines de traitement par PMBL®, et aucun événement indésirable grave, bien qu'aucune amélioration des scores de contrôle de l'asthme n'ait été obtenue (382). Chez 75 enfants avec un asthme préscolaire, Razi, *et al.* ont démontré qu'OM-85 BV réduisait le taux

et la durée des épisodes de respiration sifflante dans les 12 mois suivant le début du traitement, ainsi que le nombre d'affections aiguës des voies respiratoires (383). Chez des nourrissons âgés de 6 à 18 mois, un essai clinique est en cours pour évaluer l'effet préventif de l'OM-85V sur l'apparition du premier épisode de sifflement lié à une infection des voies respiratoires inférieures pendant une période d'observation de 3 ans (384). En ce qui concerne les mécanismes d'action, la prévention des infections respiratoires aiguës n'étant pas induite par le LPS purifié ou l'ADN bactérien, d'autres PAMP contenus dans les lysats bactériens pourraient activer l'immunité innée et promouvoir l'inflammation Th1 par les DC (385–387).

Les peptides antimicrobiens, dont le LL-37, sont également des molécules clés des réponses immunitaires innées contre les virus. Plusieurs équipes ont donc émis l'hypothèse que la supplémentation en LL-37 ou l'induction de sa production par les AEC pourrait améliorer les défenses anti-infectieuses. Sousa, *et al.* ont testé l'effet de la cathelicidine exogène sur la réplication du RV-1B après inoculation sur des cultures d'AEC (388). Ils ont rapporté que la LL-37 exogène, ainsi que les cathélicidines porcines homologues, administrées avant ou après l'infection, avaient une activité antivirale contre le RV en réduisant l'activité métabolique des cellules infectées. Cependant, une étude préclinique sur un modèle murin d'asthme a montré *in vivo* un effet délétère d'un peptide antimicrobien exogène de la famille des cathélicidines sur l'inflammation et l'hyperréactivité des voies aériennes (389). A notre connaissance, il n'y a pas d'étude publiée *in vivo* chez l'homme sur ce sujet. Néanmoins, des résultats prometteurs concernant la supplémentation en vitamine D sur la libération de LL-37 par les AEC dans des expériences *in vitro* ont été publiés (390–392). Plusieurs études cliniques ont ainsi suggéré un effet protecteur de la supplémentation en vitamine D sur le risque d'infections respiratoires aiguës chez les enfants (393). Bien que d'autres effets de la vitamine D puissent expliquer son efficacité clinique (257,394), il existe un lien biologique bien connu entre la vitamine D et les peptides microbiens de l'hôte, via la translocation de la vitamine D vers le noyau des AEC, où elle active les VDRE dans les régions

promotrices des gènes de peptides antimicrobiens tels que LL-37 (104,187,392). Cibler l'axe vitamine D / cathélicidine pourrait donc représenter une stratégie prometteuse lors d'un asthme aigu chez l'enfant.

Enfin, plusieurs équipes ont émis l'hypothèse qu'une supplémentation en IFN lors d'une infection virale pourrait renforcer les réponses antivirales et réduire la gravité des crises d'asthme. Les thérapies par IFN (IFN- α pégylé en association avec la ribavirine) ont d'abord été développées dans d'autres maladies comme l'hépatite C et le virus de l'immunodéficience humaine (395,396). Les IFN exogènes ayant réduit la réplication du RV dans des cultures *in vitro* d'AEC infectées par le RV et provenant de patients asthmatiques (397), un essai a été initié chez 147 patients asthmatiques adultes développant des symptômes d'infection virale (68% de RV) pour évaluer l'efficacité d'un traitement par IFN- β inhalé pendant 14 jours (398). Le traitement n'a pas permis d'améliorer les symptômes d'asthme, mais il a amélioré la récupération du débit expiratoire de pointe le matin et a réduit le recours au traitement par corticostéroïdes oraux ou antibiotiques. Dans une analyse exploratoire du sous-ensemble de patients plus difficiles à traiter, la supplémentation en IFN de type I a amélioré les questionnaires de contrôle de l'asthme. En outre, elle a stimulé l'immunité innée antivirale avec des taux sériques élevés et persistants de CXCL10 et une diminution des taux de molécules pro-inflammatoires telles que CCL4 et CXCL8. Dans l'essai de phase 2 On-demand Inhaled Interferon Beta-1a in Severe Asthmatics (INEXAS), conçu pour évaluer l'efficacité de l'IFN- β 1a inhalé pendant 14 jours pour prévenir les exacerbations d'asthme chez les adultes, McCrae, *et al.* ont également rapporté une amélioration du débit expiratoire de pointe matinal dans le bras traité par rapport au placebo, mais l'étude s'est arrêtée prématurément (399,400). Aucune étude n'a encore été menée chez l'enfant. Outre la ribavirine, d'autres thérapies antivirales, telles que les molécules ciblant la capsid, le pleconaril, le BTA-798 et le V-073, ont été étudiées dans les infections à entérovirus. Cependant, aucun de ces composés n'a prouvé une efficacité et une sécurité suffisantes lors des essais cliniques (401). En particulier, un essai clinique de phase 2 avec le pleconaril intranasal chez des enfants âgés de 6 ans et

plus, et des adultes, n'a montré aucun impact du traitement sur l'apparition de symptômes de rhinite induits par le RV ou sur l'exacerbation aiguë de l'asthme (402). Les thérapies par ADNzymes pourraient également constituer des stratégies prometteuses, comme l'a récemment suggéré une étude *in vitro* montrant une bonne activité catalytique de deux candidats (Dua-01 et Dua-02) sur diverses souches de RV (403). Ces thérapies ciblant les défenses anti-infectieuses pourraient représenter des thérapies potentielles dans le traitement des crises d'asthme chez les enfants. Cependant, il reste à déterminer le moment exact de l'administration lors de l'infection virale et de l'apparition de l'asthme aigu, ainsi que la population d'enfants qui pourrait bénéficier de ces stratégies.

III. L'inflammation Th2 et l'atopie, associées au risque d'exacerbations : l'effet potentiel des biothérapies

L'inflammation Th2 pourrait avoir un rôle clé dans le développement des crises d'asthme par le biais de la sensibilisation aux IgE, et non pas seulement par le biais des éosinophiles. En effet, l'atopie, définie comme une sensibilisation allergique, est une caractéristique clé associée au risque de crises d'asthme dans l'enfance (46,154). Dans la cohorte VIRASTHMA 2, composée majoritairement d'enfants exacerbateurs fréquents, l'atopie était fréquente, observée dans près d'un cas sur deux (332). Dans la cohorte CobraPed, l'atopie et la présence de comorbidités atopiques étaient associées à la sévérité à l'âge scolaire (299). Comme le montrent les analyses de classes latentes, l'atopie est également l'un des principaux facteurs pouvant expliquer l'hétérogénéité de la maladie, en particulier dans les années préscolaires (168,298), et pourrait déterminer la réponse au traitement (2). L'importance des sensibilisations allergiques dans le risque, l'histoire naturelle et la caractérisation phénotypique de l'asthme du jeune enfant est illustrée et confortée par les données des cohortes néonatales, notamment MAAS (Grande Bretagne), MAS (Allemagne), PARIS (France), PASTURE (Europe) (35–38). Les points qui émergent sont le rôle prédominant des sensibilisations précoces aux pneumallergènes par rapport aux trophallergènes, le rôle particulier des pollens par rapport aux allergènes per-annuels, le poids de la multiplication des sensibilisations à la fois pour différents allergènes ou pour un même allergène, vis-à-vis de ses différents déterminants.

L'atopie préexistante pourrait jouer un rôle dans la modulation de la réponse IFN lors d'une infection virale chez les enfants, bien que des études aient montré des résultats contradictoires (239,241,245). Durrani, *et al.* ont suggéré une implication directe du récepteur IgE de haute affinité (FcεRI) dans ce défaut, car sa liaison croisée sur les APC de patients asthmatiques allergiques est associée à une réduction de la sécrétion d'IFN lors d'une infection par un virus de type RV (245). Après une exacerbation viro-induite chez des enfants atopiques, une régulation à la hausse du récepteur FcεRI sur les monocytes et les DC a été

observée, associée à une augmentation concomitante des cytokines Th2, notamment IL-4 et IL-13 (404), ce qui suggère que l'infection virale respiratoire chez les enfants atopiques pourrait initier une cascade atopique-dépendante qui amplifie l'inflammation des voies respiratoires induite par le virus. Cela pourrait amplifier le remodelage et l'inflammation à long terme. Comme évoqué précédemment, il existe probablement un lien entre le sérotype viral, en particulier de RV, et l'atopie. Nous menons actuellement une analyse complémentaire, non publiée, des paramètres microbiologiques de la cohorte VIRASTHMA 2 (405). Des résultats préliminaires suggèrent que les enfants présentant une infection à RV-C au moment de l'exacerbation (55% des prélèvements) étaient significativement plus atopiques (60% contre 34% dans le reste de la population, $p=0.013$) et en particulier plus sensibilisés aux aéro-allergènes (60% contre 33%, $p=0.009$). Dans la littérature, les RV-C sont particulièrement associés au terrain atopique chez l'enfant, et associés à une modulation de la réponse immunitaire de l'hôte (406,407).

Nous avons mis en évidence les interactions étroites entre inflammation des voies aériennes, réponses antivirales de l'hôte et micro-organismes à l'origine des crises d'asthme. Par conséquent, les nouvelles thérapeutiques ciblant l'inflammation dans l'asthme, comme les biothérapies anti-Th2, pourraient avoir un impact spécifique sur les infections pulmonaires. L'omalizumab reste la biothérapie la plus étudiée dans l'asthme pédiatrique, bien que d'autres aient été expérimentés ces dernières années (408). L'omalizumab est un anticorps monoclonal anti-IgE, qui cible les mécanismes effecteurs de l'inflammation Th2. Après avoir fait la preuve de son efficacité dans des essais cliniques pédiatriques, il a été largement prescrit chez les enfants avec un asthme allergique sévère âgés de plus de 6 ans, ce qui nous permet d'avoir du recul sur son efficacité à plus long terme (409). Dans les études en vie réelle, nous avons observé une efficacité sur le contrôle de l'asthme, et une diminution significative des crises d'asthme chez des enfants exacerbateurs (165). Par conséquent, un effet direct de l'omalizumab sur les exacerbations induites par le RV chez les enfants a été suggéré (410,411). Dans l'étude Preventative Omalizumab or Step-up Therapy for Severe Fall

Exacerbations (PROSE), un essai contrôlé par placebo mené auprès de 478 enfants asthmatiques âgés de 6 à 17 ans et ayant présenté au moins une exacerbation récente, Esquivel, *et al.* ont observé une diminution de la durée des infections à RV, de l'excrétion virale et du risque d'affections induites par le RV chez les patients traités par omalizumab (410). Une étude récemment publiée menée chez des adultes, combinant les résultats de deux essais cliniques, a comparé l'effet de l'omalizumab sur la réponse à une inoculation expérimentale de RV-16 chez des adultes asthmatiques allergiques (412). Les patients traités par omalizumab avaient moins de symptômes d'infection des voies aériennes inférieures dans les quatre premiers jours suivant l'inoculation, suggérant que l'effet protecteur de l'omalizumab sur les exacerbations viro-induites se produirait pendant les premières étapes de l'infection. Teach, *et al.* ont décrit d'autres résultats de l'étude PROSE, comparant l'omalizumab à un placebo et l'omalizumab à un CSI sur le risque de survenue d'exacerbation à l'automne, lorsqu'il était initié 4 à 6 semaines avant le retour à l'école (413). Ils ont enregistré 86 exacerbations, parmi lesquelles 89 % étaient associées à la détection d'un virus des voies respiratoires, le plus souvent le RV (81%). Le taux d'exacerbation à l'automne était significativement plus faible dans le groupe omalizumab, mais il n'y avait pas de différence entre omalizumab et CSI, sauf dans le sous-groupe de patients ayant présenté une exacerbation pendant la phase de "screening". Dans une étude *ex vivo* sur des PBMC prélevées pendant la phase d'intervention, les auteurs ont observé une augmentation des réponses IFN- α après inoculation de RV-A16 dans le groupe traité par omalizumab, suggérant que les mécanismes de protection de l'omalizumab contre les exacerbations pourrait impliquer un effet antiviral dépendant de l'IFN- α . Une autre étude menée chez des enfants exacerbateurs fréquents avant et pendant un traitement par omalizumab a étudié l'effet de l'inoculation *ex vivo* de RV et grippe A sur des cultures de PBMC et pDC, après fixation des IgE sur les récepteurs Fc ϵ RI (414). Les auteurs ont observé que l'omalizumab augmentait à la fois les réponses IFN- α induites par le virus dans les PBMC et les pDC, et réduisait ensuite l'expression du Fc ϵ RI sur les pDC. Dans l'ensemble, la réduction des taux d'exacerbation

d'asthme chez les patients traités par omalizumab était liée aux réponses IFN- α et à l'expression atténuée du Fc ϵ RI sur les pDC.

Les effets d'autres médicaments ciblant les cytokines Th2 et les alarmines, notamment le lebrikizumab (anti IL-13), le dupilumab (anti IL-4R), le reslizumab (anti-IL-5), le benralizumab (anti-IL-5R), le tezepelumab (anti-TSLP) ou les anticorps monoclonaux anti-IL-33, font actuellement l'objet d'études précliniques et cliniques (408). Il est vraisemblable que ces thérapies s'adressent à des sous-groupes de patients dont certaines caractéristiques restent à définir. Si cette hypothèse se vérifie, il faudra identifier les biomarqueurs prédictifs, en particulier non invasifs, de la réponse aux biothérapies, qui pourraient différer entre adultes et enfants. Chez l'enfant, il faudra de plus évaluer l'impact de ces traitements sur la prévention du remodelage bronchique et la préservation de la fonction respiratoire.

IV. L'importance d'analyser l'exposome pour phénotyper les patients, en particulier à l'âge préscolaire

Les enfants exposés à un environnement délétère pourraient constituer un phénotype particulier à l'âge préscolaire. Ainsi, nous avons observé, dans les deux cohortes d'enfants asthmatiques d'âge préscolaire CobraPed (299) et VIRASTHMA 2 (332), une prévalence élevée d'exposition au tabagisme parental : 17% et 50%, respectivement ; voire même *in utero* : 16% et 22%, respectivement. Le tabagisme parental était associé au phénotype asthme sévère dans la cohorte nationale, et au phénotype asthme à facteurs déclenchant multiples, caractérisé par la présence de symptômes intercritiques, dans la cohorte régionale. L'association entre l'exposition au tabagisme parental et les exacerbations sévères d'asthme a déjà été décrite, et rapportée dans une méta-analyse de Wang, *et al.* comprenant 25 études (84). Parmi ces études, seules quatre avaient inclus des enfants d'âge préscolaire et aucune ne se concentrait sur cette population spécifique. Dans la cohorte Unbiased Biomarkers for the Prediction of Respiratory Disease Outcomes (U-BIOPRED), incluant 282 enfants de 5 pays européens, dont 131 enfants d'âge préscolaire, aucune différence n'avait été montrée concernant le tabagisme parental entre les enfants avec un asthme sévère et non sévère (respectivement 15,8% et 16,7%, $p=0,89$) (46). Dans une enquête réalisée chez plus de 20000 enfants d'âge médian de 4 ans, Farber, *et al.* ont montré que le tabagisme maternel augmentait le risque de passage aux urgences pour asthme (415). Nos résultats suggèrent que l'exposition persistante à la fumée de tabac pendant la petite enfance augmente le risque de sévérité de l'asthme et la survenue de symptômes intercritiques chez les enfants exacerbateurs. De plus, dans l'étude CobraPed, les enfants d'âge préscolaire avec asthme sévère avaient un poids de naissance inférieur à celui des enfants avec une atteinte plus modérée, alors que les données biométriques à l'inclusion étaient comparables (299). Des études antérieures ont déjà démontré les interactions entre le poids de naissance, l'exposition au tabagisme *in utero* et la croissance des voies aériennes (80). Nous avons donc mené une analyse complémentaire (non publiée) pour évaluer l'effet du tabagisme *in utero* sur les

paramètres de la fonction pulmonaire. Nous avons observé que le tabagisme *in utero* était associée à une diminution du rapport VEMS/CVF (92,0 % [88,0, 97,0] chez les patients non exposés contre 86,0 % [83,0, 90,0] chez les patients exposés au tabagisme *in utero*, $p=0,014$) et des Z-scores (0,2 [-0,7, 0,8] chez les patients non exposés contre -0,5 [-1,2, -0,4] chez les patients exposés au tabagisme *in utero*, $p=0,017$) chez les enfants d'âge préscolaire. Cette analyse conforte les liens déjà décrits entre exposition au tabagisme *in utero* et augmentation de la réactivité des voies respiratoires (81), réduction de la fonction pulmonaire dans l'enfance (416). Ces données confirment donc le caractère cumulatif de l'exposition au tabagisme pré et postnatal chez certains enfants asthmatiques d'âge préscolaire. L'un des mécanismes à l'origine des symptômes d'asthme dans cette population pourrait être une inflammation accrue au sein des voies aériennes chez les enfants exposés à la fumée de cigarette, via la stimulation des ILC2, comme démontré chez des enfants d'âge préscolaire avec un phénotype d'asthme à facteurs déclenchant multiples (89,207). On peut émettre l'hypothèse que les effets de la fumée de tabac sur le déséquilibre des réponses Th1 et Th2 est majoré dans les premières années de la vie, alors que le système immunitaire est immature et que les voies aériennes en croissance sont exposées aux toxiques de la fumée de cigarette (207,417,418). La fumée de cigarette pourrait également moduler l'inflammation Th17, comme cela a été montré dans notre équipe dans un modèle murin et chez des patients adultes avec BPCO (419). Enfin, de nombreuses études ont confirmé que le tabac pouvait induire une dysbiose, et celle-ci pourrait jouer un rôle favorisant dans le déséquilibre de la réponse immunitaire (420).

Nous avons également constaté chez les enfants asthmatiques préscolaires inclus dans ces 2 cohortes une forte prévalence de l'exposition déclarée aux moisissures / à l'humidité au domicile : 21% chez les enfants de la cohorte CobraPed et 22% chez ceux de la cohorte VIRASTHMA 2, taux sensiblement plus élevés que ceux de la moyenne nationale, autour de 12% selon les données 2010 de l'Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE) (299,332). Dans l'étude CobraPed, la prévalence de l'exposition était

plus élevée dans le groupe asthme sévère : 28% contre 8%, $p < 0,01$. L'association entre exposition aux moisissures et apparition d'un asthme a bien été démontrée dans les études épidémiologiques, principalement en utilisant l'exposition autodéclarée (421–423). En procédant à des inspections minutieuses des maisons parmi des cas d'asthme préscolaire et des cas témoins appariés, Pekkanen, *et al.* ont montré un risque accru d'asthme avec l'augmentation des dommages causés par l'humidité et la présence de moisissures visibles dans la maison de l'enfant (422). Récemment, la même équipe a montré que les dommages causés par l'humidité et la présence de moisissures visibles dans les principales pièces d'habitation de l'enfant à un âge précoce médian de 5 mois étaient significativement associés à des niveaux accrus de FeNO (>75^e percentile) à l'âge de 6 ans. L'impact sur la sévérité a également été confirmé, y-compris chez les enfants préscolaires. Flemming, *et al.* montraient une exposition rapportée sur la déclaration des parents chez 13% des enfants préscolaires non sévères mais 32% des sévères de la cohorte U-BIOPRED (46). En réponse aux moisissures, certains enfants préscolaires pourraient développer une réponse préférentielle de type Th2, à l'origine d'une inflammation éosinophilique préjudiciable et non efficace pour éliminer les agents pathogènes fongiques, plutôt qu'une réponse protectrice Th1/Th17 (58). La sensibilisation fongique pourrait également jouer un rôle important dans ces mécanismes. En particulier, l'impact de la sensibilisation vis-à-vis d'*Alternaria* est bien démontré dans l'asthme sévère et la résistance au traitement chez l'enfant d'âge scolaire (357). Fitzpatrick, *et al.* ont estimé la prévalence de la sensibilisation à *Alternaria* chez l'enfant asthmatique préscolaire en combinant les résultats de 5 cohortes. Celle-ci était particulièrement élevée, de l'ordre de 11%, notamment dans le cluster d'enfants associant une dermatite atopique sévère et une multisensibilisation (424). Les champignons pourraient donc également promouvoir une réaction Th2 par le biais d'allergènes ou en secrétant de puissants adjuvants (*e.g.* protéases).

Au-delà du rôle spécifique du tabagisme et des moisissures, l'identification de phénotypes associés à l'exposition environnementale nous montre qu'il est désormais

indispensable d'évaluer l'exposome dans sa globalité et de mesurer son impact sur la réponse immunitaire dans l'asthme et ses liens avec le microbiote, parfois *via* des modifications épigénétiques. Les nouvelles approches de biologie intégrée de type omiques, les outils numériques avec le "big data", l'"apprentissage automatique" et les études mécanistiques fourniront une manière innovante d'étudier et d'intégrer la complexité de l'exposome et son implication dans les phénotypes observés.

V. La compréhension du rôle précis des interactions hôte - microbiote : le chaînon manquant pour aboutir à une médecine personnalisée ?

Dans le travail mené lors de la mobilité hospitalo-universitaire, dont nous présentons les données dans ce manuscrit, nous avons analysé le métabolome plasmatique d'enfants atopiques, dont les enfants avec un asthme allergique des cohortes VIRASTHMA 1 et 2, et non atopiques, dont les asthmatiques non allergiques de VIRASTHMA 2. En particulier, nous avons identifié un défaut d'acides biliaires secondaires associé à l'atopie. D'autres études ont identifié les acides biliaires comme des métabolites clés associés au type de maladies atopiques, permettant de différencier les enfants avec allergies alimentaires de ceux avec asthme (425), ou associés à la réponse inflammatoire dans la dermatite atopique (328). Ces métabolites, en particulier l'acide désoxycholique et l'acide lithocholique, ont un lien étroit avec le microbiote intestinal, car ils sont générés par l'activité enzymatique microbienne intestinale, et ils ont eux-mêmes une activité antimicrobienne pouvant influencer la composition microbienne de l'intestin (426–428). Des études *in vitro* et chez la souris suggèrent des effets protecteurs des acides biliaires sur l'inflammation allergique des voies respiratoires par le biais de mécanismes multiples. En particulier, ils ont été impliqués dans la différenciation des Treg, et l'inhibition de la différenciation Th17 (429,430). A travers l'exemple des acides biliaires, nous constatons que certains métabolites pourraient servir de biomarqueurs associés à certains asthmes, voire de molécules aux fonctions thérapeutiques. L'analyse extensive de l'ensemble du métabolome, mais aussi du protéome et du transcriptome chez les patients asthmatiques pourrait permettre de comprendre certains liens entre microbiote et asthme. Cela pourrait également permettre d'élucider les relations entre les microbiotes à différents sites, en particulier le "cross talk" triangulaire à distance entre le microbiote intestinal, des voies aériennes et de la peau. Il nous faut également relier ces observations aux caractéristiques de la réponse immune pour préciser leur mode d'action.

Des données récentes suggèrent que des stratégies modulant le microbiote à ces différents sites, comme la transplantation de microbiote, et l'utilisation de certains

antibiotiques, pourraient avoir un certain intérêt dans l'asthme. La transplantation de microbiote sain, déjà utilisée dans les maladies inflammatoires intestinales, semble être une alternative prometteuse (431). Dans une étude préclinique, Arrieta, *et al.* ont démontré que l'inoculation orale de quatre espèces bactériennes précédemment identifiées comme associées au risque d'asthme à des souris exemptes de germes améliorerait l'inflammation allergique des voies respiratoires chez leur progéniture adulte (61). Plusieurs études ont également évalué le bénéfice des prébiotiques et probiotiques, dont les effets bénéfiques incluent un enrichissement des DC régulatrices et des Treg dans les zones d'inflammation (432). Bien que certains effets aient été montrés dans d'autres maladies atopiques, leur intérêt lors de la crise d'asthme reste à évaluer (433,434). Une autre option pourrait consister en l'administration des métabolites de bactéries, qui peuvent mimer l'effet du microbiote normal. Ainsi, l'alimentation de souris enceintes avec des acides gras à chaîne courte (SCFA : Short Chain Fatty Acid), tels que l'acétate, a été associée à une modulation du microbiote maternel et à une protection contre le développement d'une maladie allergique des voies respiratoires chez la progéniture (435). Un nombre croissant d'études sur des modèles expérimentaux d'infections pulmonaires a démontré l'intérêt potentiel de la transplantation de microbiote fécal et/ou de la supplémentation en SCFA, suggérant qu'ils pourraient être efficaces dans les exacerbations induites par des bactéries et des virus (436–438).

Les effets modulateurs potentiels de certains antibiotiques sur les crises d'asthme chez l'enfant font l'objet d'intenses recherches. Tout d'abord, en termes de prévention, Schwerk, *et al.* ont observé un impact positif des antibiotiques à long terme (principalement l'amoxicilline et l'acide amoxicilline-clavulanique) chez les enfants avec un asthme préscolaire sévère et une infection bactérienne positive sur les échantillons de LBA, avec des taux réduits d'exacerbations et d'hospitalisations après 6 mois de suivi par rapport aux taux avant traitement (439). Deuxièmement, les effets immunomodulateurs des macrolides sont bien décrits (440) et ont été évalués dans le traitement de l'asthme aigu chez les enfants. Ainsi, dans l'étude Early Administration of Azithromycin and Prevention of Severe Lower Respiratory

Tract Illnesses in Preschool Children (APRIL), Bacharier, *et al.* ont mené un essai contrôlé par placebo auprès de 607 enfants avec un asthme préscolaire sans traitement de fond, afin de tester l'efficacité de l'azithromycine administrée avant l'apparition de symptôme d'affection des voies aériennes inférieures (158). L'administration de macrolides a réduit le risque d'évolution vers une affection sévère des voies aériennes inférieures (c'est-à-dire nécessitant un traitement par stéroïdes oraux), sans preuve de l'induction d'organismes résistants à l'azithromycine, ni d'effets indésirables. Dans la cohorte Copenhagen Prospective Studies on Asthma in Childhood 2010 (COPSAC2010), des enfants présentant des symptômes récurrents d'asthme, dont certains étaient sous traitement de fond, ont été randomisés pour recevoir soit de l'azithromycine, soit un placebo, en cas de symptômes aigus d'asthme, évoluant depuis au moins 3 jours (157). Les enfants traités par azithromycine avaient une réduction significative de la durée de l'épisode, et l'effet augmentait en cas d'administration précoce du traitement. En revanche, Mandhane, *et al.* ont mené un essai contrôlé par placebo chez des enfants d'âge préscolaire âgés de 12 à 60 mois, se présentant aux urgences avec une respiration sifflante, afin d'évaluer l'effet de l'azithromycine (441). Ils n'ont pas montré de réduction de la durée des symptômes respiratoires dans le groupe traité, ni du délai jusqu'à l'exacerbation suivante après 6 mois de suivi. Ainsi, les preuves de l'efficacité de l'azithromycine comme traitement préventif des crises d'asthme sont encore limitées (442). En outre, des études ont été menées chez des patients adultes pour tester l'effet de l'azithromycine comme stratégie préventive, avec des résultats contradictoires (443–445). Notamment, Gibson, *et al.* ont décrit dans un essai contrôlé contre placebo qu'un traitement d'entretien de 48 semaines avec l'azithromycine diminuait la fréquence des exacerbations d'asthme et améliorait la qualité de vie dans l'asthme persistant malgré un traitement de fond (444). Dans une méta-analyse reprenant les trois principales études menées chez l'adulte (443–445), le traitement d'entretien par azithromycine était associé à une réduction du taux d'exacerbations dans l'asthme ainsi que dans tous les sous-groupes (asthme non éosinophilique, éosinophilique et asthme sévère), et à une bonne tolérance (446). En

examinant chaque type d'exacerbation séparément, les patients souffrant d'asthme éosinophilique rapportaient moins de recours aux corticostéroïdes oraux, et les patients souffrant d'asthme non éosinophilique et sévère rapportaient moins de recours aux antibiotiques. Un effet spécifique des macrolides dans l'asthme neutrophilique avait déjà été rapporté par Simpson, *et al.* chez des sujets adultes souffrant d'asthme réfractaire sévère, traités par clarithromycine pendant 8 semaines (447). Le traitement par clarithromycine était associé à une réduction des concentrations d'IL-8 et de neutrophiles dans les expectorations, entraînant une diminution des concentrations d'élastase neutrophile et de matrix metallopeptidase 9 (MMP9). Enfin, le prétraitement *in vitro* par la clarithromycine de cultures d'AEC de patients asthmatiques diminue la production des cytokines inflammatoires IL-1 β , IL-6 et IL-33 en réponse au RV14, suggérant un effet antiviral direct (448). L'azithromycine réduit également *in vitro* la réplication du RV dans les cultures d'AEC augmentant la production des IFN et de certains ISG (449). Bien que les macrolides et plus particulièrement l'azithromycine constituent une stratégie attrayante dans l'asthme aigu, des études supplémentaires sont nécessaires pour identifier les phénotypes de répondeurs potentiels et les éventuels effets indésirables. Comme les antibiotiques ont aussi pour effets indésirables d'éliminer les bactéries commensales qui protègent du développement de l'asthme, leur utilisation actuellement n'a pas fait la preuve de son efficacité (450).

Dans les années à venir, de nouvelles études devront être menées pour explorer l'effet de ces nouvelles thérapeutiques, chez les enfants asthmatiques allergiques et non allergiques, afin de comprendre leurs effets immunologiques et leur potentiel effet sur l'histoire naturelle de la maladie, pour déterminer les profils de patients bons répondeurs. Plus important encore, des études spécifiques devront être menées chez les enfants dès l'âge préscolaire, avec des critères d'évaluation appropriés. Cet effort contribuera à entrer dans l'ère de la médecine de précision.

PERSPECTIVES ET CONCLUSION

I. L'utilisation d'un modèle préclinique murin pour caractériser le défaut de réponse aux virus respiratoires et identifier des cibles thérapeutiques potentielles

Les données cliniques montrent bien le rôle prépondérant des infections virales de la prime enfance dans le développement et l'histoire naturelle de l'asthme. Les modèles expérimentaux murins pourraient faciliter la compréhension des mécanismes impliqués dans les interactions entre infections virales et immaturité des réponses immunitaires. En parallèle des travaux présentés ici, au cours du Master 2 et de la thèse, j'ai travaillé sur la mise au point d'un modèle préclinique murin d'infection virale chez le nouveau-né. Ce travail a été effectué en collaboration avec l'équipe des Dr David Torres et Dr Véronique Flamand (Institut d'Immunologie Médicale, Université Libre de Bruxelles, Gosselies, Belgique) qui dispose de la plateforme technique et d'animalerie adaptée à ce modèle néonatal. J'ai été encadrée lors de ces expérimentations et j'ai suivi et validé la formation à l'expérimentation animale (ex-niveaux 1 et 2) au cours de la deuxième année pour obtenir plus d'autonomie.

Nous avons d'abord réalisé des expérimentations *in vitro*, par isolement et culture d'AEC extraites par isolement de trachées de souris âgées de trois jours (cellules J3), 7 jours (cellules J7) et de souris adultes (cellules adultes). Pour nos expérimentations, nous avons mis les cellules en présence de virus pendant 24 heures et 48 heures lorsqu'elles étaient confluentes. Nous avons étudié la vitalité cellulaire par test colorimétrique et confirmé l'infection virale par mesure de l'expression d'un gène viral. Nous avons ensuite analysé les réponses cellulaires par étude de l'expression de gènes de la réponse antivirale et inflammatoire et dosages protéiques au sein des surnageants de culture. Nous avons déjà testé 3 souches de virus respiratoires sur ce modèle : VRS de sérotype A2 (souche clinique, Dr Ilka Engelmann, laboratoire de virologie du CHU de Lille), RV de sérotype 1B (ATCC, RV de groupe mineur ayant la capacité d'infecter les AEC murines en interagissant avec le LDL récepteur présent à la surface), et PVM (Dr Laurent Gilet, Université de Liège, Belgique), analogue murin du VRS.

En réponse au VRS, nous avons identifié un défaut d'expression de TLR7/8 au sein des AEC de J3 et J7 par rapport aux AEC adultes, sans qu'il n'y ait de différence sur l'expression d'IRF7. Nous n'avons pas montré de différence dans la réponse IFN, mais une modulation de l'expression de l'alarmine IL-33, plus fortement induite au sein des cellules J3. En réponse au RV, nous avons identifié un défaut d'expression de TLR7 et IRF7 au sein des AEC de J3 et J7 par rapport aux AEC adultes. Nous n'avons pas montré de différence dans la réponse IFN, mais une tendance à une réponse inflammatoire (IL-6 et CXCL1) moins marquée au sein des AEC de J3 et J7 qu'au sein des AEC adultes. Contrairement au VRS, une plus faible induction d'IL-33 a été observée au sein des AEC J3 et J7. Concernant le PVM, nous avons eu des difficultés en lien avec la production et la quantification du virus. Peu d'équipes ont étudié ce virus et à notre connaissance, il n'y a pas eu d'expérimentation *in vitro* sur les AEC. On peut donc supposer que nos manipulations n'ont pas été effectuées avec une dose ou à des temps optimaux. On peut également émettre l'hypothèse que les AEC ne sont pas les cibles cellulaires préférentielles du PVM, contrairement aux macrophages.

Ces travaux préliminaires semblent identifier des altérations de la réponse antivirale dans les AEC de nouveau-né. La poursuite de la caractérisation de la réponse inflammatoire induite par les virus pneumotropes chez le nouveau-né, puis l'impact sur le développement de l'asthme chez la souris n'a pas pu être effectuée au cours de la thèse mais nous envisageons la poursuite du développement de ce modèle au laboratoire. Je me propose d'encadrer dans les prochains mois un étudiant en Master 2 dont le projet sera centré sur ce travail. L'objectif du projet sera de confirmer ces données dans un modèle murin d'infection chez le souriceau avec l'inoculation de VRS et de RV. Nous étudierons les réponses antivirales et inflammatoires du poumon (IFN de type I et III, chimiokines et alarmines) ainsi que l'expression des principaux gènes d'intérêt au sein des cellules pulmonaires triées : cellules épithéliales bronchiques obtenues par microdissection, macrophages et DC séparées après tri par cyrtométrie en flux. Sur ces différents échantillons, nous analyserons l'expression des ARNm et protéines en ciblant les principaux éléments de la réponse antivirale et

inflammatoire à ces virus. Des modèles de coculture AEC / DC pourront être utilisés pour préciser les interactions cellulaires propres à ce contexte néonatal. A terme, ces expérimentations devraient permettre de caractériser le défaut de réponse des AEC et de déterminer s'il existe des spécificités de réponse au VRS et au RV. Cette étude permettra ensuite d'envisager la répétition du modèle d'infection chez des souriceaux ayant un prédisposition Th2, par sensibilisation *in utero* aux acariens de la poussière de maison (451).

II. La poursuite de l'analyse des profils de réponse inflammatoires et antivirales au moment de l'exacerbation chez les enfants de la cohorte VIRASTHMA 2.

Dans le cadre du poste prévu de MCU-PH en Pédiatrie à partir de septembre 2021, je poursuivrai l'analyse des données de la cohorte VIRASTHMA 2 par d'autres stratégies, avec pour but l'identification de profils associés à certains groupes de patients. Ces travaux futurs se déclinent en cinq aspects principaux :

1/ Sur le plan microbiologique, comme cité précédemment, nous avons débuté avec les laboratoires de virologie (Dr Ilka Engelmann) et de bactériologie (Pr Rodrigue Dessein) du CHU de Lille une analyse complémentaire portant sur les sérotypes de RV et la présence d'une virémie. J'encadre pour ce travail, qui mènera à la soumission d'un article en anglais dans une revue à comité de relecture, une étudiante en DIU de Pneumologie Pédiatrique.

2/ A l'aide des biostatisticiens du CHU de Lille et des bio-informaticiens de la plateforme BiLille, nous allons mener des analyses multivariées (à type d'analyses en composantes principales, études de clusters avec regroupement hiérarchiques) incluant les concentrations de cytokines à l'exacerbation et à l'état stable, avant et après mise en culture, pour définir si certains profils sont associés à des phénotypes cliniques spécifiques.

3/ D'un point de vue mécanistique, nous compléterons ces analyses par l'étude des profils d'activation des cellules mononuclées dans le sang et l'expectoration (LT, DC et cellules lymphoïdes innées mesurés par cytométrie de flux).

4/ Afin d'explorer les autres facteurs environnementaux impliqués dans les exacerbations, les taux de particules de pollution au moment des exacerbations (obtenues par la plateforme Atmo Hauts-de-France) seront analysés en relation avec la réponse inflammatoire. J'encadrerai une étudiante en DES de Pédiatrie, Option Pneumologie, pour la réalisation de ce travail.

5/ La cohorte VIRASTHMA 2 constitue désormais une cohorte de référence dans notre région. Nous comparerons les données issues de cette étude aux données cliniques et aux profils inflammatoires d'enfants inclus dans une étude qui va être mise en place d'ici

septembre 2021, dont je serai investigateur principal, et visant à étudier l'impact de la pandémie COVID-19 sur le contrôle de l'asthme chez l'enfant dans la grande région G4.

Ces différentes approches permettront de mieux comprendre les interactions entre phénotypes et endotypes, sous le contrôle de l'environnement, et d'évaluer les conséquences des modifications de notre mode de vie liées à la pandémie COVID-19 sur ces interactions.

III. La poursuite des études omiques, en particulier transcriptomiques, métabolomiques et protéomiques, pour comprendre l'implication du microbiote, en collaboration avec l'université de Stanford

Au cours du post-doctorat, je poursuivrai les travaux initiés avec l'équipe de Pr Kari Nadeau, au Sean Parker Center for Allergy and Asthma Research, à l'université de Stanford. En particulier, je poursuivrai le projet "multi-OMICS", comprenant le travail de métabolomique mais aussi une étude protéomique, déjà initiée, et un projet de transcriptomique, incluant des échantillons des cohortes VIRASTHMA 1 et 2, et dont le but sera de mieux comprendre l'implication du microbiote dans l'asthme atopique, mais aussi d'identifier des biomarqueurs associés aux profils cliniques. Notre collaboration sera rendue effective par la tenue de visio-conférences régulières et de visite bidirectionnelles. De plus, à plus long terme, ces approches omiques permettront de mieux définir les spécificités liées aux différents profils de maladies allergiques.

IV. L'analyse des trajectoires cliniques et fonctionnelles d'évolution des enfants inclus dans les cohortes CobraPed et VIRASTHMA 2

Au cours des prochaines années, nous mettrons ces résultats en perspective de l'évolution de l'asthme, en étudiant les trajectoires cliniques et fonctionnelles des enfants inclus. En effet, les enfants inclus dans la cohorte CobraPed sont entrés dans un suivi prospectif jusqu'à l'âge adulte avec évaluations annuelles. Nous avons également constitué à partir de l'étude VIRASTHMA 2 une étude ancillaire portant sur les patients inclus à Lille (n=104) et proposant un suivi jusqu'à l'âge de 17 ans. D'après les données de la littérature (10), nous émettons l'hypothèse que plusieurs trajectoires vont être mises en évidence, en particulier sur le plan fonctionnel et que certains patients auront une altération précoce de la fonction respiratoire, pouvant évoluer vers la BPCO du jeune adulte. Nous disposerons également pour ces 2 cohortes des données d'évolution des profils de sensibilisations allergiques. Il sera également intéressant de mettre en parallèle ces trajectoires d'évolution avec la réponse inflammatoire observée à l'âge préscolaire. Ceci nous permettra d'appréhender le caractère dynamique des mécanismes intervenant dans l'asthme de l'enfant.

En conclusion, les travaux réalisés au cours de la thèse confirment que les mécanismes sous-tendant l'asthme au cours de l'enfance peuvent varier en fonction de la catégorie d'âge. Les études présentées suggèrent que différents mécanismes sont impliqués dans l'hétérogénéité de l'asthme à l'âge pédiatrique, et, par conséquent, constituent des cibles pour de nouvelles approches thérapeutiques. La prévention, la compréhension et la gestion efficace des crises d'asthme restent l'un des besoins non satisfaits dans l'asthme sévère de l'enfant, en particulier chez les enfants préscolaires. Une meilleure prise en compte de l'exposome associé à une meilleure définition de la diversité des mécanismes impliqués, de leur caractère dynamique, et de leur impact sur l'évolution de la maladie permettra une meilleure prise en charge des patients. Les outils numériques et les études mécanistiques fourniront une manière innovante d'étudier et d'intégrer la complexité de la réponse immunitaire et son implication dans les phénotypes observés.

À l'ère de la médecine de précision, les interventions précoces ciblant les expositions environnementales, les réponses immunitaires des muqueuses, les infections pulmonaires et le microbiote, dans la petite enfance, pourraient modifier l'histoire naturelle et avoir un impact positif sur la trajectoire de l'asthme pédiatrique.

Enfin, pour comprendre l'asthme de l'enfant et le traiter, il sera essentiel de garder à l'esprit les fonctions évolutives fondamentales des divers compartiments pulmonaires, et d'équilibrer les potentiels rôles néfastes des interventions ciblées destinées à prévenir et traiter la pathologie asthmatique. Il est clair que le risque d'asthme a évolué au cours de la dernière génération, mais c'est en identifiant les causes profondes (comportements, exposition, colonisation antigénique et microbienne, etc) et en les ciblant que l'on obtiendra la meilleure fenêtre thérapeutique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Castillo JR, Peters SP, Busse WW. Asthma Exacerbations: Pathogenesis, Prevention, and Treatment. *J Allergy Clin Immunol Pract.* août 2017;5(4):918-27.
2. Saglani S, Fleming L, Sonnappa S, Bush A. Advances in the aetiology, management, and prevention of acute asthma attacks in children. *Lancet Child Adolesc Health.* mai 2019;3(5):354-64.
3. Shaw TE, Currie GP, Koudelka CW, Simpson EL. Eczema prevalence in the United States: data from the 2003 National Survey of Children's Health. *J Invest Dermatol.* janv 2011;131(1):67-73.
4. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Allergy Clin Immunol.* févr 2014;133(2):291-307; quiz 308.
5. Dharmage SC, Perret JL, Custovic A. Epidemiology of Asthma in Children and Adults. *Front Pediatr.* 2019;7:246.
6. Delmas M-C, Guignon N, Leynaert B, Moisy M, Marguet C, Fuhrman C. [Increase in asthma prevalence among young children in France]. *Rev Mal Respir.* mai 2017;34(5):525-34.
7. Renz H, Holt PG, Inouye M, Logan AC, Prescott SL, Sly PD. An exposome perspective: Early-life events and immune development in a changing world. *J Allergy Clin Immunol.* juill 2017;140(1):24-40.
8. Ganguly A, Martin RJ. Vulnerability of the developing airway. *Respir Physiol Neurobiol.* déc 2019;270:103263.
9. Morgan WJ, Stern DA, Sherrill DL, Guerra S, Holberg CJ, Guilbert TW, et al. Outcome of asthma and wheezing in the first 6 years of life: follow-up through adolescence. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 nov 2005;172(10):1253-8.
10. McGeachie MJ, Yates KP, Zhou X, Guo F, Sternberg AL, Van Natta ML, et al. Patterns of Growth and Decline in Lung Function in Persistent Childhood Asthma. *N Engl J Med.* 12 mai 2016;374(19):1842-52.
11. Kumar R, Yu Y, Story RE, Pongracic JA, Gupta R, Pearson C, et al. Prematurity, chorioamnionitis, and the development of recurrent wheezing: a prospective birth cohort study. *J Allergy Clin Immunol.* avr 2008;121(4):878-884.e6.
12. den Dekker HT, Sonnenschein-van der Voort AMM, de Jongste JC, Anessi-Maesano I, Arshad SH, Barros H, et al. Early growth characteristics and the risk of reduced lung function and asthma: A meta-analysis of 25,000 children. *J Allergy Clin Immunol.* avr 2016;137(4):1026-35.
13. Stick S. Pediatric origins of adult lung disease. 1. The contribution of airway development to paediatric and adult lung disease. *Thorax.* juill 2000;55(7):587-94.

14. O'Reilly R, Ullmann N, Irving S, Bossley CJ, Sonnappa S, Zhu J, et al. Increased airway smooth muscle in preschool wheezers who have asthma at school age. *J Allergy Clin Immunol.* avr 2013;131(4):1024-32, 1032.e1-16.
15. Saglani S, Bush A. Onset of Structural Airway Changes in Preschool Wheezers. A Window and Target for Secondary Asthma Prevention? *Am J Respir Crit Care Med.* 15 juill 2015;192(2):121-2.
16. Lezmi G, Deschildre A, Abou Taam R, Fayon M, Blanchon S, Troussier F, et al. Remodelling and inflammation in preschoolers with severe recurrent wheeze and asthma outcome at school age. *Clin Exp Allergy.* 2018;48(7):806-13.
17. Vanhoutte PM. Airway epithelium-derived relaxing factor: myth, reality, or naivety? *Am J Physiol Cell Physiol.* 1 mai 2013;304(9):C813-820.
18. Li S, Koziol-White C, Jude J, Jiang M, Zhao H, Cao G, et al. Epithelium-generated neuropeptide Y induces smooth muscle contraction to promote airway hyperresponsiveness. *J Clin Invest.* 2 mai 2016;126(5):1978-82.
19. Basha S, Surendran N, Pichichero M. Immune responses in neonates. *Expert Rev Clin Immunol.* sept 2014;10(9):1171-84.
20. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol.* mai 2007;7(5):379-90.
21. Willems F, Vollstedt S, Suter M. Phenotype and function of neonatal DC. *Eur J Immunol.* janv 2009;39(1):26-35.
22. Borràs FE, Matthews NC, Lowdell MW, Navarrete CV. Identification of both myeloid CD11c+ and lymphoid CD11c- dendritic cell subsets in cord blood. *Br J Haematol.* juin 2001;113(4):925-31.
23. Angelone DF, Wessels MR, Coughlin M, Suter EE, Valentini P, Kalish LA, et al. Innate immunity of the human newborn is polarized toward a high ratio of IL-6/TNF-alpha production in vitro and in vivo. *Pediatr Res.* août 2006;60(2):205-9.
24. De Wit D, Orlslagers V, Goriely S, Vermeulen F, Wagner H, Goldman M, et al. Blood plasmacytoid dendritic cell responses to CpG oligodeoxynucleotides are impaired in human newborns. *Blood.* 1 févr 2004;103(3):1030-2.
25. Lee H-H, Hoeman CM, Hardaway JC, Guloglu FB, Ellis JS, Jain R, et al. Delayed maturation of an IL-12-producing dendritic cell subset explains the early Th2 bias in neonatal immunity. *J Exp Med.* 29 sept 2008;205(10):2269-80.
26. Nelson DJ, Holt PG. Defective regional immunity in the respiratory tract of neonates is attributable to hyporesponsiveness of local dendritic cells to activation signals. *J Immunol.* 1 oct 1995;155(7):3517-24.
27. Roux X, Remot A, Petit-Camurdan A, Nahori M-A, Kiefer-Biasizzo H, Marchal G, et al. Neonatal lung immune responses show a shift of cytokines and transcription factors toward Th2 and a deficit in conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* oct 2011;41(10):2852-61.

28. Le Garff-Tavernier M, Béziat V, Decocq J, Siguret V, Gandjbakhch F, Pautas E, et al. Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell*. août 2010;9(4):527-35.
29. Cairo C, Mancino G, Cappelli G, Pauza CD, Galli E, Brunetti E, et al. Vdelta2 T-lymphocyte responses in cord blood samples from Italy and Côte d'Ivoire. *Immunology*. juill 2008;124(3):380-7.
30. Webster RB, Rodriguez Y, Klimecki WT, Vercelli D. The human IL-13 locus in neonatal CD4+ T cells is refractory to the acquisition of a repressive chromatin architecture. *J Biol Chem*. 5 janv 2007;282(1):700-9.
31. Burt TD. Fetal regulatory T cells and peripheral immune tolerance in utero: implications for development and disease. *Am J Reprod Immunol*. avr 2013;69(4):346-58.
32. Wang G, Miyahara Y, Guo Z, Khatat M, Stepkowski SM, Chen W. « Default » generation of neonatal regulatory T cells. *J Immunol*. 1 juill 2010;185(1):71-8.
33. Belderbos ME, Levy O, Meyaard L, Bont L. Plasma-mediated immune suppression: a neonatal perspective. *Pediatr Allergy Immunol*. mars 2013;24(2):102-13.
34. Brodin P, Jojic V, Gao T, Bhattacharya S, Angel CJL, Furman D, et al. Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell*. 15 janv 2015;160(1-2):37-47.
35. Custovic A, Sonntag H-J, Buchan IE, Belgrave D, Simpson A, Prospero MCF. Evolution pathways of IgE responses to grass and mite allergens throughout childhood. *J Allergy Clin Immunol*. déc 2015;136(6):1645-1652.e8.
36. Hose AJ, Depner M, Illi S, Lau S, Keil T, Wahn U, et al. Latent class analysis reveals clinically relevant atopy phenotypes in 2 birth cohorts. *J Allergy Clin Immunol*. juin 2017;139(6):1935-1945.e12.
37. Illi S, von Mutius E, Lau S, Niggemann B, Grüber C, Wahn U, et al. Perennial allergen sensitisation early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study. *Lancet*. 26 août 2006;368(9537):763-70.
38. Gabet S, Just J, Couderc R, Bousquet J, Seta N, Momas I. Early polysensitization is associated with allergic multimorbidity in PARIS birth cohort infants. *Pediatr Allergy Immunol*. 2016;27(8):831-7.
39. Boldogh I, Bacsi A, Choudhury BK, Dharajiya N, Alam R, Hazra TK, et al. ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation. *J Clin Invest*. août 2005;115(8):2169-79.
40. Hammad H, Lambrecht BN. Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity*. 21 juill 2015;43(1):29-40.
41. Al-Ghoulé A, Johal R, Sharquie IK, Emara M, Harrington H, Shakib F, et al. The glycosylation pattern of common allergens: the recognition and uptake of Der p 1 by epithelial and dendritic cells is carbohydrate dependent. *PLoS One*. 2012;7(3):e33929.

42. Chinthrajah RS, Hernandez JD, Boyd SD, Galli SJ, Nadeau KC. Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *J Allergy Clin Immunol.* avr 2016;137(4):984-97.
43. Belkaid Y, Harrison OJ. Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity.* 18 2017;46(4):562-76.
44. Takai T, Ikeda S. Barrier dysfunction caused by environmental proteases in the pathogenesis of allergic diseases. *Allergol Int.* mars 2011;60(1):25-35.
45. Palmer CNA, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet.* avr 2006;38(4):441-6.
46. Fleming L, Murray C, Bansal AT, Hashimoto S, Bisgaard H, Bush A, et al. The burden of severe asthma in childhood and adolescence: results from the paediatric U-BIOPRED cohorts. *Eur Respir J.* nov 2015;46(5):1322-33.
47. Choi H, Song W-M, Zhang B. Linking childhood allergic asthma phenotypes with endotype through integrated systems biology: current evidence and research needs. *Rev Environ Health.* 1 mars 2017;32(1-2):55-63.
48. Deschildre A, Rancé F. La marche atopique existe-t-elle ? *Revue Française d'Allergologie.* 1 avr 2009;49(3):244-6.
49. Illi S, von Mutius E, Lau S, Nickel R, Grüber C, Niggemann B, et al. The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* mai 2004;113(5):925-31.
50. Belgrave DCM, Granell R, Simpson A, Guiver J, Bishop C, Buchan I, et al. Developmental profiles of eczema, wheeze, and rhinitis: two population-based birth cohort studies. *PLoS Med.* oct 2014;11(10):e1001748.
51. Lack G. Epidemiologic risks for food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* juin 2008;121(6):1331-6.
52. Du Toit G, Sampson HA, Plaut M, Burks AW, Akdis CA, Lack G. Food allergy: Update on prevention and tolerance. *J Allergy Clin Immunol.* janv 2018;141(1):30-40.
53. Du Toit G, Roberts G, Sayre PH, Bahnson HT, Radulovic S, Santos AF, et al. Randomized trial of peanut consumption in infants at risk for peanut allergy. *N Engl J Med.* 26 févr 2015;372(9):803-13.
54. Santiago HC, Nutman TB. Human Helminths and Allergic Disease: The Hygiene Hypothesis and Beyond. *Am J Trop Med Hyg.* 5 oct 2016;95(4):746-53.
55. Fagerås Böttcher M, Hmani-Aifa M, Lindström A, Jenmalm MC, Mai X-M, Nilsson L, et al. A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children. *J Allergy Clin Immunol.* sept 2004;114(3):561-7.

56. Geoghegan JA, Irvine AD, Foster TJ. Staphylococcus aureus and Atopic Dermatitis: A Complex and Evolving Relationship. *Trends Microbiol.* juin 2018;26(6):484-97.
57. Barcik W, Boutin RCT, Sokolowska M, Finlay BB. The Role of Lung and Gut Microbiota in the Pathology of Asthma. *Immunity.* 18 févr 2020;52(2):241-55.
58. Bartemes KR, Kita H. Innate and adaptive immune responses to fungi in the airway. *J Allergy Clin Immunol.* août 2018;142(2):353-63.
59. Rook GAW. Hygiene and other early childhood influences on the subsequent function of the immune system. *Dig Dis.* 2011;29(2):144-53.
60. Tang HHF, Teo SM, Sly PD, Holt PG, Inouye M. The intersect of genetics, environment, and microbiota in asthma-perspectives and challenges. *J Allergy Clin Immunol.* mars 2021;147(3):781-93.
61. Arrieta M-C, Stiemsma LT, Dimitriu PA, Thorson L, Russell S, Yurist-Doutsch S, et al. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci Transl Med.* 30 sept 2015;7(307):307ra152.
62. Stiemsma LT, Michels KB. The Role of the Microbiome in the Developmental Origins of Health and Disease. *Pediatrics.* 2018;141(4).
63. Bisgaard H, Hermansen MN, Buchvald F, Loland L, Halkjaer LB, Bønnelykke K, et al. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. *N Engl J Med.* 11 oct 2007;357(15):1487-95.
64. Larsen JM, Brix S, Thysen AH, Birch S, Rasmussen MA, Bisgaard H. Children with asthma by school age display aberrant immune responses to pathogenic airway bacteria as infants. *J Allergy Clin Immunol.* avr 2014;133(4):1008-13.
65. Waser M, Michels KB, Bieli C, Flöistrup H, Pershagen G, von Mutius E, et al. Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe. *Clin Exp Allergy.* mai 2007;37(5):661-70.
66. Stein MM, Hrusch CL, Gozdz J, Igartua C, Pivniouk V, Murray SE, et al. Innate Immunity and Asthma Risk in Amish and Hutterite Farm Children. *N Engl J Med.* 4 août 2016;375(5):411-21.
67. Ruokolainen L, Paalanen L, Karkman A, Laatikainen T, von Hertzen L, Vlasoff T, et al. Significant disparities in allergy prevalence and microbiota between the young people in Finnish and Russian Karelia. *Clin Exp Allergy.* mai 2017;47(5):665-74.
68. Ruokolainen L, Parkkola A, Karkman A, Sinkko H, Peet A, Hämäläinen A-M, et al. Contrasting microbiotas between Finnish and Estonian infants: Exposure to *Acinetobacter* may contribute to the allergy gap. *Allergy.* sept 2020;75(9):2342-51.
69. Kirjavainen PV, Karvonen AM, Adams RI, Täubel M, Roponen M, Tuoresmäki P, et al. Farm-like indoor microbiota in non-farm homes protects children from asthma development. *Nat Med.* juill 2019;25(7):1089-95.

70. Depner M, Taft DH, Kirjavainen PV, Kalanetra KM, Karvonen AM, Peschel S, et al. Maturation of the gut microbiome during the first year of life contributes to the protective farm effect on childhood asthma. *Nat Med.* nov 2020;26(11):1766-75.
71. Kim H, Sitarik AR, Woodcroft K, Johnson CC, Zoratti E. Birth Mode, Breastfeeding, Pet Exposure, and Antibiotic Use: Associations With the Gut Microbiome and Sensitization in Children. *Curr Allergy Asthma Rep.* 11 mars 2019;19(4):22.
72. Stokholm J, Thorsen J, Chawes BL, Schjørring S, Krogfelt KA, Bønnelykke K, et al. Cesarean section changes neonatal gut colonization. *J Allergy Clin Immunol.* sept 2016;138(3):881-889.e2.
73. Patrick DM, Sbihi H, Dai DLY, Al Mamun A, Rasali D, Rose C, et al. Decreasing antibiotic use, the gut microbiota, and asthma incidence in children: evidence from population-based and prospective cohort studies. *Lancet Respir Med.* 24 mars 2020;
74. Hufnagl K, Pali-Schöll I, Roth-Walter F, Jensen-Jarolim E. Dysbiosis of the gut and lung microbiome has a role in asthma. *Semin Immunopathol.* févr 2020;42(1):75-93.
75. Loewen K, Monchka B, Mahmud SM, 't Jong G, Azad MB. Prenatal antibiotic exposure and childhood asthma: a population-based study. *Eur Respir J.* 2018;52(1).
76. Hoskin-Parr L, Teyhan A, Blocker A, Henderson AJW. Antibiotic exposure in the first two years of life and development of asthma and other allergic diseases by 7.5 yr: a dose-dependent relationship. *Pediatr Allergy Immunol.* déc 2013;24(8):762-71.
77. Ojwang V, Nwaru BI, Takkinen H-M, Kaila M, Niemelä O, Haapala A-M, et al. Early exposure to cats, dogs and farm animals and the risk of childhood asthma and allergy. *Pediatr Allergy Immunol.* avr 2020;31(3):265-72.
78. Wang B, Chen H, Chan YL, Wang G, Oliver BG. Why Do Intrauterine Exposure to Air Pollution and Cigarette Smoke Increase the Risk of Asthma? *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:38.
79. Stoddard JJ, Gray B. Maternal smoking and medical expenditures for childhood respiratory illness. *Am J Public Health.* févr 1997;87(2):205-9.
80. Bjerg A, Hedman L, Perzanowski M, Lundbäck B, Rönmark E. A strong synergism of low birth weight and prenatal smoking on asthma in schoolchildren. *Pediatrics.* avr 2011;127(4):e905-912.
81. Cohen RT, Raby BA, Van Steen K, Fuhlbrigge AL, Celedón JC, Rosner BA, et al. In utero smoke exposure and impaired response to inhaled corticosteroids in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* sept 2010;126(3):491-7.
82. McEvoy CT, Spindel ER. Pulmonary Effects of Maternal Smoking on the Fetus and Child: Effects on Lung Development, Respiratory Morbidities, and Life Long Lung Health. *Paediatr Respir Rev.* janv 2017;21:27-33.
83. Gibbs K, Collaco JM, McGrath-Morrow SA. Impact of Tobacco Smoke and Nicotine Exposure on Lung Development. *Chest.* févr 2016;149(2):552-61.

84. Wang Z, May SM, Charoenlap S, Pyle R, Ott NL, Mohammed K, et al. Effects of secondhand smoke exposure on asthma morbidity and health care utilization in children: a systematic review and meta-analysis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* nov 2015;115(5):396-401.e2.
85. Tinuoye O, Pell JP, Mackay DF. Meta-analysis of the association between secondhand smoke exposure and physician-diagnosed childhood asthma. *Nicotine Tob Res.* sept 2013;15(9):1475-83.
86. Andrews AL, Shirley N, Ojukwu E, Robinson M, Torok M, Wilson KM. Is secondhand smoke exposure associated with increased exacerbation severity among children hospitalized for asthma? *Hosp Pediatr.* mai 2015;5(5):249-55.
87. Hollenbach JP, Schifano ED, Hammel C, Cloutier MM. Exposure to secondhand smoke and asthma severity among children in Connecticut. *PLoS One.* 2017;12(3):e0174541.
88. Pyle RC, Divekar R, May SM, Narla N, Pianosi PT, Hartz MF, et al. Asthma-associated comorbidities in children with and without secondhand smoke exposure. *Ann Allergy Asthma Immunol.* sept 2015;115(3):205-10.
89. Kalliola S, Pelkonen AS, Malmberg LP, Sarna S, Hämäläinen M, Mononen I, et al. Maternal smoking affects lung function and airway inflammation in young children with multiple-trigger wheeze. *J Allergy Clin Immunol.* mars 2013;131(3):730-5.
90. Bui DS, Lodge CJ, Burgess JA, Lowe AJ, Perret J, Bui MQ, et al. Childhood predictors of lung function trajectories and future COPD risk: a prospective cohort study from the first to the sixth decade of life. *Lancet Respir Med.* juill 2018;6(7):535-44.
91. Prunicki M, Stell L, Dinakarandian D, de Planell-Saguer M, Lucas RW, Hammond SK, et al. Exposure to NO₂, CO, and PM_{2.5} is linked to regional DNA methylation differences in asthma. *Clin Epigenetics.* 2018;10:2.
92. Rosser F, Forno E, Kurland KS, Han Y-Y, Mair C, Acosta-Pérez E, et al. Annual SO₂ exposure, asthma, atopy, and lung function in Puerto Rican children. *Pediatr Pulmonol.* févr 2020;55(2):330-7.
93. Sbihi H, Tamburic L, Koehoorn M, Brauer M. Perinatal air pollution exposure and development of asthma from birth to age 10 years. *Eur Respir J.* avr 2016;47(4):1062-71.
94. Sompornrattanaphan M, Thongngarm T, Ratanawatkul P, Wongsa C, Swigris JJ. The contribution of particulate matter to respiratory allergy. *Asian Pac J Allergy Immunol.* mars 2020;38(1):19-28.
95. Ribeiro H, Guimarães F, Duque L, Noronha F, Abreu I. Characterisation of particulate matter on airborne pollen grains. *Environ Pollut.* nov 2015;206:7-16.
96. Rosa MJ, Lee AG, Wright RJ. Evidence establishing a link between prenatal and early-life stress and asthma development. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* avr 2018;18(2):148-58.
97. Eguluz-Gracia I, Mathioudakis AG, Bartel S, Vijverberg SJH, Fuertes E, Comberati P, et al. The need for clean air: The way air pollution and climate change affect allergic rhinitis and asthma. *Allergy.* sept 2020;75(9):2170-84.

98. Miles EA, Calder PC. Can Early Omega-3 Fatty Acid Exposure Reduce Risk of Childhood Allergic Disease? *Nutrients*. 21 juill 2017;9(7).
99. Dunstan JA, Mori TA, Barden A, Beilin LJ, Taylor AL, Holt PG, et al. Fish oil supplementation in pregnancy modifies neonatal allergen-specific immune responses and clinical outcomes in infants at high risk of atopy: a randomized, controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. déc 2003;112(6):1178-84.
100. Bisgaard H, Stokholm J, Chawes BL, Vissing NH, Bjarnadóttir E, Schoos A-MM, et al. Fish Oil-Derived Fatty Acids in Pregnancy and Wheeze and Asthma in Offspring. *N Engl J Med*. 29 déc 2016;375(26):2530-9.
101. Khan TK, Palmer DJ, Prescott SL. In-utero exposures and the evolving epidemiology of paediatric allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. oct 2015;15(5):402-8.
102. von Mutius E. Maternal farm exposure/ingestion of unpasteurized cow's milk and allergic disease. *Curr Opin Gastroenterol*. nov 2012;28(6):570-6.
103. Yepes-Nuñez JJ, Brožek JL, Fiocchi A, Pawankar R, Cuello-García C, Zhang Y, et al. Vitamin D supplementation in primary allergy prevention: Systematic review of randomized and non-randomized studies. *Allergy*. janv 2018;73(1):37-49.
104. Wang T-T, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol*. 1 sept 2004;173(5):2909-12.
105. Sassi F, Tamone C, D'Amelio P. Vitamin D: Nutrient, Hormone, and Immunomodulator. *Nutrients*. 3 nov 2018;10(11).
106. Litonjua AA. Vitamin D and childhood asthma: causation and contribution to disease activity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. avr 2019;19(2):126-31.
107. Hall SC, Agrawal DK. Vitamin D and Bronchial Asthma: An Overview of Data From the Past 5 Years. *Clin Ther*. mai 2017;39(5):917-29.
108. Dreger LC, Kozyrskyj AL, HayGlass KT, Becker AB, MacNeil BJ. Lower cortisol levels in children with asthma exposed to recurrent maternal distress from birth. *J Allergy Clin Immunol*. janv 2010;125(1):116-22.
109. Theoharides TC, Enakuaa S, Sismanopoulos N, Asadi S, Papadimas EC, Angelidou A, et al. Contribution of stress to asthma worsening through mast cell activation. *Ann Allergy Asthma Immunol*. juill 2012;109(1):14-9.
110. Flanigan C, Sheikh A, DunnGalvin A, Brew BK, Almqvist C, Nwaru BI. Prenatal maternal psychosocial stress and offspring's asthma and allergic disease: A systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Allergy*. avr 2018;48(4):403-14.
111. Kang LJ, Vu KN, Koleva PT, Field CJ, Chow A, Azad MB, et al. Maternal psychological distress before birth influences gut immunity in mid-infancy. *Clin Exp Allergy*. févr 2020;50(2):178-88.

112. Bascom EM, Napolitano MA. Breastfeeding Duration and Primary Reasons for Breastfeeding Cessation among Women with Postpartum Depressive Symptoms. *J Hum Lact.* mai 2016;32(2):282-91.
113. Jašarević E, Howerton CL, Howard CD, Bale TL. Alterations in the Vaginal Microbiome by Maternal Stress Are Associated With Metabolic Reprogramming of the Offspring Gut and Brain. *Endocrinology.* sept 2015;156(9):3265-76.
114. Raby BA. Asthma severity, nature or nurture: genetic determinants. *Curr Opin Pediatr.* juin 2019;31(3):340-8.
115. Bønnelykke K, Sparks R, Waage J, Milner JD. Genetics of allergy and allergic sensitization: common variants, rare mutations. *Curr Opin Immunol.* oct 2015;36:115-26.
116. Hall R, Hall IP, Sayers I. Genetic risk factors for the development of pulmonary disease identified by genome-wide association. *Respirology.* 2019;24(3):204-14.
117. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med.* 23 sept 2010;363(13):1211-21.
118. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* oct 2010;28(10):1057-68.
119. Potaczek DP, Harb H, Michel S, Alhamwe BA, Renz H, Tost J. Epigenetics and allergy: from basic mechanisms to clinical applications. *Epigenomics.* avr 2017;9(4):539-71.
120. Michel S, Busato F, Genuneit J, Pekkanen J, Dalphin J-C, Riedler J, et al. Farm exposure and time trends in early childhood may influence DNA methylation in genes related to asthma and allergy. *Allergy.* mars 2013;68(3):355-64.
121. Frischmeyer-Guerrero PA, Milner JD. Editorial overview: Collusion between genes and environment in the pathogenesis of allergic disease. *Curr Opin Immunol.* oct 2019;60:iii-v.
122. Johansson H, Mersha TB, Brandt EB, Khurana Hershey GK. Interactions between environmental pollutants and genetic susceptibility in asthma risk. *Curr Opin Immunol.* oct 2019;60:156-62.
123. Nadeau K, McDonald-Hyman C, Noth EM, Pratt B, Hammond SK, Balmes J, et al. Ambient air pollution impairs regulatory T-cell function in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* oct 2010;126(4):845-852.e10.
124. Barrett EG. Maternal influence in the transmission of asthma susceptibility. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008;21(3):474-84.
125. Accordini S, Calciano L, Johannessen A, Portas L, Benediktsdóttir B, Bertelsen RJ, et al. A three-generation study on the association of tobacco smoking with asthma. *Int J Epidemiol.* 1 août 2018;47(4):1106-17.

126. Gunawardhana LP, Baines KJ, Mattes J, Murphy VE, Simpson JL, Gibson PG. Differential DNA methylation profiles of infants exposed to maternal asthma during pregnancy. *Pediatr Pulmonol.* sept 2014;49(9):852-62.
127. Almoguera B, Vazquez L, Mentch F, Connolly J, Pacheco JA, Sundaresan AS, et al. Identification of Four Novel Loci in Asthma in European American and African American Populations. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 févr 2017;195(4):456-63.
128. Ferreira MAR, Matheson MC, Tang CS, Granell R, Ang W, Hui J, et al. Genome-wide association analysis identifies 11 risk variants associated with the asthma with hay fever phenotype. *J Allergy Clin Immunol.* juin 2014;133(6):1564-71.
129. Demenais F, Margaritte-Jeannin P, Barnes KC, Cookson WOC, Altmüller J, Ang W, et al. Multiancestry association study identifies new asthma risk loci that colocalize with immune-cell enhancer marks. *Nat Genet.* janv 2018;50(1):42-53.
130. Wu Q-W, Cai P-C, Wang L, Li Y-R, Kong L-L, Hu L-H. Family-based association study of Tim-1 and Tim-3 gene polymorphisms with childhood asthma in Chinese trios. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009;150(3):252-60.
131. GBD 2015 Chronic Respiratory Disease Collaborators. Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Respir Med.* sept 2017;5(9):691-706.
132. Dierick BJH, van der Molen T, Flokstra-de Blok BMJ, Muraro A, Postma MJ, Kocks JWH, et al. Burden and socioeconomics of asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis and food allergy. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.* oct 2020;20(5):437-53.
133. Chouaid C, Vergnenègre A, Vandewalle V, Liebaert F, Khelifa A, Galipon null, et al. [The costs of asthma in France: an economic analysis by a Markov model]. *Rev Mal Respir.* juin 2004;21(3 Pt 1):493-9.
134. Delmas M-C, Marguet C, Raheison C, Nicolau J, Fuhrman C. [Admissions for pediatric asthma in France]. *Arch Pediatr.* juill 2013;20(7):739-47.
135. Mukherjee M, Stoddart A, Gupta RP, Nwaru BI, Farr A, Heaven M, et al. The epidemiology, healthcare and societal burden and costs of asthma in the UK and its member nations: analyses of standalone and linked national databases. *BMC Med.* 29 août 2016;14(1):113.
136. Drake SM, Simpson A, Fowler SJ. Asthma Diagnosis: The Changing Face of Guidelines. *Pulm Ther.* déc 2019;5(2):103-15.
137. Woolcock A, Rubinfeld AR, Seale JP, Landau LL, Antic R, Mitchell C, et al. Thoracic society of Australia and New Zealand. Asthma management plan, 1989. *Med J Aust.* 4 déc 1989;151(11-12):650-3.
138. Guidelines for management of asthma in adults: I--Chronic persistent asthma. Statement by the British Thoracic Society, Research Unit of the Royal College of Physicians of London, King's Fund Centre, National Asthma Campaign. *BMJ.* 29 sept 1990;301(6753):651-3.

139. Hargreave FE, Dolovich J, Newhouse MT. The assessment and treatment of asthma: a conference report. *J Allergy Clin Immunol.* juin 1990;85(6):1098-111.
140. Guidelines for the diagnosis and management of asthma. National Heart, Lung, and Blood Institute. National Asthma Education Program. Expert Panel Report. *J Allergy Clin Immunol.* sept 1991;88(3 Pt 2):425-534.
141. Boulet L-P, Reddel HK, Bateman E, Pedersen S, FitzGerald JM, O'Byrne PM. The Global Initiative for Asthma (GINA): 25 years later. *European Respiratory Journal* [Internet]. 1 août 2019 [cité 19 avr 2021];54(2). Disponible sur: <https://erj.ersjournals.com/content/54/2/1900598>
142. Masson E. Révision de la troisième conférence de consensus en réanimation et médecine d'Urgence de 1988 : prise en charge des crises d'asthme aiguës graves de l'adulte et de l'enfant (à l'exclusion du nourrisson) [Internet]. *EM-Consulte.* [cité 19 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/151446/revision-de-la-troisieme-conference-de-consensus-e>
143. Marguet C, Groupe de Recherche Sur Les Avancées En PneumoPédiatrie. [Management of acute asthma in infants and children: recommendations from the French Pediatric Society of Pneumology and Allergy]. *Rev Mal Respir.* avr 2007;24(4 Pt 1):427-39.
144. Asthme de l'enfant de moins de 36 mois : diagnostic, prise en charge et traitement en dehors des épisodes aigus [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 19 avr 2021]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_796722/fr/asthme-de-l-enfant-de-moins-de-36-mois-diagnostic-prise-en-charge-et-traitement-en-dehors-des-episodes-aigus
145. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med.* 19 janv 1995;332(3):133-8.
146. Henderson J, Granell R, Heron J, Sherriff A, Simpson A, Woodcock A, et al. Associations of wheezing phenotypes in the first 6 years of life with atopy, lung function and airway responsiveness in mid-childhood. *Thorax.* nov 2008;63(11):974-80.
147. Simpson A, Tan VYF, Winn J, Svensén M, Bishop CM, Heckerman DE, et al. Beyond atopy: multiple patterns of sensitization in relation to asthma in a birth cohort study. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 juin 2010;181(11):1200-6.
148. Saglani S, Malmström K, Pelkonen AS, Malmberg LP, Lindahl H, Kajosaari M, et al. Airway remodeling and inflammation in symptomatic infants with reversible airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 avr 2005;171(7):722-7.
149. Saglani S, Payne DN, Zhu J, Wang Z, Nicholson AG, Bush A, et al. Early detection of airway wall remodeling and eosinophilic inflammation in preschool wheezers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 nov 2007;176(9):858-64.
150. Tillie-Leblond I, de Blic J, Jaubert F, Wallaert B, Scheinmann P, Gosset P. Airway remodeling is correlated with obstruction in children with severe asthma. *Allergy.* mai 2008;63(5):533-41.

151. Lezmi G, Gosset P, Deschildre A, Abou-Taam R, Mahut B, Beydon N, et al. Airway Remodeling in Preschool Children with Severe Recurrent Wheeze. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 juill 2015;192(2):164-71.
152. Bloom CI, Nissen F, Douglas IJ, Smeeth L, Cullinan P, Quint JK. Exacerbation risk and characterisation of the UK's asthma population from infants to old age. *Thorax*. 2018;73(4):313-20.
153. Bisgaard H, Hermansen MN, Bønnelykke K, Stokholm J, Baty F, Skytt NL, et al. Association of bacteria and viruses with wheezy episodes in young children: prospective birth cohort study. *BMJ*. 4 oct 2010;341:c4978.
154. Bacharier LB, Phillips BR, Bloomberg GR, Zeiger RS, Paul IM, Krawiec M, et al. Severe intermittent wheezing in preschool children: a distinct phenotype. *J Allergy Clin Immunol*. mars 2007;119(3):604-10.
155. Beigelman A, Bacharier LB. Management of Preschool Children with Recurrent Wheezing: Lessons from the NHLBI's Asthma Research Networks. *J Allergy Clin Immunol Pract*. févr 2016;4(1):1-8; quiz 9-10.
156. Merckx J, Ducharme FM, Martineau C, Zemek R, Gravel J, Chalut D, et al. Respiratory Viruses and Treatment Failure in Children With Asthma Exacerbation. *Pediatrics*. 2018;142(1).
157. Stokholm J, Chawes BL, Vissing NH, Bjarnadóttir E, Pedersen TM, Vinding RK, et al. Azithromycin for episodes with asthma-like symptoms in young children aged 1-3 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med*. janv 2016;4(1):19-26.
158. Bacharier LB, Guilbert TW, Mauger DT, Boehmer S, Beigelman A, Fitzpatrick AM, et al. Early Administration of Azithromycin and Prevention of Severe Lower Respiratory Tract Illnesses in Preschool Children With a History of Such Illnesses: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 17 nov 2015;314(19):2034-44.
159. Hedlin G, Bush A, Lødrup Carlsen K, Wennergren G, De Benedictis FM, Melén E, et al. Problematic severe asthma in children, not one problem but many: a GA2LEN initiative. *Eur Respir J*. juill 2010;36(1):196-201.
160. 2020 GINA Main Report [Internet]. Global Initiative for Asthma - GINA. [cité 25 avr 2020]. Disponible sur: <https://ginasthma.org/gina-reports/>
161. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro M, Sterk PJ, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J*. févr 2014;43(2):343-73.
162. Ramratnam SK, Bacharier LB, Guilbert TW. Severe Asthma in Children. *J Allergy Clin Immunol Pract*. août 2017;5(4):889-98.
163. Papadopoulos NG, Čustović A, Cabana MD, Dell SD, Deschildre A, Hedlin G, et al. Pediatric asthma: An unmet need for more effective, focused treatments. *Pediatr Allergy Immunol*. 2019;30(1):7-16.

164. Fitzpatrick AM, Teague WG, Meyers DA, Peters SP, Li X, Li H, et al. Heterogeneity of severe asthma in childhood: confirmation by cluster analysis of children in the National Institutes of Health/National Heart, Lung, and Blood Institute Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol.* févr 2011;127(2):382-389.e1-13.
165. Deschildre A, Marguet C, Salleron J, Pin I, Rittié J-L, Derelle J, et al. Add-on omalizumab in children with severe allergic asthma: a 1-year real life survey. *Eur Respir J.* nov 2013;42(5):1224-33.
166. Tyler SR, Bunyavanich S. Leveraging -omics for asthma endotyping. *J Allergy Clin Immunol.* juill 2019;144(1):13-23.
167. Conrad LA, Cabana MD, Rastogi D. Defining pediatric asthma: phenotypes to endotypes and beyond. *Pediatr Res.* 10 nov 2020;
168. Just J, Gouvis-Echraghi R, Couderc R, Guillemot-Lambert N, Saint-Pierre P. Novel severe wheezy young children phenotypes: boys atopic multiple-trigger and girls nonatopic uncontrolled wheeze. *J Allergy Clin Immunol.* juill 2012;130(1):103-110.e8.
169. Just J, Gouvis-Echraghi R, Rouve S, Wanin S, Moreau D, Annesi-Maesano I. Two novel, severe asthma phenotypes identified during childhood using a clustering approach. *Eur Respir J.* juill 2012;40(1):55-60.
170. Kurukulaaratchy RJ, Zhang H, Raza A, Patil V, Karmaus W, Ewart S, et al. The diversity of young adult wheeze: a cluster analysis in a longitudinal birth cohort. *Clin Exp Allergy.* 2014;44(5):724-35.
171. Pavord ID, Beasley R, Agusti A, Anderson GP, Bel E, Brusselle G, et al. After asthma: redefining airways diseases. *Lancet.* 27 janv 2018;391(10118):350-400.
172. Brand PLP, Baraldi E, Bisgaard H, Boner AL, Castro-Rodriguez JA, Custovic A, et al. Definition, assessment and treatment of wheezing disorders in preschool children: an evidence-based approach. *Eur Respir J.* oct 2008;32(4):1096-110.
173. Schultz A, Devadason SG, Savenije OEM, Sly PD, Le Souëf PN, Brand PLP. The transient value of classifying preschool wheeze into episodic viral wheeze and multiple trigger wheeze. *Acta Paediatr.* janv 2010;99(1):56-60.
174. Brand PLP, Caudri D, Eber E, Gaillard EA, Garcia-Marcos L, Hedlin G, et al. Classification and pharmacological treatment of preschool wheezing: changes since 2008. *Eur Respir J.* avr 2014;43(4):1172-7.
175. Raaymakers MJA, Brand PLP, Landstra AM, Brouwer ML, Balemans WAF, Niers LEM, et al. Episodic viral wheeze and multiple-trigger wheeze in preschool children are neither distinct nor constant patterns. A prospective multicenter cohort study in secondary care. *Pediatr Pulmonol.* 2019;54(9):1439-46.
176. van Wonderen KE, Geskus RB, van Aalderen WMC, Mohrs J, Bindels PJE, van der Mark LB, et al. Stability and predictiveness of multiple trigger and episodic viral wheeze in preschoolers. *Clin Exp Allergy.* 2016;46(6):837-47.

177. Vareille M, Kieninger E, Edwards MR, Regamey N. The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin Microbiol Rev.* janv 2011;24(1):210-29.
178. Bush A. Cytokines and Chemokines as Biomarkers of Future Asthma. *Front Pediatr.* 2019;7:72.
179. Hossain FMA, Choi JY, Uyangaa E, Park SO, Eo SK. The Interplay between Host Immunity and Respiratory Viral Infection in Asthma Exacerbation. *Immune Netw.* oct 2019;19(5):e31.
180. Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol.* janv 2015;16(1):27-35.
181. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med.* 17 sept 2001;194(6):863-9.
182. Barchet W, Blasius A, Cella M, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells: in search of their niche in immune responses. *Immunol Res.* 2005;32(1-3):75-83.
183. See H, Wark P. Innate immune response to viral infection of the lungs. *Paediatr Respir Rev.* déc 2008;9(4):243-50.
184. Duez C, Gosset P, Tonnel A-B. Dendritic cells and toll-like receptors in allergy and asthma. *Eur J Dermatol.* févr 2006;16(1):12-6.
185. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science.* 11 juin 1999;284(5421):1835-7.
186. Jackson DJ, Johnston SL. The role of viruses in acute exacerbations of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* juin 2010;125(6):1178-87; quiz 1188-9.
187. Casanova V, Sousa FH, Stevens C, Barlow PG. Antiviral therapeutic approaches for human rhinovirus infections. *Future Virol.* juill 2018;13(7):505-18.
188. Barlow PG, Findlay EG, Currie SM, Davidson DJ. Antiviral potential of cathelicidins. *Future Microbiol.* 2014;9(1):55-73.
189. Currie SM, Gwyer Findlay E, McFarlane AJ, Fitch PM, Böttcher B, Colegrave N, et al. Cathelicidins Have Direct Antiviral Activity against Respiratory Syncytial Virus In Vitro and Protective Function In Vivo in Mice and Humans. *J Immunol.* 15 mars 2016;196(6):2699-710.
190. Balhara J, Gounni AS. The alveolar macrophages in asthma: a double-edged sword. *Mucosal Immunol.* nov 2012;5(6):605-9.
191. Vroman H, Hendriks RW, Kool M. Dendritic Cell Subsets in Asthma: Impaired Tolerance or Exaggerated Inflammation? *Front Immunol.* 2017;8:941.
192. Miyauchi K. Helper T Cell Responses to Respiratory Viruses in the Lung: Development, Virus Suppression, and Pathogenesis. *Viral Immunol.* août 2017;30(6):421-30.

193. Schenkel JM, Fraser KA, Beura LK, Pauken KE, Veizys V, Masopust D. T cell memory. Resident memory CD8 T cells trigger protective innate and adaptive immune responses. *Science*. 3 oct 2014;346(6205):98-101.
194. Georgiev P, Charbonnier L-M, Chatila TA. Regulatory T Cells: the Many Faces of Foxp3. *J Clin Immunol*. oct 2019;39(7):623-40.
195. Ding Y, Xu J, Bromberg JS. Regulatory T cell migration during an immune response. *Trends Immunol*. avr 2012;33(4):174-80.
196. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature*. 24 juill 2008;454(7203):445-54.
197. Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I. Pathology of asthma. *Front Microbiol* [Internet]. 10 sept 2013 [cité 2 mars 2020];4. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768124/>
198. Mitchell PD, O'Byrne PM. Epithelial-Derived Cytokines in Asthma. *Chest*. 2017;151(6):1338-44.
199. Chan BCL, Lam CWK, Tam L-S, Wong CK. IL33: Roles in Allergic Inflammation and Therapeutic Perspectives. *Front Immunol*. 2019;10:364.
200. Everts B, Tussiwand R, Dreesen L, Fairfax KC, Huang SC-C, Smith AM, et al. Migratory CD103+ dendritic cells suppress helminth-driven type 2 immunity through constitutive expression of IL-12. *J Exp Med*. 11 janv 2016;213(1):35-51.
201. Min B. Basophils induce Th2 immunity: is this final answer? *Virulence*. oct 2010;1(5):399-401.
202. van Beek AA, Knol EF, de Vos P, Smelt MJ, Savelkoul HFJ, van Neerven RJJ. Recent developments in basophil research: do basophils initiate and perpetuate type 2 T-helper cell responses? *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;160(1):7-17.
203. Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol*. mars 2008;9(3):310-8.
204. Lezmi G, Leite-de-Moraes M. Invariant Natural Killer T and Mucosal-Associated Invariant T Cells in Asthmatic Patients. *Front Immunol*. 2018;9:1766.
205. Lavender P, Cousins D, Lee T. Regulation of Th2 cytokine gene transcription. *Chem Immunol*. 2000;78:16-29.
206. Marone G, Granata F, Pucino V, Pecoraro A, Heffler E, Loffredo S, et al. The Intriguing Role of Interleukin 13 in the Pathophysiology of Asthma. *Front Pharmacol*. 2019;10:1387.
207. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nat Immunol*. janv 2015;16(1):45-56.
208. Bao K, Reinhardt RL. The differential expression of IL-4 and IL-13 and its impact on type-2 immunity. *Cytokine*. sept 2015;75(1):25-37.

209. Chusid MJ. Eosinophils: Friends or Foes? *J Allergy Clin Immunol Pract.* oct 2018;6(5):1439-44.
210. Gao H, Ying S, Dai Y. Pathological Roles of Neutrophil-Mediated Inflammation in Asthma and Its Potential for Therapy as a Target. *J Immunol Res.* 2017;2017:3743048.
211. Deschildre A, Pichavant M, Engelmann I, Langlois C, Drumez E, Pouessel G, et al. Virus-triggered exacerbation in allergic asthmatic children: neutrophilic airway inflammation and alteration of virus sensors characterize a subgroup of patients. *Respir Res.* 14 nov 2017;18(1):191.
212. Travers J, Rothenberg ME. Eosinophils in mucosal immune responses. *Mucosal Immunol.* mai 2015;8(3):464-75.
213. Boyce JA. Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunol Rev.* juin 2007;217:168-85.
214. Caminati M, Menzella F, Guidolin L, Senna G. Targeting eosinophils: severe asthma and beyond. *Drugs Context.* 2019;8:212587.
215. Sastre B, Rodrigo-Muñoz JM, Garcia-Sanchez DA, Cañas JA, Del Pozo V. Eosinophils: Old Players in a New Game. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2018;28(5):289-304.
216. Liu D, Tan Y, Bajinka O, Wang L, Tang Z. Th17/IL-17 Axis Regulated by Airway Microbes Get Involved in the Development of Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 14 mars 2020;20(4):11.
217. Brandt EB, Kovacic MB, Lee GB, Gibson AM, Acciani TH, Le Cras TD, et al. Diesel exhaust particle induction of IL-17A contributes to severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.* nov 2013;132(5):1194-1204.e2.
218. Hirose K, Ito T, Nakajima H. Roles of IL-22 in allergic airway inflammation in mice and humans. *Int Immunol.* 30 août 2018;30(9):413-8.
219. Chesné J, Braza F, Mahay G, Brouard S, Aronica M, Magnan A. IL-17 in severe asthma. Where do we stand? *Am J Respir Crit Care Med.* 15 nov 2014;190(10):1094-101.
220. Bellini A, Marini MA, Bianchetti L, Barczyk M, Schmidt M, Mattoli S. Interleukin (IL)-4, IL-13, and IL-17A differentially affect the profibrotic and proinflammatory functions of fibrocytes from asthmatic patients. *Mucosal Immunol.* mars 2012;5(2):140-9.
221. de Magalhães Simões S, dos Santos MA, da Silva Oliveira M, Fontes ES, Ferezlian S, Garippo AL, et al. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. *Clin Exp Allergy.* mai 2005;35(5):602-11.
222. Hinks TSC, Hoyle RD, Gelfand EW. CD8+ Tc2 cells: underappreciated contributors to severe asthma. *Eur Respir Rev.* 31 déc 2019;28(154).
223. Turner DL, Goldklang M, Cvetkovski F, Paik D, Trischler J, Barahona J, et al. Biased Generation and In Situ Activation of Lung Tissue-Resident Memory CD4 T Cells in the Pathogenesis of Allergic Asthma. *J Immunol.* 1 mars 2018;200(5):1561-9.

224. Zajonc DM, Cantu C, Mattner J, Zhou D, Savage PB, Bendelac A, et al. Structure and function of a potent agonist for the semi-invariant natural killer T cell receptor. *Nat Immunol.* août 2005;6(8):810-8.
225. Chandra S, Wingender G, Greenbaum JA, Khurana A, Gholami AM, Ganesan A-P, et al. Development of Asthma in Inner-City Children: Possible Roles of MAIT Cells and Variation in the Home Environment. *J Immunol.* 15 mars 2018;200(6):1995-2003.
226. Iwamura C, Nakayama T. Role of CD1d- and MR1-Restricted T Cells in Asthma. *Front Immunol.* 2018;9:1942.
227. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol.* juill 2010;10(7):467-78.
228. Peters C, Häsler R, Wesch D, Kabelitz D. Human V δ 2 T cells are a major source of interleukin-9. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 nov 2016;113(44):12520-5.
229. Huang Y, Yang Z, McGowan J, Huang H, O'Brien RL, Born WK. Regulation of IgE Responses by $\gamma\delta$ T Cells. *Curr Allergy Asthma Rep.* avr 2015;15(4):13.
230. Lejeune S, Deschildre A, Le Rouzic O, Engelmann I, Dessein R, Pichavant M, et al. Childhood asthma heterogeneity at the era of precision medicine: Modulating the immune response or the microbiota for the management of asthma attack. *Biochem Pharmacol.* sept 2020;179:114046.
231. Edwards MR, Regamey N, Vareille M, Kieninger E, Gupta A, Shoemark A, et al. Impaired innate interferon induction in severe therapy resistant atopic asthmatic children. *Mucosal Immunol.* juill 2013;6(4):797-806.
232. Parsons KS, Hsu AC, Wark P a. B. TLR3 and MDA5 signalling, although not expression, is impaired in asthmatic epithelial cells in response to rhinovirus infection. *Clin Exp Allergy.* janv 2014;44(1):91-101.
233. Rupani H, Martinez-Nunez RT, Dennison P, Lau LCK, Jayasekera N, Havelock T, et al. Toll-like Receptor 7 Is Reduced in Severe Asthma and Linked to an Altered MicroRNA Profile. *Am J Respir Crit Care Med.* 01 2016;194(1):26-37.
234. Engelmann I, Mordacq C, Gosset P, Tillie-Leblond I, Dewilde A, Thumerelle C, et al. Rhinovirus and asthma: reinfection, not persistence. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 nov 2013;188(9):1165-7.
235. Arikoglu T, Kuyucu S, Karaismailoglu E, Batmaz SB, Balci S. The association of vitamin D, cathelicidin, and vitamin D binding protein with acute asthma attacks in children. *Allergy Asthma Proc.* août 2015;36(4):51-8.
236. Baraldo S, Contoli M, Bazzan E, Turato G, Padovani A, Marku B, et al. Deficient antiviral immune responses in childhood: distinct roles of atopy and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* déc 2012;130(6):1307-14.
237. Gielen V, Sykes A, Zhu J, Chan B, Macintyre J, Regamey N, et al. Increased nuclear suppressor of cytokine signaling 1 in asthmatic bronchial epithelium suppresses rhinovirus induction of innate interferons. *J Allergy Clin Immunol.* juill 2015;136(1):177-188.e11.

238. Kicic A, Stevens PT, Sutanto EN, Kicic-Starceovich E, Ling K-M, Looi K, et al. Impaired airway epithelial cell responses from children with asthma to rhinoviral infection. *Clin Exp Allergy*. 2016;46(11):1441-55.
239. Contoli M, Ito K, Padovani A, Poletti D, Marku B, Edwards MR, et al. Th2 cytokines impair innate immune responses to rhinovirus in respiratory epithelial cells. *Allergy*. août 2015;70(8):910-20.
240. Wark PAB, Johnston SL, Bucchieri F, Powell R, Puddicombe S, Laza-Stanca V, et al. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J Exp Med*. 21 mars 2005;201(6):937-47.
241. Moskwa S, Piotrowski W, Marczak J, Pawełczyk M, Lewandowska-Polak A, Jarzębska M, et al. Innate Immune Response to Viral Infections in Primary Bronchial Epithelial Cells is Modified by the Atopic Status of Asthmatic Patients. *Allergy Asthma Immunol Res*. mars 2018;10(2):144-54.
242. Bufe A, Gehlhar K, Grage-Griebenow E, Ernst M. Atopic phenotype in children is associated with decreased virus-induced interferon-alpha release. *Int Arch Allergy Immunol*. janv 2002;127(1):82-8.
243. Gehlhar K, Bilitewski C, Reinitz-Rademacher K, Rohde G, Bufe A. Impaired virus-induced interferon-alpha2 release in adult asthmatic patients. *Clin Exp Allergy*. mars 2006;36(3):331-7.
244. Iikura K, Katsunuma T, Saika S, Saito S, Ichinohe S, Ida H, et al. Peripheral blood mononuclear cells from patients with bronchial asthma show impaired innate immune responses to rhinovirus in vitro. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;155 Suppl 1:27-33.
245. Durrani SR, Montville DJ, Pratt AS, Sahu S, DeVries MK, Rajamanickam V, et al. Innate immune responses to rhinovirus are reduced by the high-affinity IgE receptor in allergic asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol*. août 2012;130(2):489-95.
246. Sykes A, Edwards MR, Macintyre J, del Rosario A, Bakhsoliani E, Trujillo-Torralbo M-B, et al. Rhinovirus 16-induced IFN- α and IFN- β are deficient in bronchoalveolar lavage cells in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*. juin 2012;129(6):1506-1514.e6.
247. Simpson JL, Carroll M, Yang IA, Reynolds PN, Hodge S, James AL, et al. Reduced Antiviral Interferon Production in Poorly Controlled Asthma Is Associated With Neutrophilic Inflammation and High-Dose Inhaled Corticosteroids. *Chest*. mars 2016;149(3):704-13.
248. Bergauer A, Sopel N, Kroß B, Vuorinen T, Xepapadaki P, Weiss ST, et al. IFN- α /IFN- λ responses to respiratory viruses in paediatric asthma. *Eur Respir J*. 2017;49(2).
249. Zhu J, Message SD, Mallia P, Kebabdzé T, Contoli M, Ward CK, et al. Bronchial mucosal IFN- α/β and pattern recognition receptor expression in patients with experimental rhinovirus-induced asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(1):114-125.e4.
250. Schwantes EA, Manthei DM, Denlinger LC, Evans MD, Gern JE, Jarjour NN, et al. Interferon gene expression in sputum cells correlates with the Asthma Index Score during virus-induced exacerbations. *Clin Exp Allergy*. juin 2014;44(6):813-21.

251. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol.* janv 2003;4(1):69-77.
252. Miller EK, Hernandez JZ, Wimmenauer V, Shepherd BE, Hijano D, Libster R, et al. A mechanistic role for type III IFN- λ 1 in asthma exacerbations mediated by human rhinoviruses. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 mars 2012;185(5):508-16.
253. Contoli M, Message SD, Laza-Stanca V, Edwards MR, Wark PAB, Bartlett NW, et al. Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations. *Nat Med.* sept 2006;12(9):1023-6.
254. Boonpiyathad T, Sözener ZC, Satitsuksanoa P, Akdis CA. Immunologic mechanisms in asthma. *Semin Immunol.* 2019;46:101333.
255. Yuan X-H, Li Y-M, Shen Y-Y, Yang J, Jin Y. Clinical and Th1/Th2 immune response features of hospitalized children with human rhinovirus infection. *J Med Virol.* janv 2020;92(1):26-33.
256. Lee H-C, Headley MB, Loo Y-M, Berlin A, Gale M, Debley JS, et al. Thymic stromal lymphopoietin is induced by respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells and promotes a type 2 response to infection. *J Allergy Clin Immunol.* nov 2012;130(5):1187-1196.e5.
257. Haag P, Sharma H, Rauh M, Zimmermann T, Vuorinen T, Papadopoulos NG, et al. Soluble ST2 regulation by rhinovirus and 25(OH)-vitamin D3 in the blood of asthmatic children. *Clin Exp Immunol.* 2018;193(2):207-20.
258. Jackson DJ, Makrinioti H, Rana BMJ, Shamji BWH, Trujillo-Torralbo M-B, Footitt J, et al. IL-33-dependent type 2 inflammation during rhinovirus-induced asthma exacerbations in vivo. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 déc 2014;190(12):1373-82.
259. Jurak LM, Xi Y, Landgraf M, Carroll ML, Murray L, Upham JW. Interleukin 33 Selectively Augments Rhinovirus-Induced Type 2 Immune Responses in Asthmatic but not Healthy People. *Front Immunol.* 2018;9:1895.
260. Qin L, Hu C, Feng J, Xia Q. Activation of lymphocytes induced by bronchial epithelial cells with prolonged RSV infection. *PLoS ONE.* 2011;6(12):e27113.
261. Marichal T, Bedoret D, Mesnil C, Pichavant M, Goriely S, Trottein F, et al. Interferon response factor 3 is essential for house dust mite-induced airway allergy. *J Allergy Clin Immunol.* oct 2010;126(4):836-844.e13.
262. Bizzintino J, Lee W-M, Laing IA, Vang F, Pappas T, Zhang G, et al. Association between human rhinovirus C and severity of acute asthma in children. *Eur Respir J.* mai 2011;37(5):1037-42.
263. Bochkov YA, Watters K, Ashraf S, Griggs TF, Devries MK, Jackson DJ, et al. Cadherin-related family member 3, a childhood asthma susceptibility gene product, mediates rhinovirus C binding and replication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 28 avr 2015;112(17):5485-90.

264. Nakagome K, Bochkov YA, Ashraf S, Brockman-Schneider RA, Evans MD, Pasic TR, et al. Effects of rhinovirus species on viral replication and cytokine production. *J Allergy Clin Immunol.* août 2014;134(2):332-41.
265. Sikazwe CT, Laing IA, Imrie A, Smith DW. Nasal Cytokine Profiles of Patients Hospitalised with Respiratory Wheeze Associated with Rhinovirus C. *Viruses.* 7 nov 2019;11(11).
266. Lu X, Schneider E, Jain S, Bramley AM, Hymas W, Stockmann C, et al. Rhinovirus Viremia in Patients Hospitalized With Community-Acquired Pneumonia. *J Infect Dis.* 27 2017;216(9):1104-11.
267. Thumerelle C, Deschildre A, Bouquillon C, Santos C, Sardet A, Scalbert M, et al. Role of viruses and atypical bacteria in exacerbations of asthma in hospitalized children: a prospective study in the Nord-Pas de Calais region (France). *Pediatr Pulmonol.* févr 2003;35(2):75-82.
268. Khetsuriani N, Kazerouni NN, Erdman DD, Lu X, Redd SC, Anderson LJ, et al. Prevalence of viral respiratory tract infections in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* févr 2007;119(2):314-21.
269. Principi N, Zampiero A, Gambino M, Scala A, Senatore L, Lelii M, et al. Prospective evaluation of rhinovirus infection in healthy young children. *J Clin Virol.* mai 2015;66:83-9.
270. Loeffelholz MJ, Trujillo R, Pyles RB, Miller AL, Alvarez-Fernandez P, Pong DL, et al. Duration of rhinovirus shedding in the upper respiratory tract in the first year of life. *Pediatrics.* déc 2014;134(6):1144-50.
271. da Silva J, Hilzendeger C, Moermans C, Schleich F, Henket M, Keadze T, et al. Raised interferon- β , type 3 interferon and interferon-stimulated genes - evidence of innate immune activation in neutrophilic asthma. *Clin Exp Allergy.* mars 2017;47(3):313-23.
272. Wylie KM. The Virome of the Human Respiratory Tract. *Clin Chest Med.* mars 2017;38(1):11-9.
273. Wang Y, Zhu N, Li Y, Lu R, Wang H, Liu G, et al. Metagenomic analysis of viral genetic diversity in respiratory samples from children with severe acute respiratory infection in China. *Clin Microbiol Infect.* mai 2016;22(5):458.e1-9.
274. Freer G, Maggi F, Pifferi M, Di Cicco ME, Peroni DG, Pistello M. The Virome and Its Major Component, Anellovirus, a Convolved System Molding Human Immune Defenses and Possibly Affecting the Development of Asthma and Respiratory Diseases in Childhood. *Front Microbiol.* 2018;9:686.
275. Pifferi M, Maggi F, Andreoli E, Lanini L, Marco ED, Fornai C, et al. Associations between nasal torquetenovirus load and spirometric indices in children with asthma. *J Infect Dis.* 1 oct 2005;192(7):1141-8.
276. Kennedy JL, Shaker M, McMeen V, Gern J, Carper H, Murphy D, et al. Comparison of viral load in individuals with and without asthma during infections with rhinovirus. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 mars 2014;189(5):532-9.

277. Licari A, Manti S, Castagnoli R, Marseglia A, Foiadelli T, Brambilla I, et al. Immunomodulation in Pediatric Asthma. *Front Pediatr*. 2019;7:289.
278. de Steenhuijsen Piters WAA, Heinonen S, Hasrat R, Bunsow E, Smith B, Suarez-Arrabal M-C, et al. Nasopharyngeal Microbiota, Host Transcriptome, and Disease Severity in Children with Respiratory Syncytial Virus Infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 01 2016;194(9):1104-15.
279. Mansbach JM, Hasegawa K, Henke DM, Ajami NJ, Petrosino JF, Shaw CA, et al. Respiratory syncytial virus and rhinovirus severe bronchiolitis are associated with distinct nasopharyngeal microbiota. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(6):1909-1913.e4.
280. Kloepfer KM, Sarsani VK, Poroyko V, Lee WM, Pappas TE, Kang T, et al. Community-acquired rhinovirus infection is associated with changes in the airway microbiome. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(1):312-315.e8.
281. Giuffrida MJ, Valero N, Mosquera J, Duran A, Arocha F, Chacín B, et al. Increased Systemic Cytokine/Chemokine Expression in Asthmatic and Non-asthmatic Patients with Bacterial, Viral or Mixed Lung Infection. *Scand J Immunol*. avr 2017;85(4):280-90.
282. Kama Y, Kato M, Yamada Y, Koike T, Suzuki K, Enseki M, et al. The Suppressive Role of *Streptococcus pneumoniae* Colonization in Acute Exacerbations of Childhood Bronchial Asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2020;181(3):191-9.
283. Teo SM, Tang HHF, Mok D, Judd LM, Watts SC, Pham K, et al. Airway Microbiota Dynamics Uncover a Critical Window for Interplay of Pathogenic Bacteria and Allergy in Childhood Respiratory Disease. *Cell Host Microbe*. 12 2018;24(3):341-352.e5.
284. Mansbach JM, Luna PN, Shaw CA, Hasegawa K, Petrosino JF, Piedra PA, et al. Increased *Moraxella* and *Streptococcus* species abundance after severe bronchiolitis is associated with recurrent wheezing. *J Allergy Clin Immunol*. févr 2020;145(2):518-527.e8.
285. Zhou Y, Jackson D, Bacharier LB, Mauger D, Boushey H, Castro M, et al. The upper-airway microbiota and loss of asthma control among asthmatic children. *Nat Commun*. 16 déc 2019;10(1):5714.
286. McCauley K, Durack J, Valladares R, Fadrosch DW, Lin DL, Calatroni A, et al. Distinct nasal airway bacterial microbiotas differentially relate to exacerbation in pediatric patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. nov 2019;144(5):1187-97.
287. Abdel-Aziz MI, Brinkman P, Vijverberg SJH, Neerincx AH, Riley JH, Bates S, et al. Sputum microbiome profiles identify severe asthma phenotypes of relative stability at 12-18 months. *J Allergy Clin Immunol*. 27 avr 2020;
288. Robinson PFM, Pattaroni C, Cook J, Gregory L, Alonso AM, Fleming LJ, et al. Lower airway microbiota associates with inflammatory phenotype in severe preschool wheeze. *J Allergy Clin Immunol*. avr 2019;143(4):1607-1610.e3.
289. Cuthbertson L, Oo SWC, Cox MJ, Khoo S-K, Cox DW, Chidlow G, et al. Viral respiratory infections and the oropharyngeal bacterial microbiota in acutely wheezing children. *PLoS ONE*. 2019;14(10):e0223990.

290. Davis MM, Tato CM, Furman D. Systems immunology: just getting started. *Nat Immunol.* 20 juin 2017;18(7):725-32.
291. Bunyavanich S, Schadt EE. Systems biology of asthma and allergic diseases: a multiscale approach. *J Allergy Clin Immunol.* janv 2015;135(1):31-42.
292. Altman MC, Gill MA, Whalen E, Babineau DC, Shao B, Liu AH, et al. Transcriptome networks identify mechanisms of viral and nonviral asthma exacerbations in children. *Nat Immunol.* 2019;20(5):637-51.
293. Bosco A, Ehteshami S, Panyala S, Martinez FD. Interferon regulatory factor 7 is a major hub connecting interferon-mediated responses in virus-induced asthma exacerbations in vivo. *J Allergy Clin Immunol.* janv 2012;129(1):88-94.
294. Aoki T, Matsumoto Y, Hirata K, Ochiai K, Okada M, Ichikawa K, et al. Expression profiling of genes related to asthma exacerbations. *Clin Exp Allergy.* févr 2009;39(2):213-21.
295. Persson H, Kwon AT, Ramilowski JA, Silberberg G, Söderhäll C, Orsmark-Pietras C, et al. Transcriptome analysis of controlled and therapy-resistant childhood asthma reveals distinct gene expression profiles. *J Allergy Clin Immunol.* sept 2015;136(3):638-48.
296. Kim CH. Immune regulation by microbiome metabolites. *Immunology.* juin 2018;154(2):220-9.
297. Dhondalay GK, Rael E, Acharya S, Zhang W, Sampath V, Galli SJ, et al. Food allergy and omics. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(1):20-9.
298. Bacharier LB, Beigelman A, Calatroni A, Jackson DJ, Gergen PJ, O'Connor GT, et al. Longitudinal Phenotypes of Respiratory Health in a High-Risk Urban Birth Cohort. *Am J Respir Crit Care Med.* 01 2019;199(1):71-82.
299. Lezmi G, Lejeune S, Pin I, Blanchon S, Bouazza N, Jolaine V, et al. Factors Associated with Asthma Severity in Children: Data from the French COBRAPed Cohort. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 24 déc 2020;
300. Fleming L, Wilson N, Regamey N, Bush A. Use of sputum eosinophil counts to guide management in children with severe asthma. *Thorax.* mars 2012;67(3):193-8.
301. Green RH, Brightling CE, Bradding P. The reclassification of asthma based on subphenotypes. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* févr 2007;7(1):43-50.
302. Castro-Rodríguez JA, Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD. A clinical index to define risk of asthma in young children with recurrent wheezing. *Am J Respir Crit Care Med.* oct 2000;162(4 Pt 1):1403-6.
303. Caudri D, Wijga A, A Schipper CM, Hoekstra M, Postma DS, Koppelman GH, et al. Predicting the long-term prognosis of children with symptoms suggestive of asthma at preschool age. *J Allergy Clin Immunol.* nov 2009;124(5):903-910.e1-7.
304. Bannier M a. GE, van de Kant KDG, Jöbsis Q, Dompeling E. Biomarkers to predict asthma in wheezing preschool children. *Clin Exp Allergy.* juin 2015;45(6):1040-50.

305. Carraro S, Bozzetto S, Giordano G, El Mazloum D, Stocchero M, Pirillo P, et al. Wheezing preschool children with early-onset asthma reveal a specific metabolomic profile. *Pediatr Allergy Immunol.* 2018;29(4):375-82.
306. Bantug GR, Galluzzi L, Kroemer G, Hess C. The spectrum of T cell metabolism in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(1):19-34.
307. Carraro S, Rezzi S, Reniero F, Héberger K, Giordano G, Zanconato S, et al. Metabolomics applied to exhaled breath condensate in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 mai 2007;175(10):986-90.
308. Farraia M, Cavaleiro Rufo J, Paciência I, Castro Mendes F, Delgado L, Laerte Boechat J, et al. Metabolic interactions in asthma. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 16 2019;51(5):196-205.
309. Esther CR, Boysen G, Olsen BM, Collins LB, Ghio AJ, Swenberg JW, et al. Mass spectrometric analysis of biomarkers and dilution markers in exhaled breath condensate reveals elevated purines in asthma and cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* juin 2009;296(6):L987-993.
310. Dallinga JW, Robroeks CMHHT, van Berkel JJBN, Moonen EJC, Godschalk RWL, Jöbssis Q, et al. Volatile organic compounds in exhaled breath as a diagnostic tool for asthma in children. *Clin Exp Allergy.* janv 2010;40(1):68-76.
311. Caldeira M, Barros AS, Bilelo MJ, Parada A, Câmara JS, Rocha SM. Profiling allergic asthma volatile metabolic patterns using a headspace-solid phase microextraction/gas chromatography based methodology. *J Chromatogr A.* 17 juin 2011;1218(24):3771-80.
312. Gahleitner F, Guallar-Hoyas C, Beardsmore CS, Pandya HC, Thomas CP. Metabolomics pilot study to identify volatile organic compound markers of childhood asthma in exhaled breath. *Bioanalysis.* sept 2013;5(18):2239-47.
313. van de Kant KDG, van Berkel JJBN, Jöbssis Q, Lima Passos V, Klaassen EMM, van der Sande L, et al. Exhaled breath profiling in diagnosing wheezy preschool children. *Eur Respir J.* janv 2013;41(1):183-8.
314. Smolinska A, Klaassen EMM, Dallinga JW, van de Kant KDG, Jobsis Q, Moonen EJC, et al. Profiling of volatile organic compounds in exhaled breath as a strategy to find early predictive signatures of asthma in children. *PLoS One.* 2014;9(4):e95668.
315. Berenguer PH, Camacho IC, Câmara R, Oliveira S, Câmara JS. Determination of potential childhood asthma biomarkers using a powerful methodology based on microextraction by packed sorbent combined with ultra-high pressure liquid chromatography. Eicosanoids as case study. *J Chromatogr A.* 11 janv 2019;1584:42-56.
316. Cáp P, Chládek J, Pehal F, Malý M, Petrů V, Barnes PJ, et al. Gas chromatography/mass spectrometry analysis of exhaled leukotrienes in asthmatic patients. *Thorax.* juin 2004;59(6):465-70.
317. Ried JS, Baurecht H, Stückler F, Krumsiek J, Gieger C, Heinrich J, et al. Integrative genetic and metabolite profiling analysis suggests altered phosphatidylcholine metabolism in asthma. *Allergy.* 2013;68(5):629-36.

318. Jung J, Kim S-H, Lee H-S, Choi GS, Jung Y-S, Ryu DH, et al. Serum metabolomics reveals pathways and biomarkers associated with asthma pathogenesis. *Clin Exp Allergy*. avr 2013;43(4):425-33.
319. Comhair SAA, McDunn J, Bennett C, Fettig J, Erzurum SC, Kalhan SC. Metabolomic Endotype of Asthma. *J Immunol*. 15 juill 2015;195(2):643-50.
320. Chang C, Guo Z, He B, Yao W. Metabolic alterations in the sera of Chinese patients with mild persistent asthma: a GC-MS-based metabolomics analysis. *Acta Pharmacol Sin*. nov 2015;36(11):1356-66.
321. Bian X, Sun B, Zheng P, Li N, Wu J-L. Derivatization enhanced separation and sensitivity of long chain-free fatty acids: Application to asthma using targeted and non-targeted liquid chromatography-mass spectrometry approach. *Anal Chim Acta*. 9 oct 2017;989:59-70.
322. Checkley W, Deza MP, Klawitter J, Romero KM, Klawitter J, Pollard SL, et al. Identifying biomarkers for asthma diagnosis using targeted metabolomics approaches. *Respir Med*. déc 2016;121:59-66.
323. Lee-Sarwar K, Kelly RS, Lasky-Su J, Moody DB, Mola AR, Cheng T-Y, et al. Intestinal microbial-derived sphingolipids are inversely associated with childhood food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. juill 2018;142(1):335-338.e9.
324. Peeters KABM, Lamers R-JAN, Penninks AH, Knol EF, Bruijnzeel-Koomen CAFM, van Nesselrooij JHJ, et al. A search for biomarkers as diagnostic tools for food allergy: a pilot study in peanut-allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;155(1):23-30.
325. Kong J, Chalcraft K, Mandur TS, Jimenez-Saiz R, Walker TD, Goncharova S, et al. Comprehensive metabolomics identifies the alarmin uric acid as a critical signal for the induction of peanut allergy. *Allergy*. mai 2015;70(5):495-505.
326. Adel-Patient K, Lezmi G, Castelli FA, Blanc S, Bernard H, Soullaines P, et al. Deep analysis of immune response and metabolic signature in children with food protein induced enterocolitis to cow's milk. *Clin Transl Allergy*. 2018;8:38.
327. Obeso D, Mera-Berriatua L, Rodríguez-Coira J, Rosace D, Fernández P, Martín-Antoniano IA, et al. Multi-omics analysis points to altered platelet functions in severe food-associated respiratory allergy. *Allergy*. nov 2018;73(11):2137-49.
328. Huang Y, Chen G, Liu X, Shao Y, Gao P, Xin C, et al. Serum metabolomics study and eicosanoid analysis of childhood atopic dermatitis based on liquid chromatography-mass spectrometry. *J Proteome Res*. 5 déc 2014;13(12):5715-23.
329. Schjødt MS, Gürdeniz G, Chawes B. The Metabolomics of Childhood Atopic Diseases: A Comprehensive Pathway-Specific Review. *Metabolites*. 16 déc 2020;10(12).
330. Bunning BJ, Contrepolis K, Lee-McMullen B, Dhondalay GKR, Zhang W, Tupa D, et al. Global metabolic profiling to model biological processes of aging in twins. *Aging Cell*. janv 2020;19(1):e13073.

331. Lejeune S, Mordacq C, Drumez E, Brisset S, Pouessel G, Pichavant M, et al. Relationship between immune parameters during a severe exacerbation in allergic asthmatic children and asthma outcomes in the following year. *Clin Exp Allergy*. 19 janv 2020;
332. Lejeune S, Pichavant M, Engelmann I, Beghin L, Drumez E, Le Rouzic O, et al. Severe preschool asthmatics have altered cytokine and anti-viral responses during exacerbation. *Pediatr Allergy Immunol*. 30 avr 2020;
333. Chinthrajah RS, Purington N, Andorf S, Long A, O'Laughlin KL, Lyu SC, et al. Sustained outcomes in oral immunotherapy for peanut allergy (POISED study): a large, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet*. 19 2019;394(10207):1437-49.
334. Andorf S, Purington N, Kumar D, Long A, O'Laughlin KL, Sicherer S, et al. A Phase 2 Randomized Controlled Multisite Study Using Omalizumab-facilitated Rapid Desensitization to Test Continued vs Discontinued Dosing in Multifood Allergic Individuals. *EClinicalMedicine*. janv 2019;7:27-38.
335. Rolland-Cachera MF, Sempé M, Guilloud-Bataille M, Patois E, Péquignot-Guggenbuhl F, Fautrad V. Adiposity indices in children. *Am J Clin Nutr*. juill 1982;36(1):178-84.
336. CDC. BMI Calculator for Child and Teen [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2020 [cité 24 janv 2021]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/healthyweight/bmi/calculator.html>
337. Carosso A, Bugiani M, Migliore E, Antò JM, DeMarco R. Reference values of total serum IgE and their significance in the diagnosis of allergy in young European adults. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;142(3):230-8.
338. Martins TB, Bandhauer ME, Bunker AM, Roberts WL, Hill HR. New childhood and adult reference intervals for total IgE. *J Allergy Clin Immunol*. févr 2014;133(2):589-91.
339. Sacco C, Perna S, Vicari D, Alfò M, Bauer C-P, Hoffman U, et al. Growth curves of « normal » serum total IgE levels throughout childhood: A quantile analysis in a birth cohort. *Pediatr Allergy Immunol*. sept 2017;28(6):525-34.
340. R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. [Internet]. [cité 17 janv 2021]. Disponible sur: <https://www.r-project.org/>
341. Hoffman GE, Schadt EE. variancePartition: interpreting drivers of variation in complex gene expression studies. *BMC Bioinformatics*. 25 nov 2016;17(1):483.
342. Jr FEH, others with contributions from CD and many. Hmisc: Harrell Miscellaneous [Internet]. 2020 [cité 24 janv 2021]. Disponible sur: <https://CRAN.R-project.org/package=Hmisc>
343. Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics*. 15 mars 2012;28(6):882-3.

344. Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics*. janv 2007;8(1):118-27.
345. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. *affy*--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics*. 12 févr 2004;20(3):307-15.
346. Kolde R. *pheatmap: Pretty Heatmaps* [Internet]. 2019 [cité 24 janv 2021]. Disponible sur: <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>
347. Blighe K. *kevinblighe/PCAtools* [Internet]. 2021 [cité 24 janv 2021]. Disponible sur: <https://github.com/kevinblighe/PCAtools>
348. Chong J, Wishart DS, Xia J. Using *MetaboAnalyst 4.0* for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinformatics*. déc 2019;68(1):e86.
349. Koncevičius K. *matrixTests: Fast Statistical Hypothesis Tests on Rows and Columns of Matrices* [Internet]. 2020 [cité 24 janv 2021]. Disponible sur: <https://CRAN.R-project.org/package=matrixTests>
350. Benjamini Y. Discovering the false discovery rate. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*. 2010;72(4):405-16.
351. *XGBoost* | Proceedings of the 22nd ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining [Internet]. [cité 4 mai 2021]. Disponible sur: <https://dl.acm.org/doi/10.1145/2939672.2939785>
352. Taylor SL, Leong LEX, Choo JM, Wesselingh S, Yang IA, Upham JW, et al. Inflammatory phenotypes in patients with severe asthma are associated with distinct airway microbiology. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(1):94-103.e15.
353. Lezmi G, de Blic J. Assessment of airway inflammation and remodeling in children with severe asthma: The next challenge. *Pediatr Pulmonol*. 2018;53(9):1171-3.
354. Ray A, Kolls JK. Neutrophilic Inflammation in Asthma and Association with Disease Severity. *Trends Immunol*. 2017;38(12):942-54.
355. Bossley CJ, Fleming L, Gupta A, Regamey N, Frith J, Oates T, et al. Pediatric severe asthma is characterized by eosinophilia and remodeling without T(H)2 cytokines. *J Allergy Clin Immunol*. avr 2012;129(4):974-982.e13.
356. Lezmi G, Abou-Taam R, Garcelon N, Dietrich C, Machavoine F, Delacourt C, et al. Evidence for a MAIT-17-high phenotype in children with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. déc 2019;144(6):1714-1716.e6.
357. Guiddir T, Saint-Pierre P, Purenne-Denis E, Lambert N, Laoudi Y, Couderc R, et al. Neutrophilic Steroid-Refractory Recurrent Wheeze and Eosinophilic Steroid-Refractory Asthma in Children. *J Allergy Clin Immunol Pract*. oct 2017;5(5):1351-1361.e2.
358. Zhu J, Message SD, Qiu Y, Mallia P, Keadze T, Contoli M, et al. Airway inflammation and illness severity in response to experimental rhinovirus infection in asthma. *Chest*. juin 2014;145(6):1219-29.

359. Malmström K, Malmberg LP, O'Reilly R, Lindahl H, Kajosaari M, Saarinen KM, et al. Lung function, airway remodeling, and inflammation in infants: outcome at 8 years. *Ann Allergy Asthma Immunol.* févr 2015;114(2):90-6.
360. Grunwell JR, Stephenson ST, Tirouvanziam R, Brown LAS, Brown MR, Fitzpatrick AM. Children with Neutrophil-Predominant Severe Asthma Have Proinflammatory Neutrophils With Enhanced Survival and Impaired Clearance. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019;7(2):516-525.e6.
361. Chang Y, Al-Alwan L, Risse P-A, Halayko AJ, Martin JG, Baglole CJ, et al. Th17-associated cytokines promote human airway smooth muscle cell proliferation. *FASEB J.* déc 2012;26(12):5152-60.
362. Just J, Saf S, Guiddir T, Cotel N, Amat F, Lambert N, et al. Determinants of blood eosinophilia in moderate and severe asthmatic patients during childhood: Evidence from the severe asthma molecular phenotype (SAMP) cohort. *Pediatr Allergy Immunol.* 24 mars 2021;
363. Teague WG. Blood Eosinophilia May Not Adequately Estimate Lung Fluid Eosinophilia in Childhood Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract.* oct 2019;7(7):2497-8.
364. Nakagome K, Nagata M. Involvement and Possible Role of Eosinophils in Asthma Exacerbation. *Front Immunol.* 2018;9:2220.
365. Hatchwell L, Collison A, Girkin J, Parsons K, Li J, Zhang J, et al. Toll-like receptor 7 governs interferon and inflammatory responses to rhinovirus and is suppressed by IL-5-induced lung eosinophilia. *Thorax.* sept 2015;70(9):854-61.
366. Nagakumar P, Puttur F, Gregory LG, Denney L, Fleming L, Bush A, et al. Pulmonary type-2 innate lymphoid cells in paediatric severe asthma: phenotype and response to steroids. *Eur Respir J.* août 2019;54(2).
367. Ross KR, Gupta R, DeBoer MD, Zein J, Phillips BR, Mauger DT, et al. Severe asthma during childhood and adolescence: A longitudinal study. *J Allergy Clin Immunol.* jan 2020;145(1):140-146.e9.
368. Gupta A, Ikeda M, Geng B, Azmi J, Price RG, Bradford ES, et al. Long-term safety and pharmacodynamics of mepolizumab in children with severe asthma with an eosinophilic phenotype. *J Allergy Clin Immunol.* nov 2019;144(5):1336-1342.e7.
369. Saglani S, Bush A, Carroll W, Cunningham S, Fleming L, Gaillard E, et al. Biologics for paediatric severe asthma: trick or TREAT? *Lancet Respir Med.* 2019;7(4):294-6.
370. Sabogal Piñeros YS, Bal SM, van de Pol MA, Dierdorff BS, Dekker T, Dijkhuis A, et al. Anti-IL-5 in Mild Asthma Alters Rhinovirus-induced Macrophage, B-Cell, and Neutrophil Responses (MATERIAL). A Placebo-controlled, Double-Blind Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 2019;199(4):508-17.
371. Fleming L, Tsartsali L, Wilson N, Regamey N, Bush A. Sputum inflammatory phenotypes are not stable in children with asthma. *Thorax.* août 2012;67(8):675-81.

372. Lejeune S, Engelmann I, Dessein R, Pouessel G, Ducoin H, Delvart C, et al. Microbiological status in preschool asthma: the VIRASTHMA 2 study. *European Respiratory Journal* [Internet]. 28 sept 2019 [cité 2 févr 2020];54(suppl 63). Disponible sur: https://erj.ersjournals.com/content/54/suppl_63/OA4938
373. Holt PG, Mok D, Panda D, Renn L, Fabozzi G, deKlerk NH, et al. Developmental regulation of type 1 and type 3 interferon production and risk for infant infections and asthma development. *J Allergy Clin Immunol*. mars 2019;143(3):1176-1182.e5.
374. Custovic A, Belgrave D, Lin L, Bakhsoliani E, Telcian AG, Solari R, et al. Cytokine Responses to Rhinovirus and Development of Asthma, Allergic Sensitization, and Respiratory Infections during Childhood. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 mai 2018;197(10):1265-74.
375. Abrams EM, Raissy HH. Emerging Therapies in the Treatment of Early Childhood Wheeze. *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol*. 1 juin 2019;32(2):78-80.
376. Cazzola M, Anapurapu S, Page CP. Polyvalent mechanical bacterial lysate for the prevention of recurrent respiratory infections: a meta-analysis. *Pulm Pharmacol Ther*. févr 2012;25(1):62-8.
377. Gutiérrez-Tarango MD, Berber A. Safety and Efficacy of Two Courses of OM-85 BV in the Prevention of Respiratory Tract Infections in Children During 12 Months. *CHEST*. 1 juin 2001;119(6):1742-8.
378. Schaad UB. OM-85 BV, an immunostimulant in pediatric recurrent respiratory tract infections: a systematic review. *World J Pediatr*. févr 2010;6(1):5-12.
379. Collet JP, Ducruet T, Kramer MS, Haggerty J, Floret D, Chomel JJ, et al. Stimulation of nonspecific immunity to reduce the risk of recurrent infections in children attending day-care centers. The Epicrèche Research Group. *Pediatr Infect Dis J*. août 1993;12(8):648-52.
380. Yin J, Xu B, Zeng X, Shen K. Broncho-Vaxom in pediatric recurrent respiratory tract infections: A systematic review and meta-analysis. *Int Immunopharmacol*. janv 2018;54:198-209.
381. Ricci R, Palmero C, Bazurro G, Riccio AM, Garelli V, Di Marco E, et al. The administration of a polyvalent mechanical bacterial lysate in elderly patients with COPD results in serological signs of an efficient immune response associated with a reduced number of acute episodes. *Pulm Pharmacol Ther*. févr 2014;27(1):109-13.
382. Emeryk A, Bartkowiak-Emeryk M, Raus Z, Braidó F, Ferlazzo G, Melioli G. Mechanical bacterial lysate administration prevents exacerbation in allergic asthmatic children-The EOLIA study. *Pediatr Allergy Immunol*. 2018;29(4):394-401.
383. Razi CH, Harmancı K, Abacı A, Özdemir O, Hızlı S, Renda R, et al. The immunostimulant OM-85 BV prevents wheezing attacks in preschool children. *J Allergy Clin Immunol*. oct 2010;126(4):763-9.

384. Oral Bacterial Extract for the Prevention of Wheezing Lower Respiratory Tract Illness - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cité 10 févr 2020]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02148796>
385. Huber M, Mossmann H, Bessler WG. Th1-orientated immunological properties of the bacterial extract OM-85-BV. *Eur J Med Res.* 20 mai 2005;10(5):209-17.
386. Zelle-Rieser C, Ramoner R, Bartsch G, Thurnher M. A clinically approved oral vaccine against pneumotropic bacteria induces the terminal maturation of CD83+ immunostimulatory dendritic cells. *Immunol Lett.* 1 févr 2001;76(1):63-7.
387. Mauël J. Stimulation of Immunoprotective Mechanisms by OM-85 BV. *RES.* 1994;61(Suppl. 1):8-15.
388. Sousa FH, Casanova V, Findlay F, Stevens C, Svoboda P, Pohl J, et al. Cathelicidins display conserved direct antiviral activity towards rhinovirus. *Peptides.* sept 2017;95:76-83.
389. Li Y, Chu X, Liu C, Huang W, Yao Y, Xia Y, et al. Exogenous murine antimicrobial peptide CRAMP significantly exacerbates Ovalbumin-induced airway inflammation but ameliorates oxazolone-induced intestinal colitis in BALB/c mice. *Hum Vaccin Immunother.* 02 2018;14(1):146-58.
390. Telcian AG, Zdrengeha MT, Edwards MR, Laza-Stanca V, Mallia P, Johnston SL, et al. Vitamin D increases the antiviral activity of bronchial epithelial cells in vitro. *Antiviral Res.* 2017;137:93-101.
391. Greiller CL, Suri R, Jolliffe DA, Keadze T, Hirsman AG, Griffiths CJ, et al. Vitamin D attenuates rhinovirus-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and platelet-activating factor receptor (PAFR) in respiratory epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019;187:152-9.
392. Schögler A, Muster RJ, Kieninger E, Casaulta C, Tapparel C, Jung A, et al. Vitamin D represses rhinovirus replication in cystic fibrosis cells by inducing LL-37. *Eur Respir J.* févr 2016;47(2):520-30.
393. Martineau AR, Jolliffe DA, Hooper RL, Greenberg L, Aloia JF, Bergman P, et al. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data. *BMJ.* 15 févr 2017;356:i6583.
394. Sandhu MS, Casale TB. The role of vitamin D in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* sept 2010;105(3):191-9; quiz 200-2, 217.
395. Kim V, Abreu RM, Nakagawa DM, Baldassare RM, Carrilho FJ, Ono SK. Pegylated interferon alfa for chronic hepatitis B: systematic review and meta-analysis. *J Viral Hepat.* mars 2016;23(3):154-69.
396. Lavender KJ, Gibbert K, Peterson KE, Van Dis E, Francois S, Woods T, et al. Interferon Alpha Subtype-Specific Suppression of HIV-1 Infection In Vivo. *J Virol.* 01 2016;90(13):6001-13.

397. Becker TM, Durrani SR, Bochkov YA, Devries MK, Rajamanickam V, Jackson DJ. Effect of exogenous interferons on rhinovirus replication and airway inflammatory responses. *Ann Allergy Asthma Immunol.* nov 2013;111(5):397-401.
398. Djukanović R, Harrison T, Johnston SL, Gabbay F, Wark P, Thomson NC, et al. The effect of inhaled IFN- β on worsening of asthma symptoms caused by viral infections. A randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 juill 2014;190(2):145-54.
399. McCrae C, Olsson M, Aurell M, Lundin C, Paraskos J, Cavallin A, et al. On-Demand Inhaled Interferon-Beta 1a for the Prevention of Severe Asthma Exacerbations: Results of the INEXAS Phase 2a Study. In: D12 IMMUNOTHERAPY IN LUNG DISEASE [Internet]. American Thoracic Society; 2018 [cité 4 févr 2020]. p. A6165-A6165. (American Thoracic Society International Conference Abstracts). Disponible sur: https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm-conference.2018.197.1_MeetingAbstracts.A6165
400. A Study in Asthma Patients to Evaluate Efficacy, Safety and Tolerability of 14 Days Once Daily Inhaled Interferon Beta-1a After the Onset of Symptoms of an Upper Respiratory Tract Infection - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cité 5 févr 2020]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02491684>
401. Thibaut HJ, De Palma AM, Neyts J. Combating enterovirus replication: state-of-the-art on antiviral research. *Biochem Pharmacol.* 15 janv 2012;83(2):185-92.
402. Effects of Pleconaril Nasal Spray on Common Cold Symptoms and Asthma Exacerbations Following Rhinovirus Exposure (Study P04295) - Study Results - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cité 4 mai 2020]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT00394914>
403. Potaczek DP, Unger SD, Zhang N, Taka S, Michel S, Akdağ N, et al. Development and characterization of DNAzyme candidates demonstrating significant efficiency against human rhinoviruses. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143(4):1403-15.
404. Subrata LS, Bizzantino J, Mamessier E, Bosco A, McKenna KL, Wikström ME, et al. Interactions between Innate Antiviral and Atopic Immunoinflammatory Pathways Precipitate and Sustain Asthma Exacerbations in Children. *The Journal of Immunology.* 15 août 2009;183(4):2793-800.
405. Lejeune S, Engelmann I, Dessein R, Pouessel G, Ducoin H, Delvart C, et al. Microbiological status in preschool asthma: the VIRASTHMA 2 study. *European Respiratory Journal* [Internet]. 28 sept 2019 [cité 2 févr 2020];54(suppl 63). Disponible sur: https://erj.ersjournals.com/content/54/suppl_63/OA4938
406. Turunen R, Jartti T, Bochkov YA, Gern JE, Vuorinen T. Rhinovirus species and clinical characteristics in the first wheezing episode in children: Rhinovirus Species and the First Wheezing Episode. *J Med Virol.* déc 2016;88(12):2059-68.
407. Hasegawa K, Mansbach JM, Bochkov YA, Gern JE, Piedra PA, Bauer CS, et al. Association of Rhinovirus C Bronchiolitis and Immunoglobulin E Sensitization During Infancy With Development of Recurrent Wheeze. *JAMA Pediatr.* juin 2019;173(6):544-52.

408. Just J, Deschildre A, Lejeune S, Amat F. New perspectives of childhood asthma treatment with biologics. *Pediatr Allergy Immunol.* 2019;30(2):159-71.
409. Busse WW, Morgan WJ, Gergen PJ, Mitchell HE, Gern JE, Liu AH, et al. Randomized trial of omalizumab (anti-IgE) for asthma in inner-city children. *N Engl J Med.* 17 mars 2011;364(11):1005-15.
410. Esquivel A, Busse WW, Calatroni A, Togias AG, Grindle KG, Bochkov YA, et al. Effects of Omalizumab on Rhinovirus Infections, Illnesses, and Exacerbations of Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 2017;196(8):985-92.
411. Kantor DB, McDonald MC, Stenquist N, Schultz BJ, Smallwood CD, Nelson KA, et al. Omalizumab Is Associated with Reduced Acute Severity of Rhinovirus-triggered Asthma Exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 2016;194(12):1552-5.
412. Heymann PW, Platts-Mills TA, Woodfolk JA, Borish L, Murphy DD, Carper HT, et al. Understanding the Asthmatic Response to an Experimental Rhinovirus Infection: Exploring the Effects of Blocking IgE. *J Allergy Clin Immunol.* 1 févr 2020;
413. Teach SJ, Gill MA, Togias A, Sorkness CA, Arbes SJ, Calatroni A, et al. Preseasonal treatment with either omalizumab or an inhaled corticosteroid boost to prevent fall asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol.* déc 2015;136(6):1476-85.
414. Gill MA, Liu AH, Calatroni A, Krouse RZ, Shao B, Schiltz A, et al. Enhanced plasmacytoid dendritic cell antiviral responses after omalizumab. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(5):1735-1743.e9.
415. Farber HJ, Batsell RR, Silveira EA, Calhoun RT, Giardino AP. The Impact of Tobacco Smoke Exposure on Childhood Asthma in a Medicaid Managed Care Plan. *Chest.* mars 2016;149(3):721-8.
416. Li YF, Gilliland FD, Berhane K, McConnell R, Gauderman WJ, Rappaport EB, et al. Effects of in utero and environmental tobacco smoke exposure on lung function in boys and girls with and without asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* déc 2000;162(6):2097-104.
417. Singh SP, Gundavarapu S, Peña-Philippides JC, Rir-Sima-ah J, Mishra NC, Wilder JA, et al. Prenatal secondhand cigarette smoke promotes Th2 polarization and impairs goblet cell differentiation and airway mucus formation. *J Immunol.* 1 nov 2011;187(9):4542-52.
418. Strzelak A, Ratajczak A, Adamiec A, Feleszko W. Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. mai 2018 [cité 27 avr 2021];15(5). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5982072/>
419. Pichavant M, Sharan R, Le Rouzic O, Olivier C, Hennegrave F, Rémy G, et al. IL-22 Defect During *Streptococcus pneumoniae* Infection Triggers Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *EBioMedicine.* nov 2015;2(11):1686-96.
420. Savin Z, Kivity S, Yonath H, Yehuda S. Smoking and the intestinal microbiome. *Arch Microbiol.* juill 2018;200(5):677-84.

421. Karvonen AM, Hyvärinen A, Korppi M, Haverinen-Shaughnessy U, Renz H, Pfefferle PI, et al. Moisture damage and asthma: a birth cohort study. *Pediatrics*. mars 2015;135(3):e598-606.
422. Pekkanen J, Hyvärinen A, Haverinen-Shaughnessy U, Korppi M, Putus T, Nevalainen A. Moisture damage and childhood asthma: a population-based incident case-control study. *Eur Respir J*. mars 2007;29(3):509-15.
423. Tischer CG, Hohmann C, Thiering E, Herbarth O, Müller A, Henderson J, et al. Meta-analysis of mould and dampness exposure on asthma and allergy in eight European birth cohorts: an ENRIECO initiative. *Allergy*. déc 2011;66(12):1570-9.
424. Fitzpatrick AM, Bacharier LB, Guilbert TW, Jackson DJ, Szeffler SJ, Beigelman A, et al. Phenotypes of Recurrent Wheezing in Preschool Children: Identification by Latent Class Analysis and Utility in Prediction of Future Exacerbation. *J Allergy Clin Immunol Pract*. mars 2019;7(3):915-924.e7.
425. Crestani E, Harb H, Charbonnier L-M, Leirer J, Motsinger-Reif A, Rachid R, et al. Untargeted metabolomic profiling identifies disease-specific signatures in food allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. mars 2020;145(3):897-906.
426. Swann JR, Want EJ, Geier FM, Spagou K, Wilson ID, Sidaway JE, et al. Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 mars 2011;108 Suppl 1:4523-30.
427. Lee-Sarwar KA, Lasky-Su J, Kelly RS, Litonjua AA, Weiss ST. Gut Microbial-Derived Metabolomics of Asthma. *Metabolites*. 6 mars 2020;10(3).
428. Grüner N, Mattner J. Bile Acids and Microbiota: Multifaceted and Versatile Regulators of the Liver-Gut Axis. *Int J Mol Sci*. 30 janv 2021;22(3).
429. Song X, Sun X, Oh SF, Wu M, Zhang Y, Zheng W, et al. Microbial bile acid metabolites modulate gut ROR γ + regulatory T cell homeostasis. *Nature*. 2020;577(7790):410-5.
430. Hang S, Paik D, Yao L, Kim E, Trinath J, Lu J, et al. Bile acid metabolites control TH17 and Treg cell differentiation. *Nature*. 2019;576(7785):143-8.
431. Li P, Zhang T, Xiao Y, Tian L, Cui B, Ji G, et al. Timing for the second fecal microbiota transplantation to maintain the long-term benefit from the first treatment for Crohn's disease. *Appl Microbiol Biotechnol*. janv 2019;103(1):349-60.
432. Konieczna P, Groeger D, Ziegler M, Frei R, Ferstl R, Shanahan F, et al. *Bifidobacterium infantis* 35624 administration induces Foxp3 T regulatory cells in human peripheral blood: potential role for myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Gut*. mars 2012;61(3):354-66.
433. Wang HT, Anvari S, Anagnostou K. The Role of Probiotics in Preventing Allergic Disease. *Children (Basel)*. 5 févr 2019;6(2).
434. Cuello-Garcia C, Fiocchi A, Pawankar R, Yepes-Nuñez JJ, Morgano GP, Zhang Y, et al. Prebiotics for the prevention of allergies: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Exp Allergy*. nov 2017;47(11):1468-77.

435. Thorburn AN, McKenzie CI, Shen S, Stanley D, Macia L, Mason LJ, et al. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nat Commun.* 23 juin 2015;6:7320.
436. Schuijt TJ, Lankelma JM, Scicluna BP, de Sousa e Melo F, Roelofs JJTH, de Boer JD, et al. The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia. *Gut.* avr 2016;65(4):575-83.
437. Sencio V, Barthelemy A, Tavares LP, Machado MG, Soulard D, Cuinat C, et al. Gut Dysbiosis during Influenza Contributes to Pulmonary Pneumococcal Superinfection through Altered Short-Chain Fatty Acid Production. *Cell Rep.* 3 mars 2020;30(9):2934-2947.e6.
438. Brown RL, Sequeira RP, Clarke TB. The microbiota protects against respiratory infection via GM-CSF signaling. *Nat Commun.* 15 2017;8(1):1512.
439. Schwerk N, Brinkmann F, Soudah B, Kabesch M, Hansen G. Wheeze in preschool age is associated with pulmonary bacterial infection and resolves after antibiotic therapy. *PLoS ONE.* 2011;6(11):e27913.
440. Zimmermann P, Ziesenitz VC, Curtis N, Ritz N. The Immunomodulatory Effects of Macrolides-A Systematic Review of the Underlying Mechanisms. *Front Immunol.* 2018;9:302.
441. Mandhane PJ, Paredes Zambrano de Silbernagel P, Aung YN, Williamson J, Lee BE, Spier S, et al. Treatment of preschool children presenting to the emergency department with wheeze with azithromycin: A placebo-controlled randomized trial. *PLoS ONE.* 2017;12(8):e0182411.
442. Pincheira MA, Bacharier LB, Castro-Rodriguez JA. Efficacy of Macrolides on Acute Asthma or Wheezing Exacerbations in Children with Recurrent Wheezing: A Systematic Review and Meta-analysis. *Paediatr Drugs.* 14 janv 2020;
443. Brusselle GG, Vanderstichele C, Jordens P, Deman R, Slabbynck H, Ringoet V, et al. Azithromycin for prevention of exacerbations in severe asthma (AZISAST): a multicentre randomised double-blind placebo-controlled trial. *Thorax.* avr 2013;68(4):322-9.
444. Gibson PG, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, Hodge S, James AL, et al. Effect of azithromycin on asthma exacerbations and quality of life in adults with persistent uncontrolled asthma (AMAZES): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 12 août 2017;390(10095):659-68.
445. Hahn DL, Grasmick M, Hetzel S, Yale S, AZMATICS (AZithroMycin-Asthma Trial In Community Settings) Study Group. Azithromycin for bronchial asthma in adults: an effectiveness trial. *J Am Board Fam Med.* août 2012;25(4):442-59.
446. Hiles SA, McDonald VM, Guilhermino M, Brusselle GG, Gibson PG. Does maintenance azithromycin reduce asthma exacerbations? An individual participant data meta-analysis. *Eur Respir J.* nov 2019;54(5).

447. Simpson JL, Powell H, Boyle MJ, Scott RJ, Gibson PG. Clarithromycin targets neutrophilic airway inflammation in refractory asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 janv 2008;177(2):148-55.
448. Yamaya M, Nomura K, Arakawa K, Sugawara M, Deng X, Lusamba Kalonji N, et al. Clarithromycin decreases rhinovirus replication and cytokine production in nasal epithelial cells from subjects with bronchial asthma: effects on IL-6, IL-8 and IL-33. *Arch Pharm Res.* 31 août 2017;
449. Gielen V, Johnston SL, Edwards MR. Azithromycin induces anti-viral responses in bronchial epithelial cells. *Eur Respir J.* sept 2010;36(3):646-54.
450. Bush A. Azithromycin is the answer in paediatric respiratory medicine, but what was the question? *Paediatr Respir Rev.* 16 août 2019;
451. Richgels PK, Yamani A, Chougnet CA, Lewkowich IP. Maternal house dust mite exposure during pregnancy enhances severity of house dust mite-induced asthma in murine offspring. *J Allergy Clin Immunol.* nov 2017;140(5):1404-1415.e9.

ANNEXE 1

Lejeune S, Deschildre A, Le Rouzic O, et al. Childhood asthma heterogeneity at the era of precision medicine: Modulating the immune response or the microbiota for the management of asthma attack. Biochem Pharmacol. 2020 Sep;179:114046. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114046. Epub 2020 May 22. PMID: 32446884; PMCID: PMC7242211.

Version finale, non formatée par éditeur, ci-dessous :

Childhood asthma heterogeneity at the era of precision medicine: Modulating the immune response or the microbiota for the management of asthma attack.

Lejeune Stéphanie^{1,2}, Deschildre Antoine^{1,2}, Le Rouzic Olivier^{2,3}, Engelmann Ilka⁴, Dessein Rodrigue^{2,5}, Pichavant Muriel², Gosset Philippe²

¹ CHU Lille, Univ. Lille, Pediatric Pulmonology and Allergy Department. Hôpital Jeanne de Flandre, F-59000 Lille, France.

² Univ. Lille, INSERM Unit 1019, CNRS UMR 9017 CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, Center for infection and immunity of Lille, F-59019 Lille cedex, France.

³ CHU Lille, Univ. Lille, Department of Respiratory Diseases, F- 59000 Lille cedex, France.

⁴ Univ. Lille, Virology laboratory, EA3610, Institute of Microbiology, CHU Lille, F-59037 Lille cedex, France.

⁵ Univ. Lille, Bacteriology departement, Institute of Microbiology, CHU Lille, F-59037 Lille cedex, France.

Corresponding author:

Philippe Gosset, PhD

OpInFIELD, CIIL, Institut Pasteur de Lille

1, rue du Pr A. Calmette

59019- Lille Cedex –FRANCE

Tel : +33 320 87 79 65

E-mail: philippe.gosset@pasteur-lille.fr

Words count: 9250 words

Abstract words count: 249 words

Key words: acute asthma, asthma exacerbation, childhood, virus, microbiota, therapeutics

ORCID Numbers:

S. Lejeune: <https://orcid.org/0000-0001-7009-2113>

A Deschildre: <https://orcid.org/0000-0003-2006-7221>

O. Le Rouzic: <https://orcid.org/0000-0003-4439-2950>

M. Pichavant: <https://orcid-org/0000-0002-1315-4397>

P. Gosset: <https://orcid.org/0000-0002-4043-6429>

Abstract (249 words)

Exacerbations are a main characteristic of asthma. In childhood, the risk is increasing with severity. Exacerbations are a strong phenotypic marker, particularly of severe and therapy-resistant asthma. These early-life events may influence the evolution and be involved in lung function decline.

In children, asthma attacks are facilitated by exposure to allergens and pollutants, but are mainly triggered by microbial agents. Multiple studies have assessed immune responses to viruses, and to a lesser extent bacteria, during asthma exacerbation. Research has identified impairment of innate immune responses in children, related to altered pathogen recognition, interferon release, or anti-viral response. Influence of this host-microbiota dialog on the adaptive immune response may be crucial, leading to the development of biased T helper (Th)₂ inflammation. These dynamic interactions may impact the presentations of asthma attacks, and have long-term consequences.

The aim of this review is to synthesize studies exploring immune mechanisms impairment against viruses and bacteria promoting asthma attacks in children. The potential influence of the nature of infectious agents and/or preexisting microbiota on the development of exacerbation is also addressed. We then discuss our understanding of how these diverse host-microbiota interactions in children may account for the heterogeneity of endotypes and clinical presentations. Finally, improving the knowledge of the pathophysiological processes induced by infections has led to offer new opportunities for the development of preventive or curative therapeutics for acute asthma. A better definition of asthma endotypes associated with precision medicine might lead to substantial progress in the management of severe childhood asthma.

Introduction

Childhood asthma is a major public health issue in industrialized countries. Development and progression of the disease is marked by exacerbations, also called asthma attacks, which are one of the most prevalent causes of hospitalization in children with consequently significant costs worldwide [1–3]. They constitute key events in the natural history of childhood asthma and are major markers of its heterogeneity [4]. Mechanisms leading to asthma attacks are not fully understood and may differ between children, according to their age range or phenotype.

Pediatric literature on asthma usually distinguishes preschool recurrent wheeze / also called preschool asthma in children aged 5 years and younger; from school-age children asthma, in those aged 6 to 11 years; and adolescent asthma, in those aged 12-17 years [3,5,6]. During preschool years, these events can be isolated, with few or no interval symptoms, and their persistence despite conventional maintenance treatment, such as inhaled corticosteroids (ICS), is a marker of severity [6,7]. Although viral infections are the main triggers of acute asthma, early and multiple allergic sensitization is a strong risk factor of presenting severe and frequent exacerbations [7,8]. In school-age children and adolescents, acute asthma attacks are usually less frequent, and not only triggered by lung infections, but also by exposure to allergens and pollutants [3,9,10]. Exacerbations rates increase with the severity of the disease, which is defined according to treatment pressure to obtain asthma control [4,5]. Repetition of frequent and severe episodes under high doses of ICS associated with another maintenance treatment (mainly long acting beta2 agonists) is a criteria of severe asthma in these age-groups [11,12], as demonstrated in pediatric asthma cohorts [13,14]. Additionally, it is now recognized that patients prone to exacerbations constitute a distinct susceptibility phenotype, possibly associated with different endotypes, including specific airway inflammation patterns, or inflammatory mechanisms in response to infectious agents [15]. In some individuals, the severity of the disease and propensity to develop acute asthma may also vary throughout the course of childhood [16]. These early-life events can influence

the long-term evolution at adult-age, in terms of asthma persistence, phenotype and alterations of lung function, that may lead to early chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [17]. Early interventions could modify the natural history of the disease. However, in children with severe asthma, conventional maintenance therapies may be insufficient to prevent asthma attacks [7,18], and repeated or prolonged oral corticosteroids are associated with many side effects, such as defective growth [19]. New treatment strategies are now needed. Interestingly, some studies have shown the efficacy of biologics in pediatric asthma, mainly on severe exacerbations, and suggested disease-modifying properties of some of them, making it a particularly attractive strategy in children [20].

Viruses are closely linked to wheezing illnesses during early childhood [21]. Respiratory syncytial virus (RSV), and rhinoviruses (RV), both RNA viruses, are among the most common causes of lower respiratory tract infections, *i.e.* bronchiolitis and/or pneumonia, with a predominance of RSV in the first 12 months of life and then RV in the following years [22]. Birth cohort studies and other epidemiological studies have shown a strong association between early RV-induced wheeze, and to a lesser extent, RSV-induced wheeze, and subsequent development of childhood asthma [23–26]. Moreover, pediatric asthma attacks are mainly triggered by respiratory viruses, particularly RV, both in the preschool and school-age [10,27–31]. The question of whether asthma-associated underlying inflammation promotes the pathogenic effect of viral infection or whether the virus induces exaggerated inflammation is still under debate and has been the subject of many research studies over the past 25 years.

Alongside viruses, there is also a growing interest on the impact of bacteria in the onset of asthma attacks and the perpetuation of inflammation. Neonatal airway colonization with bacteria including *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and/or *Streptococcus pneumoniae*, has been associated with persistence of asthma [32]. Indeed, Kloepfer, *et al.* have shown frequent viral and bacterial co-infection in asthmatic children aged 2-18 years [33]. It is well known that viral infection can predispose to bacterial secondary infection. A few

studies have begun to describe inflammatory phenotypes linked with altered microbiota, known as dysbiosis, within the airways [34,35]. Interactions between viruses and bacteria, personal risk factors (e.g. genetic background and atopy), and environmental exposures may promote more severe acute asthma episodes that will influence the progression of asthma [21]. However, the precise role of each of these factors and their interplay with the host immune defenses remains to be elucidated.

The aim of this review was to synthesize studies exploring human innate immune mechanisms responses against viruses and bacteria during asthma attacks and to provide hypotheses to decipher how they may contribute to the phenotypes observed in childhood asthma. We will then discuss how therapeutic strategies targeting these pathways may improve the management of acute asthma in children.

1/ Impact of viruses on the onset of asthma attacks: chicken or egg?

Up to now, mechanisms explaining susceptibility to develop acute asthma upon respiratory viruses, in particular RV and to a lesser extent RSV, in asthmatic children prone to exacerbation are not fully understood. As innate immune cells play a central role in the onset of anti-viral defenses, they have been the focus of many studies in pediatric and adult asthma, conducted both *ex-vivo* and *in-vivo*, contributing to the identification of new asthma endotypes. The original studies presented in this review have been summarized in **Table 1**.

1.1 Virus recognition during asthma attack is mainly driven by airway epithelial cells

Before addressing the viral infections impact on asthma attacks, we will briefly describe the virus-induced anti-viral responses. Airway epithelial cells (AEC) are the main cellular targets of pathogens, and act as sentinel cells in response to infection (**Fig 1**) [36–38]. These structural cells are a central part of innate immune response [39]. They first act as a complex physicochemical barrier, *via* the presence of tight intercellular junctions and the muco-ciliary escalator, clearing foreign particles out. If not cleared, Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMP) on the surface of infectious agents, will then be recognized through Pattern Recognition Receptors (PRR), in particular Toll-Like Receptors (TLR) and intracellular RNA helicases, which will trigger innate immune responses. Although AEC play an early and central role in orchestrating innate immune defenses, innate immune cells including alveolar macrophages (AM) and dendritic cells (DC), especially plasmacytoid DC (pDC), are also involved in innate immune responses against pathogens [40–44].

Studies aiming to explore PRR recognition by epithelial cells and innate immune cells from asthmatic children are multiple but heterogeneous. In cultures of primary AEC from children with severe therapy resistant asthma (STRA), lower expression levels of extracellular and intracellular PRR than healthy controls were observed at baseline [45]. Expression of PRR was also decreased upon infection with RV on these cultures and in those from adult

asthmatics, suggesting a persistent defect in adulthood [45,46]. Hence, in AM from adults with severe asthma, Rupani, *et al.* also showed a reduction of TLR7 expression after RV infection compared with healthy subjects, with an effect potentially mediated by microRNAs [47]. Conversely, in *ex vivo* cultures of cells from broncho-alveolar lavages (BAL) cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from adults with mild-to-moderate asthma, no impairment of PRR expression (TLR, RNA-helicases) was observed [48]. This discrepancy was also illustrated by our *in vivo* real-life study conducted in 72 school-age children with allergic asthma hospitalized for severe exacerbation, associated with viral infection in 64% (RV: 51%) [49]. Whereas viral infection did not modulate PRR expression and function on PBMC as compared with non-infected asthmatic patients, a reduced expression of PRR was reported in a sub-group of children prone to reinfection outside an exacerbation (steady state 8 weeks later), and displaying neutrophilic airway inflammation away from exacerbation [10,49]. Although present both at exacerbation and steady state, this impairment of PRR expression as well as the inflammatory profile was not associated with the clinical evolution and risk of exacerbations in the year following exacerbation [50].

Altogether, these data suggest that impairment of PRR recognition in asthmatic children could be limited to a subpopulation of patients, potentially severe, and may persist into adulthood. Rather than an altered baseline expression or synthesis of PRR, a down-regulation of the expression and activation of the co-receptors, and/or enzymes involved in signaling may be determinant. Longitudinal *in vivo* studies could provide more insights into these mechanisms and allow studying their dynamics during the course of the disease.

1.2 Modulation of anti-viral responses

Activation of PRR on AEC and innate immune cells will onset various signaling pathways, such as interferon regulatory factors (IRF) 3 and 7, and nuclear factor-kappa B pathway (NF- κ B). This will lead to the production of anti-viral molecules such as interferons (IFN) and anti-microbial peptides, including interferon-stimulated genes (ISG) as well as

cathelicidins and defensins [51]. Anti-microbial peptides have immunomodulatory activities and can alter host cellular responses. LL-37, also called human cationic antimicrobial peptide is the only human peptide of the cathelicidin family and one of the most-studied [52,53]. In *in vitro* models, LL-37 has the ability to reduce virus replication, notably for RSV [53,54]. In a population of 77 asthmatic children, Arikoglu, *et al.* have shown that children prone to develop acute asthma attacks displayed higher blood levels of cathelicidins and lower levels of vitamin D at baseline than children with controlled asthma, suggesting a role for anti-microbial peptides in acute asthma [55]. However, the evolution of these baseline levels during acute asthma attacks and their impact on the anti-viral and inflammatory response remain unknown.

The majority of studies conducted in asthmatic subjects have had the aim to explore anti-viral IFN response upon viral infection. They have observed a defect of production of type I IFN. In response to RV, most *ex-vivo* studies have demonstrated an impairment of IFN- α and IFN- β production in AEC from pediatric asthmatic patients compared to levels observed in cells from healthy controls [45,56–58]. This impairment was also demonstrated in adult cells [59–61]. Interestingly, similar results have been observed in *ex-vivo* cultures of PBMC. As early as 2002, Bufe, *et al.* have shown in an *ex-vivo* model a defective production of IFN- α in PBMC from pediatric asthmatic patients compared to healthy controls, upon Newcastle disease virus (NDV) infection, an avian respiratory virus belonging to the *Paramyxoviridae* family and well-known potent inducer of IFN- α [62]. They later extended these observations in whole blood cells cultures from adult asthmatics, upon infection with either NDV or RSV [63]. In the later years, similar results have been shown in pediatric studies [64,65] but also in adult studies [45,48,66]. So far, only a few studies have been conducted upon *in vivo* inoculation and natural infection. In a cohort of preschool children, IFN- α systemic levels were reduced at the time of RV-induced exacerbation in asthmatics, as compared with healthy controls during an asymptomatic RV infection [30]. In our recently published cohort of preschool asthmatic children with natural virus-induced exacerbation (RV: 73%), the most severe children, who were prone-to-exacerbation, displayed lower plasma concentrations of

IFN- β at exacerbation than the others, suggesting a defect of production in response to viruses limited to this sub-population [8]. In another study conducted in older children, we did not observe altered IFN responses in sputum, plasma and cultures of stimulated-PBMC of patients presenting a virus-induced exacerbation, compared with those with a non-virus-induced exacerbation [49]. In adult asthmatics, a significant type I IFN defect was demonstrated in bronchial epithelium and sub-epithelium obtained from bronchial biopsies compared with healthy controls, after experimental infection with RV-A16 [67]. In contrast, Schwantes, *et al.* described elevated rather than low RNA levels of type I IFN in sputum from adult asthmatic patients, compared to those observed in healthy subjects, early in the course of a virus-induced exacerbation.[68].

Following their discovery in 2003, there has been increasing knowledge regarding the implication of type III IFN in anti-viral responses [69]. *Ex-vivo* studies conducted in AEC from asthmatic subjects have suggested a parallel impairment of IFN- λ 1 and IFN- λ 2/3 production upon RV infection in pediatric patients [45,56,57], and this impairment seemed to persist in adult patients [46,59]. *In vivo*, this defective response was not observed at the time of asthma exacerbation in sputum and/or PBMC from atopic asthmatic children [30,49,70], nor in adults [68,71], suggesting that there are compensatory mechanisms or other sources of IFN, supplementing the defect observed in resident cells.

A few studies have explored the potential pathways leading to a defect of IFN production in asthmatic patients. Downregulation of IRF3 or IRF7, following virus infection in asthmatic cells, has been suggested [57,59]. Gielen, *et al.* have also demonstrated a role of the molecule suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1), exercising a negative-feedback on IFN production following viral infection in children with STRA [57].

Collectively, these studies suggest a potential impairment of anti-viral IFN response, in particular type I IFN, during asthma attack. Rather than explained by immaturity in the first years of life, this defective response could also be limited to a sub-phenotype of patients who

are prone-to-exacerbation, from early childhood to adulthood. The effect of age, the kinetics of the IFN response following viral infection and the impact of viral load in the airways remain to be addressed.

1.3 Cytokines and epithelial-derived alarmins (IL-25, IL-33 and TSLP) response against viral infection

Airway epithelial cells display immunoregulatory properties by producing pro-inflammatory cytokines, including alarmins interleukin (IL)-25, IL-33 and thymic stromal lymphopeietin (TSLP), released upon viral infection, and implicated in the recruitment of macrophages, DC, T cells and granulocytes, such as eosinophils and neutrophils. This will promote the adaptive immune response through DC maturation and migration to draining lymph nodes associated with the airways. Dendritic cells will thus induce naïve T cell differentiation into antigen-specific T cells. This will drive the adaptive immune response within the airways to clear the virus out. The alarmins also contribute to a biased T helper (Th)2 immune response by activating type 2 innate lymphoid cells (ILC2) and polarizing DC in order to promote T cells differentiation (**Fig 1**). This specific cytokine environment in asthmatic patients favor naïve T cells polarization into Th2 cells, producing IL-4, IL-5, IL-13, as opposed to Th1 cells, producing IFN- γ and TNF- β [37,72]. These cytokines are responsible for the type 2 inflammation and induce the pathophysiological features of asthma, including eosinophil mobilization, mucus hypersecretion, smooth muscle hyperplasia and airflow obstruction [3,73].

Under the influence of IL-5, eosinophils will enter the airways and perpetuate type 2 inflammation [49,74]. They will also contribute to resolution of immune responses, including tissue repair [75]. Other cytokines, such as type 17 cytokines: IL-17, IL-21, IL-22, can also promote mucus hypersecretion and production of cytokines and chemokines by AEC. They will favor the recruitment of neutrophils, through the induction of C-X-C chemokines, conducting to a state of chronic inflammation [67]. In the longer term, IL-17 may contribute to

the development of airway remodeling during asthma by enhancing the production of profibrotic cytokines, proangiogenic factors, proteases and collagen [76,77].

In children, the influence of respiratory viruses and innate immune mechanisms on the adaptive immune response development may be crucial. First, some respiratory viruses may induce the release of alarmins, and thus favor the development of Th2 inflammation. A recently published study showed that children with RV-positive-bronchiolitis displayed increased IL-4/IFN- γ ratio in nasopharyngeal aspirates [78]. Upon RSV infection, Lee, *et al.* observed a higher production of TSLP by AEC from asthmatic children compared to healthy controls [79]. Hence, some respiratory viruses may induce Th2 inflammation in the airways of children and this may be increased in an asthmatic environment. In a cohort of preschool asthmatic children, ILC markers, such as soluble ST2, were induced *in vivo* following RV infection in preschool asthmatic children, and were correlated with nasal levels of IL-33 [80]. In our study of school-age children, at exacerbation, airway inflammation in infected patients was characterized by significantly higher IL-5 concentration and eosinophil count than in non-infected patients [49]. This may not be specific to childhood, as Jackson, *et al.* have also demonstrated an induction of IL-4, IL-5 and IL-13 in BAL following RV inoculation in asthmatic subjects, associated with exacerbation severity [81]. Additional *in vitro* experiments showed that IL-33 directly induced Th2 cytokine production by T cells and ILC2. However, this RV-induced Th2 inflammation could be limited to an asthmatic environment in adults, as suggested by an *in vitro* study reproducing the induction of IL-4 and IL-13 by asthmatic PBMC after co-exposition with RV and IL-33, but showing no effect on PBMC from healthy donors [82]. In addition, exposure to respiratory viruses has also been associated with an increase in Th17 cytokines, as demonstrated in co-cultures of RSV-infected AEC with T cells [83].

Interferon production is also closely linked to Th2 and inflammatory cytokines. In asthmatic preschool children prone to exacerbation, we observed simultaneously lower production of Th1 cytokines (IFN- γ), Th2 cytokines (IL-5), pro-inflammatory cytokines (TNF- α), regulatory cytokines (IL-10), and type 1 IFN (IFN- β) during virus-induced exacerbation in

a subgroup of preschool children with characteristics of severe asthma and a history of frequent exacerbations [8]. This association seems to persist in adults, as suggested by Parsons, *et al.* reporting a parallel decrease of type III IFNs and of IL-6, (C-X-C motif) ligand (CXCL)8 and CXCL10 in adult asthmatic AEC inoculated with RV [46]. In a murine model of allergic asthma, IRF3 controlled the parallel evolution of IFN and Th2 cytokines during acute episodes induced by allergen exposure [84]. Some adult studies have suggested bi-directional influences during viral infection. Upon RV infection, pre-treatment with Th2 cytokines in cultures of AEC may impair TLR3 and IRF3 signaling pathway [59], or type 1 and 3 IFN expression [57]. Lower production of type I IFN, displayed by some children, could also reduce the apoptosis of neighbored-infected cells and increase viral loads, consequently amplifying airway inflammation, inflammatory cytokine production and thus, asthma attack severity [58,60].

Altogether, these studies confirm close interactions between innate and adaptive immune mechanisms against viruses in an asthmatic environment. Modulating airway inflammation, particularly Th2 inflammation, could therefore directly improve anti-viral responses during asthma attacks in some children.

1.4 Viral behavior during asthma attack

Although the impairment of anti-viral responses plays a key role in asthma attack, characteristics of the microorganisms are also important. First, pathogenicity of RV strongly differs according to subtypes, probably because of the implication of different cellular targets. Indeed, infection with RV-C strains, which use cadherin-related family member 3 (CDHR3) as a receptor, may be associated with higher clinical severity [10,31,85], whereas B serotypes seem to be responsible for milder symptoms. Interestingly, single nucleotide polymorphism in the *CDHR3* gene, which influences the efficiency of RV-C to infect its target cells, has been associated with childhood asthma susceptibility [86]. Moreover, different viral strains could have different replication rates and thus induce higher viral loads [87]. Rhinovirus C strains

could also modulate the airways inflammation, and induce higher levels of Th2 and/or Th17 cytokines, as shown in preschool children with RV-C-induced wheeze [88]. Second, systemic viremia has been observed in children infected with respiratory viruses, such as RV-C, and young age was found to be a risk factor associated with viremia [89]. This state could induce an enhanced inflammation in children by interaction of viruses with systemic immune cells. Finally, viral-coinfection has been frequently observed at exacerbation in asthmatic children, particularly in the preschool years [30,31]. The combined effects of several viruses within the airways may modulate both the innate and adaptive responses.

These data demonstrate that, in susceptible children, the nature of respiratory viruses, their spreading, as well as their interactions with the host cells may directly impact the inflammation and the severity of asthma exacerbations.

1.5 Emerging role of the airways virome

The role of viral carriage and/or asymptomatic infection at steady state, *i.e.* outside an exacerbation, in asthmatic patients has also been hypothesized. Hence, pediatric studies have shown a frequent virus shedding in children, with RV positive samples observed in 19-29% of unselected asthmatic children and in 15-23% of healthy children [10,28,90,91]. In the previously-cited cohort of preschool children prone to exacerbation, we observed even higher rates, with 67% of positive PCR (51% for RV) at steady state [8]. In 78 school-age children, we also observed that 10% of children had positive RV sampling at exacerbation and steady state, and that RV serotypes were systematically different at both time points, pointing toward reinfection rather than persistence [10]. Consistent with these observations, Bergauer, *et al.* also found 54% of RV at steady state in preschool children with asthma, vs 45% in healthy controls [30]. Interestingly, RV carriage in both asthmatics and healthy controls was found to be associated with higher levels of type III IFN at baseline than in subjects without. This increase in baseline inflammation seems to persist in adulthood. Hence, in sputum cells from 57 asthmatic adults, da Silva, *et al.* have shown higher baseline levels of IFN and anti-viral

molecules compared with healthy subjects [92]. In all, one could hypothesize that RV persistence in asthmatic patients could induce a pro-inflammatory state and/or a desensitization of PRR, which could reduce the response against pathogens within the airways upon new infection.

Alongside RV, other respiratory viruses, could also take part in these processes. Metagenomic analyses have made it possible to identify hundreds of viral species within the airways, constituting the respiratory tract virome [93]. In non-asthmatic children, Wang, *et al.* have shown multiple common epidemic respiratory viruses in children with severe acute respiratory infection, whereas, the virome was less diverse and mainly dominated by the *Anelloviridae* family in healthy children [94]. *Anelloviruses* are major components of the virome and display immunomodulatory properties on both innate and adaptive immunity [95]. Although their presence has been associated with an impaired lung function in asthmatic children [96], to our knowledge, no study has evaluated their association with asthma attacks. Thus, the contribution of these viruses and their interactions with both pathogenic infectious agents, as well as commensal bacteria from the pulmonary microbiota on chronic inflammation and the onset of acute asthma remain to be determined.

2/ The emerging role of pathogenic bacteria and microbiota in asthma

Increasing evidence indicates that the respiratory microbiota, including bacterial and viral microorganisms has an important role in respiratory health and disease [97,98]. In addition, recent data underline the role of bacterial infections in the development and progression of asthma, as summarized in **table 2**.

During the first weeks of life, the respiratory tract begins to develop a niche-specific community pattern, where *Staphylococcus aureus* and *Corynebacterium* replace the originally colonizing bacteria and become the dominant microorganisms [98]. The most dramatic changes occur during the first 2 months. In the following six months, the respiratory microbiota continues to mature; relative abundance of *S. aureus* declines, and an increase in *Moraxella*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Dolosigranulum*, *Alloiococcus*, and *Prevotella sp.* is observed. This period is crucial and alterations of the microbiota have been implicated in the development and the manifestations of chronic lung diseases. .

2.1 Bacteria and asthma development

Using bacterial culture techniques, it has been demonstrated that neonates born to asthmatic mothers with upper airway colonization with *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, and/or *H. influenzae* were at higher risk of presenting asthma at the age of 5 years [32]. This was associated with an aberrant immune response, with increased IL-5 and IL-13 synthesis in PBMC obtained at the age of 6 months [99]. Interestingly, evaluation of the gut microbiota in infants included in the Canadian (CHILD) study showed that infants at risk of asthma exhibited transient alterations of the microbiota, known as dysbiosis, in neonates [100]. More specifically, the relative abundance of the commensal bacterial genera *Lachnospira*, *Veillonella*, *Faecalibacterium*, and *Rothia* was significantly decreased in children at risk of asthma. Furthermore, antibiotic-induced gut dysbiosis has been shown to facilitate the development of allergic asthma in experimental murine models and clinical studies [101]. In a population-based cohort, it has been reported that pre- and post-natal antibiotic exposure was

associated with a higher asthma risk [102]. No significant difference in bacterial diversity was observed between samples from those with wheeze and healthy controls. Age and attendance at day care or kindergarten were important factors in driving bacterial diversity whereas wheeze and viral infection were not found to be significantly associated to the bacterial communities. In the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC) cohort, children for whom antibiotics course was reported before the age of 2 years were more likely to have asthma at age 7, although microbiota was not characterized [103]. Similarly, in British Columbia (Canada), "controlled" antibiotic use during infancy was associated with a reduction in the incidence of pediatric asthma, and was related with the preservation of gut microbial communities [104]. Altogether, these data confirm the need to preserve the microbiota in early infancy in order to limit the development of asthma.

2.2 Relationship between bacteria and asthma attack

Bacterial infections potentially contribute to the severity of symptomatic respiratory viral infections and asthma attacks in children. Indeed, there are bidirectional interactions between viruses and airway bacteria that appear to modulate the severity of illness and the likelihood of asthma attack [20]. Pediatric studies have shown that upper respiratory tract colonization with *Streptococcus*, *Haemophilus*, and/or *Staphylococcus* genus during RSV and RV infection increases the risk of hospitalization independently of age and of the presence of asthma [105,106]. In our previously-cited cohort of preschool children, asthma attacks were frequently associated with viral infection (94%, mostly RV). Pathogenic bacteria were isolated in induced sputum in 56%, mainly *H. influenza*, *M. catharralis* or *S. pneumoniae* [21]. In adult asthmatics, asymptomatic RV infection was associated with increased abundance of *Dolosigranulum* and *Corynebacterium*, whereas symptomatic RV infection seemed to be related with a higher frequency of *Moraxella* [107]. In another adult study, co-infection with virus and bacteria induced higher levels of cytokine/chemokine than bacterial infection [108]. Interestingly, circulating CCL2 and CCL5 concentrations were increased in infected asthmatic patients

compared with non-asthmatic patients. *Streptococcus* species may also influence the course of asthma exacerbation, as shown by Kama, *et al.* in preschool children [109]. Indeed, patients with *S. pneumoniae* colonization in the pharyngeal microbiota had significantly shorter wheezing episodes and reduced lung inflammation (including lower levels of TNF- α).

In summary, these data suggest an ability for bacteria to promote asthma attacks and modulate the inflammation during childhood. Targeting bacterial infections during asthma attacks could thus be an alternative strategy in some children.

2.3 Dysbiosis and impact on asthma natural history

Early-life dysbiosis of the microbiota, in particular lung microbiota, may have long-term consequences on asthma natural history. During viral infection in children less than two years old, detection of *Moraxella* was found to be associated with current wheeze at 5 years old and presence of *Streptococcus*, *Moraxella*, or *Haemophilus* was associated with a high risk of asthma development [110]. Mansbach, *et al.* showed in a joint modeling analysis adjusting for 16 covariates, including viral trigger, that a higher relative abundance of *Moraxella* or *Streptococcus* species 3 weeks after day 1 of hospitalization for severe bronchiolitis was associated with an increased risk of recurrent wheezing [111]. In contrast, no significant difference in microbiota composition was observed between oro-pharyngeal microbiota from children with acute wheezing (0-14 years old) and healthy controls [112]. In this study, the large range of patient ages and day care attendance were important confounding factors, since the microbiota evolves throughout childhood.

In school-age asthmatic children, Zhou, *et al.* assessed by longitudinal measurements the relationship between nasal airway microbiota and either loss of asthma control, or risk of severe exacerbations [113]. Whereas the commensal *Corynebacterium/Dolosigranulum* cluster characterized the patients with the lowest risk of disease progression, a switch towards the *Moraxella* cluster was associated with the highest risk of severe asthma exacerbations. Similarly, in another cohort of school-age asthmatic children, nasal microbiota dominated by

Moraxella species was associated with increased exacerbation risk, and eosinophil activation at exacerbation [35]. *Staphylococcus* or *Corynebacterium* species-dominated microbiota were linked with reduced respiratory illness and exacerbation event rates, whereas *Streptococcus* species-dominated microbiota increased the risk of RV infection. Interestingly, using unbiased airway microbiome-driven clustering, Abdel-Aziz, *et al.* recently described in adult asthmatics two distinct robust severe asthma phenotypes that were associated with airway neutrophilia, and not related to the presence of *Moraxella* species [114]. Robinson, *et al.* assessed the lower airway microbiota by performing BAL at steady state in severe preschool wheezers [34]. They reported two profiles: a *Moraxella* species “dysbiotic” cluster, associated with airway neutrophilia and a “mixed microbiota” cluster associated with macrophage- and lymphocyte-predominant airway inflammation, thus suggesting that bacteria might influence the characteristics of lung inflammation.

Altogether, these data show that airway dysbiosis in early life might contribute to recurrent wheeze and asthma, and to the severity of the disease. Among bacterial species, the early presence of *M. Catharralis* and *H. influenzae* during childhood seems to be a marker of evolution toward a severe disease, through the modulation of the inflammatory reaction. In contrast, colonization with *S. pneumoniae* might have some anti-inflammatory effects. However, the role of bacteria is often exacerbated or modulated by intrinsic (atopy, inflammation characteristics) or extrinsic factors, such as viral infections and antibiotics.

3/ Consequences on asthma phenotypes and endotypes

It is now clear that phenotyping and even more so, endotyping asthmatic patients is an essential step to understand the diversity of immune responses at the time of an asthma attack. We will review the commonly described endotypes of childhood asthma, successively based on airway leukocyte infiltrate, profiles of allergic sensitization and nature of asthma trajectories.

Among airway inflammatory phenotypes, neutrophilic asthma appears to be a distinct endotype, associated with asthma severity in adults, and possibly involved in corticosteroid insensitivity [76]. In children, several studies have shown that association of airway neutrophilia with severity is inconstant [115–118], and may not persist throughout the course of the disease [116,119]. However, neutrophils present in the airways of severe asthmatic children may have enhanced survival and proinflammatory functions that could increase baseline inflammation [120]. As previously stated, airway neutrophilia has also been associated with a different IFN response, at baseline and at the time of asthma attack, both in adults [66,92] and pediatric studies [49]. This could have an impact on lung infections. Thus, we have shown that a subgroup of school-aged children with positive viral PCR both at baseline and exacerbation displayed airway neutrophilia [49]. In severe adult asthmatics, airway neutrophilia has also been associated with lesser microbiota diversity in BAL [114,121]. Finally, experimental RV infection in adult asthmatic subjects directly induces bronchial mucosal neutrophilia [122]. Therefore, the neutrophilic endotype may be characterized by an alteration of airway microbiota and association with viral infections.

Airway eosinophilia is highly frequent in asthmatic children, observed in severe and non-severe asthma, often but not always associated with response to ICS, thus highlighting the diversity of eosinophilic profiles in pediatric asthma [116,118,123]. Mouse models and adult studies have suggested a role of IL-5 induced airway eosinophilia as a positive regulator of RV receptor intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 on AEC, and a negative regulator of PRR and antiviral responses [124,125]. However, in children, it remains unclear whether

airway eosinophils are involved in the pathophysiology of severe asthma, and in the propensity to develop acute asthma attacks [126]. In addition, peripheral blood eosinophilia, currently used as the basis for selection of eosinophil-targeted biologics, may not be representative of airway eosinophilia in children [127]. Most importantly, it has been reported that eosinophilia is not necessarily associated with higher levels of Th2 cytokines [118], and other cells such as alarmin-stimulated ILC2 may have a greater biological importance in the pathophysiology of asthma attacks [128]. Eosinophils can also have beneficial effects in childhood asthma, as they display regulatory functions and contribute to lung repair and mucosal homeostasis [75]. Peripheral blood eosinophilia has recently been identified as a biomarker predicting the decrease of severity throughout the adolescent years [16]. Finally, it remains to be determined whether eosinophil-targeted biologics, such as anti-IL-5 mepolizumab, are efficient in reducing asthma attacks in children [129]. Overall, as opposed to adults, airway eosinophilia does not appear as the preferential biomarker to classify pediatric patients nor to assess their risk of acute asthma attacks.

Rather than through the recruitment of eosinophils, type 2 inflammation may play a key role in some children's susceptibility to develop acute asthma attacks through IgE sensitization. Hence, atopy, defined as allergic sensitization, is a key feature associated with risk of asthma attacks in childhood [7,8,14]. As shown by latent-class analyses, atopy is also one of the main factors that may account for the heterogeneity of the disease, especially in the preschool years [130,131] and could drive response to treatment [3]. Pre-existing atopy may play a role in the modulation of IFN response upon viral infection in children, although studies have shown conflicting results [59,61,65]. Durrani, *et al.* have suggested a direct implication of the high-affinity IgE receptor (FcεRI) in this defect, as its cross-linking on pDC from asthmatic allergic patients is associated with reduced IFN secretion upon RV infection [65]. Following virus-induced exacerbation in atopic children, upregulation of FcεRI receptor on monocytes and DC was observed, associated with a concomitant upregulation of pro-inflammatory cytokines, including IL-4 and IL-13 [132], suggesting that respiratory viral

infection in atopic children may initiate an atopy-dependent cascade that amplifies virus-induced airway inflammation. This could initiate long-term remodeling and inflammation. Hence, IgE sensitization, especially if occurring early in life and multiple, has been identified as the main factor associated with long-term asthma risk (recurrence of exacerbations, persistence of asthma, impaired lung function) in neonatal cohorts, including MAAS (Great Britain), MAS (Germany), PARIS (France) and PASTURE (Europe) [133–136].

Describing asthma trajectories in neonatal longitudinal cohorts may precisely allow identifying novel endotypes. For instance, in a birth cohort of children at high risk of atopy, cord blood cells were tested for their ability to produce IFN after exposure to polyinosinic-polycytidylic acid (Poly I:C), a double stranded RNA that mimics viral PAMP [137]. A group of low producers of type I and III IFN response upon stimulation representing 24% of the patients was identified. They displayed higher risk of lower respiratory tract infection and persistent wheeze at the age of 5, suggesting that these clinical outcomes are partly determined by constitutional mechanisms.

Altogether, beyond airway leukocyte and type 2 inflammation, childhood asthma endotypes seem to be associated with the characteristics of airway microbiota and of the associated immune response. Because these might involve dynamic processes, the study of asthma trajectories throughout childhood is crucial. A better characterization of asthma endotypes will be an essential step in order to achieve a personalized medicine.

4/ In the future: machine learning and systemic biological approaches

Digital tools provide an innovative way to study the integrated immune response in asthmatic patients. For instance, Custovic, *et al.* used machine learning in an *in vitro* model of RV-A16 infection on PBMC extracted from 11 years old children and described 6 clusters of cytokine response to infection [138]. One cluster, with patients from whom PBMC displayed low IFN responses, high pro-inflammatory cytokines, low Th2 responses and moderate

regulatory responses, was associated with early-onset asthma and the highest risk of asthma exacerbations and hospitalizations for lower respiratory tract infection.

Omic technologies, known as genomic, epigenomic, transcriptomic, proteomic, single-cell omics, metabolomics, microbiomics, exposomics, are others fast-developing tools, generating a massive amount of data reflecting the biological state of cell populations at a given time, that will certainly make possible in the future to identify new endotypes and their biomarkers [139,140]. For instance, with the development of the Human Genome Project, genome-wide association studies have allowed to link childhood asthma with association signals in or near genes involved in innate immune response pathways, such as the *TLR1* locus, and the *IL-33* locus [141,142]. Transcriptomics analyses, which aim at investigating all RNA transcripts in a biological sample, will certainly enable the identification of a large quantity of genes modulated in certain conditions. A recent study has described 94 distinct gene-expression modules between virus-induced and non-virus-induced exacerbation in nasal and sputum cells from a large cohort of school-age children [143]. In asthma attacks, this tool may also provide information on the activated pathways linked with inflammatory and anti-microbial response [144,145]. RNA sequencing in nasal lavage cells from asthmatic children at exacerbation led to identify some genes overexpressed as relevant “nodes” linking genes of the inflammatory response, such as IRF7 [144]. Transcriptomic analyses have also been used to identify genes associated with different phenotypes of asthmatic patients [146]. Finally, metabolomics, the study of the metabolites produced in living systems (both humans and microbiota) represents another promising strategy in the upcoming years to address the role of immuno-metabolism as well as lung and gut microbiota in asthma pathophysiology [147,148].

To sum up, systemic approaches integrating all biologic pathways are now increasingly used to study the mechanisms leading to susceptibility to acute asthma attacks in children. They may facilitate the identification of novel multimodal biomarkers linked with specific endotypes and therapeutic targets.

5/ Therapeutic strategies modulating innate immune defenses during asthma attacks

Conventional maintenance treatment, such as ICS, may be insufficient to prevent attacks in children, especially in severe asthma. Severe therapy-resistant asthma is precisely characterized by repeated severe exacerbations despite high dose daily treatment. As the knowledge about infection-underlying pathophysiological processes grows, new therapeutic approaches that may contribute to either improve innate immune responses or limit the occurrence and consequences of infections during asthma attacks have been recently explored (**Figure 2**).

5.1 Immunostimulatory therapeutics

As we have shown earlier, asthmatic children may display an impairment of PRR signaling that leads to susceptibility to infection-induced asthma attacks. One of the strategies to enhance their anti-viral responses could involve stimulation of PRR. This strategy has only been tested in pre-clinical and adult studies. Following promising results from pre-clinical studies [149], Silkoff, *et al.* reported results of a clinical trial assessing the effect of CNTO3157, a TLR3 agonist, upon *in vivo* inoculation of RV-A16 in adult subjects with mild-to-moderate asthma [150]. The molecule was ineffective in blocking the effect of RV-16 challenge on the onset of asthma exacerbation, without effect on asthma symptoms nor lung function. Additionally, all post-inoculation exacerbations occurred in the CNTO3157 group, and two were severe, thus pointing toward a lack of efficacy and safety of the TLR3 targeting drugs.

Another way of enhancing PRR activation and activate different pathways could therefore be the administration of PAMP-like adjuvants or particles. Some teams have hypothesized that Poly I:C, a double stranded RNA that activates TLR3 and intracellular receptors, might modulate anti-viral responses. Preclinical studies have shown contrasting results, with promising effect in the context of Influenza A virus infection [52,151], but concerns regarding its safety. Indeed, Tian, *et al.* have described, in a mouse model, a prolonged IFN response upon *S. pneumonia* and *S. aureus* infection, inducing an impaired bacterial

clearance [152]. We have also demonstrated in a murine model of allergic asthma that TLR3 ligands can enhance the Th2 response [153]. Thus, the exact consequences of administering exogenous TLR ligands (including TLR7-8) in humans are still unknown and their potential role in bacterial secondary infections in the lungs need to be addressed.

Another immunomodulatory strategy, particularly appealing in pediatric asthma, could rely on the administration of bacterial lysates [154]. Two main therapies have been described: polyvalent mechanical bacterial lysates (PMBL®) and Broncho-Vaxom OM-85 BV. They contain lysates of 8 pathogenic bacteria including *H. influenzae* and *S. pneumoniae*. Both PMBL® and OM-85 administration have proven to be efficient in preventing respiratory tract infections in adult and pediatric patients with chronic bronchitis and/or history of recurrent chronic infections [155–159]. Interestingly, in a trial conducted in elderly COPD patients, Ricci, *et al.* observed a reduced number of seroconversion against numerous viral pathogens in patients treated with PMBL®, as well as a better control of the number of all infectious episodes and COPD exacerbations, suggesting that the preventing effect of PMBL® on acute infections was not only on bacterial infections, but also on viral infections [160]. In 152 school-aged children with allergic asthma, Emerick, *et al.* have described a reduction of exacerbations after 12 weeks of treatment with PMBL®, and no serious adverse event, although no improvement of asthma control scores were achieved [161]. In 75 preschool children with recurrent wheeze, Razi, *et al.* demonstrated that OM-85 BV reduced the rate and duration of wheezing episodes in the 12 months following the treatment initiation, and reduced the number of acute respiratory tract illnesses [162]. Finally, in toddlers aged 6-18 months, a clinical trial is ongoing to assess the preventive effect of OM-85V on the onset of first wheeze episode related to lower respiratory tract infection during a 3 years observational period [163]. Regarding the mechanisms of action, prevention of acute respiratory infections was not induced by purified LPS or bacterial DNA, suggesting that other PAMP contained in bacterial lysates would activate innate immunity and lead to promotion of type 1 inflammation by DC [164–166].

Altogether, immunostimulatory therapeutics may represent a promising strategy as additional treatments to prevent asthma attacks but their safety and efficacy need to be properly addressed. Because multiple microorganisms may be involved in acute asthma, it remains also unclear whether they would have an impact on the onset and severity of acute asthma attacks in children.

5.2 Therapeutics enhancing anti-viral responses

Anti-microbial peptides, among which LL-37, are key molecules of the innate immune responses against both viruses and bacteria. Thus, it has been hypothesized that supplementing with LL-37 or inducing its production among AEC could enhance anti-infectious defenses. Sousa, *et al.* have tested the effect of exogenous cathelicidin on RV-1B replication after inoculation on cultures of AEC [167]. They reported that exogenous LL-37, as well as homologous porcine cathelicidins, either administered prior or after infection, displayed antiviral activity against RV by reducing the metabolic activity of infected cells. However, one preclinical study in a mouse model of asthma showed *in vivo* a deleterious effect of exogenous cathelicidin-related antimicrobial peptide in airway inflammation and responsiveness [168], and to our knowledge, there is no published study *in vivo* in humans. Nevertheless, promising results regarding vitamin D supplementation on the release of LL-37 by AEC in *in vitro* experiments have been published [169–171]. In clinical studies, there is evidence toward a protective effect of vitamin D supplementation on risk of acute respiratory infections in children [172]. Although there are other effects of vitamin D that might explain its clinical efficacy [80,173], there is a well-studied biological link between vitamin D and host microbial peptides, *via* the translocation of vitamin D to the nucleus of AEC, where it activates Vitamin D responsive elements in promoter regions of anti-microbial peptide genes such as LL-37 [52,171,174]. Hence, targeting the vitamin D / cathelicidin axis could represent a promising strategy during acute asthma in children.

As studies have shown deficient IFN responses in asthmatic patients, it has been hypothesized that IFN supplementation upon viral infection could enhance anti-viral responses and reduce asthma attacks severity. Interferon therapies (pegylated IFN- α in association with ribavirin) have first been developed in other diseases such as in hepatitis C and human immunodeficiency virus [175,176]. Ribavirin is a synthetic guanosine nucleoside that impairs the synthesis of viral mRNA [52]. Its clinical utility, upon respiratory virus infection, has been shown in RSV, Adenovirus, RV, or in (SARS)-CoV immunocompromised patients [177–180]. Since exogenous IFNs reduced RV replication in *in vitro* cultures of RV-infected AEC from asthmatic patients [181], a trial was initiated in 147 adult asthmatic patients developing symptoms of viral infection (68% RV) to evaluate the efficacy of inhaled IFN- β treatment for 14 days [182]. Overall, it did not improve asthma symptoms, but it enhanced morning peak expiratory flow recovery and reduced the need for additional treatment, *i.e.* oral corticosteroids or antibiotics. In an exploratory analysis of the subset of more difficult-to-treat patients, IFN supplementation improved asthma control questionnaires. In addition, it boosted anti-viral innate immunity with persistent elevated serum levels of CXCL10, and decreased levels of pro-inflammatory molecules such as CCL4 and CXCL8. In the INEXAS phase 2 trial, designed to assess efficacy of inhaled IFN- β 1a for 14 days to prevent asthma exacerbations in adults, McCrae, *et al.* also reported improvement in the morning peak expiratory flow in the treated arm compared with placebo, but the study stopped early [183,184]. No study has yet been conducted in pediatric patients.

Collectively, anti-viral therapies could represent potential therapies in the treatment of acute asthma attacks in children. However, the exact timing of administration upon viral infection and onset of acute asthma, and the population of children who might benefit from these strategies remain to be determined.

5.3 Role of anti-microbial therapeutics

Apart from ribavirin, other anti-viral therapies, such as capsid-targeting molecules pleconaril, BTA-798 and V-073 have been studied in enteroviruses infections. However, none of these compounds have proven sufficient efficacy and safety in clinical trials [185]. In particular, a phase 2 clinical trial with intranasal pleconaril in children aged 6 years and older, and adults, showed no impact of treatment on the onset of RV-induced cold symptoms or acute asthma exacerbation [186]. Although their efficacy needs to be addressed in clinical trials, DNAzyme therapies could also be promising strategies, as recently suggested by an *in vitro* study showing good catalytic activity of 2 candidates (Dua-01 and Dua-02) on various RV strains [187].

As described above, bacteria and microbiota may be associated with asthma development and attacks, and antibacterial therapies have emerged as alternative strategies to prevent and/or to treat asthma exacerbation [154,188,189]. Treatments aiming to influence the composition of the microbiota are presently tested in different clinical situations and recent data have suggested that these methods might have some interest in asthma. Transplantation of healthy microbiota seems a promising alternative as demonstrated in gut inflammatory diseases [190]. In preclinical study, Arrieta, *et al.* demonstrated that oral inoculation with four bacterial species previously identified as associated with risk of childhood asthma to germ-free mice improved allergic airway inflammation in their adult offspring [100]. Several studies have also evaluated the benefit of prebiotic and probiotic but their interest during childhood asthma attack has yet to be evaluated [191,192]. Another option may be to administer bacteria metabolites, which can mimic the effect of normal microbiota. Thus, feeding pregnant mice with short chain fatty acid (SCFA), such as acetate, was associated with modulation of the maternal microbiota and protection from developing allergic airway disease in the offspring [193]. Finally, an increasing number of studies in experimental models of lung infections has demonstrated the potential interest of fecal microbiota transplantation and/or SCFA

supplementation, suggesting that they might be efficient in bacteria- and virus-induced exacerbations [194–196].

The potential modulatory effects of some antibiotics on asthma attacks in children are subject of intense research. First, in terms of prevention, Schwerk, *et al.* observed a positive impact of long-term antibiotics (mainly amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid) in preschoolers with severe wheeze who had positive bacterial infection on BAL samples, with reduced rates of exacerbations and hospitalizations at 6 months follow-up compared with rates before treatment [197]. Second, immunomodulatory effects of macrolides are well-described [198], and have been evaluated in the treatment of acute asthma in children. Hence, in the Early Administration of Azithromycin and Prevention of Severe Lower Respiratory Tract Illnesses in Preschool Children (APRIL) study, Bacharier, *et al.* conducted a placebo-controlled trial in 607 preschool children with recurrent wheeze and no controller medication, testing the efficacy of azithromycin started prior to the development of lower respiratory tract illness [199]. Macrolide administration reduced the risk of progressing to severe lower respiratory tract illness (*i.e* requiring a course of oral steroids), without evidence for induction of azithromycin-resistant organisms, nor adverse events. In the Copenhagen Prospective Studies on Asthma in Childhood 2010 (COPSAC2010) cohort, children with recurrent asthma-like symptoms, some of whom under maintenance treatment, were randomly assigned to receive either azithromycin or placebo in case of episode of asthma-like symptoms, lasting at least 3 days [200]. Children treated with azithromycin displayed a significant reduction of episode length, and the effect size increased with early administration of treatment. Moreover, Mandhane, *et al.* conducted a placebo-control trial in preschool children aged 12 to 60 months, presenting to the emergency department with wheeze, to assess the effect of azithromycin [201]. They did not show a reduction of duration of respiratory symptoms in the treated group, neither in the time to the next exacerbation upon 6 months follow-up. Thus, there is still limited evidence on the use of azithromycin as a preventive treatment of acute asthma attacks [202]. In addition, studies have been conducted in adult patients to test the effect of azithromycin as a preventive

strategy, with conflicting results [203–205]. Notably, Gibson, *et al.* described in a placebo-controlled trial that 48 weeks maintenance treatment with azithromycin decreased the frequency of asthma exacerbations and improved asthma-related quality of life in symptomatic asthma despite current maintenance treatment [204]. In a meta-analysis of the three main studies conducted in adult patients [203–205], maintenance treatment with azithromycin was associated with a reduced rate of exacerbations in asthma as well as in all subgroups (non-eosinophilic, eosinophilic and severe asthma), and a good tolerance [206]. Examining each exacerbation type separately, patients with eosinophilic asthma reported fewer oral corticosteroid courses, and patients with non-eosinophilic and severe asthma reported fewer antibiotic courses. Additionally, a specific effect of macrolides in neutrophilic asthma had been reported previously by Simpson, *et al.* in adult subjects with severe refractory asthma, treated with clarithromycin for 8 weeks [207]. Clarithromycin therapy reduced sputum concentrations of IL-8 and neutrophil numbers leading to lower levels of neutrophil elastase and Matrix metalloproteinase (MMP)-9 concentrations versus placebo. Finally, a decrease of inflammatory cytokines, notably IL-1 β , IL-6 and IL-33, was observed *in vitro* in cultures of human AEC from asthmatic patients pretreated with clarithromycin, in a context of RV14 infection, suggesting a direct anti-viral effect [208]. Consistent with this hypothesis, another *in vitro* study showed an effect of azithromycin to reduce RV replication after inoculation in AEC, associated with an increase in IFN and interferon-stimulated genes mRNA expression and protein production [209].

To sum up, although macrolides and more particularly azithromycin constitute an appealing strategy in acute asthma, further studies are needed to identify the phenotypes of potential responders and the possible adverse events. Since antibiotics have the potential limitation of eliminating commensal bacteria that protect from asthma development, it must be emphasized that their use should only be considered in particular clinical situations [188].

5.4- Potential role of biologics targeting type 2 inflammation in anti-microbial response

We have highlighted the close interactions between underlying airway inflammation, host anti-microbial responses and microorganisms leading to asthma attacks. Therefore, novel therapeutics targeting inflammatory pathways in asthma, such as anti-Th2 inflammation biologics, may have a specific impact on lung infections.

Omalizumab is an anti-IgE monoclonal antibody, targeting the effector mechanisms of Th2 inflammation. After proof of efficacy in pediatric clinical trials, it has been widely prescribed in severe asthmatic atopic children aged older than 6 years, providing more insights on the longer-term evolution [210]. In real-life studies, we have observed higher levels of asthma control after its initiation, and a significant decrease of asthma attacks in children previously prone to exacerbation [211]. Hence, a direct effect of omalizumab on RV-induced exacerbations in children has been suggested [212,213]. In the Preventative Omalizumab or Step-up Therapy for Severe Fall Exacerbations (PROSE) study, a placebo-controlled trial conducted among 478 inner-city asthmatic children aged 6 to 17 years with 1 or more recent exacerbations, Esquivel, *et al.* observed a decrease of the duration of RV infections, viral shedding, and risk of RV-induced illnesses in omalizumab-treated patients [212]. A recently published adult study including results from two clinical trials has compared the effect of omalizumab on the response to an experimental inoculation with RV-16 in allergic asthmatic adults [214]. Omalizumab-treated patients displayed a reduction of symptoms of lower respiratory tract infection, more pronounced in the four first days following inoculation, suggesting that the protective effect of omalizumab on virus-induced exacerbations occurs in the early stages of infection. Teach, *et al.* described other results from the PROSE study that compared omalizumab with placebo and omalizumab with an inhaled corticosteroid boost with regard to fall exacerbation rates when initiated 4 to 6 weeks before return to school [215]. They recorded 86 exacerbations, among which 89% were associated with a respiratory tract virus detection, most commonly RV (81%). More importantly, they observed a significantly lower fall exacerbation rate in the omalizumab group, but no difference between omalizumab

and inhaled corticosteroid boost except in the subgroup of patients with exacerbation during the run-in phase. In an *ex vivo* study of PBMC taken during the intervention phase, the authors observed increased IFN- α responses following RV-A16 inoculation in the omalizumab-treated group, suggesting that the mechanism of Omalizumab protection against exacerbations could involve IFN- α dependent antiviral effect [20]. Another study in children with exacerbation-prone asthma before and during omalizumab treatment described the effect of *ex vivo* inoculation of RV and Influenza A virus on PBMC and blood pDC, after IgE cross-linking on cell-surface Fc ϵ RI [216]. The authors observed that omalizumab increased both virus-induced IFN- α responses in PBMCs and pDC, and subsequently reduced Fc ϵ RI expression on pDC. Altogether, the lower asthma exacerbation rates consecutive to omalizumab treatment were related to IFN- α responses and attenuated Fc ϵ RI expression on pDC.

Omalizumab remains the most-studied biologic in pediatric asthma but others have been experimented in the past years [217]. Mepolizumab, an anti-IL-5 antibody therapy, has proven to be efficient in reducing the exacerbation rate in adults and is now available in children older than 6 years old with eosinophilic asthma in Europe and the US [218]. As previously stated, its efficacy in reducing exacerbation rates in pediatric clinical trials and real-life studies remain to be determined [129]. However, adult studies suggest it may have a modifying effect on RV-induced inflammatory response. Hence, a placebo-controlled trial was conducted in adult patients with mild asthma, randomized to receive mepolizumab versus placebo, followed by RV-16 inoculation, to study its impact on anti-viral responses [219]. The authors showed that mepolizumab attenuated baseline blood eosinophils numbers and activation status, but did not prevent the activation of remaining eosinophils upon RV infection. However, after infection, it enhanced levels of airway B lymphocytes and AM and modified BAL levels of CCL20 and IL-1RA. Effects of other drugs targeting Th2 cytokines and alarmins, including lebrikizumab (anti IL-13), dupilumab (anti IL-4R), reslizumab (anti-IL-5), benralizumab (anti-IL-5R), tezepelumab (anti-TSLP), or anti-IL-33 monoclonal antibodies are currently studied in pre-clinical and clinical studies [217].

In the next years, new studies are needed regarding these novel treatments, both in allergic and non-allergic asthmatic children, to provide new evidence on their immunological effects and potential disease-modifying properties, and to fully determine the phenotypes/endotypes of good responders. Most importantly, specific studies in the youngest children need to be carried out, with appropriate end-points [129]. This effort will contribute to enter the era of precision medicine in pediatric asthma.

6. Conclusion

In conclusion, asthma attacks are a main feature of pediatric asthma, especially of severe asthma. We have highlighted studies suggesting impairment of the mucosal anti-microbial immune responses during acute asthma and/or at steady state. Interestingly, these alterations seem to inconstantly persist into adulthood. These various altered pathways may reflect different endotypes underlying asthma heterogeneity and consequently, constitute targets for new treatment approaches. Preventing, understanding and efficiently managing acute asthma attacks remain one of the unmet needs in severe childhood asthma, especially in the youngest children. At the era of precision medicine, early interventions targeting mucosal immune responses, lung infections, and microbiota, in early childhood, could have disease-modifying properties and positive impact on the trajectory of childhood asthma.

Acknowledgements

Our studies received grant supports from the “Conseil regional des hauts de France “ (Virasthma 1 and Virasthma 2), the Société Française d’Allergologie, and the « Comité National contre les maladies respiratoires » (Virasthma 1), the « Fondation du souffle » and *Stallergen greer* (Virasthma 2) . Our research is also supported by INSERM, CNRS and University of Lille.

CrediT:

Lejeune S: Conceptualization, Data collection Data analysis, Writing, Review & Editing,
Deschildre A: Conceptualization, Data collection Data analysis, Writing, Review & Editing,
Le Rouzic O: Data collection Data analysis, Writing, Review & Editing,
Engelmann I: Data collection Data analysis, Writing, Review & Editing,
Dessein R: Data collection Data analysis, Writing, Review & Editing,
Pichavant M: Data collection Data analysis, Writing, Review & Editing,
Gosset P: Conceptualization, Data collection Data analysis, Writing, Review & Editing.

Figure Legends:

Figure 1: Summary of the main mechanisms favoring asthma development and involved in asthma attack.

These mechanisms **(in red)** involve: (1) Impairment of innate immune responses; (2) Influence of the host-microbiota dialog on Th2 inflammation; (3) Pathogen characteristics; (4) Airway leukocyte inflammation. These dynamic interactions may impact the presentations of asthma attacks, and have long-term consequences.

AM: Alveolar macrophages; AEC: airway epithelial cells; DC: dendritic cells; IFN: Interferon; IL: Interleukin; ILC2: type 2 innate lymphoid cells; IRF: interferon regulatory factor; PAMP: Pathogen-associated molecular pattern; PRR: pattern recognition receptor; RV: Rhinovirus; TSLP: Thymic stromal lymphopoietin.

Figure 2: Possible therapeutics strategies to limit asthma development/progression and attacks.

These strategies **(in green)** target: (1) Enhancement of the innate immune responses; (2) Anti-infectious therapeutics and strategies to modulate the microbiota; (3) Alarmins and anti-Th2 biologics.

AM: Alveolar macrophages; AEC: airway epithelial cells; DC: dendritic cells; IFN: Interferon; IL: Interleukin; ILC2: type 2 innate lymphoid cells; IRF: interferon regulatory factor; PAMP: Pathogen-associated molecular pattern; PRR: pattern recognition receptor; RV: Rhinovirus; SCFA: Short Chain Fatty Acid, TSLP: Thymic stromal lymphopoietin.

Capsule summary:

Characteristics of host-microbiota interactions in asthmatic children favor asthma attacks and may allow to define asthma endotypes. This knowledge offers promising perspectives to treat asthmatic children using precision medicine.

Bibliographical references

- [1] M.-C. Delmas, N. Guignon, B. Leynaert, M. Moisy, C. Marguet, C. Fuhrman, [Increase in asthma prevalence among young children in France], *Rev Mal Respir.* 34 (2017) 525–534. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2016.09.002>.
- [2] S. Ebmeier, D. Thayabaran, I. Braithwaite, C. Bénamara, M. Weatherall, R. Beasley, Trends in international asthma mortality: analysis of data from the WHO Mortality Database from 46 countries (1993-2012), *Lancet.* 390 (2017) 935–945. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31448-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31448-4).
- [3] S. Saglani, L. Fleming, S. Sonnappa, A. Bush, Advances in the aetiology, management, and prevention of acute asthma attacks in children, *Lancet Child Adolesc Health.* 3 (2019) 354–364. [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(19\)30025-2](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(19)30025-2).
- [4] C.I. Bloom, F. Nissen, I.J. Douglas, L. Smeeth, P. Cullinan, J.K. Quint, Exacerbation risk and characterisation of the UK's asthma population from infants to old age, *Thorax.* 73 (2018) 313–320. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-210650>.
- [5] Global Initiative for Asthma (GINA). 2020 Report: Global strategy for asthma management and prevention. <https://ginasthma.org/> (last accessed: April 2020), (n.d.).
- [6] P.L.P. Brand, D. Caudri, E. Eber, E.A. Gaillard, L. Garcia-Marcos, G. Hedlin, J. Henderson, C.E. Kuehni, P.J.F.M. Merkus, S. Pedersen, A. Valiulis, G. Wennergren, A. Bush, Classification and pharmacological treatment of preschool wheezing: changes since 2008, *Eur. Respir. J.* 43 (2014) 1172–1177. <https://doi.org/10.1183/09031936.00199913>.
- [7] L.B. Bacharier, B.R. Phillips, G.R. Bloomberg, R.S. Zeiger, I.M. Paul, M. Krawiec, T. Guilbert, V.M. Chinchilli, R.C. Strunk, Childhood Asthma Research and Education Network, National Heart, Lung, and Blood Institute, Severe intermittent wheezing in preschool children: a distinct phenotype, *J. Allergy Clin. Immunol.* 119 (2007) 604–610. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.12.607>.
- [8] S. Lejeune, M. Pichavant, I. Engelmann, L. Beghin, E. Drumez, O. Le Rouzic, R. Dessein, S. Rogeau, T. Beke, G. Kervoaze, C. Delvart, H. Ducoin, G. Pouessel, A. Le Mée, S. Boileau, J. Roussel, C. Bonnel, C. Mordacq, C. Thumerelle, P. Gosset, A. Deschildre, Severe preschool asthmatics have altered cytokine and anti-viral responses during exacerbation, *Pediatr Allergy Immunol.* (2020). <https://doi.org/10.1111/pai.13268>.
- [9] S.L. Johnston, P.K. Pattemore, G. Sanderson, S. Smith, F. Lampe, L. Josephs, P. Symington, S. O'Toole, S.H. Myint, D.A. Tyrrell, Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children, *BMJ.* 310 (1995) 1225–1229. <https://doi.org/10.1136/bmj.310.6989.1225>.
- [10] I. Engelmann, C. Mordacq, P. Gosset, I. Tillie-Leblond, A. Dewilde, C. Thumerelle, G. Pouessel, A. Deschildre, Rhinovirus and asthma: reinfection, not persistence, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 188 (2013) 1165–1167. <https://doi.org/10.1164/rccm.201303-0585LE>.
- [11] K.F. Chung, S.E. Wenzel, J.L. Brozek, A. Bush, M. Castro, P.J. Sterk, I.M. Adcock, E.D. Bateman, E.H. Bel, E.R. Bleeker, L.-P. Boulet, C. Brightling, P. Chanaz, S.-E. Dahlen, R. Djukanovic, U. Frey, M. Gaga, P. Gibson, Q. Hamid, N.N. Jajour, T. Mauad, R.L. Sorkness, W.G. Teague, International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma, *Eur. Respir. J.* 43 (2014) 343–373. <https://doi.org/10.1183/09031936.00202013>.
- [12] G. Hedlin, A. Bush, K. Lødrup Carlsen, G. Wennergren, F.M. De Benedictis, E. Melén, J. Paton, N. Wilson, K.-H. Carlsen, Problematic Severe Asthma in Childhood Initiative group, Problematic severe asthma in children, not one problem but many: a GA2LEN initiative, *Eur. Respir. J.* 36 (2010) 196–201. <https://doi.org/10.1183/09031936.00104809>.
- [13] W.G. Teague, B.R. Phillips, J.V. Fahy, S.E. Wenzel, A.M. Fitzpatrick, W.C. Moore, A.T. Hastie, E.R. Bleeker, D.A. Meyers, S.P. Peters, M. Castro, A.M. Coverstone, L.B.

- Bacharier, N.P. Ly, M.C. Peters, L.C. Denlinger, S. Ramratnam, R.L. Sorkness, B.M. Gaston, S.C. Erzurum, S.A.A. Comhair, R.E. Myers, J. Zein, M.D. DeBoer, A.-M. Irani, E. Israel, B. Levy, J.C. Cardet, W. Phipatanakul, J.M. Gaffin, F. Holguin, M.L. Fajt, S.J. Aujla, D.T. Mauger, N.N. Jarjour, Baseline Features of the Severe Asthma Research Program (SARP III) Cohort: Differences with Age, *J Allergy Clin Immunol Pract.* 6 (2018) 545-554.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2017.05.032>.
- [14] L. Fleming, C. Murray, A.T. Bansal, S. Hashimoto, H. Bisgaard, A. Bush, U. Frey, G. Hedlin, F. Singer, W.M. van Aalderen, N.H. Vissing, Z. Zolkipli, A. Selby, S. Fowler, D. Shaw, K.F. Chung, A.R. Sousa, S. Wagers, J. Corfield, I. Pandis, A. Rowe, E. Formaggio, P.J. Sterk, G. Roberts, U-BIOPRED Study Group, The burden of severe asthma in childhood and adolescence: results from the paediatric U-BIOPRED cohorts, *Eur. Respir. J.* 46 (2015) 1322–1333. <https://doi.org/10.1183/13993003.00780-2015>.
- [15] L.C. Denlinger, P. Heymann, R. Lutter, J.E. Gern, Exacerbation-Prone Asthma, *J Allergy Clin Immunol Pract.* 8 (2020) 474–482. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.11.009>.
- [16] K.R. Ross, R. Gupta, M.D. DeBoer, J. Zein, B.R. Phillips, D.T. Mauger, C. Li, R.E. Myers, W. Phipatanakul, A.M. Fitzpatrick, N.P. Ly, L.B. Bacharier, D.J. Jackson, J.C. Celedón, A. Larkin, E. Israel, B. Levy, J.V. Fahy, M. Castro, E.R. Bleecker, D. Meyers, W.C. Moore, S.E. Wenzel, N.N. Jarjour, S.C. Erzurum, W.G. Teague, B. Gaston, Severe asthma during childhood and adolescence: A longitudinal study, *J. Allergy Clin. Immunol.* 145 (2020) 140-146.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.09.030>.
- [17] D.C.M. Belgrave, I. Buchan, C. Bishop, L. Lowe, A. Simpson, A. Custovic, Trajectories of lung function during childhood, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189 (2014) 1101–1109. <https://doi.org/10.1164/rccm.201309-1700OC>.
- [18] A. Beigelman, L.B. Bacharier, Management of Preschool Children with Recurrent Wheezing: Lessons from the NHLBI's Asthma Research Networks, *J Allergy Clin Immunol Pract.* 4 (2016) 1–8; quiz 9–10. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2015.10.003>.
- [19] A. Bourdin, I. Adcock, P. Berger, P. Bonniaud, P. Chanson, C. Chenivesse, J. de Blic, A. Deschildre, P. Devillier, G. Devouassoux, A. Didier, G. Garcia, A. Magnan, Y. Martinat, T. Perez, N. Roche, C. Taillé, P. Val, P. Chanez, How can we minimise the use of regular oral corticosteroids in asthma?, *Eur Respir Rev.* 29 (2020). <https://doi.org/10.1183/16000617.0085-2019>.
- [20] A. Licari, S. Manti, R. Castagnoli, A. Marseglia, T. Foiadelli, I. Brambilla, G.L. Marseglia, Immunomodulation in Pediatric Asthma, *Front Pediatr.* 7 (2019) 289. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00289>.
- [21] T. Jartti, J.E. Gern, Role of viral infections in the development and exacerbation of asthma in children, *J. Allergy Clin. Immunol.* 140 (2017) 895–906. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.003>.
- [22] T. Jartti, M. Korppi, Rhinovirus-induced bronchiolitis and asthma development, *Pediatr Allergy Immunol.* 22 (2011) 350–355. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2011.01170.x>.
- [23] D.J. Jackson, R.E. Gangnon, M.D. Evans, K.A. Roberg, E.L. Anderson, T.E. Pappas, M.C. Printz, W.-M. Lee, P.A. Shult, E. Reisdorf, K.T. Carlson-Dakes, L.P. Salazar, D.F. DaSilva, C.J. Tisler, J.E. Gern, R.F. Lemanske, Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178 (2008) 667–672. <https://doi.org/10.1164/rccm.200802-309OC>.
- [24] M. Lukkarinen, A. Koistinen, R. Turunen, P. Lehtinen, T. Vuorinen, T. Jartti, Rhinovirus-induced first wheezing episode predicts atopic but not nonatopic asthma at school age, *J. Allergy Clin. Immunol.* 140 (2017) 988–995. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.12.991>.
- [25] E. Bergroth, M. Aakula, M. Korppi, S. Remes, J.E. Kivistö, P.A. Piedra, C.A. Camargo, T. Jartti, Post-bronchiolitis Use of Asthma Medication: A Prospective 1-year Follow-up Study, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 35 (2016) 363–368. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001017>.

- [26] F.J. Rubner, D.J. Jackson, M.D. Evans, R.E. Gangnon, C.J. Tisler, T.E. Pappas, J.E. Gern, R.F. Lemanske, Early life rhinovirus wheezing, allergic sensitization, and asthma risk at adolescence, *J. Allergy Clin. Immunol.* 139 (2017) 501–507. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.03.049>.
- [27] C. Thumerelle, A. Deschildre, C. Bouquillon, C. Santos, A. Sardet, M. Scalbert, L. Delbecque, P. Debray, A. Dewilde, D. Turck, F. Leclerc, Role of viruses and atypical bacteria in exacerbations of asthma in hospitalized children: a prospective study in the Nord-Pas de Calais region (France), *Pediatr. Pulmonol.* 35 (2003) 75–82. <https://doi.org/10.1002/ppul.10191>.
- [28] N. Khetsuriani, N.N. Kazerouni, D.D. Erdman, X. Lu, S.C. Redd, L.J. Anderson, W.G. Teague, Prevalence of viral respiratory tract infections in children with asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 119 (2007) 314–321. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.08.041>.
- [29] J.L. Kennedy, M. Shaker, V. McMeen, J. Gern, H. Carper, D. Murphy, W.-M. Lee, Y.A. Bochkov, R.F. Vrtis, T. Platts-Mills, J. Patrie, L. Borish, J.W. Steinke, W.A. Woods, P.W. Heymann, Comparison of viral load in individuals with and without asthma during infections with rhinovirus, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189 (2014) 532–539. <https://doi.org/10.1164/rccm.201310-1767OC>.
- [30] A. Bergauer, N. Sopel, B. Kroß, T. Vuorinen, P. Xepapadaki, S.T. Weiss, A. Blau, H. Sharma, C. Kraus, R. Springel, M. Rauh, S. Mittler, A. Graser, T. Zimmermann, V.O. Melichar, A. Kiefer, M.L. Kowalski, A. Sobanska, T. Jartti, H. Lukkarinen, N.G. Papadopoulos, S. Finotto, IFN- α /IFN- λ responses to respiratory viruses in paediatric asthma, *Eur. Respir. J.* 49 (2017). <https://doi.org/10.1183/13993003.00969-2016>.
- [31] S. Lejeune, I. Engelmann, R. Dessein, G. Pouessel, H. Ducoin, C. Delvart, C. Mordacq, C. Thumerelle, M. Pichavant, P. Gosset, A. Deschildre, Microbiological status in preschool asthma: the VIRASTHMA 2 study, *European Respiratory Journal.* 54 (2019). <https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2019.OA4938>.
- [32] H. Bisgaard, M.N. Hermansen, F. Buchvald, L. Loland, L.B. Halkjaer, K. Bønnelykke, M. Brasholt, A. Heltberg, N.H. Vissing, S.V. Thorsen, M. Stage, C.B. Pipper, Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates, *N. Engl. J. Med.* 357 (2007) 1487–1495. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052632>.
- [33] K.M. Kloepfer, W.M. Lee, T.E. Pappas, T.J. Kang, R.F. Vrtis, M.D. Evans, R.E. Gangnon, Y.A. Bochkov, D.J. Jackson, R.F. Lemanske, J.E. Gern, Detection of pathogenic bacteria during rhinovirus infection is associated with increased respiratory symptoms and asthma exacerbations, *J. Allergy Clin. Immunol.* 133 (2014) 1301–1307, 1307.e1–3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.02.030>.
- [34] P.F.M. Robinson, C. Pattaroni, J. Cook, L. Gregory, A.M. Alonso, L.J. Fleming, C.M. Lloyd, A. Bush, B.J. Marsland, S. Saglani, Lower airway microbiota associates with inflammatory phenotype in severe preschool wheeze, *J. Allergy Clin. Immunol.* 143 (2019) 1607–1610.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.12.985>.
- [35] K. McCauley, J. Durack, R. Valladares, D.W. Fadrosch, D.L. Lin, A. Calatroni, P.K. LeBeau, H.T. Tran, K.E. Fujimura, B. LaMere, G. Merana, K. Lynch, R.T. Cohen, J. Pongracic, G.K. Khurana Hershey, C.M. Kercksmar, M. Gill, A.H. Liu, H. Kim, M. Kattan, S.J. Teach, A. Togias, H.A. Boushey, J.E. Gern, D.J. Jackson, S.V. Lynch, National Institute of Allergy and Infectious Diseases–sponsored Inner-City Asthma Consortium, Distinct nasal airway bacterial microbiotas differentially relate to exacerbation in pediatric patients with asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 144 (2019) 1187–1197. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.05.035>.
- [36] M. Vareille, E. Kieninger, M.R. Edwards, N. Regamey, The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses, *Clin. Microbiol. Rev.* 24 (2011) 210–229. <https://doi.org/10.1128/CMR.00014-10>.
- [37] A. Bush, Cytokines and Chemokines as Biomarkers of Future Asthma, *Front Pediatr.* 7 (2019) 72. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00072>.

- [38] F.M.A. Hossain, J.Y. Choi, E. Uyangaa, S.O. Park, S.K. Eo, The Interplay between Host Immunity and Respiratory Viral Infection in Asthma Exacerbation, *Immune Netw.* 19 (2019) e31. <https://doi.org/10.4110/in.2019.19.e31>.
- [39] J.A. Whitsett, T. Alenghat, Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity, *Nat. Immunol.* 16 (2015) 27–35. <https://doi.org/10.1038/ni.3045>.
- [40] N. Kadowaki, S. Ho, S. Antonenko, R.W. Malefyt, R.A. Kastelein, F. Bazan, Y.J. Liu, Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens, *J. Exp. Med.* 194 (2001) 863–869. <https://doi.org/10.1084/jem.194.6.863>.
- [41] W. Barchet, A. Blasius, M. Cella, M. Colonna, Plasmacytoid dendritic cells: in search of their niche in immune responses, *Immunol. Res.* 32 (2005) 75–83. <https://doi.org/10.1385/IR:32:1-3:075>.
- [42] H. See, P. Wark, Innate immune response to viral infection of the lungs, *Paediatr Respir Rev.* 9 (2008) 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2008.04.001>.
- [43] C. Duez, P. Gosset, A.-B. Tonnel, Dendritic cells and toll-like receptors in allergy and asthma, *Eur J Dermatol.* 16 (2006) 12–16.
- [44] F.P. Siegal, N. Kadowaki, M. Shodell, P.A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko, Y.J. Liu, The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood, *Science.* 284 (1999) 1835–1837. <https://doi.org/10.1126/science.284.5421.1835>.
- [45] M.R. Edwards, N. Regamey, M. Vareille, E. Kieninger, A. Gupta, A. Shoemark, S. Saglani, A. Sykes, J. Macintyre, J. Davies, C. Bossley, A. Bush, S.L. Johnston, Impaired innate interferon induction in severe therapy resistant atopic asthmatic children, *Mucosal Immunol.* 6 (2013) 797–806. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.118>.
- [46] K.S. Parsons, A.C. Hsu, P. a. B. Wark, TLR3 and MDA5 signalling, although not expression, is impaired in asthmatic epithelial cells in response to rhinovirus infection, *Clin. Exp. Allergy.* 44 (2014) 91–101. <https://doi.org/10.1111/cea.12218>.
- [47] H. Rupani, R.T. Martinez-Nunez, P. Dennison, L.C.K. Lau, N. Jayasekera, T. Havelock, A.S. Francisco-Garcia, C. Grainge, P.H. Howarth, T. Sanchez-Elsner, Toll-like Receptor 7 Is Reduced in Severe Asthma and Linked to an Altered MicroRNA Profile, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 194 (2016) 26–37. <https://doi.org/10.1164/rccm.201502-0280OC>.
- [48] A. Sykes, M.R. Edwards, J. Macintyre, A. del Rosario, E. Bakhsoliani, M.-B. Trujillo-Torralbo, O.M. Kon, P. Mallia, M. McHale, S.L. Johnston, Rhinovirus 16-induced IFN- α and IFN- β are deficient in bronchoalveolar lavage cells in asthmatic patients, *J. Allergy Clin. Immunol.* 129 (2012) 1506-1514.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.03.044>.
- [49] A. Deschildre, M. Pichavant, I. Engelmann, C. Langlois, E. Drumez, G. Pouessel, S. Boileau, D. Romero-Cubero, I. Decleyre-Badiu, A. Dewilde, D. Hober, V. Néve, C. Thumerelle, S. Lejeune, C. Mordacq, P. Gosset, Virus-triggered exacerbation in allergic asthmatic children: neutrophilic airway inflammation and alteration of virus sensors characterize a subgroup of patients, *Respir. Res.* 18 (2017) 191. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0672-0>.
- [50] S. Lejeune, C. Mordacq, E. Drumez, S. Brisset, G. Pouessel, M. Pichavant, I. Engelmann, L. Béghin, I. Decleyre-Badiu, V. Neve, C. Thumerelle, P. Gosset, A. Deschildre, Relationship between immune parameters during a severe exacerbation in allergic asthmatic children and asthma outcomes in the following year, *Clin. Exp. Allergy.* (2020). <https://doi.org/10.1111/cea.13570>.
- [51] D.J. Jackson, S.L. Johnston, The role of viruses in acute exacerbations of asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (2010) 1178–1187; quiz 1188–1189. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.04.021>.
- [52] V. Casanova, F.H. Sousa, C. Stevens, P.G. Barlow, Antiviral therapeutic approaches for human rhinovirus infections, *Future Virol.* 13 (2018) 505–518. <https://doi.org/10.2217/fvl-2018-0016>.

- [53] P.G. Barlow, E.G. Findlay, S.M. Currie, D.J. Davidson, Antiviral potential of cathelicidins, *Future Microbiol.* 9 (2014) 55–73. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.135>.
- [54] S.M. Currie, E. Gwyer Findlay, A.J. McFarlane, P.M. Fitch, B. Böttcher, N. Colegrave, A. Paras, A. Jozwik, C. Chiu, J. Schwarze, D.J. Davidson, Cathelicidins Have Direct Antiviral Activity against Respiratory Syncytial Virus In Vitro and Protective Function In Vivo in Mice and Humans, *J. Immunol.* 196 (2016) 2699–2710. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502478>.
- [55] T. Arikoglu, S. Kuyucu, E. Karaismailoglu, S.B. Batmaz, S. Balci, The association of vitamin D, cathelicidin, and vitamin D binding protein with acute asthma attacks in children, *Allergy Asthma Proc.* 36 (2015) 51–58. <https://doi.org/10.2500/aap.2015.36.3848>.
- [56] S. Baraldo, M. Contoli, E. Bazzan, G. Turato, A. Padovani, B. Marku, F. Calabrese, G. Caramori, A. Ballarin, D. Snijders, A. Barbato, M. Saetta, A. Papi, Deficient antiviral immune responses in childhood: distinct roles of atopy and asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 130 (2012) 1307–1314. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.08.005>.
- [57] V. Gielen, A. Sykes, J. Zhu, B. Chan, J. Macintyre, N. Regamey, E. Kieninger, A. Gupta, A. Shoemark, C. Bossley, J. Davies, S. Saglani, P. Walker, S.E. Nicholson, A.H. Dalpke, O.-M. Kon, A. Bush, S.L. Johnston, M.R. Edwards, Increased nuclear suppressor of cytokine signaling 1 in asthmatic bronchial epithelium suppresses rhinovirus induction of innate interferons, *J. Allergy Clin. Immunol.* 136 (2015) 177–188.e11. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.039>.
- [58] A. Kicic, P.T. Stevens, E.N. Sutanto, E. Kicic-Starceovich, K.-M. Ling, K. Looi, K.M. Martinovich, L.W. Garratt, T. Iosifidis, N.C. Shaw, A.G. Buckley, P.J. Rigby, F.J. Lannigan, D.A. Knight, S.M. Stick, Impaired airway epithelial cell responses from children with asthma to rhinoviral infection, *Clin. Exp. Allergy.* 46 (2016) 1441–1455. <https://doi.org/10.1111/cea.12767>.
- [59] M. Contoli, K. Ito, A. Padovani, D. Poletti, B. Marku, M.R. Edwards, L.A. Stanciu, G. Gnesini, A. Pastore, A. Spanevello, P. Morelli, S.L. Johnston, G. Caramori, A. Papi, Th2 cytokines impair innate immune responses to rhinovirus in respiratory epithelial cells, *Allergy.* 70 (2015) 910–920. <https://doi.org/10.1111/all.12627>.
- [60] P.A.B. Wark, S.L. Johnston, F. Bucchieri, R. Powell, S. Puddicombe, V. Laza-Stanca, S.T. Holgate, D.E. Davies, Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 937–947. <https://doi.org/10.1084/jem.20041901>.
- [61] S. Moskwa, W. Piotrowski, J. Marczak, M. Pawełczyk, A. Lewandowska-Polak, M. Jarzębska, M. Brauncajs, A. Głobińska, P. Górski, N.G. Papadopoulos, M.R. Edwards, S.L. Johnston, M.L. Kowalski, Innate Immune Response to Viral Infections in Primary Bronchial Epithelial Cells is Modified by the Atopic Status of Asthmatic Patients, *Allergy Asthma Immunol Res.* 10 (2018) 144–154. <https://doi.org/10.4168/aaair.2018.10.2.144>.
- [62] A. Bufe, K. Gehlhar, E. Grage-Griebenow, M. Ernst, Atopic phenotype in children is associated with decreased virus-induced interferon-alpha release, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 127 (2002) 82–88. <https://doi.org/10.1159/000048173>.
- [63] K. Gehlhar, C. Bilitewski, K. Reinitz-Rademacher, G. Rohde, A. Bufe, Impaired virus-induced interferon-alpha2 release in adult asthmatic patients, *Clin. Exp. Allergy.* 36 (2006) 331–337. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02450.x>.
- [64] K. Iikura, T. Katsunuma, S. Saika, S. Saito, S. Ichinohe, H. Ida, H. Saito, K. Matsumoto, Peripheral blood mononuclear cells from patients with bronchial asthma show impaired innate immune responses to rhinovirus in vitro, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 155 Suppl 1 (2011) 27–33. <https://doi.org/10.1159/000327262>.
- [65] S.R. Durrani, D.J. Montville, A.S. Pratt, S. Sahu, M.K. DeVries, V. Rajamanickam, R.E. Gangnon, M.A. Gill, J.E. Gern, R.F. Lemanske, D.J. Jackson, Innate immune responses to rhinovirus are reduced by the high-affinity IgE receptor in allergic asthmatic children, *J. Allergy Clin. Immunol.* 130 (2012) 489–495. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.05.023>.

- [66] J.L. Simpson, M. Carroll, I.A. Yang, P.N. Reynolds, S. Hodge, A.L. James, P.G. Gibson, J.W. Upham, Reduced Antiviral Interferon Production in Poorly Controlled Asthma Is Associated With Neutrophilic Inflammation and High-Dose Inhaled Corticosteroids, *Chest*. 149 (2016) 704–713. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2015.12.018>.
- [67] J. Zhu, S.D. Message, P. Mallia, T. Kebabze, M. Contoli, C.K. Ward, E.S. Barnathan, M.A. Mascelli, O.M. Kon, A. Papi, L.A. Stanciu, M.R. Edwards, P.K. Jeffery, S.L. Johnston, Bronchial mucosal IFN- α/β and pattern recognition receptor expression in patients with experimental rhinovirus-induced asthma exacerbations, *J. Allergy Clin. Immunol.* 143 (2019) 114-125.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.04.003>.
- [68] E.A. Schwantes, D.M. Manthei, L.C. Denlinger, M.D. Evans, J.E. Gern, N.N. Jarjour, S.K. Mathur, Interferon gene expression in sputum cells correlates with the Asthma Index Score during virus-induced exacerbations, *Clin. Exp. Allergy*. 44 (2014) 813–821. <https://doi.org/10.1111/cea.12269>.
- [69] S.V. Kolenko, G. Gallagher, V.V. Baurin, A. Lewis-Antes, M. Shen, N.K. Shah, J.A. Langer, F. Sheikh, H. Dickensheets, R.P. Donnelly, IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex, *Nat. Immunol.* 4 (2003) 69–77. <https://doi.org/10.1038/ni875>.
- [70] E.K. Miller, J.Z. Hernandez, V. Wimmenauer, B.E. Shepherd, D. Hijano, R. Libster, M.E. Serra, N. Bhat, J.P. Batalle, Y. Mohamed, A. Reynaldi, A. Rodriguez, M. Otello, N. Pisapia, J. Bugna, M. Bellabarba, D. Kraft, S. Coviello, F.M. Ferolla, A. Chen, S.J. London, G.K. Siberry, J.V. Williams, F.P. Polack, A mechanistic role for type III IFN- $\lambda 1$ in asthma exacerbations mediated by human rhinoviruses, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185 (2012) 508–516. <https://doi.org/10.1164/rccm.201108-1462OC>.
- [71] M. Contoli, S.D. Message, V. Laza-Stanca, M.R. Edwards, P.A.B. Wark, N.W. Bartlett, T. Kebabze, P. Mallia, L.A. Stanciu, H.L. Parker, L. Slater, A. Lewis-Antes, O.M. Kon, S.T. Holgate, D.E. Davies, S.V. Kolenko, A. Papi, S.L. Johnston, Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations, *Nat. Med.* 12 (2006) 1023–1026. <https://doi.org/10.1038/nm1462>.
- [72] T. Boonpiyathad, Z.C. Sözener, P. Satitsuksanoa, C.A. Akdis, Immunologic mechanisms in asthma, *Semin. Immunol.* 46 (2019) 101333. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101333>.
- [73] P.D. Mitchell, P.M. O’Byrne, Epithelial-Derived Cytokines in Asthma, *Chest*. 151 (2017) 1338–1344. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.10.042>.
- [74] H. Gao, S. Ying, Y. Dai, Pathological Roles of Neutrophil-Mediated Inflammation in Asthma and Its Potential for Therapy as a Target, *J Immunol Res.* 2017 (2017) 3743048. <https://doi.org/10.1155/2017/3743048>.
- [75] J. Travers, M.E. Rothenberg, Eosinophils in mucosal immune responses, *Mucosal Immunol.* 8 (2015) 464–475. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.2>.
- [76] J. Chesné, F. Braza, G. Mahay, S. Brouard, M. Aronica, A. Magnan, IL-17 in severe asthma. Where do we stand?, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190 (2014) 1094–1101. <https://doi.org/10.1164/rccm.201405-0859PP>.
- [77] A. Bellini, M.A. Marini, L. Bianchetti, M. Barczyk, M. Schmidt, S. Mattoli, Interleukin (IL)-4, IL-13, and IL-17A differentially affect the profibrotic and proinflammatory functions of fibrocytes from asthmatic patients, *Mucosal Immunol.* 5 (2012) 140–149. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.60>.
- [78] X.-H. Yuan, Y.-M. Li, Y.-Y. Shen, J. Yang, Y. Jin, Clinical and Th1/Th2 immune response features of hospitalized children with human rhinovirus infection, *J. Med. Virol.* 92 (2020) 26–33. <https://doi.org/10.1002/jmv.25587>.
- [79] H.-C. Lee, M.B. Headley, Y.-M. Loo, A. Berlin, M. Gale, J.S. Debley, N.W. Lukacs, S.F. Ziegler, Thymic stromal lymphopoietin is induced by respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells and promotes a type 2 response to infection, *J. Allergy Clin. Immunol.* 130 (2012) 1187-1196.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.031>.

- [80] P. Haag, H. Sharma, M. Rauh, T. Zimmermann, T. Vuorinen, N.G. Papadopoulos, S.T. Weiss, S. Finotto, Soluble ST2 regulation by rhinovirus and 25(OH)-vitamin D3 in the blood of asthmatic children, *Clin. Exp. Immunol.* 193 (2018) 207–220. <https://doi.org/10.1111/cei.13135>.
- [81] D.J. Jackson, H. Makrinioti, B.M.J. Rana, B.W.H. Shamji, M.-B. Trujillo-Torralbo, J. Footitt, null Jerico Del-Rosario, A.G. Telcian, A. Nikonova, J. Zhu, J. Aniscenko, L. Gogsadze, E. Bakhsoliani, S. Traub, J. Dhariwal, J. Porter, D. Hunt, T. Hunt, T. Hunt, L.A. Stanciu, M. Khaitov, N.W. Bartlett, M.R. Edwards, O.M. Kon, P. Mallia, N.G. Papadopoulos, C.A. Akdis, J. Westwick, M.J. Edwards, D.J. Cousins, R.P. Walton, S.L. Johnston, IL-33-dependent type 2 inflammation during rhinovirus-induced asthma exacerbations in vivo, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190 (2014) 1373–1382. <https://doi.org/10.1164/rccm.201406-1039OC>.
- [82] L.M. Jurak, Y. Xi, M. Landgraf, M.L. Carroll, L. Murray, J.W. Upham, Interleukin 33 Selectively Augments Rhinovirus-Induced Type 2 Immune Responses in Asthmatic but not Healthy People, *Front Immunol.* 9 (2018) 1895. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01895>.
- [83] L. Qin, C. Hu, J. Feng, Q. Xia, Activation of lymphocytes induced by bronchial epithelial cells with prolonged RSV infection, *PLoS ONE.* 6 (2011) e27113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027113>.
- [84] T. Marichal, D. Bedoret, C. Mesnil, M. Pichavant, S. Goriely, F. Trottein, D. Cataldo, M. Goldman, P. Lekeux, F. Bureau, C.J. Desmet, Interferon response factor 3 is essential for house dust mite-induced airway allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 126 (2010) 836–844.e13. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.06.009>.
- [85] J. Bizzantino, W.-M. Lee, I.A. Laing, F. Vang, T. Pappas, G. Zhang, A.C. Martin, S.-K. Khoo, D.W. Cox, G.C. Geelhoed, P.C. McMinn, J. Goldblatt, J.E. Gern, P.N. Le Souëf, Association between human rhinovirus C and severity of acute asthma in children, *Eur. Respir. J.* 37 (2011) 1037–1042. <https://doi.org/10.1183/09031936.00092410>.
- [86] Y.A. Bochkov, K. Watters, S. Ashraf, T.F. Griggs, M.K. Devries, D.J. Jackson, A.C. Palmenberg, J.E. Gern, Cadherin-related family member 3, a childhood asthma susceptibility gene product, mediates rhinovirus C binding and replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112 (2015) 5485–5490. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421178112>.
- [87] K. Nakagome, Y.A. Bochkov, S. Ashraf, R.A. Brockman-Schneider, M.D. Evans, T.R. Pasic, J.E. Gern, Effects of rhinovirus species on viral replication and cytokine production, *J. Allergy Clin. Immunol.* 134 (2014) 332–341. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.01.029>.
- [88] C.T. Sikazwe, I.A. Laing, A. Imrie, D.W. Smith, Nasal Cytokine Profiles of Patients Hospitalised with Respiratory Wheeze Associated with Rhinovirus C, *Viruses.* 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/v11111038>.
- [89] X. Lu, E. Schneider, S. Jain, A.M. Bramley, W. Hymas, C. Stockmann, K. Ampofo, S.R. Arnold, D.J. Williams, W.H. Self, A. Patel, J.D. Chappell, C.G. Grijalva, E.J. Anderson, R.G. Wunderink, J.A. McCullers, K.M. Edwards, A.T. Pavia, D.D. Erdman, Rhinovirus Viremia in Patients Hospitalized With Community-Acquired Pneumonia, *J. Infect. Dis.* 216 (2017) 1104–1111. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix455>.
- [90] N. Principi, A. Zampiero, M. Gambino, A. Scala, L. Senatore, M. Lelii, B. Ascolese, C. Pelucchi, S. Esposito, Prospective evaluation of rhinovirus infection in healthy young children, *J. Clin. Virol.* 66 (2015) 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.03.013>.
- [91] M.J. Loeffelholz, R. Trujillo, R.B. Pyles, A.L. Miller, P. Alvarez-Fernandez, D.L. Pong, T. Chonmaitree, Duration of rhinovirus shedding in the upper respiratory tract in the first year of life, *Pediatrics.* 134 (2014) 1144–1150. <https://doi.org/10.1542/peds.2014-2132>.
- [92] J. da Silva, C. Hilzendeger, C. Moermans, F. Schleich, M. Henket, T. Kebabze, P. Mallia, M.R. Edwards, S.L. Johnston, R. Louis, Raised interferon- β , type 3 interferon and interferon-stimulated genes - evidence of innate immune activation in neutrophilic asthma, *Clin. Exp. Allergy.* 47 (2017) 313–323. <https://doi.org/10.1111/cea.12809>.

- [93] K.M. Wylie, The Virome of the Human Respiratory Tract, *Clin. Chest Med.* 38 (2017) 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2016.11.001>.
- [94] Y. Wang, N. Zhu, Y. Li, R. Lu, H. Wang, G. Liu, X. Zou, Z. Xie, W. Tan, Metagenomic analysis of viral genetic diversity in respiratory samples from children with severe acute respiratory infection in China, *Clin. Microbiol. Infect.* 22 (2016) 458.e1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.006>.
- [95] G. Freer, F. Maggi, M. Pifferi, M.E. Di Cicco, D.G. Peroni, M. Pistello, The Virome and Its Major Component, Anellovirus, a Convoluted System Molding Human Immune Defenses and Possibly Affecting the Development of Asthma and Respiratory Diseases in Childhood, *Front Microbiol.* 9 (2018) 686. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00686>.
- [96] M. Pifferi, F. Maggi, E. Andreoli, L. Lanini, E.D. Marco, C. Fornai, M.L. Vatteroni, M. Pistello, V. Ragazzo, P. Macchia, A. Boner, M. Bendinelli, Associations between nasal torquetenovirus load and spirometric indices in children with asthma, *J. Infect. Dis.* 192 (2005) 1141–1148. <https://doi.org/10.1086/444389>.
- [97] D.L. Dinwiddie, J.L. Denson, J.L. Kennedy, Role of the Airway Microbiome in Respiratory Infections and Asthma in Children, *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol.* 31 (2018) 236–240. <https://doi.org/10.1089/ped.2018.0958>.
- [98] L.T. Stiemsma, K.B. Michels, The Role of the Microbiome in the Developmental Origins of Health and Disease, *Pediatrics.* 141 (2018). <https://doi.org/10.1542/peds.2017-2437>.
- [99] J.M. Larsen, S. Brix, A.H. Thysen, S. Birch, M.A. Rasmussen, H. Bisgaard, Children with asthma by school age display aberrant immune responses to pathogenic airway bacteria as infants, *J. Allergy Clin. Immunol.* 133 (2014) 1008–1013. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.01.010>.
- [100] M.-C. Arrieta, L.T. Stiemsma, P.A. Dimitriu, L. Thorson, S. Russell, S. Yurist-Doutsch, B. Kuzeljevic, M.J. Gold, H.M. Britton, D.L. Lefebvre, P. Subbarao, P. Mandhane, A. Becker, K.M. McNagny, M.R. Sears, T. Kollmann, CHILD Study Investigators, W.W. Mohn, S.E. Turvey, B.B. Finlay, Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma, *Sci Transl Med.* 7 (2015) 307ra152. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aab2271>.
- [101] K. Hufnagl, I. Pali-Schöll, F. Roth-Walter, E. Jensen-Jarolim, Dysbiosis of the gut and lung microbiome has a role in asthma, *Semin Immunopathol.* 42 (2020) 75–93. <https://doi.org/10.1007/s00281-019-00775-y>.
- [102] K. Loewen, B. Monchka, S.M. Mahmud, G. 't Jong, M.B. Azad, Prenatal antibiotic exposure and childhood asthma: a population-based study, *Eur. Respir. J.* 52 (2018). <https://doi.org/10.1183/13993003.02070-2017>.
- [103] L. Hoskin-Parr, A. Teyhan, A. Blocker, A.J.W. Henderson, Antibiotic exposure in the first two years of life and development of asthma and other allergic diseases by 7.5 yr: a dose-dependent relationship, *Pediatr Allergy Immunol.* 24 (2013) 762–771. <https://doi.org/10.1111/pai.12153>.
- [104] D.M. Patrick, H. Sbihi, D.L.Y. Dai, A. Al Mamun, D. Rasali, C. Rose, F. Marra, R.C.T. Boutin, C. Petersen, L.T. Stiemsma, G.L. Winsor, F.S.L. Brinkman, A.L. Kozyrskyj, M.B. Azad, A.B. Becker, P.J. Mandhane, T.J. Moraes, M.R. Sears, P. Subbarao, B.B. Finlay, S.E. Turvey, Decreasing antibiotic use, the gut microbiota, and asthma incidence in children: evidence from population-based and prospective cohort studies, *Lancet Respir Med.* (2020). [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30052-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30052-7).
- [105] W.A.A. de Steenhuijsen Piters, S. Heinonen, R. Hasrat, E. Bunsow, B. Smith, M.-C. Suarez-Arrabal, D. Chaussabel, D.M. Cohen, E.A.M. Sanders, O. Ramilo, D. Bogaert, A. Mejias, Nasopharyngeal Microbiota, Host Transcriptome, and Disease Severity in Children with Respiratory Syncytial Virus Infection, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 194 (2016) 1104–1115. <https://doi.org/10.1164/rccm.201602-0220OC>.
- [106] J.M. Mansbach, K. Hasegawa, D.M. Henke, N.J. Ajami, J.F. Petrosino, C.A. Shaw, P.A. Piedra, A.F. Sullivan, J.A. Espinola, C.A. Camargo, Respiratory syncytial virus and rhinovirus severe bronchiolitis are associated with distinct nasopharyngeal microbiota,

- J. Allergy Clin. Immunol. 137 (2016) 1909-1913.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.01.036>.
- [107] K.M. Kloepfer, V.K. Sarsani, V. Poroyko, W.M. Lee, T.E. Pappas, T. Kang, K.A. Grindle, Y.A. Bochkov, S.C. Janga, R.F. Lemanske, J.E. Gern, Community-acquired rhinovirus infection is associated with changes in the airway microbiome, *J. Allergy Clin. Immunol.* 140 (2017) 312-315.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.01.038>.
- [108] M.J. Giuffrida, N. Valero, J. Mosquera, A. Duran, F. Arocha, B. Chacín, L.M. Espina, J. Gotera, J. Bermudez, A. Mavarez, M. Alvarez-Mon, Increased Systemic Cytokine/Chemokine Expression in Asthmatic and Non-asthmatic Patients with Bacterial, Viral or Mixed Lung Infection, *Scand. J. Immunol.* 85 (2017) 280–290. <https://doi.org/10.1111/sji.12532>.
- [109] Y. Kama, M. Kato, Y. Yamada, T. Koike, K. Suzuki, M. Enseki, H. Tabata, K. Hirai, H. Mochizuki, The Suppressive Role of *Streptococcus pneumoniae* Colonization in Acute Exacerbations of Childhood Bronchial Asthma, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 181 (2020) 191–199. <https://doi.org/10.1159/000504541>.
- [110] S.M. Teo, H.H.F. Tang, D. Mok, L.M. Judd, S.C. Watts, K. Pham, B.J. Holt, M. Kusel, M. Serralha, N. Troy, Y.A. Bochkov, K. Grindle, R.F. Lemanske, S.L. Johnston, J.E. Gern, P.D. Sly, P.G. Holt, K.E. Holt, M. Inouye, Airway Microbiota Dynamics Uncover a Critical Window for Interplay of Pathogenic Bacteria and Allergy in Childhood Respiratory Disease, *Cell Host Microbe.* 24 (2018) 341-352.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.08.005>.
- [111] J.M. Mansbach, P.N. Luna, C.A. Shaw, K. Hasegawa, J.F. Petrosino, P.A. Piedra, A.F. Sullivan, J.A. Espinola, C.J. Stewart, C.A. Camargo, Increased *Moraxella* and *Streptococcus* species abundance after severe bronchiolitis is associated with recurrent wheezing, *J. Allergy Clin. Immunol.* 145 (2020) 518-527.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.10.034>.
- [112] L. Cuthbertson, S.W.C. Oo, M.J. Cox, S.-K. Khoo, D.W. Cox, G. Chidlow, K. Franks, F. Prastanti, M.L. Borland, J.E. Gern, D.W. Smith, J.A. Bizzintino, I.A. Laing, P.N. Le Souëf, M.F. Moffatt, W.O.C. Cookson, Viral respiratory infections and the oropharyngeal bacterial microbiota in acutely wheezing children, *PLoS ONE.* 14 (2019) e0223990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223990>.
- [113] Y. Zhou, D. Jackson, L.B. Bacharier, D. Mauger, H. Boushey, M. Castro, J. Durack, Y. Huang, R.F. Lemanske, G.A. Storch, G.M. Weinstock, K. Wylie, R. Covar, A.M. Fitzpatrick, W. Phipatanakul, R.G. Robison, A. Beigelman, The upper-airway microbiota and loss of asthma control among asthmatic children, *Nat Commun.* 10 (2019) 5714. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13698-x>.
- [114] M.I. Abdel-Aziz, P. Brinkman, S.J.H. Vijverberg, A.H. Neerincx, J.H. Riley, S. Bates, S. Hashimoto, N.Z. Kermani, K.F. Chung, R. Djukanovic, S.-E. Dahlén, I.M. Adcock, P.H. Howarth, P.J. Sterk, A.D. Kraneveld, A.H. Maitland-van der Zee, U-BIOPRED Study Group, Sputum microbiome profiles identify severe asthma phenotypes of relative stability at 12-18 months, *J. Allergy Clin. Immunol.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.018>.
- [115] G. Lezmi, J. de Blic, Assessment of airway inflammation and remodeling in children with severe asthma: The next challenge, *Pediatr. Pulmonol.* 53 (2018) 1171–1173. <https://doi.org/10.1002/ppul.24051>.
- [116] G. Lezmi, A. Deschildre, R. Abou Taam, M. Fayon, S. Blanchon, F. Troussier, P. Mallinger, B. Mahut, P. Gosset, J. de Blic, Remodelling and inflammation in preschoolers with severe recurrent wheeze and asthma outcome at school age, *Clin. Exp. Allergy.* 48 (2018) 806–813. <https://doi.org/10.1111/cea.13143>.
- [117] A. Ray, J.K. Kolls, Neutrophilic Inflammation in Asthma and Association with Disease Severity, *Trends Immunol.* 38 (2017) 942–954. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.07.003>.
- [118] C.J. Bossley, L. Fleming, A. Gupta, N. Regamey, J. Frith, T. Oates, L. Tsartsali, C.M. Lloyd, A. Bush, S. Saglani, Pediatric severe asthma is characterized by eosinophilia

- and remodeling without T(H)2 cytokines, *J. Allergy Clin. Immunol.* 129 (2012) 974-982.e13. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.01.059>.
- [119] L. Fleming, L. Tsartsali, N. Wilson, N. Regamey, A. Bush, Sputum inflammatory phenotypes are not stable in children with asthma, *Thorax.* 67 (2012) 675–681. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-201064>.
- [120] J.R. Grunwell, S.T. Stephenson, R. Tirouvanziam, L.A.S. Brown, M.R. Brown, A.M. Fitzpatrick, Children with Neutrophil-Predominant Severe Asthma Have Proinflammatory Neutrophils With Enhanced Survival and Impaired Clearance, *J Allergy Clin Immunol Pract.* 7 (2019) 516-525.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2018.08.024>.
- [121] S.L. Taylor, L.E.X. Leong, J.M. Choo, S. Wesselingh, I.A. Yang, J.W. Upham, P.N. Reynolds, S. Hodge, A.L. James, C. Jenkins, M.J. Peters, M. Baraket, G.B. Marks, P.G. Gibson, J.L. Simpson, G.B. Rogers, Inflammatory phenotypes in patients with severe asthma are associated with distinct airway microbiology, *J. Allergy Clin. Immunol.* 141 (2018) 94-103.e15. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.03.044>.
- [122] J. Zhu, S.D. Message, Y. Qiu, P. Mallia, T. Keadze, M. Contoli, C.K. Ward, E.S. Barnathan, M.A. Mascelli, O.M. Kon, A. Papi, L.A. Stanciu, P.K. Jeffery, S.L. Johnston, Airway inflammation and illness severity in response to experimental rhinovirus infection in asthma, *Chest.* 145 (2014) 1219–1229. <https://doi.org/10.1378/chest.13-1567>.
- [123] T. Guiddir, P. Saint-Pierre, E. Purenne-Denis, N. Lambert, Y. Laoudi, R. Couderc, R. Gouvis-Echraghi, F. Amat, J. Just, Neutrophilic Steroid-Refractory Recurrent Wheeze and Eosinophilic Steroid-Refractory Asthma in Children, *J Allergy Clin Immunol Pract.* 5 (2017) 1351-1361.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2017.02.003>.
- [124] K. Nakagome, M. Nagata, Involvement and Possible Role of Eosinophils in Asthma Exacerbation, *Front Immunol.* 9 (2018) 2220. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02220>.
- [125] L. Hatchwell, A. Collison, J. Girkin, K. Parsons, J. Li, J. Zhang, S. Phipps, D. Knight, N.W. Bartlett, S.L. Johnston, P.S. Foster, P.A.B. Wark, J. Mattes, Toll-like receptor 7 governs interferon and inflammatory responses to rhinovirus and is suppressed by IL-5-induced lung eosinophilia, *Thorax.* 70 (2015) 854–861. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-205465>.
- [126] L. Fleming, N. Wilson, N. Regamey, A. Bush, Use of sputum eosinophil counts to guide management in children with severe asthma, *Thorax.* 67 (2012) 193–198. <https://doi.org/10.1136/thx.2010.156836>.
- [127] W.G. Teague, Blood Eosinophilia May Not Adequately Estimate Lung Fluid Eosinophilia in Childhood Asthma, *J Allergy Clin Immunol Pract.* 7 (2019) 2497–2498. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.05.008>.
- [128] P. Nagakumar, F. Puttur, L.G. Gregory, L. Denney, L. Fleming, A. Bush, C.M. Lloyd, S. Saglani, Pulmonary type-2 innate lymphoid cells in paediatric severe asthma: phenotype and response to steroids, *Eur. Respir. J.* 54 (2019). <https://doi.org/10.1183/13993003.01809-2018>.
- [129] S. Saglani, A. Bush, W. Carroll, S. Cunningham, L. Fleming, E. Gaillard, A. Gupta, C. Murray, P. Nagakumar, J. Paton, G. Roberts, P. Seddon, I. Sinha, Biologics for paediatric severe asthma: trick or TREAT?, *Lancet Respir Med.* 7 (2019) 294–296. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30045-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30045-1).
- [130] J. Just, R. Gouvis-Echraghi, R. Couderc, N. Guillemot-Lambert, P. Saint-Pierre, Novel severe wheezy young children phenotypes: boys atopic multiple-trigger and girls nonatopic uncontrolled wheeze, *J. Allergy Clin. Immunol.* 130 (2012) 103-110.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.02.041>.
- [131] L.B. Bacharier, A. Beigelman, A. Calatroni, D.J. Jackson, P.J. Gergen, G.T. O'Connor, M. Kattan, R.A. Wood, M.T. Sandel, S.V. Lynch, K.E. Fujimura, D.W. Fadrosch, C.A. Santee, H. Boushey, C.M. Visness, J.E. Gern, NIAID sponsored Inner-City Asthma Consortium, Longitudinal Phenotypes of Respiratory Health in a High-Risk Urban Birth

- Cohort, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 199 (2019) 71–82.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201801-0190OC>.
- [132] L.S. Subrata, J. Bizzantino, E. Mamessier, A. Bosco, K.L. McKenna, M.E. Wikström, J. Goldblatt, P.D. Sly, B.J. Hales, W.R. Thomas, I.A. Laing, P.N. LeSouëf, P.G. Holt, Interactions between Innate Antiviral and Atopic Immunoinflammatory Pathways Precipitate and Sustain Asthma Exacerbations in Children, *The Journal of Immunology*. 183 (2009) 2793–2800. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900695>.
- [133] A. Custovic, H.-J. Sonntag, I.E. Buchan, D. Belgrave, A. Simpson, M.C.F. Prosperi, Evolution pathways of IgE responses to grass and mite allergens throughout childhood, *J. Allergy Clin. Immunol.* 136 (2015) 1645-1652.e8.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.03.041>.
- [134] S. Illi, E. von Mutius, S. Lau, B. Niggemann, C. Grüber, U. Wahn, Multicentre Allergy Study (MAS) group, Perennial allergen sensitisation early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study, *Lancet*. 368 (2006) 763–770.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69286-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69286-6).
- [135] S. Gabet, J. Just, R. Couderc, J. Bousquet, N. Seta, I. Momas, Early polysensitization is associated with allergic multimorbidity in PARIS birth cohort infants, *Pediatr Allergy Immunol.* 27 (2016) 831–837. <https://doi.org/10.1111/pai.12622>.
- [136] A.J. Hose, M. Depner, S. Illi, S. Lau, T. Keil, U. Wahn, O. Fuchs, P.I. Pfefferle, E. Schmaußner-Hechfellner, J. Genuneit, R. Lauener, A.M. Karvonen, C. Roduit, J.-C. Dalphin, J. Riedler, J. Pekkanen, E. von Mutius, M.J. Ege, MAS, PASTURE study groups, Latent class analysis reveals clinically relevant atopy phenotypes in 2 birth cohorts, *J. Allergy Clin. Immunol.* 139 (2017) 1935-1945.e12.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.08.046>.
- [137] P.G. Holt, D. Mok, D. Panda, L. Renn, G. Fabozzi, N.H. deKlerk, M.M.H. Kusel, M. Serralha, E.M. Hollams, B.J. Holt, P.D. Sly, R.L. Rabin, Developmental regulation of type 1 and type 3 interferon production and risk for infant infections and asthma development, *J. Allergy Clin. Immunol.* 143 (2019) 1176-1182.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.08.035>.
- [138] A. Custovic, D. Belgrave, L. Lin, E. Bakhsoliani, A.G. Telcian, R. Solari, C.S. Murray, R.P. Walton, J. Curtin, M.R. Edwards, A. Simpson, M. Rattray, S.L. Johnston, Cytokine Responses to Rhinovirus and Development of Asthma, Allergic Sensitization, and Respiratory Infections during Childhood, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 197 (2018) 1265–1274. <https://doi.org/10.1164/rccm.201708-1762OC>.
- [139] B.M. Donovan, L. Bastarache, K.N. Turi, M.M. Zutter, T.V. Hartert, The current state of omics technologies in the clinical management of asthma and allergic diseases, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 123 (2019) 550–557.
<https://doi.org/10.1016/j.anai.2019.08.460>.
- [140] N. Farzan, S.J. Vijverberg, M. Kabesch, P.J. Sterk, A.H. Maitland-van der Zee, The use of pharmacogenomics, epigenomics, and transcriptomics to improve childhood asthma management: Where do we stand?, *Pediatr. Pulmonol.* 53 (2018) 836–845.
<https://doi.org/10.1002/ppul.23976>.
- [141] R. Hall, I.P. Hall, I. Sayers, Genetic risk factors for the development of pulmonary disease identified by genome-wide association, *Respirology*. 24 (2019) 204–214.
<https://doi.org/10.1111/resp.13436>.
- [142] M.F. Moffatt, I.G. Gut, F. Demenais, D.P. Strachan, E. Bouzigon, S. Heath, E. von Mutius, M. Farrall, M. Lathrop, W.O.C.M. Cookson, GABRIEL Consortium, A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma, *N. Engl. J. Med.* 363 (2010) 1211–1221. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0906312>.
- [143] M.C. Altman, M.A. Gill, E. Whalen, D.C. Babineau, B. Shao, A.H. Liu, B. Jepson, R.S. Gruchalla, G.T. O'Connor, J.A. Pongracic, C.M. Kercsmar, G.K. Khurana Hershey, E.M. Zoratti, C.C. Johnson, S.J. Teach, M. Kattan, L.B. Bacharier, A. Beigelman, S.M. Sigelman, S. Presnell, J.E. Gern, P.J. Gergen, L.M. Wheatley, A. Togias, W.W. Busse, D.J. Jackson, Transcriptome networks identify mechanisms of viral and nonviral

- asthma exacerbations in children, *Nat. Immunol.* 20 (2019) 637–651. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0347-8>.
- [144] A. Bosco, S. Ehteshami, S. Panyala, F.D. Martinez, Interferon regulatory factor 7 is a major hub connecting interferon-mediated responses in virus-induced asthma exacerbations in vivo, *J. Allergy Clin. Immunol.* 129 (2012) 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.10.038>.
- [145] T. Aoki, Y. Matsumoto, K. Hirata, K. Ochiai, M. Okada, K. Ichikawa, M. Shibasaki, T. Arinami, R. Sumazaki, E. Noguchi, Expression profiling of genes related to asthma exacerbations, *Clin. Exp. Allergy.* 39 (2009) 213–221. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.03186.x>.
- [146] H. Persson, A.T. Kwon, J.A. Ramilowski, G. Silberberg, C. Söderhäll, C. Orsmark-Pietras, B. Nordlund, J.R. Konradsen, M.J.L. de Hoon, E. Melén, Y. Hayashizaki, G. Hedlin, J. Kere, C.O. Daub, Transcriptome analysis of controlled and therapy-resistant childhood asthma reveals distinct gene expression profiles, *J. Allergy Clin. Immunol.* 136 (2015) 638–648. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.02.026>.
- [147] A.M. Fitzpatrick, Y. Park, L.A.S. Brown, D.P. Jones, Children with severe asthma have unique oxidative stress-associated metabolomic profiles, *J. Allergy Clin. Immunol.* 133 (2014) 258–261.e1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.10.012>.
- [148] C.-Y. Chiu, M.-L. Cheng, M.-H. Chiang, Y.-L. Kuo, M.-H. Tsai, C.-C. Chiu, G. Lin, Gut microbial-derived butyrate is inversely associated with IgE responses to allergens in childhood asthma, *Pediatr Allergy Immunol.* 30 (2019) 689–697. <https://doi.org/10.1111/pai.13096>.
- [149] K.E. Duffy, R.J. Lamb, L.R. San Mateo, J.L. Jordan, G. Canziani, M. Brigham-Burke, J. Korteweg, M. Cunningham, H.S. Beck, J. Carton, J. Giles-Komar, C. Duchala, R.T. Sarisky, M.L. Mbow, Down modulation of human TLR3 function by a monoclonal antibody, *Cell. Immunol.* 248 (2007) 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2007.10.002>.
- [150] P.E. Silkoff, S. Flavin, R. Gordon, M.J. Loza, P.J. Sterk, R. Lutter, Z. Diamant, R.B. Turner, B.J. Lipworth, D. Proud, D. Singh, A. Eich, V. Backer, J.E. Gern, C. Herzmann, S.A. Halperin, T.T. Mensinga, A.M. Del Vecchio, P. Branigan, L. San Mateo, F. Baribaud, E.S. Barnathan, S.L. Johnston, Toll-like receptor 3 blockade in rhinovirus-induced experimental asthma exacerbations: A randomized controlled study, *J. Allergy Clin. Immunol.* 141 (2018) 1220–1230. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.06.027>.
- [151] J.P. Wong, M.E. Christopher, S. Viswanathan, N. Karpoff, X. Dai, D. Das, L.Q. Sun, M. Wang, A.M. Salazar, Activation of toll-like receptor signaling pathway for protection against influenza virus infection, *Vaccine.* 27 (2009) 3481–3483. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.048>.
- [152] X. Tian, F. Xu, W.Y. Lung, C. Meyerson, A.A. Ghaffari, G. Cheng, J.C. Deng, Poly I:C enhances susceptibility to secondary pulmonary infections by gram-positive bacteria, *PLoS ONE.* 7 (2012) e41879. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041879>.
- [153] D. Torres, A. Dieudonné, B. Ryffel, E. Vilain, M. Si-Tahar, M. Pichavant, P. Lassalle, F. Trottein, P. Gosset, Double-stranded RNA exacerbates pulmonary allergic reaction through TLR3: implication of airway epithelium and dendritic cells, *J. Immunol.* 185 (2010) 451–459. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902833>.
- [154] E.M. Abrams, H.H. Raissy, Emerging Therapies in the Treatment of Early Childhood Wheeze, *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol.* 32 (2019) 78–80. <https://doi.org/10.1089/ped.2019.1043>.
- [155] M. Cazzola, S. Anapurapu, C.P. Page, Polyvalent mechanical bacterial lysate for the prevention of recurrent respiratory infections: a meta-analysis, *Pulm Pharmacol Ther.* 25 (2012) 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2011.11.002>.
- [156] M.D. Gutiérrez-Tarango, A. Berber, Safety and Efficacy of Two Courses of OM-85 BV in the Prevention of Respiratory Tract Infections in Children During 12 Months, *CHEST.* 119 (2001) 1742–1748. <https://doi.org/10.1378/chest.119.6.1742>.

- [157] U.B. Schaad, OM-85 BV, an immunostimulant in pediatric recurrent respiratory tract infections: a systematic review, *World J Pediatr.* 6 (2010) 5–12. <https://doi.org/10.1007/s12519-010-0001-x>.
- [158] J.P. Collet, T. Ducruet, M.S. Kramer, J. Haggerty, D. Floret, J.J. Chomel, F. Durr, Stimulation of nonspecific immunity to reduce the risk of recurrent infections in children attending day-care centers. The Epicrèche Research Group, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 12 (1993) 648–652. <https://doi.org/10.1097/00006454-199308000-00005>.
- [159] J. Yin, B. Xu, X. Zeng, K. Shen, Broncho-Vaxom in pediatric recurrent respiratory tract infections: A systematic review and meta-analysis, *Int. Immunopharmacol.* 54 (2018) 198–209. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.10.032>.
- [160] R. Ricci, C. Palmero, G. Bazurro, A.M. Riccio, V. Garelli, E. Di Marco, C. Cirillo, F. Braidò, G.W. Canonica, G. Melioli, The administration of a polyvalent mechanical bacterial lysate in elderly patients with COPD results in serological signs of an efficient immune response associated with a reduced number of acute episodes, *Pulm Pharmacol Ther.* 27 (2014) 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2013.05.006>.
- [161] A. Emeryk, M. Bartkowiak-Emeryk, Z. Raus, F. Braidò, G. Ferlazzo, G. Melioli, Mechanical bacterial lysate administration prevents exacerbation in allergic asthmatic children-The EOLIA study, *Pediatr Allergy Immunol.* 29 (2018) 394–401. <https://doi.org/10.1111/pai.12894>.
- [162] C.H. Razi, K. Harmancı, A. Abacı, O. Özdemir, S. Hızlı, R. Renda, F. Keskin, The immunostimulant OM-85 BV prevents wheezing attacks in preschool children, *J. Allergy Clin. Immunol.* 126 (2010) 763–769. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.07.038>.
- [163] Oral Bacterial Extract for the Prevention of Wheezing Lower Respiratory Tract Illness - Full Text View - ClinicalTrials.gov, (n.d.). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02148796> (accessed February 9, 2020).
- [164] M. Huber, H. Mossmann, W.G. Bessler, Th1-orientated immunological properties of the bacterial extract OM-85-BV, *Eur. J. Med. Res.* 10 (2005) 209–217.
- [165] C. Zelle-Rieser, R. Ramoner, G. Bartsch, M. Thurnher, A clinically approved oral vaccine against pneumotropic bacteria induces the terminal maturation of CD83+ immunostimulatory dendritic cells, *Immunol. Lett.* 76 (2001) 63–67. [https://doi.org/10.1016/s0165-2478\(00\)00326-6](https://doi.org/10.1016/s0165-2478(00)00326-6).
- [166] J. Mauël, Stimulation of Immunoprotective Mechanisms by OM-85 BV, *RES.* 61 (1994) 8–15. <https://doi.org/10.1159/000196372>.
- [167] F.H. Sousa, V. Casanova, F. Findlay, C. Stevens, P. Svoboda, J. Pohl, L. Proudfoot, P.G. Barlow, Cathelicidins display conserved direct antiviral activity towards rhinovirus, *Peptides.* 95 (2017) 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.07.013>.
- [168] Y. Li, X. Chu, C. Liu, W. Huang, Y. Yao, Y. Xia, P. Sun, Q. Long, X. Feng, K. Li, X. Yang, H. Bai, W. Sun, Y. Ma, Exogenous murine antimicrobial peptide CRAMP significantly exacerbates Ovalbumin-induced airway inflammation but ameliorates oxazolone-induced intestinal colitis in BALB/c mice, *Hum Vaccin Immunother.* 14 (2018) 146–158. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1386823>.
- [169] A.G. Telcian, M.T. Zdrenghea, M.R. Edwards, V. Laza-Stanca, P. Mallia, S.L. Johnston, L.A. Stanciu, Vitamin D increases the antiviral activity of bronchial epithelial cells in vitro, *Antiviral Res.* 137 (2017) 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.11.004>.
- [170] C.L. Greiller, R. Suri, D.A. Jolliffe, T. Keadze, A.G. Hirsman, C.J. Griffiths, S.L. Johnston, A.R. Martineau, Vitamin D attenuates rhinovirus-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and platelet-activating factor receptor (PAFR) in respiratory epithelial cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 187 (2019) 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.11.013>.
- [171] A. Schögler, R.J. Muster, E. Kieninger, C. Casaulta, C. Tapparel, A. Jung, A. Moeller, T. Geiser, N. Regamey, M.P. Alves, Vitamin D represses rhinovirus replication in cystic fibrosis cells by inducing LL-37, *Eur. Respir. J.* 47 (2016) 520–530. <https://doi.org/10.1183/13993003.00665-2015>.

- [172] A.R. Martineau, D.A. Jolliffe, R.L. Hooper, L. Greenberg, J.F. Aloia, P. Bergman, G. Dubnov-Raz, S. Esposito, D. Ganmaa, A.A. Ginde, E.C. Goodall, C.C. Grant, C.J. Griffiths, W. Janssens, I. Laaksi, S. Manaseki-Holland, D. Mauger, D.R. Murdoch, R. Neale, J.R. Rees, S. Simpson, I. Stelmach, G.T. Kumar, M. Urashima, C.A. Camargo, Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data, *BMJ*. 356 (2017) i6583. <https://doi.org/10.1136/bmj.i6583>.
- [173] M.S. Sandhu, T.B. Casale, The role of vitamin D in asthma, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 105 (2010) 191–199; quiz 200–202, 217. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2010.01.013>.
- [174] T.-T. Wang, F.P. Nestel, V. Bourdeau, Y. Nagai, Q. Wang, J. Liao, L. Tavera-Mendoza, R. Lin, J.W. Hanrahan, S. Mader, J.H. White, J.H. Hanrahan, Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression, *J. Immunol.* 173 (2004) 2909–2912. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.2909>.
- [175] V. Kim, R.M. Abreu, D.M. Nakagawa, R.M. Baldassare, F.J. Carrilho, S.K. Ono, Pegylated interferon alfa for chronic hepatitis B: systematic review and meta-analysis, *J. Viral Hepat.* 23 (2016) 154–169. <https://doi.org/10.1111/jvh.12418>.
- [176] K.J. Lavender, K. Gibbert, K.E. Peterson, E. Van Dis, S. Francois, T. Woods, R.J. Messer, A. Gawanbacht, J.A. Müller, J. Münch, K. Phillips, B. Race, M.S. Harper, K. Guo, E.J. Lee, M. Trilling, H. Hengel, J. Piehler, J. Verheyen, C.C. Wilson, M.L. Santiago, K.J. Hasenkrug, U. Dittmer, Interferon Alpha Subtype-Specific Suppression of HIV-1 Infection In Vivo, *J. Virol.* 90 (2016) 6001–6013. <https://doi.org/10.1128/JVI.00451-16>.
- [177] T.P. Trang, M. Whalen, A. Hilts-Horeczko, S.B. Doernberg, C. Liu, Comparative effectiveness of aerosolized versus oral ribavirin for the treatment of respiratory syncytial virus infections: A single-center retrospective cohort study and review of the literature, *Transpl Infect Dis.* 20 (2018) e12844. <https://doi.org/10.1111/tid.12844>.
- [178] S.A. Grim, G.E. Reid, N.M. Clark, Update in the treatment of non-influenza respiratory virus infection in solid organ transplant recipients, *Expert Opin Pharmacother.* 18 (2017) 767–779. <https://doi.org/10.1080/14656566.2017.1322063>.
- [179] O. Ruuskanen, M. Waris, L. Kainulainen, Treatment of persistent rhinovirus infection with pegylated interferon α 2a and ribavirin in patients with hypogammaglobulinemia, *Clin. Infect. Dis.* 58 (2014) 1784–1786. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu169>.
- [180] S.S.Y. Wong, K.-Y. Yuen, The management of coronavirus infections with particular reference to SARS, *J. Antimicrob. Chemother.* 62 (2008) 437–441. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn243>.
- [181] T.M. Becker, S.R. Durrani, Y.A. Bochkov, M.K. Devries, V. Rajamanickam, D.J. Jackson, Effect of exogenous interferons on rhinovirus replication and airway inflammatory responses, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 111 (2013) 397–401. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2013.07.029>.
- [182] R. Djukanović, T. Harrison, S.L. Johnston, F. Gabbay, P. Wark, N.C. Thomson, R. Niven, D. Singh, H.K. Reddel, D.E. Davies, R. Marsden, C. Boxall, S. Dudley, V. Plagnol, S.T. Holgate, P. Monk, INTERCIA Study Group, The effect of inhaled IFN- β on worsening of asthma symptoms caused by viral infections. A randomized trial, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190 (2014) 145–154. <https://doi.org/10.1164/rccm.201312-2235OC>.
- [183] C. McCrae, M. Olsson, M. Aurell, C. Lundin, J. Paraskos, A. Cavallin, M. Kjerrulf, K. Karlsson, R. Marsden, A. Malmgren, P. Gustafson, T. Harrison, On-Demand Inhaled Interferon-Beta 1a for the Prevention of Severe Asthma Exacerbations: Results of the INEXAS Phase 2a Study, in: D12. IMMUNOTHERAPY IN LUNG DISEASE, American Thoracic Society, 2018: pp. A6165–A6165. https://doi.org/10.1164/ajrccm-conference.2018.197.1_MeetingAbstracts.A6165.
- [184] A Study in Asthma Patients to Evaluate Efficacy, Safety and Tolerability of 14 Days Once Daily Inhaled Interferon Beta-1a After the Onset of Symptoms of an Upper

- Respiratory Tract Infection - Full Text View - ClinicalTrials.gov, (n.d.).
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02491684> (accessed February 4, 2020).
- [185] H.J. Thibaut, A.M. De Palma, J. Neyts, Combating enterovirus replication: state-of-the-art on antiviral research, *Biochem. Pharmacol.* 83 (2012) 185–192.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.08.016>.
- [186] Effects of Pleconaril Nasal Spray on Common Cold Symptoms and Asthma Exacerbations Following Rhinovirus Exposure (Study P04295) - Study Results - ClinicalTrials.gov, (n.d.). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT00394914> (accessed May 3, 2020).
- [187] D.P. Potaczek, S.D. Unger, N. Zhang, S. Taka, S. Michel, N. Akdağ, F. Lan, M. Helfer, C. Hudemann, M. Eickmann, C. Skevaki, S. Megremis, A. Sadewasser, B. Alashkar Alhamwe, F. Alhamdan, M. Akdis, M.R. Edwards, S.L. Johnston, C.A. Akdis, S. Becker, C. Bachert, N.G. Papadopoulos, H. Garn, H. Renz, Development and characterization of DNzyme candidates demonstrating significant efficiency against human rhinoviruses, *J. Allergy Clin. Immunol.* 143 (2019) 1403–1415.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.07.026>.
- [188] A. Bush, Azithromycin is the answer in paediatric respiratory medicine, but what was the question?, *Paediatr Respir Rev.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2019.07.002>.
- [189] F.M. de Benedictis, I. Carloni, R. Guidi, Question 4: Is there a role for antibiotics in infantile wheeze?, *Paediatr Respir Rev.* (2019).
<https://doi.org/10.1016/j.prrv.2019.11.001>.
- [190] P. Li, T. Zhang, Y. Xiao, L. Tian, B. Cui, G. Ji, Y.-Y. Liu, F. Zhang, Timing for the second fecal microbiota transplantation to maintain the long-term benefit from the first treatment for Crohn’s disease, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103 (2019) 349–360.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9447-x>.
- [191] H.T. Wang, S. Anvari, K. Anagnostou, The Role of Probiotics in Preventing Allergic Disease, *Children (Basel)*. 6 (2019). <https://doi.org/10.3390/children6020024>.
- [192] C. Cuello-Garcia, A. Fiocchi, R. Pawankar, J.J. Yepes-Nuñez, G.P. Morgano, Y. Zhang, A. Agarwal, S. Gandhi, L. Terracciano, H.J. Schünemann, J.L. Brozek, Prebiotics for the prevention of allergies: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *Clin. Exp. Allergy*. 47 (2017) 1468–1477.
<https://doi.org/10.1111/cea.13042>.
- [193] A.N. Thorburn, C.I. McKenzie, S. Shen, D. Stanley, L. Macia, L.J. Mason, L.K. Roberts, C.H.Y. Wong, R. Shim, R. Robert, N. Chevalier, J.K. Tan, E. Mariño, R.J. Moore, L. Wong, M.J. McConville, D.L. Tull, L.G. Wood, V.E. Murphy, J. Mattes, P.G. Gibson, C.R. Mackay, Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites, *Nat Commun.* 6 (2015) 7320.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8320>.
- [194] T.J. Schuijt, J.M. Lankelma, B.P. Scicluna, F. de Sousa e Melo, J.J.T.H. Roelofs, J.D. de Boer, A.J. Hoogendijk, R. de Beer, A. de Vos, C. Belzer, W.M. de Vos, T. van der Poll, W.J. Wiersinga, The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia, *Gut*. 65 (2016) 575–583.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309728>.
- [195] V. Sencio, A. Barthelemy, L.P. Tavares, M.G. Machado, D. Soulard, C. Cuinat, C.M. Queiroz-Junior, M.-L. Noordine, S. Salomé-Desnoulez, L. Deryuter, B. Foligné, C. Wahl, B. Frisch, A.T. Vieira, C. Paget, G. Milligan, T. Ulven, I. Wolowczuk, C. Faveeuw, R. Le Goffic, M. Thomas, S. Ferreira, M.M. Teixeira, F. Trottein, Gut Dysbiosis during Influenza Contributes to Pulmonary Pneumococcal Superinfection through Altered Short-Chain Fatty Acid Production, *Cell Rep.* 30 (2020) 2934–2947.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.013>.
- [196] R.L. Brown, R.P. Sequeira, T.B. Clarke, The microbiota protects against respiratory infection via GM-CSF signaling, *Nat Commun.* 8 (2017) 1512.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-01803-x>.

- [197] N. Schwerk, F. Brinkmann, B. Soudah, M. Kabesch, G. Hansen, Wheeze in preschool age is associated with pulmonary bacterial infection and resolves after antibiotic therapy, *PLoS ONE*. 6 (2011) e27913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027913>.
- [198] P. Zimmermann, V.C. Ziesenitz, N. Curtis, N. Ritz, The Immunomodulatory Effects of Macrolides-A Systematic Review of the Underlying Mechanisms, *Front Immunol*. 9 (2018) 302. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00302>.
- [199] L.B. Bacharier, T.W. Guilbert, D.T. Mauger, S. Boehmer, A. Beigelman, A.M. Fitzpatrick, D.J. Jackson, S.N. Baxi, M. Benson, C.-A.D. Burnham, M. Cabana, M. Castro, J.F. Chmiel, R. Covar, M. Daines, J.M. Gaffin, D.A. Gentile, F. Holguin, E. Israel, H.W. Kelly, S.C. Lazarus, R.F. Lemanske, N. Ly, K. Meade, W. Morgan, J. Moy, T. Olin, S.P. Peters, W. Phipatanakul, J.A. Pongratic, H.H. Raissy, K. Ross, W.J. Sheehan, C. Sorkness, S.J. Szeffler, W.G. Teague, S. Thyne, F.D. Martinez, Early Administration of Azithromycin and Prevention of Severe Lower Respiratory Tract Illnesses in Preschool Children With a History of Such Illnesses: A Randomized Clinical Trial, *JAMA*. 314 (2015) 2034–2044. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.13896>.
- [200] J. Stokholm, B.L. Chawes, N.H. Vissing, E. Bjarnadóttir, T.M. Pedersen, R.K. Vinding, A.-M.M. Schoos, H.M. Wolsk, S. Thorsteinsdóttir, H.W. Hallas, L. Arianto, S. Schjørring, K.A. Krogh, T.K. Fischer, C.B. Phipper, K. Bønnelykke, H. Bisgaard, Azithromycin for episodes with asthma-like symptoms in young children aged 1-3 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet Respir Med*. 4 (2016) 19–26. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00500-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00500-7).
- [201] P.J. Mandhane, P. Paredes Zambrano de Silbernagel, Y.N. Aung, J. Williamson, B.E. Lee, S. Spier, M. Noseworthy, W.R. Craig, D.W. Johnson, Treatment of preschool children presenting to the emergency department with wheeze with azithromycin: A placebo-controlled randomized trial, *PLoS ONE*. 12 (2017) e0182411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182411>.
- [202] M.A. Pincheira, L.B. Bacharier, J.A. Castro-Rodriguez, Efficacy of Macrolides on Acute Asthma or Wheezing Exacerbations in Children with Recurrent Wheezing: A Systematic Review and Meta-analysis, *Paediatr Drugs*. (2020). <https://doi.org/10.1007/s40272-019-00371-5>.
- [203] G.G. Brusselle, C. Vanderstichele, P. Jordens, R. Deman, H. Slabbynck, V. Ringoet, G. Verleden, I.K. Demedts, K. Verhamme, A. Delporte, B. Demeyere, G. Claeys, J. Boelens, E. Padalko, J. Verschakelen, G. Van Maele, E. Deschepper, G.F.P. Joos, Azithromycin for prevention of exacerbations in severe asthma (AZISAST): a multicentre randomised double-blind placebo-controlled trial, *Thorax*. 68 (2013) 322–329. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-202698>.
- [204] P.G. Gibson, I.A. Yang, J.W. Upham, P.N. Reynolds, S. Hodge, A.L. James, C. Jenkins, M.J. Peters, G.B. Marks, M. Baraket, H. Powell, S.L. Taylor, L.E.X. Leong, G.B. Rogers, J.L. Simpson, Effect of azithromycin on asthma exacerbations and quality of life in adults with persistent uncontrolled asthma (AMAZES): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet*. 390 (2017) 659–668. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31281-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31281-3).
- [205] D.L. Hahn, M. Grasmick, S. Hetzel, S. Yale, AZMATICS (AZithroMycin-Asthma Trial In Community Settings) Study Group, Azithromycin for bronchial asthma in adults: an effectiveness trial, *J Am Board Fam Med*. 25 (2012) 442–459. <https://doi.org/10.3122/jabfm.2012.04.110309>.
- [206] S.A. Hiles, V.M. McDonald, M. Guilhermino, G.G. Brusselle, P.G. Gibson, Does maintenance azithromycin reduce asthma exacerbations? An individual participant data meta-analysis, *Eur. Respir. J*. 54 (2019). <https://doi.org/10.1183/13993003.01381-2019>.
- [207] J.L. Simpson, H. Powell, M.J. Boyle, R.J. Scott, P.G. Gibson, Clarithromycin targets neutrophilic airway inflammation in refractory asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 177 (2008) 148–155. <https://doi.org/10.1164/rccm.200707-1134OC>.

- [208] M. Yamaya, K. Nomura, K. Arakawa, M. Sugawara, X. Deng, N. Lusamba Kalonji, H. Nishimura, M. Yamada, R. Nagatomi, T. Kawase, Clarithromycin decreases rhinovirus replication and cytokine production in nasal epithelial cells from subjects with bronchial asthma: effects on IL-6, IL-8 and IL-33, *Arch. Pharm. Res.* (2017). <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0950-x>.
- [209] V. Gielen, S.L. Johnston, M.R. Edwards, Azithromycin induces anti-viral responses in bronchial epithelial cells, *Eur. Respir. J.* 36 (2010) 646–654. <https://doi.org/10.1183/09031936.00095809>.
- [210] W.W. Busse, W.J. Morgan, P.J. Gergen, H.E. Mitchell, J.E. Gern, A.H. Liu, R.S. Gruchalla, M. Kattan, S.J. Teach, J.A. Pongratic, J.F. Chmiel, S.F. Steinbach, A. Calatroni, A. Togias, K.M. Thompson, S.J. Szeffler, C.A. Sorkness, Randomized trial of omalizumab (anti-IgE) for asthma in inner-city children, *N. Engl. J. Med.* 364 (2011) 1005–1015. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1009705>.
- [211] A. Deschildre, C. Marguet, J. Salleron, I. Pin, J.-L. Rittié, J. Derelle, R.A. Taam, M. Fayon, J. Brouard, J.C. Dubus, D. Siret, L. Weiss, G. Pouessel, L. Beghin, J. Just, Add-on omalizumab in children with severe allergic asthma: a 1-year real life survey, *Eur. Respir. J.* 42 (2013) 1224–1233. <https://doi.org/10.1183/09031936.00149812>.
- [212] A. Esquivel, W.W. Busse, A. Calatroni, A.G. Togias, K.G. Grindle, Y.A. Bochkov, R.S. Gruchalla, M. Kattan, C.M. Kercksmar, G. Khurana Hershey, H. Kim, P. Lebeau, A.H. Liu, S.J. Szeffler, S.J. Teach, J.B. West, J. Wildfire, J.A. Pongratic, J.E. Gern, Effects of Omalizumab on Rhinovirus Infections, Illnesses, and Exacerbations of Asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 196 (2017) 985–992. <https://doi.org/10.1164/rccm.201701-0120OC>.
- [213] D.B. Kantor, M.C. McDonald, N. Stenquist, B.J. Schultz, C.D. Smallwood, K.A. Nelson, W. Phipatanakul, J.N. Hirschhorn, Omalizumab Is Associated with Reduced Acute Severity of Rhinovirus-triggered Asthma Exacerbation, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 194 (2016) 1552–1555. <https://doi.org/10.1164/rccm.201606-1145LE>.
- [214] P.W. Heymann, T.A. Platts-Mills, J.A. Woodfolk, L. Borish, D.D. Murphy, H.T. Carper, M.R. Conaway, J.W. Steinke, L. Muehling, T.W. Gerald, J.L. Kennedy, A.-M. Irani, M.D. McGraw, S.V. Early, L.M. Wheatley, A.P. Adams, R.B. Turner, Understanding the Asthmatic Response to an Experimental Rhinovirus Infection: Exploring the Effects of Blocking IgE, *J. Allergy Clin. Immunol.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.01.035>.
- [215] S.J. Teach, M.A. Gill, A. Togias, C.A. Sorkness, S.J. Arbes, A. Calatroni, J.J. Wildfire, P.J. Gergen, R.T. Cohen, J.A. Pongratic, C.M. Kercksmar, G.K. Khurana Hershey, R.S. Gruchalla, A.H. Liu, E.M. Zoratti, M. Kattan, K.A. Grindle, J.E. Gern, W.W. Busse, S.J. Szeffler, Preseasonal treatment with either omalizumab or an inhaled corticosteroid boost to prevent fall asthma exacerbations, *J. Allergy Clin. Immunol.* 136 (2015) 1476–1485. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.09.008>.
- [216] M.A. Gill, A.H. Liu, A. Calatroni, R.Z. Krouse, B. Shao, A. Schiltz, J.E. Gern, A. Togias, W.W. Busse, Enhanced plasmacytoid dendritic cell antiviral responses after omalizumab, *J. Allergy Clin. Immunol.* 141 (2018) 1735-1743.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.07.035>.
- [217] J. Just, A. Deschildre, S. Lejeune, F. Amat, New perspectives of childhood asthma treatment with biologics, *Pediatr Allergy Immunol.* 30 (2019) 159–171. <https://doi.org/10.1111/pai.13007>.
- [218] A. Gupta, M. Ikeda, B. Geng, J. Azmi, R.G. Price, E.S. Bradford, S.W. Yancey, J. Steinfeld, Long-term safety and pharmacodynamics of mepolizumab in children with severe asthma with an eosinophilic phenotype, *J. Allergy Clin. Immunol.* 144 (2019) 1336-1342.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.08.005>.
- [219] Y.S. Sabogal Piñeros, S.M. Bal, M.A. van de Pol, B.S. Dierdorp, T. Dekker, A. Dijkhuis, P. Brinkman, K.F. van der Sluijs, A.H. Zwinderman, C.J. Majoor, P.I. Bonta, L. Ravanetti, P.J. Sterk, R. Lutter, Anti-IL-5 in Mild Asthma Alters Rhinovirus-induced Macrophage, B-Cell, and Neutrophil Responses (MATERIAL). A Placebo-controlled,

Double-Blind Study, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 199 (2019) 508–517.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201803-0461OC>.

Compartment	Study	Design and age-group	Main results	
PRR	<i>In vitro and ex-vivo</i>			
	AEC	Edwards M, et al. 2013 [45]	RV-A16 Children: <u>Severe therapy resistant asthma (STRA)</u> 11y (9-15y) vs healthy controls	In STRA: lower basal levels of TLR3, reduced RIG-I, MDA5 levels after RV stimulation; lower basal levels of TLR3, reduced RIG-I, MDA5 levels after RV stimulation No association with age, IgE levels, allergen reactivity, BAL/sputum neutrophils and eosinophils, lung function
	AEC	Parsons KS, et al. 2014 [46]	RV-B1 Adults: <u>asthma</u> / Healthy controls	In asthma: no impairment of expression of MDA5, TLR3 and reduced release of CXCL-10
	AEC	Contoli M, et al. 2015 [59]	RV-A16 Pre-treatment with IL-4 and IL-13 prior to infection Adults: <u>atopic rhinitis</u> / non-atopic healthy	In atopic cells: impaired immune response to RV-16 in the presence of IL-4 and IL-13, through inhibition of TLR3 expression and signaling (IRF3),
	AEC	Moskwa S, et al. 2018 [61]	PIV-3 / RV-B1 Adults: <u>atopic asthma</u> / <u>non-atopic asthma</u> / healthy controls	<u>Atopic asthma:</u> After PIV3 infection: higher IFN- λ 1, IFN- α , IFN- β and IRF7 expressions After RV1B infection: IFN- β higher than in <u>non-atopic asthmatics</u>
	AM	Rupani H, et al. 2016 [47]	RV-A16 Pre-treatment with Imiquimod (TLR7 agonist) Adults: <u>severe asthma</u> / Healthy controls	In severe asthma: reduced TLR7 expression, inverse correlation with number of exacerbations Increased levels of 3 microRNAs (miR-150, miR-152, and miR-375) Restored TLR7 expression after blocking these microRNAs with anti-miRNA oligonucleotides
	BAL cells PBMC	Sykes A, et al. 2012 [48]	RV-A16 Adults: <u>mild-to-moderate allergic asthma</u> vs healthy controls	In asthma: no impairment of expression of PRR (TLR, RNA-helicases), their adaptor proteins, transcription factors downstream
	<i>In vivo</i>			
	Sputum Serum PBMC	Deschildre A, et al. 2017 [49]	School-age children 8.9 y (6-16y) <u>Atopic asthma:</u> virus vs no virus Severe exacerbation (64% virus, 51% RV) / steady state (8 weeks later) (25% virus, 11% RV) 24% virus at both time	Virus at exacerbation: similar TLR3, RIG-I and MDA-5 expression on blood monocytes and DC, similar levels of IFN- β , IFN- γ , IFN- λ 1 in sputum and plasma, higher airway IL-5 and eosinophils counts than patients with negative viral PCR Virus at both time: modification in PRR expression/function on PBMC, higher airway neutrophilic inflammation at steady state
	Bronchial biopsies	Zhu J, et al. 2019 [67]	In vivo inoculation - RV-A16 Young adults: <u>atopic asthma</u> (23 y \pm 1.4) vs non-atopic control subjects (27 y \pm 2.3)	In asthma: PRR expression (TLR3, MDA5, RIG-I) not deficient at baseline; and induced after RV both in epithelium and sub-epithelium

		<i>In vitro</i>		
Type I and type III IFN	AEC	<i>Wark PA, et al. 2005 [60]</i>	RV-A16 Adults: <u>Asthma</u> vs healthy controls	In asthma: Impaired IFN- β , late virus release and late cell lysis, impaired apoptotic response
	AEC	<i>Edwards M, et al. 2013 [45]</i>	RV-A16 Children: <u>Severe therapy resistant asthma (STRA)</u> 11y (9-15y), vs healthy controls	In STRA: IFN- β , IFN- λ 1, IFN- λ 2/3 mRNA levels lower and RV virus load higher No association with age, IgE levels, allergen reactivity, BAL/sputum neutrophils and eosinophils, lung function
	AEC	<i>Gielen V, et al. 2015 [57]</i>	RV-B1 / RV-A16 Pre-treatment with IL-4 / IL-13 Children: <u>STRA</u> 11y (9-15y), vs healthy controls	In STRA: SOCS1 expression increased and related to IFN deficiency, increased viral replication Suppression of RV-induced IFN promoter activation in AEC by SOCS1, dependent on nuclear translocation
	AEC	<i>Parsons KS, et al. 2014 [46]</i>	RV-B1 Adults: <u>asthma</u> / Healthy controls	In asthma: reduced release of IL-6, CXCL-8 and IFN- λ in response to RV, reduced release of CXCL-10
	AEC	<i>Kicic A, et al. 2016 [58]</i>	RV-B1 / RV-B14 Children: <u>Asthma</u> 8.2 y (2.6-14.8) vs healthy children 8.4 y (3.2-15.6)	In asthma: greater virus proliferation and release, reduced apoptosis and wound repair (RV-B1), lower IFN- β , higher inflammatory cytokine production Addition of IFN- β : restored apoptosis, suppressed virus replication and improved repair of AEC from asthmatics, no effect on inflammatory cytokine production
	AM	<i>Rupani H, et al. 2016 [47]</i>	RV-A16 Pre-treatment with Imiquimod (TLR7) Adults: <u>severe asthma</u> / Healthy controls	In severe asthma: reduced IFN responses Increased levels of 3 microRNAs (miR-150, miR-152, and miR-375): Blocking these microRNAs with anti-miRNA oligonucleotides increased IFN production
	BAL cells	<i>Sykes A, et al. 2012 [48]</i>	RV-A16 Adults: <u>mild-to-moderate allergic asthma</u> vs healthy	In asthma: induction of type I IFN delayed and deficient, associated with airway hyperresponsiveness
	Bronchial biopsy specimens	<i>Baraldo S, et al. 2012 [56]</i>	RV-A16 Children, 5y \pm 0.5: <u>asthma, atopy</u> / <u>Asthma, no atopy</u> / <u>Atopy, no asthma</u> / No atopy nor asthma (Controls)	In all groups vs controls: reduced type I and III IFN production, increased RV viral RNA IFN inversely correlated with airway eosinophils, IL-4, epithelial damage, total IgE (type III IFN)
	Whole blood cultures	<i>Bufe A, et al. 2002 [62]</i>	NDV Children: <u>Allergic asthma</u> / non-allergic asthma / allergic rhinitis / healthy control	In allergic asthma: lower virus-induced IFN- α in allergic asthma/ rhinitis: higher production of IFN- γ
	PBMC	<i>Gehihar K, et al. 2006 [63]</i>	RSV-1A / NDV Adults: <u>Allergic asthma</u> vs healthy controls	In allergic asthma: significant reduction of virus-induced IFN- α release, independent of virus used; no influence of medication (cortico-steroids)
	PBMC	<i>likura K, et al. 2011 [64]</i>	RV-B14 <u>Wheeze</u> / healthy; Young children: 2-6y; Youth group: 7-19 y; Adult group: \geq 20y	Asthma (youth group): lower IFN- α production Asthma (youth group and adults): lower IL-6, TNF- α , IL-10 and sFasL productions Wheeze (young children): lower IL-10 associated with persistent wheeze at 2 y follow-up
	PBMC	<i>Sykes A, et al. 2012 [48]</i>	RV-A16 Adults: <u>mild-to-moderate allergic asthma</u> vs healthy controls	In asthma: no impairment of type I IFN in PBMC, as opposed to BAL cells
	PBMC	<i>Durrani S, et al. 2012 [65]</i>	RV-A16 Children 10-12 y : <u>allergic asthma</u> / <u>non-allergic asthma</u> / <u>airborne sensitization without asthma</u> / healthy controls.	Allergic asthma: lower IFN-responses after cross-linking Fc ϵ RI (vs sensitization and vs controls); higher surface expression of Fc ϵ RI on pDC and mDC Inverse relationship between total IgE and diminished IFN secretion, only when cross-linking of Fc ϵ RI

	PBMC	Simpson J, et al. 2016 [66]	RV-B1 Adults: <u>asthma</u> , 76% atopic. Sputum phenotypes: eosinophilic / neutrophilic / paucigranulocytic / granulocytic	In neutrophilic asthma: significantly less IFN- α than PBMC from eosinophilic and paucigranulocytic asthma after RV; IFN- α inversely correlated with serum IL-6, sputum IL-1 β Sputum neutrophils and dose of inhaled corticosteroids independent predictors of reduced IFN- α
Type I and type III IFN	<i>In vivo</i>			
	Bronchial biopsies	Zhu J, et al. 2019 [67]	<i>In vivo</i> inoculation - RV-A16 Young adults: atopic asthma (23 y \pm 1.4) vs non-atopic control subjects (27 y \pm 2.3)	In asthma: IFN α/β deficiency in epithelium, at baseline, day 4 and week 6 post-inoculation; correlated with viral load, and clinical severity Sub-epithelium: lower frequencies of monocytes / macrophages expressing IFN α/β after RV infection in sub-epithelium; subepithelial neutrophils were the source of IFN α/β
	BAL monocytes and AM	Contoli M, et al. 2006 [71]	<i>In vivo</i> inoculation - RV-A16 Adults: <u>severe asthma</u> (<i>ex vivo</i>) / mild asthma without steroids treatment (<i>ex vivo</i> and <i>in vivo</i>) vs healthy controls	In asthma / <i>Ex vivo</i> : Impaired induction and production of type III IFN- λ 1 and IFN- λ 2/3 in AEC and AM, impaired induction of IFN- λ upon LPS stimulation In asthma / <i>in vivo</i> : severity of symptoms, BAL virus load, airway inflammation, reduction of lung function inversely correlated with <i>ex vivo</i> production of IFN- λ
	Nasal washes	Miller EK, et al. 2012 [70]	Natural infection: 82% virus Children 5-18 y Upper respiratory infection; <u>Wheezing</u> / no-wheezing RV in 56% wheezing / 37% non-wheezing	Specific association between RV infection and asthma exacerbation, but no difference in virus titers, RV species and inflammatory or allergic molecules between RV+ wheezing and non-wheezing children In RV+ wheezing children: IFN- λ 1 level higher, increased with worsening symptoms
	Nasal washes	Kennedy J, et al. 2014 [29]	Natural infection: 74 children (4-18 y): <u>acute wheezing</u> (57% RV) / acute rhinitis (56% RV) / controls Inoculation (RVA-16): 24 young adults Asthma / healthy	Natural infection: No difference in viral loads and levels of IFN- λ 1 between wheezing and acute rhinitis; In children with wheezing: lower levels of sICAM-1 Inoculation: No difference in viral load between groups, levels of sICAM-1 correlated with RV levels
	Nasal washes Induced sputum	Schwantes E, et al. 2014 [68]	Natural infection Adults: <u>asthma</u> vs healthy 17 exacerbations : 67% RV	In asthma, at exacerbation: sputum RNA levels of IFN- α 1, IFN- β 1 and IFN- γ correlated with exacerbation and the peak Asthma Index, early in the course of infection, higher levels of IL-13, IL-10
	Serum PBMC	Bergauer A, et al. 2017 [30]	<i>Ex vivo</i> inoculation of RV-1B on PBMC cultures <i>In vivo</i> natural infection Preschool children 4-6y <u>Asthma</u> at baseline (54% RV) / Asthma at exacerbation (100% RV) vs healthy controls	<i>Ex vivo</i>: induction of STAT1/STAT2 by RV in asthma / IRF9 in controls / IRF1 in both Natural infection (baseline): No increase of IFN- α expression in RV+ asthma patients compared with RV+ healthy controls; increase of IFN- λ protein with RV, both in asthma patients and controls Natural infection (exacerbation): reduced serum IFN- α at exacerbation compared with RV healthy children at baseline
	Sputum Serum PBMC	Deschildre A, et al. 2017 [49]	School-age children 8.9 y (6-16y) <u>Atopic asthma</u> : virus vs no virus Severe exacerbation (64% virus, 51% RV) / steady state (8 weeks later) (25% virus, 11% RV) / 24% virus at both time	Virus at exacerbation: similar levels of IFN- β , IFN- γ , IFN- λ 1 in sputum and plasma, higher airway IL-5 and eosinophils Virus at both time: lower levels of IFN- γ in plasma and sputum at exacerbation, higher airway neutrophilic inflammation at steady state
	Sputum Plasma	Lejeune S, et al. 2020 [8]	Preschool children 30 mo (1y-5y) <u>Recurrent wheeze / preschool asthma</u> ; 47% atopy; 70% prone to exacerbation (\geq 2 exacerbations in the previous year) <u>Severe exacerbation</u> (94% virus, 73% RV) / steady state (8 weeks later) (67% virus, 50% RV)	Children prone to exacerbation: lower plasma concentrations of IFN- β and CXCL10 at exacerbation, and lower plasma levels of CXCL10 at steady state

Alarmins and cytokines	<i>In vitro</i>			
	Co-culture AEC and T cells	<i>Qin L, et al. 2011 [83]</i>	RSV-A2 AEC T cells extracted from adult PBMC (healthy volunteers)	Prolonged RSV infection in AEC induced T cells differentiation in Th2 and Th17 subsets that released IL-4, IFN- γ and IL-17 induced by supernatants from RSV-infected AEC
	AEC	<i>Lee HC, et al. 2012 [79]</i>	RSV-A AEC from healthy children and asthmatic children	Production of TSLP after infection of AEC with RSV, via activation of an innate signaling pathway that involved retinoic acid induced gene I, interferon promoter-stimulating factor 1, and nuclear factor- κ B. Greater levels of TSLP after RSV infection in AEC from asthmatic children than from healthy children
	PBMC	<i>Jurak L, et al. 2018 [82]</i>	RV-A16 and IL-33 co-exposition Adults with <u>allergic asthma</u> vs healthy controls	In asthmatic cells: IL-5 and IL-13 release induced by RV, enhanced by IL-33, surface protein expression of ST2 induced by IL-33 Predominant source of IL-13 release: ILC2 In healthy cells: IL-33 had no effect on IL-5 and IL-13 production
	<i>In vivo</i>			
	BAL PBMC	<i>Jackson D, et al. 2014 [81]</i>	<i>In vivo</i> inoculation <i>Ex vivo</i> study: AEC, PBMC (T cells, ILC2) Adults: <u>mild-to-moderate asthma</u> vs non-atopic healthy volunteers	<i>In vivo</i> : IL-4, IL-5, IL-13 induced by RV in BAL in asthma Type 2 cytokines and IL-33 correlate with clinical outcomes and viral load <i>Ex vivo</i> : IL-5 and IL-13 production directly induced by IL-33 present in RV-infected AEC supernatants by human ILC2 and T cells
	PBMC Serum Nasal washes	<i>Haag P, et al. 2018 [80]</i>	Preschool children 4-6y <i>Ex vivo study</i> : RVB-1 inoculation <i>In vivo</i> : <u>asthma</u> (54% RV) / controls (45% RV) at <u>baseline</u>	<i>Ex vivo</i> : Induction of ILC2 genes in asthma following RV inoculation <i>In vivo</i> : Down regulation of sST2 in asthma and controls by RV Up regulation of sST2 in RV- asthma patients with low levels of 25(OH)-VitD3 In asthma: direct correlation of serum sST2 with nasal IL-33
	Nasopharyngeal aspirates	<i>Yuan XH, et al. 2020 [78]</i>	Children aged less than 14y <u>Bronchiolitis or pneumonia</u> 19.7% RV, 35 bronchiolitis and 31 pneumonia cases	RV bronchiolitis: increased IL-4/IFN- γ and decreased TNF- α /IL-10 ratios, compared with RV pneumonia
	Sputum Plasma	<i>Lejeune S, et al. 2020 [8]</i>	Preschool children 30mo (1y-5y) Recurrent wheeze / preschool asthma; 47% atopy; 70% prone to exacerbation (≥ 2 exacerbations in the previous year) Severe exacerbation (94% virus, 73% RV) / steady state (8 weeks later) (67% virus, 50% RV)	Children prone to exacerbation: lower plasma concentrations of IFN- γ , IL-5, TNF- α , IL-10, and lower levels of IFN- γ in sputum at exacerbation At steady state, lower plasma levels of IFN- γ

Table 1: Major studies (pediatric and adult population) assessing immune responses to viral infection during asthma exacerbation

Studies conducted in animal models, and/or without administration of viral particles (e.g. administration of TLR agonists, double-stranded RNAs) were not included in this table.

AEC: Airway epithelial cells; AM: Alveolar macrophages; BAL: broncho-alveolar lavage; CCL: C-C motif ligand; CXCL: C-X-C motif ligand; FcεRI: high-affinity IgE receptor; IgE: Immunoglobulin E; IFN: Interferon; IL: Interleukin; ILC2: type 2 innate lymphoid cells; IRF: interferon regulatory factor; mDC: myeloid dendritic cells; LPS: Lipopolysaccharides ; MDA-5: melanoma differentiation-associated protein 5; NDV: Newcastle disease virus; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; pDC: plasmacytoid dendritic cells; PBMC: Peripheral blood mononuclear cells; PCR: Polymerase chain reaction; PIV3: parainfluenza virus type 3; PRR: pattern recognition receptor; RIGI-I: retinoic-acid inducible gene I; RSV: Respiratory syncytial virus; RV: Rhinovirus; sFasL: Serum Soluble Fas Ligand; sICAM-1: Soluble intercellular adhesion molecule-1; siRNA: small interfering RNA; SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1; sST2: soluble suppression of tumorigenicity 2 (IL-33 receptor IL1RL1); STAT: signal transducer and activator of transcription; STRA: severe therapy resistant asthma; Th2: T helper 2; TLR: Toll like receptor; TNF: Tumor necrosis factor.

	Compartment	Study	Design and age-group	Main results
Asthma development	Hypopharynx	<i>Bisgaard H, et al. 2007 [32]</i>	Hypopharyngeal samples were cultured from 321 neonates at 1 month of age	21% of children were colonized with <i>S. pneumoniae</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>H. influenzae</i> , or a combination of these organisms. Colonization with one or more of these organisms, but not colonization with <i>S. aureus</i> , was significantly associated with persistent wheeze. Neonates colonized in the hypopharyngeal region with one or a combination of these organisms, were at increased risk for recurrent wheeze and asthma early in life.
	Gut microbiota	<i>Arrieta MC, et al. 2015 [100]</i>	319 children enrolled in the Canadian Healthy Infant Longitudinal Development (CHILD) Study	Children at risk of asthma exhibited transient gut microbial dysbiosis during the first 100 days of life. Relative abundance of the bacterial genera <i>Lachnospira</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Faecalibacterium</i> , and <i>Rothia</i> was significantly decreased in children at risk of asthma. This reduction in bacterial taxa was accompanied by reduced levels of fecal acetate. Inoculation of germ-free mice with these four bacterial taxa ameliorated airway inflammation in their adult progeny.
	Lung	<i>Loewen K, et al. 2015 [102]</i>	213,661 mother-child dyads with a median follow-up time of 9.3 years from birth. Maternal antibiotic use was determined from records of oral antibiotic prescriptions	36.8% of children were exposed prenatally to antibiotics and 10.1% developed asthma. Prenatal antibiotic exposure was associated with an increased risk of asthma. Maternal antibiotic use during 9 months before pregnancy and 9 months postpartum were similarly associated with asthma.
		<i>Hoskin-Parr L, et al. 2013 [103]</i>	4,952 children from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). Child antibiotic use and asthma, eczema and hay fever symptoms were reported	Children reported to have taken antibiotics during infancy (0-2 yr) were more likely to have asthma. The risk increased with greater numbers of antibiotic courses. The number of courses was also associated with a higher risk of eczema and hay fever but not atopy.
	Gut microbiota	<i>Patrick DM, et al. 2020 [104]</i>	2,644 children from the Canadian Healthy Infant Longitudinal Development (CHILD) prospective birth cohort and among them, 917 were analyzed for fecal microbiota	Reduction in asthma incidence over the study period was associated with decreasing antibiotic use in the first year of life. Asthma diagnosis in childhood was associated with infant antibiotic use (adjusted odds ratio [aOR] 2.15), with a significant dose-response; α -diversity of the gut microbiota was associated with a 32% reduced risk of asthma at age 5 years.
Acute asthma	Nasopharynx	<i>Mansbach JM, et al. 2016 [106]</i>	The MARC-35 prospective cohort study of 1,016 infants (age <1 year) hospitalized with bronchiolitis and followed for the development of recurrent wheezing	RSV infection was associated with high abundance of <i>Firmicutes</i> and <i>Streptococcus</i> and a low abundance of <i>Proteobacteria</i> and the genera <i>Haemophilus</i> and <i>Moraxella</i> . RV infection was associated with low <i>Streptococcus</i> and high <i>Haemophilus</i> and <i>Moraxella</i> . RSV/RV coinfections had intermediate abundances.
	Nasopharynx	<i>De Steenhuijsen P, et al. 2016 [105]</i>	106 children less than 2 years of age with RSV infection / 26 asymptomatic healthy control	5 nasopharyngeal microbiota clusters were identified, characterized by high levels of either <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Moraxella</i> , or <i>Staphylococcus aureus</i> . RSV hospitalization were positively associated with <i>H. influenzae</i> and <i>Streptococcus</i> . RSV-induced expression of IFN-related genes is independent of the microbiota cluster
	Nasopharynx	<i>Kloepfer KM, et al. 2017 [107]</i>	17 adult subjects collected nasal mucus samples on a weekly basis for 5 consecutive weeks	Asymptomatic RV infections were associated with a significant increase in the abundance of <i>Dolosigranulum</i> and <i>Corynebacterium</i> . RV infection preceded the increased odds of detection of <i>Streptococcus</i> and <i>Moraxella</i> by 1 week.

	Blood	<i>Giuffrida LM, et al. 2017 [108]</i>	14 asthmatic and 29 non-asthmatic adult patients with acute respiratory infection 10 healthy individuals	Higher blood concentrations of CCL2 and CCL5 in infected asthmatic patients than in non-asthmatic patients. Both asthmatic and non-asthmatics with pneumonia or bronchitis had higher concentrations of blood cytokines.
	Pharynx	<i>Kama Y, et al. 2020 [109]</i>	Pharyngeal samples of outpatients and/or in patients children with acute exacerbations of asthma (n= 111) (median age: 2.8/2.6, respectively)	The 3 major bacterial pathogens were <i>Streptococcus pneumoniae</i> (29.7%), <i>Moraxella catarrhalis</i> (11.7%), and <i>Haemophilus influenzae</i> (10.8%). Patients with <i>S. pneumoniae</i> colonization had significantly shorter wheezing episodes and reduced lung inflammation (including lower level of TNF- α)
Asthma natural history	Nasopharynx	<i>Teo SM, et al. 2018 [110]</i>	244 infants with acute respiratory tract illnesses (ARIs) followed through their first five years of life	Dominance with <i>Moraxella</i> , <i>Haemophilus</i> and <i>Streptococcus</i> cluster were positively associated with acute respiratory tract illness. This change frequently preceded the detection of viral pathogens and acute symptoms. These changes were associated with ensuing development of persistent wheeze in children developing early allergic sensitization
	Nasal microbiota	<i>Zhou Y, et al. 2019 [113]</i>	A 1 year longitudinal study in school-age children with mild-moderate persistent asthma treated with daily ICS (mean age 8.0 \pm 1.8 years)	Children with nasal microbiota dominated by the commensal <i>Corynebacterium / Dolosigranulum</i> cluster at steady state experienced the lowest rates of exacerbation and disease progression. A switch towards the <i>Moraxella</i> - cluster was associated with highest risk of severe asthma exacerbation.
	Lung	<i>Mansbach JM, et al. 2020 [111]</i>	842 infants hospitalized for bronchiolitis with a follow -up at 3 years	Increased abundance of <i>Moraxella</i> or <i>Streptococcus</i> species 3 weeks after day 1 of hospitalization was associated with an increased risk of recurrent wheezing. Increased <i>Streptococcus</i> species abundance the summer after hospitalization was also associated with a greater risk of recurrent wheezing
	Oropharynx	<i>Cuthbertson L, et al. 2019 [112]</i>	Oropharyngeal swabs were collected from 109 children hospitalized for acute wheezing / 75 non-wheezing controls.	No significant difference in bacterial diversity between wheezers and healthy controls In wheezers, attendance at kindergarten or preschool was, associated with increased bacterial diversity.in contrast with rhinovirus (RV) infection
	Nasopharynx	<i>McCauley K. et al. 2019 [35]</i>	312 school-age asthmatic patients enrolled in a trial of omalizumab, nasal secretion samples collected after randomization	Nasal microbiotas dominated by <i>Moraxella</i> species were associated with increased exacerbation risk and eosinophil activation. <i>Staphylococcus</i> or <i>Corynebacterium</i> species-dominated microbiotas were associated with reduced respiratory illness and exacerbation events. <i>Streptococcus</i> species-dominated microbiota increased the risk of RV.
	Sputum	<i>Abdel-Aziz MI. et al. 2020 [114]</i>	Sputum samples were collected in 100 severe asthmatics of the U-BIOPRED adult patients cohort at baseline and after 12-18 months of follow-up	Two microbiome-driven clusters were identified, characterized by asthma onset, smoking status, treatment, lung spirometry results, percentage of neutrophils and macrophages in sputum. Patients of the most severe cluster displayed a commensal-deficient bacterial profile which was associated with worse asthma outcomes. Longitudinal clusters revealed high relative stability after 12-18 months in the severe asthmatics.
	Lung (BAL)	<i>Robinson PFM, et al. 2019 [34]</i>	Children: 35 wheezers categorized as MTW or EVW BAL obtained at steady state	There was no relationship between lower airway inflammation or infection and clinical preschool wheeze phenotypes. 2 groups identified: 1) a <i>Moraxella</i> species dysbiotic microbiota cluster that associated with airway neutrophilia and a mixed microbiota; 2) a mixed microbiota cluster with a macrophage- and lymphocyte-predominant inflammatory profile

Table 2: Major human studies (pediatric and adult population) assessing the impact of pathogenic bacteria and microbiota during the development, the attack and the natural history of pediatric asthma.

BAL: Broncho-alveolar lavage; EVW: Episodic Viral Wheeze, MTW: Multiple trigger Wheeze, RSV: Respiratory syncytial virus; RV: Rhinovirus

Figure 1: Summary of the main mechanisms favoring asthma development and involved in asthma attack.

These mechanisms **(in red)** involve: (1) Impairment of innate immune responses; (2) Influence of the host-microbiota dialog on Th2 inflammation; (3) Pathogen characteristics; (4) Airway leukocyte inflammation. These dynamic interactions may impact the presentations of asthma attacks, and have long-term consequences.

AM: Alveolar macrophages; AEC: airway epithelial cells; DC: dendritic cells; IFN: Interferon; IL: Interleukin; ILC2: type 2 innate lymphoid cells; IRF: interferon regulatory factor; PAMP: Pathogen-associated molecular pattern; PRR: pattern recognition receptor; RV: Rhinovirus; TSLP: Thymic stromal lymphopoietin.

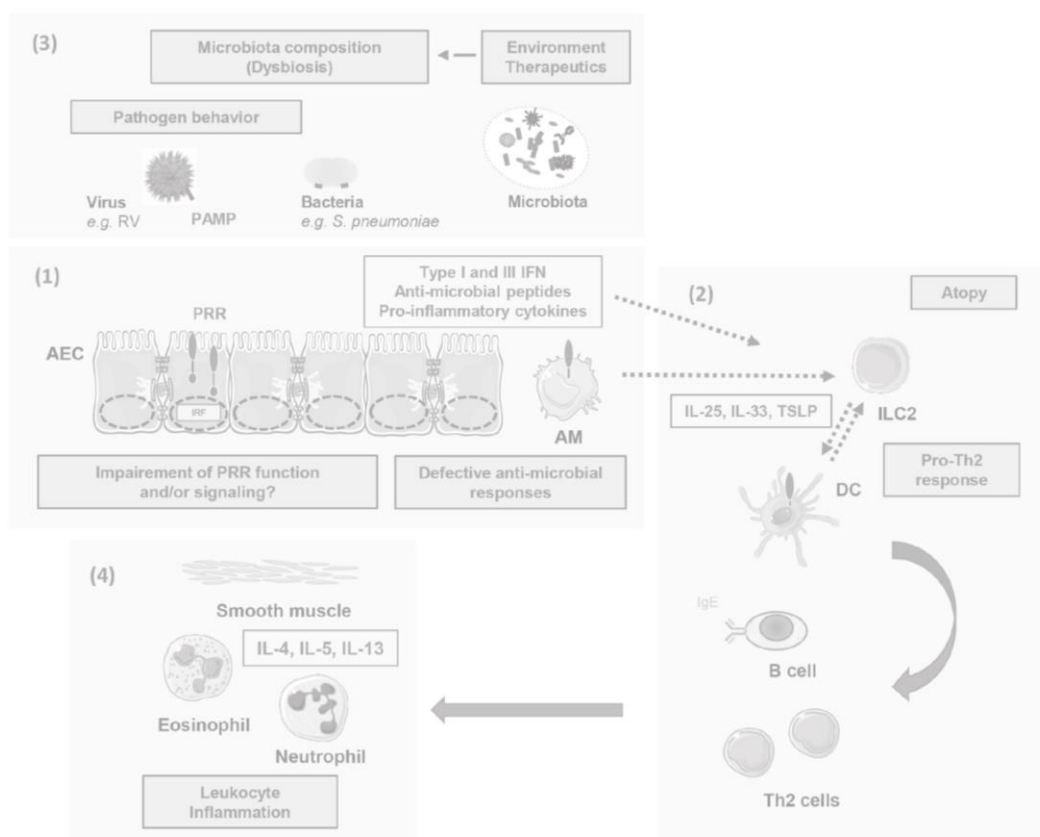


Figure 2: Possible therapeutics strategies to limit asthma development/progression and attacks.

These strategies (**in green**) target: (1) Enhancement of the innate immune responses; (2) Anti-infectious therapeutics and strategies to modulate the microbiota; (3) Alarmins and anti-Th2 biologics.

AM: Alveolar macrophages; AEC: airway epithelial cells; DC: dendritic cells; IFN: Interferon; IL: Interleukin; ILC2: type 2 innate lymphoid cells; IRF: interferon regulatory factor; PAMP: Pathogen-associated molecular pattern; PRR: pattern recognition receptor; RV: Rhinovirus; TSLP: Thymic stromal lymphopoietin.

