



**HAL**  
open science

# Microbiome et inflammation pulmonaires et digestifs dans la mucoviscidose : Approches physiopathologiques et thérapeutiques

Raphaël Enaud

► **To cite this version:**

Raphaël Enaud. Microbiome et inflammation pulmonaires et digestifs dans la mucoviscidose : Approches physiopathologiques et thérapeutiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0090 . tel-04042124

**HAL Id: tel-04042124**

**<https://theses.hal.science/tel-04042124v1>**

Submitted on 23 Mar 2023

**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.

THESE PRESENTEE POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX**

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE  
SPECIALITE MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE  
Par Raphaël ENAUD, né le 08/05/1988 à Nîmes (30)

---

**Microbiome et inflammation pulmonaires et digestifs dans la  
mucoviscidose : Approches physiopathologiques et thérapeutiques**

---

Sous la direction du Pr Michael FAYON

Soutenue le 23 mars 2021

**Membres du jury**

Monsieur le Professeur David Laharie (PU-PH)	Président
Madame le Professeur Françoise Botterel (PU-PH)	Rapporteur
Monsieur le Professeur Dominique Turck (PU-PH)	Rapporteur
Madame le Docteur Emilie Bessède (MCU-PH)	Examineur
Madame le Docteur Sylvie Leroy (PH)	Examineur
Monsieur le Professeur Thierry Schaevebeke (PU-PH)	Invité
Madame le Professeur Laurence Delhaes (PU-PH)	Invitée
Monsieur le Professeur Michael Fayon (PU-PH)	Directeur



*A Olivia et Charlotte,  
A ma famille et mes amis,*

## REMERCIEMENTS

**Monsieur le Professeur David Laharie**, vous me faites l'honneur de juger ce travail et de présider le jury. Merci pour votre soutien et votre bienveillance depuis ce fameux semestre au C3, qui restera un souvenir impérissable de mon internat. Je vous dois cet engouement pour la prise en charge des maladies inflammatoires de l'intestin. J'espère pouvoir continuer à apprendre à vos côtés. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

**Madame le Professeur Françoise Botterel**, vous me faites l'honneur de juger ce travail. Merci beaucoup d'apporter votre expertise sur le microbiote fongique, notamment dans la pathologie humaine. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

**Monsieur le Professeur Dominique Turck**, vous me faites l'honneur de juger ce travail. Merci beaucoup d'apporter votre expertise pédiatrique sur les atteintes inflammatoires digestives. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

**Madame le Docteur Emilie Bessède**, tu me fais l'honneur de juger ce travail. Merci beaucoup d'apporter ton expertise sur le microbiote bactérien. C'est toujours un plaisir d'échanger avec toi sur ce sujet. J'espère que nous pourrons continuer d'interagir et de collaborer. Avec l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

**Madame le Docteur Sylvie Leroy**, vous me faites l'honneur de juger ce travail. Merci beaucoup d'apporter votre expertise sur la prise en charge des patients atteints de mucoviscidose. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

**Monsieur le Professeur Thierry Schaefferbeke**, vous me faites l'honneur de juger ce travail. Cette thèse est le fruit du travail et des questionnements que nous avons commencés ensemble. Je vous serai donc éternellement reconnaissant pour le temps que vous m'avez consacré, pour votre ouverture d'esprit et de votre curiosité qui ont permis d'échanger sur cette thématique loin de votre quotidien, et pour votre passion communicative pour la recherche. Merci d'être présent à chaque rendez-vous, votre présence aujourd'hui compte beaucoup pour moi. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

**Madame le Professeur Laurence Delhaes**, tu me fais l'honneur de juger ce travail. Ce travail n'aurait pas été ce qu'il est aujourd'hui sans ton aide et ton soutien quotidiens. Merci infiniment pour ta présence, ton écoute et ta disponibilité durant ces trois années, je suis conscient de la chance que j'ai eue. J'espère avoir le plaisir de continuer à collaborer et à apprendre à tes côtés. Avec mon éternelle reconnaissance.

**Monsieur le Professeur Michael Fayon**, merci d'avoir accepté d'encadrer cette thèse. Je tenais également à vous remercier pour votre disponibilité et vos conseils depuis que je suis interne. Vous avez su transmettre à l'équipe du CRCM pédiatrique de Bordeaux votre intérêt pour la recherche, qui a permis ces collaborations enrichissantes. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

J'ai également conscience que les rencontres qui ont jalonné mon parcours m'ont enrichi et fait grandir, autant sur le plan professionnel que personnel, et j'en suis très reconnaissant.

Tout d'abord Thierry, sans qui rien n'aurait pu se faire. C'est impossible de résumer dans un paragraphe tout ce que je te dois. Merci pour ta disponibilité et tes conseils, ta bienveillance et ton soutien, ton écoute et ta confiance. Tu as une curiosité et une connaissance qui me fascinent et qui m'inspirent, même si parfois cela donne le vertige ! Je te serai éternellement reconnaissant.

Merci également à l'ensemble de l'équipe de gastro-pédiatrie et de pneumologie pédiatriques de l'Hôpital des Enfants. Tout d'abord à toi Haude. J'admire ton dévouement et ton souci de faire bien, pour les patients, mais aussi pour le service. Travailler à tes côtés donne envie de faire de son mieux et de ... « s'appliquer » ! Merci aussi pour ton écoute et ta présence dans les moments plus durs. Merci à toi Laurent, pour ta disponibilité et ton compagnonnage, avec humour et simplicité, et de m'apprendre l'endoscopie en écoutant Jerusalem ! Enfin, merci à tous les deux de m'avoir permis de me consacrer à cette thèse, j'ai conscience de la répercussion sur votre charge de travail durant ces trois années. Merci aussi à mes collègues pneumologues, François et Stéphane (qui m'a débauché !), à mes cochefs Aurélie et Delphine, à mes premiers internes Audrey M, Audrey C, Mathilde, Greg, Margaux et Léa, et à toute l'équipe paramédicale du 5A, c'est un réel plaisir de travailler dans ce service.

Merci ensuite à la famille du CRCM pédiatrique de Bordeaux, pour qui j'ai une affection toute particulière. Vous êtes derrière moi depuis le début, et sans vous, rien n'aurait pu se faire. J'ai passé une excellente année à vos côtés, à m'épanouir dans nos échanges et à m'inspirer votre implication sans faille pour les patients. Tous n'ont pas conscience de la chance qu'ils ont, mais ne changez pas. A Sandrine, Jessica, Caroline, Charlotte, Valérie, Aurélie, Lucie, Pascale, Nelly, Angélique, Vincent, Virginie, Hélène et Henri, les anges gardiens de ce service. A Cyrielle, c'était un immense plaisir de travailler ensemble. Et pour finir, à toi Stéphanie, qui donne tant pour ce service. C'était une année chargée et compliquée pour l'équipe. Tu as su porter, et supporter toutes les difficultés, sans jamais flancher. Merci pour ta confiance et ta bienveillance, sans parler de ta présence dans les moments plus compliqués ... comme en SAUV par exemple !

Merci Patrick Berger de m'avoir accepté au sein de votre équipe, au risque d'évoquer parfois la région sous diaphragmatique. Je vous suis également reconnaissant pour votre soutien et votre confiance. Avec mon éternelle reconnaissance.

Merci à l'équipe INSERM U1045 pour m'avoir si bien accueilli. Merci pour votre disponibilité et votre aide, toujours spontanée et naturelle. Pensées particulières à Paul, Elise, Maryline, Benoît, Céline, Armelle, Thomas, Isabelle et mes colloc' et voisins du loft : Pauline, Guillaume, Alexis, Juliette, Edmée, Ophélie, Louise Eva et Sébastien, A Fabien, c'est un réel plaisir de travailler et d'échanger ensemble, même si tu n'es toujours pas sur R.

A mes compagnons de microbiote, Renaud et Thomas, c'est tout simplement passionnant de travailler ensemble. En espérant de futures collaborations !

A l'ensemble des collaborateurs de ces travaux, notamment Erwan Guichoux, Marie Massot et l'équipe de la plateforme Genome Transcriptome de Bordeaux ; Macha Nikolski, Alexis Groppi, Aurélien Barré, Katarzyna Hooks et le CBiB ; Caroline Bouyssoux, Guillaume Simon et l'équipe du CIC pédiatrique du CHU de Bordeaux ; Frederic Perry, Florian Lussac-Sorton, Elena Charpentier et tous les centres investigateur de Lum-Iva-Biota ; le CRCM de Toulouse et notamment Marie Mittaine, Emmanuel Mas et Pascale Maumus ; l'ISPED et notamment Rodolphe Thiebaut, Marta Avalos, Florence Francis et Hélène Savel ; l'équipe de

Bactériologie du CHU de Bordeaux, et notamment Philippe Lehours, Emilie Bessède et Cécile Bébéar ; Marion Bouchecareilh et Christine Varon (INSERM U1053-UMR BaRITOn) pour les cellules CACO<sub>2</sub> ; Maria Mamani (UMR 516 Immunoconcept) pour les cellules THP-1 et enfin à Fatima M'Zali (Aquitaine Microbiologie) pour ton accueil à de multiples reprises.

Merci à mes plus jeunes collaborateurs, avec qui j'ai eu un réel plaisir de travailler : Candice Tétard, Adrian Camino, Tyty Heng, Esther Jausseme.

Un immense merci à Aurore Capelli, de la DRCI de Bordeaux, pour ton aide précieuse, ta disponibilité et tes conseils dans tous ces projets. J'espère avoir encore l'occasion de travailler avec toi.

Je voudrais également remercier le CHU de Bordeaux qui a financé cette thèse grâce au programme MD-PhD et à l'année recherche.

Merci également au soutien financier de Vaincre La Mucoviscidose, Avad, Biocodex et Vertex.



Enfin, je voulais remercier ceux qui ne me font pas perdre de vue l'essentiel.

Tout d'abord mes parents, qui ont toujours été présents. Merci pour votre soutien, votre écoute et votre amour sans faille. A mes frères, Gaël, Nicolas et Tanguy, mes compères de toujours. Je suis fier de ce que vous êtes devenus. Vous êtes, chacun à votre façon, un modèle de persévérance, en réalisant vos rêves et vos projets. Merci à tous pour ce que vous m'apportez au quotidien, vous êtes de vrais piliers pour moi. « On ne choisit pas sa famille » comme dit la chanson, mais je n'aurais pas pu rêver mieux.

A mes belles sœurs, pour supporter notre famille. C'est un plaisir de vous avoir.

A Jaimie, mon neveu préféré, le roi du dancefloor !

A Papalu, pour nos 6 mois en colocation qui restent un très bon souvenir.

A ma belle-famille, pour votre accueil, l'intérêt que vous portez à chacun, vos petites attentions et tous les bons moments passés ensemble.

A mes précieux témoins. Luca, pour notre amitié unique. A tous les moments (et les power points) que nous avons partagés, aux soirées à Blagnac et au canapé de notre coloc. Thomas, pour ta fidélité en amitié et notre passion commune pour la musique. On va faire un duo de choc. Julien et Jérémie, mes cousins en or. J'ai tellement de souvenirs avec vous et je compte bien en fabriquer de nouveaux. Laure, pour ton amitié sans faille. Tu es la seule à comprendre The Voice, et c'est de là que vient toute mon estime. Pour tous les concerts que l'on a faits et pour les futurs à venir. Claire, ma cousine surgie de nulle part, mais qui depuis est toujours là. J'ai hâte que tu reprennes le travail pour nos petits coups de fil matinaux.

A mon petit Vincent, pour ta bonne humeur et ton éternelle motivation. Il me tarde de rénover notre salle de bain. A ma petite Léopoldine, ma filleule qui me fait toujours autant craquer, et à Nils qui va nous régaler !

Aux Jackys, éparpillés aux quatre coins du monde. Je pense que vous comprenez autant cette thèse que moi les règles du rugby, et c'est pour ça que je vous aime.

Aux saucissonneurs, pour leurs saucisses. Notamment Jean Paul, pour ton éternelle présence. Tu as été là dans des moments importants, et je ne l'oublierai jamais. Pour Ben, le roi du timing, j'ai tellement à apprendre de toi ! Pour toi Alex, qui arrive à trouver de la bière sans gluten, à l'autre bout du monde. Du coup, je te pardonne pour la pizza à PSV. A Maracas, pour la première échographie de Charlotte et pour ces merveilleux jours passés avec vous à Raiatea.

Aux Chi-chi-cos et chicas, et tout votre love !

A ceux que je n'ai pas encore cités, mais qui ont toute leur place dans ces remerciements : Ma Raphoune, Marine, Nam, Alex, Arnaud, Fanny, Mathieu, Franck, Patoch, ma petite Béa, Benjamine, Claire, Marine, Alban et Maylis.

A ma petite Charlotte, qui fait rayonner mon quotidien. Ton sourire me fait chavirer et te voir grandir me comble. J'espère partager plein de beaux moments avec toi.

Et enfin, à toi Olivia, tout simplement pour tout. Cette thèse, je te le dois si je suis allé jusqu'au bout. Merci pour ton soutien et ta compréhension dans les moments les plus chargés. Tu m'équilibres et me rappelles où se trouve l'essentiel. Je suis comblé à tes côtés.



# SOMMAIRE

<b>VALORISATIONS SCIENTIFIQUES .....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCTION ET GENERALITES .....</b>	<b>23</b>
1 La Mucoviscidose.....	25
1.1 Epidémiologie et Physiopathologie .....	25
1.2 Atteinte pulmonaire et intestinale dans la mucoviscidose.....	27
2 Prise en charge de la mucoviscidose.....	37
3 Les modulateurs de la protéine CFTR .....	39
3.1 Définitions .....	39
3.2 Ivacaftor.....	42
3.3 L'association Lumacaftor/Ivacaftor .....	44
3.4 L'association Tezacaftor/Ivacaftor .....	45
3.5 L'association Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor .....	46
4 Objectifs de thèse.....	47
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>49</b>
1 Méthodes d'analyse métagénomique .....	51
1.1 Métagénomique ciblée.....	51
1.2 Aperçu des analyses statistiques utilisées en métagénomique ciblée .....	57
1.3 Démarches utilisées dans notre travail pour l'analyse longitudinale du microbiote.....	71
1.4 Synthèse des Scripts R utilisés au cours de notre travail .....	72
2 Exploration in vitro de l'effet du microbiote intestinal sur cellules épithéliales humaines (CACO2) .....	73
2.1 Surnageants de selles.....	73
2.2 Cultures cellulaires .....	74
2.3 Stimulation .....	75
2.4 Lyse cellulaire et Analyses moléculaires .....	76

<b>RESULTATS .....</b>	<b>81</b>
<b>PARTIE 1 DES RESULTATS : MICROBIOTE ET INFLAMMATION PULMONAIRES DANS LA MUCOVISCIDOSE .....</b>	<b>84</b>
1 Biomarqueurs microbiens associés à l'évolution de la fonction pulmonaire dans la mucoviscidose .....	85
1.1 Présentation du travail .....	85
1.2 Article correspondant .....	86
2 Efficacité à deux ans d'un traitement par Lumacaftor-Ivacaftor en vie réelle sur les adolescents atteints de mucoviscidose.....	107
1.1 Présentation du travail .....	107
1.2 Article correspondant .....	109
3 Evolution des myco-microbiotes pulmonaires sous Lumacaftor-Ivacaftor : Etude observationnelle « Lum-Iva-Biota » .....	129
1.1 Présentation du travail .....	129
1.2 Article correspondant .....	130
<b>PARTIE 2 DES RESULTATS : MICROBIOTE ET INFLAMMATION DIGESTIFS DANS LA MUCOVISCIDOSE .....</b>	<b>159</b>
1 L'augmentation de la calprotectine fécale est associée à une dégradation des symptômes gastro-intestinaux et de la qualité de vie chez les enfants atteints de mucoviscidose.....	161
1.1 Présentation du travail .....	161
1.2 Article correspondant .....	162
2 L'augmentation de la calprotectine fécale chez les enfants atteints de mucoviscidose est associée à des perturbations du microbiote similaires à celles observées dans la maladie de Crohn.....	185
1.1 Présentation du travail .....	185
1.2 Article correspondant .....	186
3 Rôle du microbiote dans la réponse inflammatoire épithéliale digestive dans la mucoviscidose .....	203
3.1 Stimulation des cellules CACO2 avec les surnageants de selles.....	203
3.2 Stimulation de cocultures CACO2 - THP-1 avec les surnageants de selles pendant 24h.....	204
3.3 Stimulation chronique des cellules CACO2.....	205
3.4 Viabilité cellulaire.....	207
3.5 Discussion des résultats .....	208

4 Réduction de l'inflammation intestinale sous Lumacaftor/Ivacaftor chez les adolescents atteints de mucoviscidose .....	211
1.1 Présentation du travail .....	211
1.2 Article correspondant .....	212

**PARTIE 3 DES RESULTATS : VERS UN AXE INTESTIN-POUMON, ELEMENT CLE DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MUCOVISCIDOSE.....221**

1 L'axe intestin-poumons dans la santé et les maladies respiratoires : une place pour les dialogues inter-organes et interrègnes .....	223
1.1 Présentation du travail .....	223
1.2 Revue correspondante.....	224

**DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....237**

1 Points forts et limites des approches utilisées dans la thèse .....	239
1.1 Microbiote et inflammation pulmonaires dans la mucoviscidose .....	239
1.2 Microbiote et inflammation intestinale dans la mucoviscidose.....	240
1.3 Limites des approches utilisées dans cette thèse .....	241
2 Perspectives .....	243
2.1 Etude observationnelle « Lum-Iva-Biota chez les 2 – 11 ans » .....	243
2.2 Suivi de l'axe intestin-poumon des patients atteints de mucoviscidose et traités par la combinaison Ivacaftor/Tezacaftor/Elexacaftor .....	244
2.3 Effet d'un traitement par polyéthylène glycol sur l'inflammation intestinale dans la mucoviscidose chez l'enfant .....	245
3 Conclusion .....	246

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 247**

**ANNEXES ..... 285**

1 Script DADA2 pour l'assignation 16S (format R markdown).....	286
2 Script DADA2 pour l'assignation ITS2 (format R markdown) .....	293
3 Preprocessing 16S (format R markdown).....	303
4 Comparaison des communautés.....	315
5 Amorces des gènes utilisés en qPCR.....	328
6 Critères d'éligibilités de l'étude MucoLax.....	329



## LISTE DES ABREVIATIONS

AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASV	Amplicon Sequence Variant
$\beta$ -ME	$\beta$ -mercaptoethanol
BMI	Body mass index
CF	Cystic Fibrosis
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose Sigma
ECBC	Examen Cyto-Bactériologique des Crachats
EFR	Epreuves fonctionnelles respiratoires
FEV <sub>1</sub>	Forced Expiratory Volume in 1s
GMCSF	Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages
GMCSF	Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages
HMGB-1	High mobility group box-1 protein
IBD	Inflammatory Bowel Diseases
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleukine
IQR	Interquartile Range
IV	Intra-veineux / Intravenous (en anglais)
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LPS	Lipopolysaccharide
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques De L'Intestin
OTU	Unité Taxonomique Opérationnelle (Operational Taxonomic Unit)
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acétate
ppFEV <sub>1</sub>	Percent of predicted Forced Expiratory Volume in 1 second
qPCR	de l'anglais « quantitative Polymerase Chain Reaction »
RT-qPCR	Retro-transcription et PCR quantitative en temps réel
SVF	Sérum de veau fœtal
TLR	Toll Like Receptor
VEMS	Volume Expiratoire Maximal par Seconde
VEMS%	VEMS exprimé en % de la valeur prédite





# VALORISATIONS SCIENTIFIQUES

## 1 Communications scientifiques

### 1.1 Orales

1. **R. Enaud**, T. Bazin, A. Barré, M. Nikolski, T. Barnetche, C. Hubert, H. Clouzeau, S. Bui, P. Lehours, C. Bébéar, T. Lamireau, T. Schaefferbeke, « Impact de l'antibiothérapie intraveineuse sur le microbiote intestinal chez l'enfant atteint de Mucoviscidose », 18ème congrès des jeunes chercheurs pour la Mucoviscidose 2017, Paris
2. **R. Enaud**, LE. Vandenborgh, P. Soret, N. Coron, F. Francis, T. Schaefferbeke, P. Berger, M. Fayon, R. Thiebaut, L. Delhaes « Caractérisation du mycobioete et du microbiote respiratoire dans la mucoviscidose : Importance du dialogue interrègnes pendant un phénomène d'exacerbation », Congrès de la société française de microbiologie, Octobre 2018, Paris
3. **R. Enaud**, KB. Hooks KB, T. Bazin, A. Barré, T. Barnetche, C. Hubert, H. Clouzeau, S. Bui, M. Fayon, T. Heng, F. Mzali, P. Lehours, C. Bébéar, M. Nikolski, P. Berger, T. Lamireau, L. Delhaes, T. Schaefferbeke, « Dysbiose dans l'inflammation intestinale de la mucoviscidose : une nouvelle pièce du puzzle ? », Congrès de la société française de microbiologie, Octobre 2018, Paris
4. **R. Enaud**, K. Hooks, A. Barre, T. Barnetche, C. Hubert, M. Massot, T. Bazin, H. Clouzeau, S. Bui, M. Fayon, P. Berger, P. Lehours, C. Bebear, M. Nikolski, T. Lamireau, L. Delhaes, T. Schaefferbeke, « Dysbiose et inflammation intestinale précoces chez les enfants atteints de mucoviscidose », Congrès JFHOD/GFHGNP, Mars 2019, Paris
5. F. Francis, **R. Enaud**, P. Soret, MucoFong consortium, S. Bui, M. Fayon, R. Thiebaut, L. Delhaes ; Microbiologie des expectorations et évolution clinique : Essais de modélisation dans la mucoviscidose à partir des données de MucoFong, Congrès SFPSFMM 2019, Tours
6. C. Tétard, M. Mittaine, S. Bui, F. Beaufls, P. Maumus, M. Fayon, PR. Burgel, T. Lamireau, L. Delhaes, Emmanuel Mas, **R. Enaud**; Reduced intestinal inflammation with Lumacaftor/Ivacaftor in adolescents with cystic fibrosis. Congrès European Cystic Fibrosis Society 2020, Lyon

### 1.2 Ecrites

1. **R. Enaud**, T. Bazin, A. Barré, M. Nikolski, T. Barnetche, C. Hubert, H. Clouzeau, S. Bui, P. Lehours, C. Bébéar, T. Lamireau, T. Schaefferbeke, « Impact de l'antibiothérapie intraveineuse sur le microbiote intestinal chez l'enfant atteint de Mucoviscidose », **Congrès GFHGNP 2017 (Amiens), Poster**
2. **R. Enaud**, T. Bazin, A. Barré, M. Nikolski, T. Barnetche, C. Hubert, H. Clouzeau, S. Bui, P. Lehours, C. Bébéar, T. Lamireau, T. Schaefferbeke, « Impact of intravenous antibiotics on the gut microbiota in children with cystic fibrosis », Congrès ESPGHAN 2017 (Prague)
3. **R. Enaud**, T. Bazin, A. Barré, M. Nikolski, T. Barnetche, C. Hubert, H. Clouzeau, S. Bui, P. Lehours, C. Bébéar, T. Lamireau, T. Schaefferbeke, « Impact de l'antibiothérapie intraveineuse sur le microbiote intestinal chez l'enfant atteint de Mucoviscidose », Congrès JFHOD 2017 (Paris)

4. **R. Enaud**, T. Bazin, A. Barré, M. Nikolski, T. Barnetche, C. Hubert, H. Clouzeau, S. Bui, P. Lehours, C. Bébéar, T. Lamireau, T. Schaefferbeke, « Impact of intravenous antibiotics on the gut microbiota in children with cystic fibrosis », Congrès European Cystic Fibrosis Society 2017 (Séville)
5. JP Gangneux, H Guegan, LE Vandenberght, S Buffet-Bataillon, **R Enaud**, L Delhaes for the ESGHAMI-EFISG (ESCMID) and ECMM study groups, “An ECMM-ESCMID survey on goals and practices for mycobiota characterization using Next Generation Sequencing in European laboratories”, Poster, ECCMID 2019 (Prague)
6. **R. Enaud**, KB. Hooks KB, A. Barré, T. Barnetche, C. Hubert, M. Massot, T. Bazin, H. Clouzeau, S. Bui, M. Fayon, P. Berger, P. Lehours, C. Bébéar, M. Nikolski, T. Lamireau, L. Delhaes, T. Schaefferbeke; « Early microbiota disturbance and intestinal inflammation in children with cystic fibrosis », Poster, ECCMID 2019 (Prague)
7. **R. Enaud**, KB. Hooks KB, A. Barré, T. Barnetche, C. Hubert, M. Massot, T. Bazin, H. Clouzeau, S. Bui, M. Fayon, P. Berger, P. Lehours, C. Bébéar, M. Nikolski, T. Lamireau, L. Delhaes, T. Schaefferbeke; « Early microbiota disturbance and intestinal inflammation in children with cystic fibrosis », ePoster, ESPGHAN 2019 (Glasgow)
8. C. Tétard, M. Mittaine, S. Bui, F. Beaufiles, P. Maumus, M. Fayon, PR. Burgel, T. Lamireau, L. Delhaes, Emmanuel Mas, **R. Enaud** ; Lumacaftor/Ivacaftor améliore l'inflammation intestinale chez les enfants atteints de mucoviscidose ; Congrès GFHGNP 2020 (Bordeaux).
9. F. Beaufiles, E. Mas, M. Addra, S. Bui, H. Clouzeau, M. Mittaine, L. Delhaes, T. Lamireau, **R. Enaud** ; Impact de l'inflammation intestinale sur la qualité de vie et les symptômes digestifs chez les enfants atteints de mucoviscidose ; Congrès GFHGNP 2020 (Bordeaux).
10. C. Tétard, M. Mittaine, S. Bui, F. Beaufiles, P. Maumus, M. Fayon, PR. Burgel, T. Lamireau, L. Delhaes, Emmanuel Mas, **R. Enaud** ; Lumacaftor/Ivacaftor améliore l'inflammation intestinale chez les enfants atteints de mucoviscidose ; Congrès SFP 2020 (Lille).

## 2 Conférences sur invitation

1. R. Enaud, « 10 bonnes raisons de parler de microbiote », Soirée du pôle pédiatrie, CHU de Bordeaux, Juin 2017
2. R. Enaud, « Microbiota and cystic fibrosis: a new era? », Laboratoire Immunoconcept (CNRS), Université de Bordeaux, Février 2018
3. R. Enaud, « Microbiota and cystic fibrosis: a new era? », Journée de l'Ecole Santé Science de l'Université de Bordeaux, Mars 2019

## 3 Publications scientifiques

AO = article original, CC = cas clinique, R = revue

### 3.1 Publiées

1. **Enaud, R.**; Vandenberght, L.-E.; Coron, N.; Bazin, T.; Prevel, R.; Schaefferbeke, T.; Berger, P.; Fayon, M.; Lamireau, T.; Delhaes, L. The Mycobioime: A neglected compartment in the microbiota-gut-brain axis. *Microorganisms*, Mars 2018;6:e22 (R)
2. **Enaud R**, Hooks KB, Barre A, Barnetche T, Hubert C, Massot M, et al. Intestinal Inflammation in Children with Cystic Fibrosis Is Associated with Crohn's-Like Microbiota Disturbances. *J Clin Med*. 10 mai 2019;8(5) (AO)
3. Gangneux, J.-P.; Guegan, H.; Vandenberght, L.-E.; Buffet-Bataillon, S.; **Enaud, R.**; Delhaes, L. A European ECMM-ESCMID survey on goals and practices for mycobioime characterisation using next-generation sequencing. *Mycoses* 2019, 62(12):1096-1099 (AO)
4. Soret, P.; Vandenberght, L.-E.; Francis, F.; Coron, N.; **Enaud, R.**; Avalos, M.; Schaefferbeke, T.; Berger, P.; Fayon, M.; Thiebaut, R.; et al. Respiratory mycobioime and suggestion of inter-kingdom network during acute pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. *Sci Rep*. 2020, 10(1):3589 (AO)
5. **Enaud, R.**; Prevel, R.; Ciarlo, E.; Beaufils, F.; Wieërs, G.; Guery, B.; Delhaes, L. The Gut-Lung Axis in Health and Respiratory Diseases: A Place for Inter-Organ and Inter-Kingdom Crosstalks. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2019, 10:9 (R)
6. Tétard C, Mittaine M, Bui S, Beaufils F, Maumus P, Fayon M, Burgel PR, Lamireau T, Delhaes L, Mas E, **Enaud R**. Reduced Intestinal Inflammation with Lumacaftor/Ivacaftor in Adolescents with Cystic Fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2020, 71:778-81 (AO)
7. Fabien Beaufils, Emmanuel Mas, Marie Mittaine, Martin Addra, Michael Fayon, Laurence Delhaes, Haude Clouzeau, François Galode, Thierry Lamireau, Stéphanie Bui, **Raphaël Enaud**. Increased fecal calprotectin is associated with worse gastrointestinal symptoms and quality of life scores in children with cystic fibrosis. *J Clin Med*. 2020, 17;9:4080 (AO)

### 3.2 En cours de soumission

1. Florence Francis, **Raphael Enaud**, Perrine Soret, Florian Lussac-Sorton, Marta Avalos Fernandez, MucoFong Investigation Group, Stéphanie Bui, Michael Fayon, Rodolphe Thiebaut, Laurence Delhaes. Microbial biomarkers predicting lung function decline in CF: lessons from the MucoFong project.
2. Stéphanie Bui, Alexandra Masson, **Raphaël Enaud**, Léa Roditis, Gaël Dournes, François Galode, Cyrielle Collet, Emmanuel Mas, Jeanne Languepin, Michael Fayon, Fabien Beaufiles, Marie Mittaine. Long-term outcomes of Lumacaftor-Ivacaftor on cystic fibrosis adolescents in real life.
3. **Raphaël Enaud**, et al. Impacts of lumacaftor-ivacaftor on the airway microbiota/mycobiota are more significant in patients uncolonized with *Pseudomonas aeruginosa*

## 4 Revues pédagogiques et chapitres de livres

1. T. Lamireau, **R. Enaud**. Differential diagnosis of pediatric inflammatory bowel disease. In: Pediatric Inflammatory Bowel Disease. P. Mamula, J.E. Markowitz, R.N. Baldassano. Ed. Springer, New York, 2017
2. **R. Enaud**, T. Lamireau. Douleurs abdominales chroniques. In : Pédiatrie pour le Praticien. A Bourrillon, G Cheron, B Chabrol, E Grimpel, et G Benoist Ed. Elsevier, Paris, 2019.
3. **R. Enaud**, T. Lamireau. Diarrhées chroniques. In : Pédiatrie pour le Praticien. A Bourrillon, G Cheron, B Chabrol, E Grimpel, et G Benoist Ed. Elsevier, Paris, 2019.
4. Vandendorgh LE, **Enaud R**, Coron N, Denning D, Delhaes L, From culturomics to metagenomics: clinical relevance of mycobiome in chronic respiratory diseases, In: The lung microbiome, ERS Monograph, 2019, 88-118.
5. **Enaud R.**, Tétard C, Lamireau T. Liens entre Alimentation, Microbiote, MICI : bases physiopathologiques et implications thérapeutiques. Colon et Rectum 2020, 14 :80-87.

## 5 Prix et bourses

- Lauréat de la bourse Biocodex 2017 « Microbiote et inflammation digestive » pour le projet « Etude du microbiote dans l'inflammation intestinale chez l'enfant atteint de mucoviscidose », Février 2017
- Bourse MD-PhD du CHU de Bordeaux, 2017 et 2018
- Bourse jeune Reporter du congrès de l'ESPGHAN 2018, Juin 2018
- Lauréat de la bourse « Jeune orateur en gastroentérologie pédiatrique » du GFHGPN, Mars 2019

## **6 Financements obtenus**

- Lauréat de la bourse Biocodex 2017 « Microbiote et inflammation digestive » pour le projet « Etude du microbiote dans l'inflammation intestinale chez l'enfant atteint de mucoviscidose », Février 2017
- Lauréat de l'appel d'offre interne 2019 du CHU de Bordeaux pour l'étude MUCOLAX : Effet d'un traitement par polyéthylène glycol sur l'inflammation intestinale associée a la mucoviscidose chez l'enfant, 2019.
- Financement de la plateforme participative Thellie, pour le projet « Le microbiote est-il la clé pour soigner l'inflammation intestinale de la mucoviscidose ? » en 2020
- Etude EMILI « Effet du traitement par Lumacaftor-Ivacaftor sur l'atteinte digestive de l'enfant homozygote deltaf508 atteint de mucoviscidose », Lauréat de l'appel d'offre de l'Association Vaincre La Mucoviscidose (VLM), 2020-21.

-

# Introduction et Généralités

---





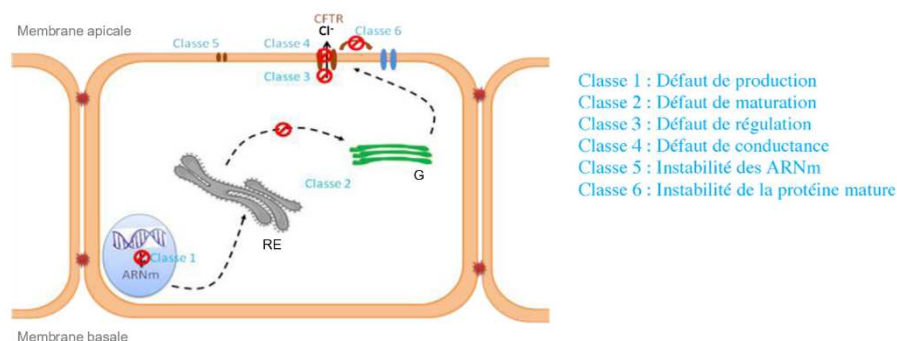
# 1 LA MUCOVISCIDOSE

## 1.1 EPIDEMIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE

La mucoviscidose est la maladie héréditaire grave la plus fréquente dans les populations d'origine caucasienne. En France en 2017, l'incidence était évaluée à 1 pour 4 000 naissances (soit environ 200 nouveaux patients/an) et la prévalence, tous âges confondus, était de 6 931, dont 3 055 (44.1%) enfants de moins de 18 ans (Vaincre La Mucoviscidose, 2017).

Transmise sur le mode autosomique récessif, la mucoviscidose est la conséquence de mutations du gène CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) situé sur le bras long des deux chromosomes 7 (7q31), qui code pour la protéine du même nom. Parmi plus des 2 000 mutations actuellement identifiées, la mutation la plus fréquente est la deltaF508 (40% de patients à l'état homozygote et 80% à l'état hétérozygote) (Vaincre la mucoviscidose, 2017).

Dans les conditions physiologiques, la protéine CFTR est synthétisée puis subit un processus complexe de maturation intracellulaire impliquant le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, avant d'être transportée au pôle apical de la cellule épithéliale, où elle joue notamment le rôle de canal pour l'ion chlorure. Les mutations sont donc réparties en 6 classes, en fonction de leurs conséquences sur la synthèse et la qualité de la protéine CFTR (Figure 1) (Corvol et al., 2015; Bell et al., 2020). Les classes I (défaut de production) et II (destruction d'une protéine mal maturée) ne permettent pas ou pratiquement pas la présence d'une protéine CFTR au pôle apical des cellules. Dans la classe III (trouble de régulation), une protéine anormale atteint le pôle apical de la cellule, mais n'est pas fonctionnelle. Dans la classe IV (trouble de conductance), sa fonctionnalité n'est que partielle. Dans la classe V (défaut quantitatif par instabilité de l'ARM messenger), la protéine est fonctionnelle mais sa quantité est trop faible. La classe VI inclut des mutations donnant lieu à une protéine fonctionnelle mais instable.



**Figure 1. Différentes classes de mutations du gène CFTR**

ARNm : acide ribonucléique messenger ; G : Appareil de Golgi ; RE : Réticulum endoplasmique.  
D'après Corvol et al., 2015.

Le phénotype de la maladie est donc très variable selon les mutations. On distingue les mutations « sévères » (mutations de classe I, II et III), presque toujours associées à une insuffisance pancréatique exocrine et avec une atteinte pulmonaire généralement plus évolutive et plus souvent associée à une colonisation chronique à *Pseudomonas aeruginosa*, des mutations « modérées » (pour les mutations de classe IV, V et VI) (McKone et al., 2006). Cependant, à l'échelle individuelle, cette distinction a moins de sens : le génotype prédit mal le phénotype, notamment sur le plan de l'évolution respiratoire qui est tributaire d'autres facteurs, notamment génétiques (gènes modificateurs) et environnementaux (dont la qualité des soins). De plus, bien que conceptuellement pratique, la classification des mutations a plusieurs limites : (i) une mutation donnée peut entraîner des conséquences relevant de plusieurs classes ; (ii) une même conséquence peut relever de mécanismes variés ; (iii) deux mutations d'une même classe ne vont pas toujours répondre de la même manière à un même traitement (exemple de Lumacaftor/Ivacaftor sur les mutations deltaF508 et N1303K, deux mutations de classe II) ; et (iv) les conséquences exactes de nombreuses mutations ne sont pas connues de manière précise.

La perte de la fonctionnalité de la protéine CFTR va perturber l'équilibre hydroélectrolytique des sécrétions exocrines dans lequel elle est impliquée. Ces dernières, déshydratées et trop visqueuses, vont générer une stase dans les organes concernés et aboutir progressivement à leur destruction parenchymateuse. L'anomalie de fonctionnement de CFTR s'exprime principalement au niveau des voies respiratoires, du pancréas, du tube digestif, du foie, des glandes sudoripares et du tractus génital. Bien que la morbi-mortalité soit essentiellement conditionnée par l'atteinte pulmonaire, l'amélioration de la prise en charge des patients ces dernières années a conduit à une augmentation de l'âge médian des patients et à l'apparition de nouveaux enjeux, telle que la physiopathologie et l'impact de l'atteinte intestinale sur la morbi-mortalité des patients (Garg and Ooi, 2017). Nous détaillerons donc dans le chapitre suivant les deux atteintes concernées par nos travaux, à savoir l'atteinte respiratoire et l'atteinte intestinale.

## 1.2 ATTEINTE PULMONAIRE ET INTESTINALE DANS LA MUCOVISCIDOSE

### 1.2.1 L'atteinte pulmonaire

L'atteinte pulmonaire est pratiquement constante au cours de l'évolution de la mucoviscidose. Des phénomènes inflammatoires et infectieux au niveau pulmonaire surviennent dès les premiers mois de vie et participent à l'installation progressive d'une broncho-pneumopathie chronique obstructive et à la dégradation de la fonction respiratoire des patients.

La bronchiectasie (ou dilatation des bronches) et la colonisation chronique sont des éléments bien établis qui contribuent à la morbi-mortalité de la maladie. Bien que le rôle pathogène de *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose ne soit plus à démontrer, d'autres bactéries participent également à la morbidité pulmonaire, notamment *Burkholderia cepacia* (Gilligan, 2014), *Staphylococcus aureus* dont les isolats résistants à la méthicilline (Dasenbrook et al., 2010) et certaines mycobactéries non tuberculeuses telles que le complexe *Mycobacterium abscessus* ou *avium* (Martiniano and Nick, 2015). D'autres agents pathogènes sont régulièrement incriminés tels que *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* et *Achromobacter ruhlandii*, ou encore les bactéries anaérobies (dont *Prevotella*) (Jones, 2011; Parkins et al., 2011; Gilligan, 2014; Cogen et al., 2015).

Les avancées techniques récentes dans le domaine de la microbiologie, dont les techniques d'identification indépendantes de la culture avec le séquençage haut débit, ont permis une caractérisation plus précise des communautés microbiennes, bactériennes (microbiote) mais aussi fongique (mycobiote), au sein des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose.

#### 1.2.1.1 Perturbations des microbiotes et mycobiotes pulmonaires

Le microbiote respiratoire des patients atteints de mucoviscidose se démarque de celui des individus sains, avec notamment une diversité moins importante (Zemanick et al., 2017; Frayman et al., 2019). Cependant, les études menées chez des patients adultes atteints de mucoviscidose ont montré une grande hétérogénéité inter-individuelle de la composition des communautés bactériennes des voies respiratoires (principalement à partir d'expectorations) (Tunney et al., 2008; Fodor et al., 2012; Carmody et al., 2015). Une autre conclusion constante est que les groupes bactériens les plus présents chez un patient ont tendance à rester stables dans le temps et reflètent les espèces ou les genres détectés par les techniques de cultures employées en soin courant (tels que *P. aeruginosa*, *Burkholderia* et *Staphylococcus*) (Fodor et al., 2012; Carmody et al., 2015).

Plusieurs études ont montré que l'évolution de la mucoviscidose était marquée par des modifications du microbiote pulmonaire bactérien et fongique, avec notamment une diminution de l'alpha-diversité et une surreprésentation d'agents pathogènes, toutes deux associées à la diminution de la fonction pulmonaire (Zhao et al., 2012; Coburn et al., 2015a; Stokell et al., 2015; Carmody et al., 2018; Muhlebach et al., 2018; Cuthbertson et al., 2020; Soret et al., 2020). De plus, la diversité microbienne et l'abondance relative de *Streptococcus*, *Prevotella* et *Veillonella* ont été inversement associées à l'inflammation pulmonaire (Frayman et al., 2017; Zemanick et al., 2017). Une étude de cohorte a révélé que la diversité bactérienne au cours des deux premières années de la vie était influencée par les habitudes alimentaires et qu'un déclin de bactéries spécifiques, telle que *Haemophilus*, précédait la colonisation de *P. aeruginosa* (Coburn et al., 2015a). Des tendances similaires ont été observées à partir d'analyses transversales dans différents groupes d'âge (Cox et al., 2010; Klepac-Ceraj et al., 2010). Enfin, les cures d'antibiotiques systémiques apparaissent comme un facteur prédominant dans le changement du microbiote pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose (Zhao et al., 2012).

Il a été également montré que les changements de la communauté microbienne pulmonaire, et notamment de son alpha-diversité<sup>1</sup>, étaient corrélés à la sévérité et la progression de la maladie (Zhao et al., 2012). Récemment, Acosta *et al.* ont montré que la diversité du microbiote pulmonaire était un facteur prédictif d'une progression vers une maladie pulmonaire en phase terminale précoce (décès/transplantation < 25 ans) et d'un déclin rapide de la fonction pulmonaire (diminution du Volume Expiratoire Maximal par Seconde (VEMS) > -3%/an au cours des 5 années suivantes) (Acosta et al., 2018).

Contre toute attente, le changement des communautés bactériennes ne semble pas majeur en cas d'exacerbation pulmonaire, remettant en question la vision conventionnelle qu'une exacerbation pulmonaire résulte d'une prolifération d'agents pathogènes spécifiques (Fodor et al., 2012; Zhao et al., 2012; Carmody et al., 2015; Coburn et al., 2015a; Cuthbertson et al., 2016; Zemanick et al., 2017). Des approches plus récentes, telle que l'analyse de réseau microbien, ont permis également d'étudier les associations entre le microbiote pulmonaire et les exacerbations dans la mucoviscidose. Quinn *et al.* ont constaté que les taxons se regroupaient en trois groupes distincts. Le premier groupe du réseau était dominé par des bactéries anaérobies et était associé négativement à deux autres groupes du réseau, dominés par des agents pathogènes classiques de la mucoviscidose tels que *Pseudomonas* et *Staphylococcus*. La découverte de ces groupes ou communautés écologiques distincts ont permis de proposer

---

<sup>1</sup> L'alpha-diversité représente le nombre d'espèces différentes d'une communauté donnée. Par exemple le nombre de plantes d'une forêt ou le nombre de microorganismes au sein des voies aériennes. Plusieurs indices peuvent être utilisés, dont l'indice de Shannon qui permet d'exprimer la diversité en prenant en compte le nombre d'espèces et l'abondance des individus au sein de chacune de ces espèces. Cet indice est donc sensible aux variations des espèces les plus rares. L'indice de Simpson quant à lui est plus sensible aux variations des espèces les plus abondantes.

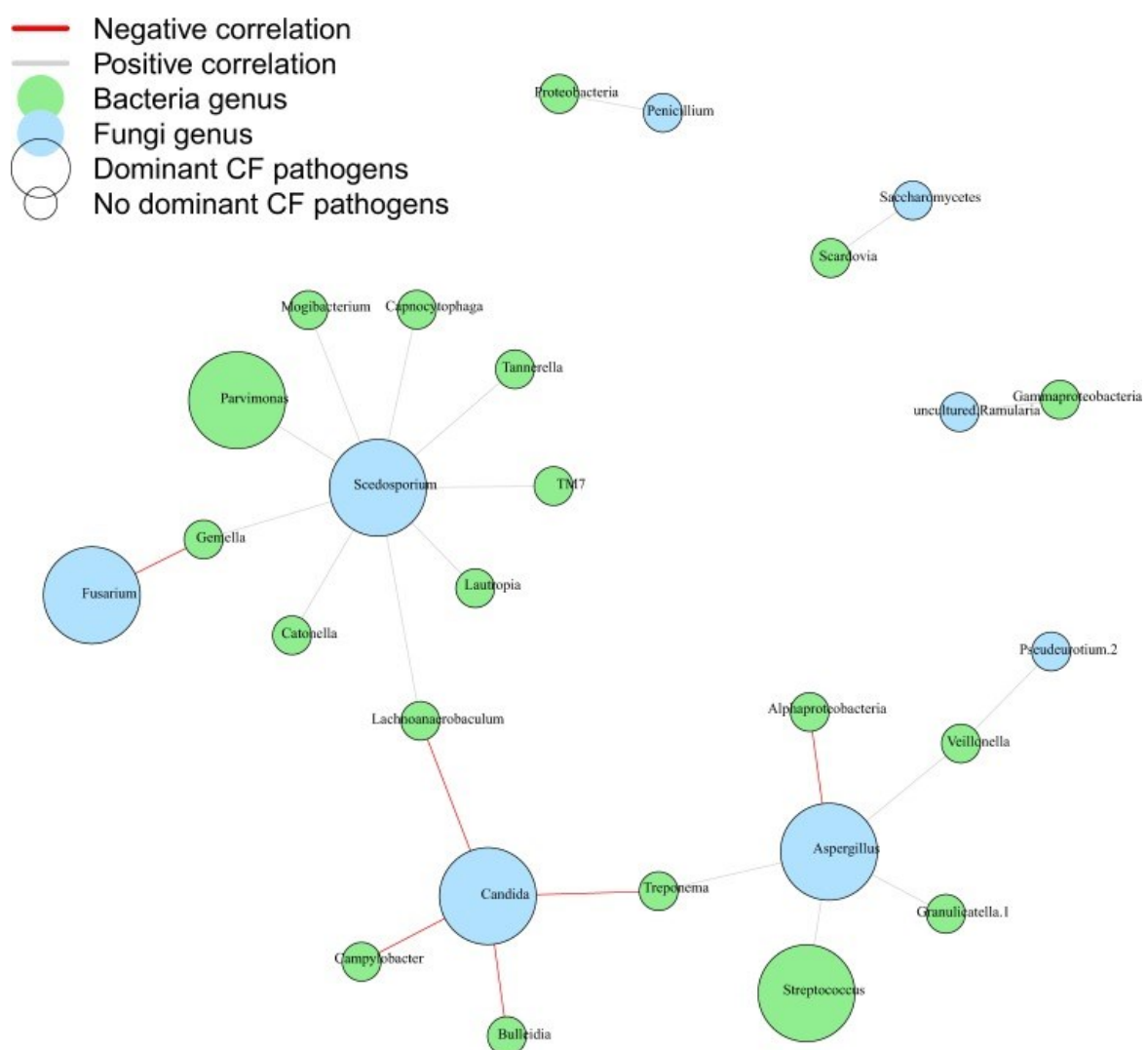
le modèle Climax - Attack (Conrad et al., 2013; Lim et al., 2014; Quinn et al., 2016; Zhou-Suckow et al., 2017) qui postule l'existence de communautés microbiennes « Climax » et « Attack » fonctionnellement distinctes, mais qui ne s'excluent pas mutuellement. Les communautés « Climax » représentent des communautés persistantes qui dominent pendant les périodes de stabilité clinique et qui sont enrichies de microbes résistants aux antibiotiques exprimant des gènes qui favorisent la colonisation chronique. Les communautés « Attack » sont des communautés plus transitoires associées aux exacerbations pulmonaires (Quinn et al., 2016).

En parallèle, les taxons anaérobies ont été trouvés plus récemment en nombre significatif dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose (Sherrard et al., 2016). Les données sur leur rôle dans la mucoviscidose leur attribuent des impacts diamétralement opposés. Initialement, la présence d'anaérobies était associée à une diminution de l'inflammation pulmonaire pendant les exacerbations (Zemanick et al., 2013; O'Neill et al., 2015). De plus, la présence des bactéries anaérobies a été associée à une meilleure fonction pulmonaire et à un meilleur état nutritionnel (Tunney et al., 2011). Mais, des travaux ultérieurs se sont concentrés sur leur rôle potentiellement nuisible au cours de la mucoviscidose, notamment sur le remodelage environnemental des voies respiratoires favorisé par les produits issus du métabolisme anaérobie fermentatif, tels que l'acétaldéhyde et les acides gras à courte chaîne (Quinn et al., 2014, 2015; Mirković et al., 2015). La croissance des anaérobies et le remodelage acide de leur environnement local pourraient contribuer à une réponse immunitaire dérégulée et à une augmentation de l'inflammation des voies respiratoires et des lésions tissulaires (Zemanick et al., 2013; Mirković et al., 2015; O'Neill et al., 2015; Zhou-Suckow et al., 2017). Par ailleurs, les bactéries anaérobies ont récemment été retrouvées surreprésentées lors des exacerbations pulmonaires (Layeghifard et al., 2019).

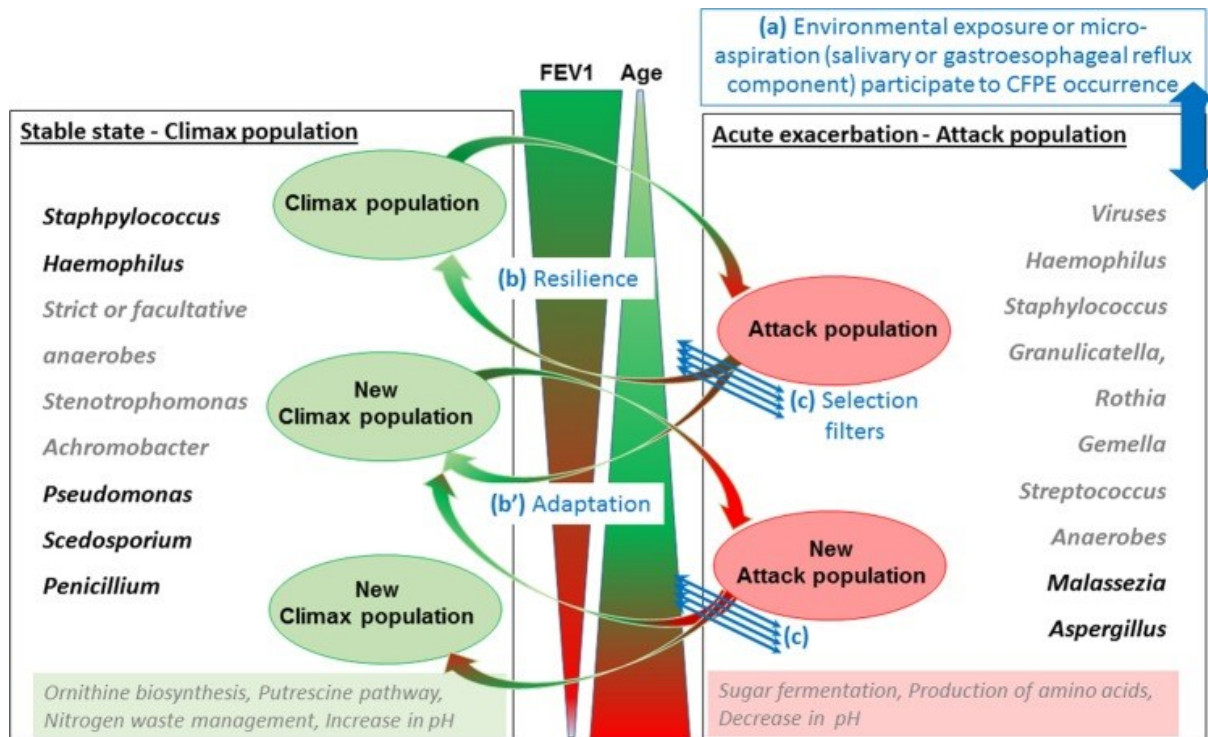
L'importance de la caractérisation des communautés fongiques (mycobiote) n'est plus à démontrer (Cui et al., 2013; Kramer et al., 2015; Nguyen et al., 2015), mais les données restent moins nombreuses que pour les communautés bactériennes. Comme pour les bactéries, certaines espèces fongiques sont difficiles, voire impossibles à cultiver (comme *Pneumocystis jirovecii* par exemple), et le développement du séquençage haut débit a permis de mieux appréhender les compositions des communautés fongiques (Delhaes et al., 2012). Plusieurs études ont exploré le mycobiote pulmonaire dans la mucoviscidose. L'une d'elles a montré que le nombre d'espèces fongiques détectées dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose était plus élevé que celui des bactéries, mais qu'il fluctuait également beaucoup plus dans le temps (Kramer et al., 2015). Les chercheurs ont conclu que l'exposition aux spores fongiques par inhalation était un facteur plus important que la colonisation fongique chronique dans la composition du mycobiote pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose. Récemment, notre équipe a étudié la composition des communautés bactériennes et fongiques durant les exacerbations (Soret et al., 2020). L'analyse du réseau,

incluant les communautés bactériennes et fongiques, a révélé trois principaux groupes organisés autour des genres *Aspergillus*, *Candida* et *Scedosporium* (Figure 2). Nous avons identifié *Aspergillus* et *Malassezia* comme étant associés aux exacerbations, et *Pseudomonas*, *Penicillium*, et *Scedosporium* associés au déclin de la fonction pulmonaire, et avons proposé un modèle « Climax-Attack » incluant nos données sur les communautés fongiques (Figure 3).

Les infections par des virus à ARN (par exemple, *rhinovirus*, *coronavirus*, *parainfluenzae*) sont des facteurs importants dans la survenue des exacerbations pulmonaires dans la mucoviscidose (Esther et al., 2014; Flight et al., 2014; Goffard et al., 2014). Toutefois, peu d'études ont analysé le virome respiratoire, en partie à cause des difficultés techniques.



**Figure 2. Réseau de cooccurrence entre les communautés bactériennes et les fongiques.** Les bactéries et les champignons sont représentés par des cercles verts et bleus, respectivement. Les grands cercles font référence aux agents pathogènes reconnus de la mucoviscidose. Les lignes grises reliant les cercles représentent une corrélation positive, tandis que les lignes rouges représentent une corrélation négative. Une corrélation positive fait référence à une augmentation de l'abondance du genre bactérien et fongique. Une corrélation négative entre un genre bactérien et fongique fait référence à une augmentation de l'abondance du genre bactérien et une diminution de l'abondance du genre fongique. D'après Soret, *et al.*, 2020.



**Figure 3. Adaptation du modèle « Climax-Attack »**

Selon le modèle « Climax-Attack », deux populations microbiennes différentes évoluent dynamiquement dans les poumons des personnes atteintes de mucoviscidose, toutes deux étant potentiellement composées d'anaérobies. (a) Les modifications microbiennes acquises par exposition environnementale ou par aspiration salivaire semblent participer à l'apparition d'une exacerbation, conduisant à une communauté « Attack ». La communauté microbienne pourra ensuite revenir à son état initial (Résilience en (b)) ou se déplacer vers une nouvelle communauté considérée comme stable mais composée d'une nouvelle communauté « Climax » (Adaptation en (b')), en fonction de l'intensité des perturbations liée à la population d'Attaque et de sa capacité à passer à travers les filtres de sélection (c). Les filtres de sélection (c) font référence aux facteurs qui influencent l'évolution d'une structure microbienne : changements dans les nutriments, sources/pression d'oxygène, pH, niveau de croissance et de virulence des micro-organismes, réponse immunitaire et inflammatoire de l'hôte, pression du traitement antimicrobien. Elles participent à la sélection de la population la plus adaptée au nouveau remodelage des voies respiratoires. D'après Soret, *et al.*, 2020.



### 1.2.1.2 Inflammation pulmonaire

La mucoviscidose est associée à une inflammation des voies respiratoires, à prédominance neutrophilique. Plusieurs biomarqueurs de l'inflammation sont retrouvés plus élevés dans les voies respiratoires des personnes atteintes de mucoviscidose, comparées à celles des sujets non malades, notamment la calprotectine, l'interleukine-(IL)-2, IL-3, IL-8, le taux de neutrophiles et l'activité de l'élastase neutrophile (Koller et al., 1997; Hubeau et al., 2004; Mayer-Hamblett et al., 2007; Fidler et al., 2009; Gray et al., 2010).

Par ailleurs, trois biomarqueurs sont associés à la progression de la maladie :

- La calprotectine, une molécule pro- inflammatoire dérivée des neutrophiles, que nous détaillerons plus en détail dans un paragraphe dédié ci-dessous.

- La protéine HMGB-1 (High mobility group box-1 protein) qui est associée aux exacerbations pulmonaires (Rowe et al., 2008) et dont sa concentration dans les expectorations est corrélée à la fonction pulmonaire et au nombre d'exacerbations de l'année précédente (Liou et al., 2012). La concentration d'HMGB-1 dans les expectorations est également un marqueur prédictif du délai avant la prochaine exacerbation, du nombre d'exacerbations pulmonaires ultérieures et du délai avant le décès ou la transplantation pulmonaire.

- L'activité de l'élastase neutrophile, présente dans les sécrétions des voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose (Goldstein and Döring, 1986) ; elle induit la production d'IL-8 (Nakamura et al., 1992) et prédit une accélération du déclin de la fonction pulmonaire chez les enfants atteints de mucoviscidose (Sagel et al., 2007).

D'autres biomarqueurs sont utilisés dans la littérature, tel que le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF), dont la concentration dans les expectorations au début de l'hospitalisation pour une exacerbation pulmonaire a été fortement associée à la diminution du VEMS% (Liou et al., 2012). Une étude est actuellement en cours pour comparer la pertinence et l'utilisation de ces différents biomarqueurs (Liou et al., 2019).

Plusieurs études ont associé la composition du microbiote à l'inflammation pulmonaire, notamment chez l'enfant (Zemanick et al., 2015; Pittman et al., 2017; Muhlebach et al., 2018). *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, ainsi qu'une moindre alpha-diversité du microbiote ont notamment été corrélés à une augmentation de l'inflammation pulmonaire (Zemanick et al., 2015; Pittman et al., 2017). *In fine*, l'ensemble de ces résultats souligne que les interactions hôte-microorganismes commencent très tôt et participent à la l'évolution de l'atteinte pulmonaire de la mucoviscidose.

#### 1.2.1.2.1 La calprotectine pulmonaire dans la mucoviscidose

La calprotectine est une protéine de 36 kDa se liant au zinc, universellement présente dans l'organisme et dans le cytoplasme des neutrophiles et des macrophages. La calprotectine est libérée par les neutrophiles activés, ce qui entraîne des concentrations élevées dans divers fluides, tels que le plasma, le sérum, le liquide céphalo-rachidien, le liquide synovial, l'urine, la salive ou les selles (Voganatsi et al., 2001). Par conséquent, la calprotectine est augmentée de façon prédominante dans les processus inflammatoires des organes concernés. La calprotectine possède des propriétés pro-inflammatoires *via* l'activation de TLR-4 (Vogl et al., 2007), et il a été démontré qu'elle joue un rôle central dans l'inflammation pulmonaire dans des modèles d'infection pulmonaire hors mucoviscidose (Raquil et al., 2008).

Comme la calprotectine est libérée localement, elle peut être un indicateur sensible de l'inflammation locale. Ainsi, la calprotectine est connue comme un excellent biomarqueur du statut inflammatoire de l'intestin dans les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) (Lin et al., 2014). En ce qui concerne son dosage dans les sécrétions bronchiques pour évaluer l'inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose, elle est retrouvée en abondance dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose et diminue sous antibiotiques (Gray et al., 2008, 2010). Des concentrations élevées sont par ailleurs associées à une récurrence plus rapide des exacerbations pulmonaires (Gray et al., 2008, 2010). La calprotectine pulmonaire peut également être utilisée comme le reflet de l'inflammation locale et des exacerbations dans d'autres pathologies respiratoire, telles que l'asthme et la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) (Decaestecker et al., 2017; Raats et al., 2019; Jerkic et al., 2020).

## 1.2.2 L'atteinte intestinale

### 1.2.2.1 Le microbiote intestinal dans la mucoviscidose

Le rôle du microbiote intestinal sur la santé, dont la maturité et l'homéostasie du système immunitaire et les relations avec d'autres microbiotes (axe intestin-poumon) ou d'autres organes est maintenant clairement établi (Enaud et al., 2018, 2020; Chiu et al., 2017).

Dans la mucoviscidose, une différence significative de la composition du microbiote intestinal (appelée « dysbiose ») est retrouvée chez les patients atteints, comparé aux individus sains (Duytschaever et al., 2011, 2013; Bruzzese et al., 2014; Nielsen et al., 2016). Cette dysbiose intestinale, de plus en plus étudiée dans la mucoviscidose (Duytschaever et al., 2011, 2013; Bruzzese et al., 2014; Nielsen et al., 2016), se caractérise par une augmentation de l'abondance bactérienne (Norkina et al., 2004; De Lisle, 2007; Lynch et al., 2013) et une diminution de son alpha-diversité, avec notamment une baisse des espèces bactériennes anti-inflammatoires : *Faecalibacterium prauztnisii*, *Bifidobacterium spp.* et *Eubacterium limosum* (Scanlan et al., 2012; Schippa et al., 2013; Bruzzese et al., 2014) et l'émergence de bactéries pro- inflammatoires telle qu'*Escherichia coli* (Schippa et al., 2013; Hoffman et al., 2014). L'intensité de cette dysbiose est par ailleurs corrélée à la sévérité de la maladie (Schippa et al., 2013).

Une altération du microbiote intestinal dans la mucoviscidose a été montrée dès les premiers jours de vie dans le modèle murin (De Lisle, 2007; Lynch et al., 2013) ou les premiers mois de vie chez l'Homme (Madan et al., 2012; Scanlan et al., 2012; Schippa et al., 2013; Hoen et al., 2015), avant toute exposition aux antibiotiques. Madan *et al.* ont également montré que les premières exacerbations pulmonaires, ainsi que la colonisation initiale à *P. aeruginosa* étaient associés à une diminution de la diversité du microbiote intestinal et d'espèces bénéfiques (Madan et al., 2012). Les facteurs impliqués dans l'installation de la dysbiose intestinale dans la mucoviscidose sont multiples et encore mal élucidés.

Tout d'abord, la stagnation du mucus digestif, trop épais, favoriserait la prolifération bactérienne et diminuerait la diversité du microbiote intestinal (Norkina et al., 2004). De plus, un ralentissement du transit semble être aussi présent et serait alors un facteur supplémentaire de stase de mucus (De Lisle, 2007). Enfin, un traitement par laxatif, permettant d'hydrater le mucus et d'accélérer le temps de transit, semble corriger partiellement cette dysbiose, notamment en diminuant l'abondance bactérienne (De Lisle, 2007).

L'intégrité de la barrière intestinale semble aussi être en cause, avec une diminution de l'immunité innée (Van Biervliet et al., 2003; Stoltz et al., 2010; Ooi et al., 2015) et un mucus trop épais pour que les molécules antibactériennes des cellules de Paneth puissent remplir correctement leurs fonctions au niveau de la lumière intestinale (Clarke et al., 2004). Il faut

néanmoins rappeler que dans la mucoviscidose, la dysbiose survient dès les premiers jours de vie, avant la différenciation des cellules de Paneth (De Lisle, 2007).

Les modifications du milieu intestinal, avec notamment une acidité accrue, l'accumulation de nutriments mal digérés en cas d'insuffisance pancréatique exocrine ou encore des lipides mal absorbés en cas d'atteinte biliaire sont aussi des facteurs impliqués dans la constitution de la dysbiose.

La déglutition des expectorations peut aussi expliquer en partie la composition du microbiote intestinal dans la mucoviscidose (Döring et al., 1989).

Les facteurs iatrogéniques sont aussi à prendre en compte. La prescription d'inhibiteurs de la pompe à protons en cas de reflux gastro-œsophagien (plus fréquent dans la mucoviscidose) diminue l'acidité gastrique, élément essentiel de la barrière intestinale, surtout chez ces patients qui déglutissent leurs crachats. Enfin, l'antibiothérapie systémique (*per os* et intraveineuse), utilisée de façon récurrente dans des indications respiratoires, peut moduler de façon importante le microbiote intestinal (De La Cochetière et al., 2005; Sekirov et al., 2010; de Freitas et al., 2018).

#### 1.2.2.2 Inflammation intestinale chronique

Une inflammation intestinale chronique est présente chez la majorité des patients, surtout en cas d'insuffisance pancréatique, même en l'absence de symptômes digestifs (Lisowska et al., 2010; Munck, 2014; Ellemunter et al., 2017; Garg et al., 2017a). Elle est caractérisée par une infiltration de la *lamina propria* par des mononucléaires exprimant des marqueurs de l'inflammation (ICAM-1, CD-25, IL-2, IFN $\gamma$ ) (Raia et al., 2000), une augmentation d'IL-1 $\beta$ , IL-8, des protéines cationiques des éosinophiles et de l'activité de l'élastase du polynucléaire neutrophile (Smyth et al., 2000) et par des lésions de la muqueuse à l'endoscopie (œdème, érythème ou ulcérations) (Werlin et al., 2010). Enfin, on retrouve aussi une augmentation des pertes digestives en albumine et immunoglobulines, attestant encore une fois de l'existence d'une entéropathie associée à la mucoviscidose (Smyth et al., 2000). La calprotectine fécale, biomarqueur reflétant l'inflammation digestive, témoigne de cette inflammation. Elle est significativement plus élevée chez les enfants atteints de mucoviscidose comparé à un groupe contrôle d'enfants non malades ( $598,7 \pm 277,5 \mu\text{g/g}$  versus  $48,4 \pm 34,0 \mu\text{g/g}$ ;  $p < 0,001$ ) et est corrélée à la sévérité du phénotypes de la maladie (VEMS < 50%, colonisation chronique à *P. aeruginosa*, insuffisance pancréatique associée, insuffisance pondérale) (Parisi et al., 2017). Cependant, une étude récente n'a pas trouvé de corrélation entre la valeur de VEMS et le taux de calprotectine fécale, ce qui suggère que l'atteinte digestive dans la mucoviscidose peut évoluer de façon indépendante à l'atteinte pulmonaire (Ellemunter et al., 2017).

Cette inflammation intestinale chronique impacte la morbi-mortalité des patients, avec notamment des conséquences sur l'état nutritionnel. Une étude faite chez des patients atteints de mucoviscidose a montré que les taux de calprotectine fécale étaient inversement corrélés aux Z-scores du poids et de la taille des patients atteints de mucoviscidose (Dhaliwal et al., 2015). Par ailleurs, une étude interventionnelle sur modèle murin a montré qu'un traitement par antibiotique oral ou par laxatif diminue les marqueurs liés à l'inflammation intestinale et la réponse immunitaire innée et améliore la croissance pondérale (Norkina et al., 2004; De Lisle et al., 2011). Or, le statut nutritionnel est un facteur prédictif de la dégradation de la fonction pulmonaire et de la survie dans la mucoviscidose (Steinkamp and Wiedemann, 2002; Konstan et al., 2003).

La physiopathologie de cette inflammation intestinale, encore à préciser, est probablement multifactorielle (De Lisle and Borowitz, 2013; Dorsey and Gonska, 2017). L'altération de l'intégrité de la barrière intestinale et la diminution de l'immunité innée peut contribuer à la genèse de cette inflammation (Van Biervliet et al., 2003; Stoltz et al., 2010; Ooi et al., 2015).

#### 1.2.2.3 Le risque de cancers de l'intestin et colo-rectal dans la mucoviscidose

Un surrisque de cancers de l'intestin grêle et colo-rectal est maintenant bien démontré dans la mucoviscidose. Ils surviennent de façon plus fréquentes (ratio standardisé d'incidence<sup>2</sup> à 11,5 et 6,2, respectivement) et plus précocement (âge médian au diagnostic de 32 ± 9 ans, contre 68 ans dans la population générale) (Maisonneuve et al., 2013; Garg and Ooi, 2017; Yamada et al., 2018). Chez les patients transplantés, les indices de risque s'élèvent à 52,2 et 30,1, pour les cancers de l'intestin grêle et colo-rectal respectivement (Maisonneuve et al., 2013). Dans une étude évaluant le dépistage systématique par coloscopie chez les patients de plus de 40 ans atteints de mucoviscidose, l'incidence des polypes adénomateux était de 56%, environ 25 % avaient des adénomes avancés et 3 % avaient un cancer du côlon (Niccum et al., 2016).

Les raisons de ce surrisque de ces cancers digestifs sont encore mal comprises. L'inflammation chronique est associée au risque de cancer, notamment colorectal, dans la population générale (Arthur et al., 2012). Dans les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), l'atteinte colique est un facteur de risque de cancer colorectal et ce risque est corrélé à l'intensité et à l'ancienneté de l'inflammation (Munkholm, 2003). On peut donc penser qu'une inflammation intestinale présente dès l'enfance, comme c'est le cas de la mucoviscidose, constitue un facteur de risque à part entière de cancers digestifs. Le rôle de la dysfonction du gène CFTR, identifié comme un gène suppresseur de tumeur, pourrait également contribuer à ce surrisque de cancer (Than et al., 2016).

---

<sup>2</sup> Correspond à un indice de risque ajusté sur plusieurs facteurs de risque de cancer.

## **2 PRISE EN CHARGE DE LA MUCOVISCIDOSE**

---

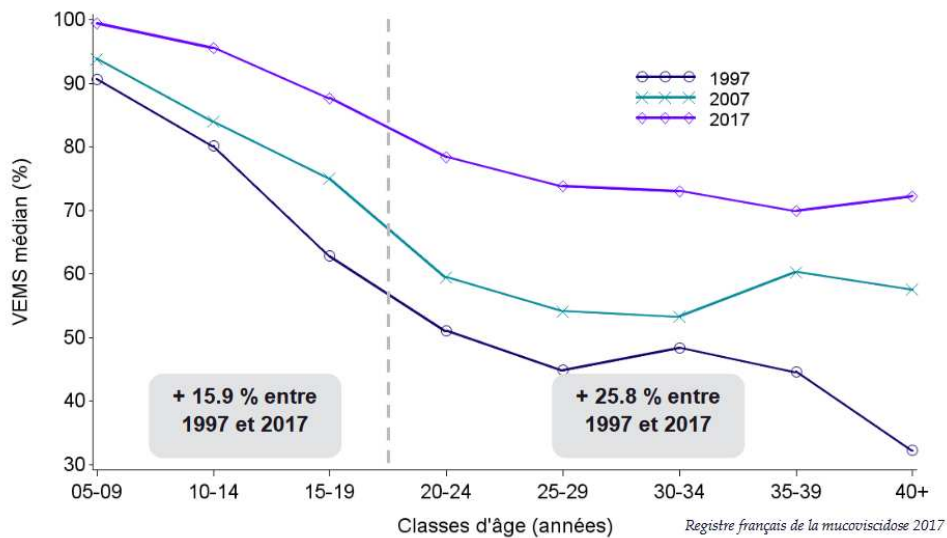
En 2002, le dépistage systématique de la mucoviscidose à la naissance a été instauré en France, et les Centres de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM) ont été mis en place pour favoriser la coordination des soins ainsi que la recherche grâce à des équipes multidisciplinaires expertes (médicale et paramédicale).

Il y a quelques années encore, la prise en charge des patients atteints de mucoviscidose était essentiellement symptomatique et préventive : drainage des sécrétions bronchiques par kinésithérapie quotidienne et par fluidifiants inhalés (sérum salé hypertonique ou rhDNase), suppléments vitaminiques, phosphocalciques et sodés, alimentation hypercalorique, prise en charge des colonisations et exacerbations pulmonaires par antibiothérapie (inhalés et/ou *per os* et/ou intraveineuses) et plus rarement par antifongiques, supplémentation de l'insuffisance pancréatique exocrine par des préparations d'enzymes pancréatiques, mise à jour rigoureuse du calendrier vaccinal et encore éducation thérapeutiques de patients.

Depuis les années 1980, la transplantation pulmonaire peut constituer un recours thérapeutique dans la mucoviscidose, pour les malades atteints d'insuffisance respiratoire chronique sévère.

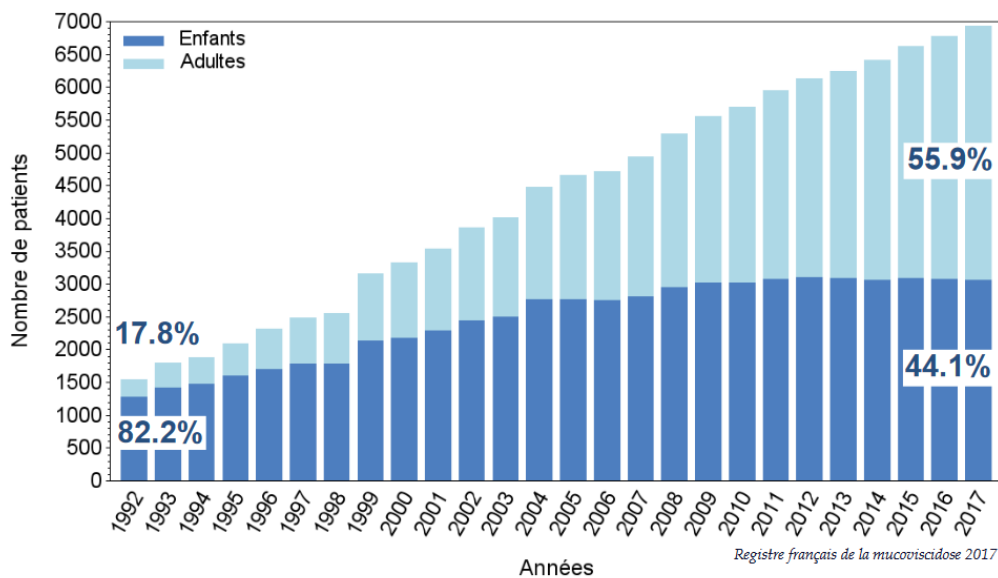
Très récemment, une nouvelle classe thérapeutique prometteuse a vu le jour dans la prise en charge des patients atteints de mucoviscidose. Appelés « modulateurs de la protéine CFTR », ou « modulateurs CFTR », ces traitements visent à améliorer, voire restaurer la fonctionnalité de la protéine CFTR défectueuse. Cette classe représentant une avancée majeure dans la prise en charge de la mucoviscidose et un élément clé de notre travail, nous détaillerons les différents modulateurs disponibles dans le paragraphe suivant.

Au total, ces progrès dans la prise en charge de la mucoviscidose ont changé la démographie des malades. Le VEMS médian a augmenté de 15% chez les 0-20 ans et de 25% chez les plus de 20 ans entre 1997 et 2017 (figure 4) ; 56% des patients ont plus de 18 ans en 2017, contre 18% en 1997 (figure 5) (Vaincre La Mucoviscidose, 2017). Avec l'augmentation de l'espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose (Burgel et al., 2015), de nouveaux enjeux s'imposent, tels que les conséquences à long terme sur la morbi-mortalité des atteintes extra-respiratoires (dont les atteintes intestinales).



**Figure 4. Evolution du VEMS médian par âge, entre 1997 et 2017**

Le VEMS (%) collecté était le dernier de l'année de 1992 à 2010 et le meilleur de l'année à partir de 2011. Le VEMS médian des patients de 6 à 19 ans était de 78,6 % en 1997 et 94,5 % en 2017. Il était de 47,8 % en 1997 et 73,6 % en 2017 pour les 20 ans et plus. D'après le registre français de la mucoviscidose 2017.



**Figure 5. Nombre de patients atteints de mucoviscidose en France, depuis 1992**

A noter la proportion croissante de patients adultes. D'après le registre français de la mucoviscidose 2017.

## 3 LES MODULATEURS DE LA PROEINE CFTR

---

### 3.1 DEFINITIONS

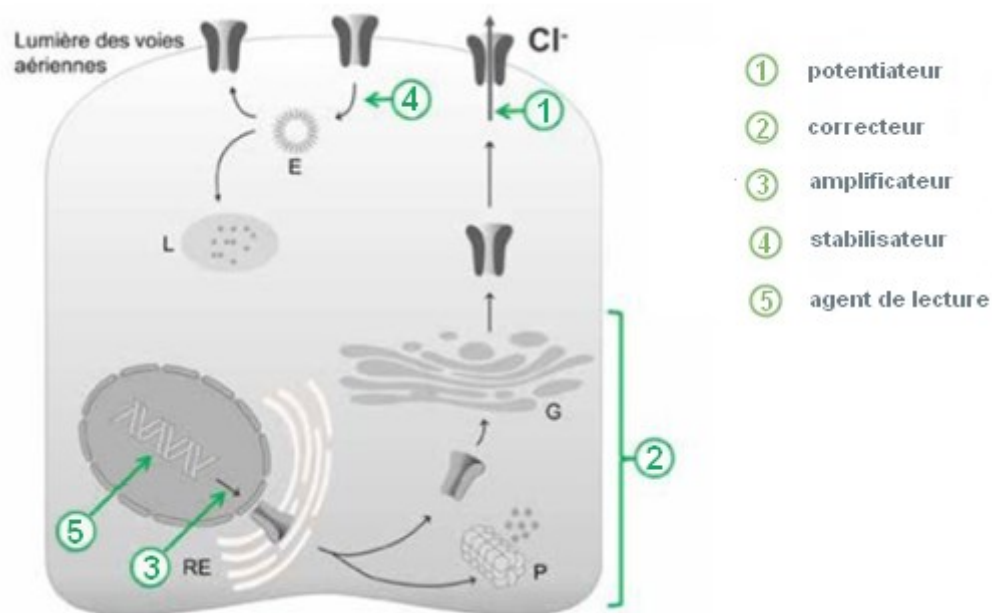
Les modulateurs CFTR sont de petites molécules qui visent à améliorer la fonction des protéines CFTR mutantes par différentes approches (Clancy et al., 2019; Joshi et al., 2019). En effet selon le type de mutations (Figure 1), différentes étapes de la production d'une protéine CFTR mature et fonctionnelle peuvent être compromises, se traduisant alors par une diminution de la production ou de l'activité de la protéine CFTR. Afin de corriger ou de surmonter les conséquences de ces mutations, plusieurs approches sont actuellement étudiées, isolément ou en associations (Figure 6) :

- (i) Les « potentiateurs », qui sont capables d'améliorer la fonctionnalité des protéines CFTR ayant atteint leur position transmembranaire au pôle apical des cellules, en augmentant le *channel gating* (probabilité de canal ouvert). La molécule pionnière, et à l'heure actuelle la seule commercialisée, est l'Ivacaftor chez les patients porteurs de la mutation G551D ;
- (ii) Les « correcteurs », qui augmentent le nombre de protéines CFTR présentes à la surface de la membrane apicale, en limitant leur dégradation intracellulaire par le protéasome lors des étapes de maturation. Les correcteurs les plus avancés (et les plus étudiés) sont ceux de la firme Vertex (Lumacaftor, Tezacaftor, Elexacaftor) ;
- (iii) Les « amplificateurs », qui permettent d'augmenter la synthèse brute de la protéine CFTR mutée. Parmi les molécules prometteuses, PTI-428 a récemment montré une amélioration du VEMS de 5% en 4 semaines chez des patients adultes homozygotes pour la mutation deltaF508 sous Lumacaftor/Ivacaftor (Flume P et al., 2018) ;
- (iv) Les « stabilisateurs », qui augmentent le temps de résidence de la protéine CFTR au niveau de la membrane plasmique au pôle apical des cellules ;
- (v) Les agents de lecture des codons Stop prématurés, qui suppriment les codons Stop prématurés et permettent donc une lecture complète de la séquence nucléotidique par le ribosome.

Une grande partie de la complexité de la mise en place d'un traitement efficace par modulateur réside dans le fait qu'une mutation donnée peut entraîner plusieurs déficits fonctionnels. A titre d'exemple, la mutation deltaF508 produit une protéine qui est à la fois mal pliée et incapable d'échapper au réticulum endoplasmique, mais la petite quantité de CFTR qui migre vers la membrane cellulaire présente également un défaut de fermeture des canaux (Joshi et al., 2019). Une combinaison de modulateurs de CFTR est donc souvent nécessaire, associant des "correcteurs" qui facilitent le traitement et le trafic de la protéine vers la surface



cellulaire et des "potentiateurs" qui augmentent la capacité d'ouverture du canal une fois localisé à la membrane plasmique au pôle apical des cellules épithéliales.



**Figure 6. Niveau d'action des modulateurs de la protéine CFTR**

E : Endosome ; G : Appareil de Golgi ; L : Lysosome ; P : Protéasome ; RE : Réticulum endoplasmique. D'après Lebecque *et al.*

L'identification des molécules d'intérêt fait appel à des techniques de criblage à haut débit, qui consistent à tester l'effet de milliers de molécules sur l'activité de la protéine CFTR. Une fois ces molécules identifiées, la pertinence des résultats est analysée par diverses méthodes en laboratoire de recherche (études électrophysiologiques sur des lignées épithéliales, études sur les organoïdes ...). A noter que malgré une certaine corrélation retrouvée dans les études cliniques entre l'amélioration de la fonction respiratoire et la diminution du taux de chlorure dans la sueur, cette relation est trop faible pour être utilisée à l'échelle individuelle : la variation du taux de chlorure dans la sueur ne permet pas de prédire l'évolution du VEMS chez un patient donné (Durmowicz *et al.*, 2013; Fidler *et al.*, 2017). La Figure 7 répertorie les différents modulateurs de la protéine CFTR en cours de développement, ainsi que ceux déjà approuvés par l'agence américaine Food and Drug Administration (FDA) et/ou l'Agence Européenne du Médicament (EMA) et que nous allons détailler.

Pré-clinique	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Autorisé	Commentaires	
Elexacaftor + tezacaftor + ivacaftor (Trikafta®) ;*					✓	Elexacaftor et Tezacaftor sont des correcteurs et Ivacaftor est un potentiateur. Approuvé par la FDA et l'EMA pour les patients âgés de 12 ans et plus possédant au moins une copie de la mutation deltaF508. Deux études de phase 3 actuellement en cours pour les patients âgés de 2 à 5 ans et 6 à 11 ans, avec au moins une copie de la mutation deltaF508.
Ivacaftor (Kalydeco®) ;					✓	Ivacaftor est un potentiateur. Approuvé pour les patients âgés d'au moins 6 mois, porteurs d'une mutation R117H ou de l'une des mutations de classe III suivantes : G551D, G1244E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549N ou S549R.
Lumacaftor + ivacaftor (Orkambi®) ;					✓	Lumacaftor est un correcteur et Ivacaftor un potentiateur. Approuvé pour les patients âgés de plus de 2 ans, homozygote pour la mutation deltaF508.
Tezacaftor + ivacaftor (Symdeko®) ;**					✓	Tezacaftor est un correcteur et Ivacaftor un potentiateur. Approuvé par la FDA et l'EMA pour les patients âgés d'au moins 12 ans, non transplantés et porteurs soit de deux mutations deltaF508 ou d'une mutation deltaF508 combinée à une des 14 mutations résiduelles suivantes : P67L, R117C, L206W, R352Q, A455E, D579G, 711+3A→G, S945L, S977F, R1070W, D1152H, 2789+5G→A, 3272-26A→G et 3849+10kbC→T.
ABBV-2222 (formerly GLPG2222) ;						ABBV-2222 (anciennement GLPG2222) est un correcteur. Une étude de phase 2a visant à tester la sécurité et la tolérance de l'ABBV-2222 chez les patients homozygotes pour la mutation deltaF508del a été achevée. Une étude de phase 2 en combinaison avec l'ABBV-3067 (un potentialisateur) est en cours.
ABBV-3067 ;						L'ABBV-3067 est un potentiateur. Une étude de phase 2 est en cours chez les patients homozygote pour la mutation deltaF508, L'étude testera l'ABBV-3067 à la fois seul et en combinaison avec l'ABBV-2222, un correcteur CFTR.
ELX-02 ;						ELX-02 est un composé conçu pour restaurer la fonction CFTR chez les patients qui présentent des mutations non-sens (G452X). Une étude de phase 2 est actuellement en cours, chez des patients possédant au moins une copie de la mutation G542X.
Nesolicaftor (PTI-428) ;						PTI-428 est un amplificateur. Des études de phase 2 ont été menées chez les patients homozygote pour la mutation deltaF508, pour tester la sécurité et l'efficacité du nesolicaftor seul et en combinaison avec deux autres modulateurs CFTR, posenaftor (PTI-801) et dirocaftor (PTI-808).
Posenaftor (PTI-801) ;						PTI-801 est un correcteur. Des études de phase 2 ont été menées chez les patients homozygote pour la mutation deltaF508, pour tester la sécurité et l'efficacité de posenaftor seul et en combinaison avec deux autres modulateurs CFTR, nesolicaftor (PTI-428) et dirocaftor (PTI-808).
Dirocaftor (PTI-808) ;						PTI-808 est un potentiateur. Des études de phase 2 ont été menées chez les patients ayant au moins une mutation deltaF508, pour tester la sécurité et l'efficacité du dirocaftor en combinaison avec deux autres modulateurs CFTR, posenaftor (PTI-801) et nesolicaftor (PTI-428).
VX-121 ;						VX-121 est un correcteur. Une étude de phase 2 visant à tester la sécurité et l'efficacité du VX-121 est actuellement en cours chez les patients ayant au moins une mutation deltaF508. Cette étude teste le VX-121 en combinaison avec un autre correcteur CFTR, le Tezacaftor, et le potentiateur CFTR VX-561.
VX-561 (formerly CTP-656) ;						VX-561 est une forme modifiée du potentiateur Ivacaftor. Une étude de phase 2 visant à tester la sécurité et l'efficacité du VX-561 chez les adultes qui présentent une mutation de classe III est en cours.
ABBV-191 ;						ABBV-191 est un potentiateur.
MRT5005 ;						MRT5005 est conçu pour restaurer la fonction CFTR en délivrant des copies correctes de l'ARNm codant pour la protéine CFTR, chez les patients ayant des mutations de classe I ou II.
Arcturus ;						Ce programme développe une thérapie inhalée pour délivrer de l'ARN messenger CFTR normal dans les poumons.
Icagen ;						Ce programme travaille à l'identification de thérapies potentielles pour les patients qui présentent des mutations non-sens.
Reata ;						Ce programme vise à augmenter le nombre de thérapies conçues pour réparer la protéine CFTR défectueuse chez les personnes qui présentent une mutation deltaF508.
ReCode Therapeutics ;						Ce programme développe des ARN de transfert supprimeurs pour traiter des mutations non-sens.
Southern Research Institutes ;						Ce programme vise à identifier des thérapies potentielles pour des mutations non-sens.
Spirovant Sciences ;						Ce programme vise à faire progresser la thérapie génique consistant à administrer le gène CFTR dans les poumons via le virus adéno-associé (AAV) par voie inhalée.
4D Molecular Therapeutics ;						4D-710 est un vecteur à virus adéno-associé (AAV) personnalisé conçu pour délivrer un gène CFTR sain spécifiquement aux cellules pulmonaires

**Figure 7. Développement des nouvelles thérapies dans la mucoviscidose, d'après la fondation américaine pour la mucoviscidose**  
 EMA : European Medicines Agency ; FDA : Food and Drug Administration ; \* Nom européen : Kaftrio® ; \*\* Nom européen : Symkevi®. Mise à jour : 12/2020

### 3.2 IVACAFTOR

En 2012, Ivacaftor (Kalydeco®, Vertex Pharmaceuticals) fut le premier modulateur de la protéine CFTR approuvé dans la mucoviscidose par la Food and Drug Administration (FDA) et l'Agence Européenne du Médicament (EMA). Ivacaftor est un potentiateur CFTR, qui se lie à la protéine CFTR pour favoriser son ouverture à la surface de la cellule, afin que le chlore et l'eau puissent être transportés efficacement à travers la membrane (Davies et al., 2013). Depuis sa découverte, Ivacaftor a été approuvé pour le traitement de 38 mutations du gène CFTR (tableau 1), sur la base des résultats d'essais cliniques et de recherches *in vitro*. En raison de son mécanisme d'action, Ivacaftor n'est efficace que chez les patients qui ont un certain degré de production de protéine CFTR fonctionnelle, et, en monothérapie, il ne concerne donc pas les patients homozygotes pour la mutation deltaF508.

**Tableau 1 : Mutations du gène CFTR répondant à l'Ivacaftor**

A455E	E193K	G1244E	R347H	S1251N
A1067T	E831X	G1349D	R352Q	S1255P
D110E	F1052V	K1060T	R1070Q	711+3A>G
D110H	F1074L	L206W	S549N	2789+5G>A
D579G	G178R	P67L	S549R	3272-26A>G
D1152H	G551D	R74W	S945L	3849-10kbC>T
D1270N	G551S	R117C	S977F	E56K
G1069R	R117H	S1244E		

Ivacaftor a été approuvé sur la base des résultats d'études randomisées en double aveugle, contre placebo, dont les études STRIVE (pour les patients âgés de 12 ans et plus) et ENVISON (pour les patients âgés de 6 à 11 ans), évaluant l'efficacité d'Ivacaftor sur l'évolution du VEMS chez des patients porteurs d'au moins une mutation G551D (Davies et al., 2013; Quittner et al., 2015). Après 24 semaines, Ivacaftor a entraîné une augmentation de 10,6% (pour les 12 ans et plus) et de 12,6% (pour les 6-11 ans) par rapport au VEMS à l'inclusion. L'effet de l'Ivacaftor sur l'évolution du VEMS était significatif dès le 15<sup>ème</sup> jour de traitement et s'est poursuivi tout au long des 48 semaines de suivi. D'autres études ont ensuite permis d'étendre les indications d'Ivacaftor aux patients âgés entre 6 mois et 5 ans, ainsi qu'à d'autres mutations (De Boeck et al., 2014; Davies et al., 2016; Vertex Pharmaceuticals Incorporated, 2020).

Plusieurs études ont également montré que les patients traités par Ivacaftor avaient une meilleure prise de poids, une amélioration de la qualité de vie, une diminution du nombre d'exacerbations pulmonaires et du taux de chlore sudoral, comparé au groupe placebo (Davies et al., 2013; McKone et al., 2014; Moss et al., 2015; Guimbellot et al., 2020).

Par ailleurs, la tolérance de l'Ivacaftor est considérée comme bonne. Les événements indésirables les plus fréquemment constatés chez les patients traités comprennent les douleurs oropharyngées, les céphalées, les rhinopharyngites, les infections des voies respiratoires supérieures, les otites moyennes, la diarrhée, l'augmentation du nombre de polynucléaires éosinophiles plasmatiques et les cytolyses hépatiques (Davies et al., 2013, 201; McKone et al., 2014; Vertex Pharmaceuticals Incorporated, 2020).

Cependant, la corrélation que partielle entre l'amélioration de la fonction pulmonaire et celle du test de la sueur suggère que la réponse des patients à l'Ivacaftor est multifactorielle (Barry et al., 2014). L'effet du traitement sur le microbiote pulmonaire et notamment sur la colonisation à *P. aeruginosa* est un élément essentiel à appréhender pour mieux comprendre l'impact du traitement sur la fonction pulmonaire. Plusieurs études observationnelles de suivis de patients sous Ivacaftor ont permis de montrer une diminution du taux de colonisation à *P. aeruginosa* sous traitement (Heltshe et al., 2015; Millar et al., 2018; Frost et al., 2019; Singh et al., 2019; Guimbellot et al., 2020). Cet effet persistait à 5 ans et demi après le début du traitement (Guimbellot et al., 2020). En revanche, peu de données existent concernant l'effet d'Ivacaftor sur le microbiote pulmonaire dans son ensemble. Elles sont issues des petites cohortes de patients, notamment du fait de la faible prévalence des mutations concernées par le traitement. Malgré des améliorations significatives du VEMS constatées sous Ivacaftor, aucune étude n'a pu montrer des changements significatifs sur la charge bactérienne totale, la diversité bactérienne ou encore des marqueurs de l'inflammation (dont IL-1 $\beta$ , IL-8, alpha-1 antitrypsine et activité de l'élastase neutrophile) (Bernarde et al., 2015; Peleg et al., 2018; Harris et al., 2020). Cependant, l'effet du traitement sur le microbiote pulmonaire pourrait être en partie atténué par des traitements intercurrents, notamment la prise d'antibiotiques (Peleg et al., 2018).

Ooi *et al.* ont montré qu'un traitement par Ivacaftor avait également une efficacité sur l'atteinte intestinale de la mucoviscidose, avec une diminution de l'inflammation intestinale, comme en témoigne la baisse significative de la calprotectine fécale (Ooi et al., 2018). De plus, cette diminution de l'inflammation intestinale était associée à des modifications du microbiote intestinal, et notamment à une augmentation d'*Akkermansia* et une diminution d'*Enterobacteriaceae* (Ooi et al., 2018).

### 3.3 L'ASSOCIATION LUMACAFTOR/IVACAFTOR

En 2015, la FDA et l'EMA ont approuvé le premier correcteur Lumacaftor, en combinaison avec le potentiateur Ivacaftor (Orkambi®, Vertex Pharmaceuticals). Lumacaftor complète l'Ivacaftor en augmentant la production et le trafic des protéines CFTR vers la surface cellulaire. Initialement indiqué pour les patients homozygotes pour la mutation deltaF508 âgés de plus de 12 ans, Lumacaftor/Ivacaftor a récemment été approuvé pour les patients âgés de 2 et plus (Milla et al., 2017; Ratjen et al., 2017; Vertex Pharmaceuticals Incorporated, 2018). En France, il est autorisé depuis 2015 dans le traitement des patients de 12 ans et plus, et depuis Décembre 21019, il bénéficie d'une extension aux 2 – 11 ans.

L'association Lumacaftor/Ivacaftor a été étudiée pour la première fois chez des patients âgés de 12 ans et plus (Wainwright et al., 2015). Cet essai de phase 3 randomisé de 24 semaines, contre placebo, a permis de montrer une amélioration significative de la fonction respiratoire (VEMS) de 4,3% à la semaine 24, une réduction du nombre d'exacerbations bronchiques de -39%, et une augmentation de l'IMC de 0,36. Les tests de la sueur ont indiqué que le traitement par Lumacaftor/Ivacaftor permettait également une amélioration significative du taux de chlore dans la sueur (Milla et al., 2017), mais qui ne semble pas être corrélée à l'amélioration du VEMS et/ou de l'IMC (Aalbers et al., 2020b).

Concernant les effets secondaires, Lumacaftor/Ivacaftor a été associé à une incidence plus élevée d'événements respiratoires (y compris des exacerbations, des oppressions thoraciques et une dyspnée), de toux, de congestion nasale, de céphalée, d'hypertension artérielle, de cytolyses hépatiques et de cataractes (Wainwright et al., 2015; Burgel et al., 2020). Plus récemment, la tolérance et l'efficacité de l'association Lumacaftor/Ivacaftor été évaluée sur une période de 1 an en conditions réelles d'utilisation chez 845 patients de 12 ans (292 adolescents et 553 adultes). Dix-huit pourcents des patients ont arrêté le traitement, souvent en raison d'effets indésirables respiratoires (48,1%). Les patients exposés de façon continue à Lumacaftor/Ivacaftor ont présenté une augmentation de 3,7 % du VEMS, une augmentation de l'IMC de 0,73 kg/m<sup>2</sup> et une diminution de 35 % des traitements antibiotiques intraveineux (Burgel et al., 2020).

Très peu de données sont disponibles quant à l'effet de Lumacaftor/Ivacaftor sur le microbiote pulmonaire. Des résultats préliminaires semblent indiquer que l'association Lumacaftor/Ivacaftor permet d'augmenter l'alpha-diversité (Boutin et al., 2019). Les données concernant l'effet du traitement sur l'abondance de *P. aeruginosa* sont contradictoires et ne permettent pas de conclure (Boutin et al., 2019; Neerincx et al., 2020). A notre connaissance, aucune donnée n'était disponible

sur l'évolution de l'inflammation pulmonaire, du microbiote, du mycobiote et de l'inflammation intestinale.

### 3.4 L'ASSOCIATION TEZACAFITOR/IVACAFITOR

Le deuxième correcteur proposé en association avec l'Ivacaftor est le Tezacaftor. L'association Tezacaftor/Ivacaftor (Symkevi<sup>®3</sup>, Vertex Pharmaceuticals) a été approuvée en 2018 par la FDA et l'EMA. Comme le Lumacaftor, le Tezacaftor est un correcteur de CFTR, permettant d'augmenter la production et le trafic de CFTR vers la surface cellulaire. Le Tezacaftor présente plusieurs avantages par rapport au Lumacaftor, dont un meilleur profil de tolérance avec notamment une incidence réduite des symptômes respiratoires, et la possibilité de traiter un plus grand nombre de mutations du gène CFTR (Rowe et al., 2017; Taylor-Cousar et al., 2017). Tezacaftor/Ivacaftor a été étudié chez les patients de plus de 12 ans homozygotes pour la mutation deltaF508 ou avec une mutation deltaF508 associée à une des 26 autres mutations du gène CFTR du tableau 2 (Rowe et al., 2017; Taylor-Cousar et al., 2017).

**Tableau 2 : Mutations du gène CFTR répondant au Tezacaftor/Ivacaftor**

A455E	D1270N	F1074L	R347H	2789+5G>A
A1067T	E56K	K1060T	R352Q	3272-26A>G
D110E	E193K	L206W	R1070W	3849+10kbC>T
D110H	E831X	P67L	S945L	
D579G	DeltaF508	R74W	S977F	
D1152H	F1052V	R117C	711+3A>G	

L'association Tezacaftor/Ivacaftor a montré, après 24 semaines de traitement, une amélioration du VEMS de 4,0 % pour les patients homozygotes deltaF508 et de 6,8% pour les patients hétérozygotes deltaF508, ainsi qu'une diminution de la concentration de chlore dans la sueur d'environ 10 mmol/L (Rowe et al., 2017; Taylor-Cousar et al., 2017).

<sup>3</sup> Le nom commercial aux Etats-Unis est Symdeko<sup>®</sup>

### **3.5 L'ASSOCIATION ELEXACAFITOR/TEZACAFITOR/IVACAFITOR**

Vertex pharmaceuticals a récemment développé un nouveau correcteur, l'Elexacaftor, qui a un effet synergique sur l'association Tezacaftor/Ivacaftor. Approuvée en 2020 par la FDA et l'EMA, cette combinaison est censée concerner le génotype de 90% des patients (Keating et al., 2018).

L'efficacité de cette association chez les patients homozygotes pour la mutation deltaF508 a été rapportée lors d'un essai randomisé de 4 semaines en double aveugle chez des patients âgés de 12 ans ou plus (Heijerman et al., 2019). Il s'agissait d'une comparaison avec l'association Tezacaftor/Ivacaftor seuls, chez 107 patients âgés de 12 ans et plus. Par rapport à ceux qui ont reçu Tezacaftor/Ivacaftor, ceux qui recevaient Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor ont eu une augmentation significative du VEMS de 10,0 %, une diminution significative de la concentration de chlore dans la sueur d'environ 45,1 mmol/L, et une augmentation significative du score du domaine respiratoire du questionnaire CFQ-R de 17,4 points. L'essai était trop court pour évaluer les changements dans le taux d'exacerbations respiratoires.

Cette association concerne également les patients ayant une mutation deltaF508 associée à une mutation à fonction minimale. L'efficacité de cette association chez ces patients a été confirmée lors d'une étude de phase 3 de 24 semaines en double aveugle chez 403 patients âgés de plus de 12 ans (Middleton et al., 2019). Par rapport au placebo, Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor a entraîné une augmentation significative du VEMS de 13,8 % et de 14,3 % après 4 et 24 semaines de traitement respectivement. Après 24 semaines de traitement, ont également été constatées des diminutions significatives de la concentration moyenne en chlore dans la sueur de 41,8 mmol/L et du nombre d'exacerbation pulmonaire de deux tiers, et des augmentations significatives de l'IMC moyen de 1,04 et du score moyen du domaine respiratoire du questionnaire CFQ-R de 20,2 (Middleton et al., 2019). A noter que la concentration moyenne en chlore dans la sueur, chez les personnes traitées par Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor, était de 58 mmol/L, soit moins que le seuil diagnostique établi de 60 mmol/L. La tolérance de cette triple combinaison semble être bonne avec des taux d'évènements indésirables similaires dans les deux groupes.

A notre connaissance, aucune donnée n'est disponible à l'heure actuelle concernant l'impact de l'association Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor sur l'inflammation et le microbiote pulmonaires et/ou digestifs.

## 4 OBJECTIFS DE THESE

---

L'objectif principal de cette thèse était de répondre à l'évolution physiopathologique et clinique actuelle de la mucoviscidose, en complétant les données biocliniques conventionnelles par une approche métagénomique des communautés microbiennes bactériennes et fongiques pulmonaires et digestives des patients. Ceci afin d'étudier les phénomènes d'inflammation et de dysbiose pulmonaires et digestifs dans la mucoviscidose et de mieux appréhender l'impact des modulateurs CFTR sur ces phénomènes.

Ainsi, le premier objectif consistait à mieux caractériser l'efficacité de la modulation de la fonction CFTR par la combinaison Lumacaftor/Ivacaftor sur les myco/microbiotes et l'inflammation pulmonaires (Partie 1.3 des résultats). Au préalable, nous avons étudié les microorganismes bactériens et fongiques, identifiés en culture, associés à un déclin de la fonction pulmonaire dans la mucoviscidose en proposant une modélisation du VEMS (Partie 1.1 des résultats), et avons évalué l'impact en vie réelle d'un traitement par Lumacaftor/Ivacaftor sur la fonction pulmonaire des patients pédiatrique (Partie 1.2 des résultats).

Le deuxième objectif de notre travail était de contribuer à l'amélioration de la compréhension et de la prise en charge de l'inflammation intestinale dans la mucoviscidose (Partie 2 des résultats). Pour atteindre cet objectif, nous avons identifié et développé plusieurs axes de travail. Le premier était d'évaluer l'association entre le taux calprotectine fécale (biomarqueur de l'inflammation intestinale) et les scores de qualité de vie des patients d'une part, et leurs symptômes digestifs d'autre part (Partie 2.1 des résultats). En parallèle, un deuxième axe de recherche visait à analyser l'association, dans la mucoviscidose, entre la composition du microbiote intestinal et la présence d'une inflammation intestinale (attestée par des taux élevés de calprotectine fécale) (Partie 2.2 des résultats). Dans le but de mieux comprendre la physiopathologie de cette inflammation, cet axe était complété par des approches *in vitro* (Partie 2.3 des résultats). Enfin, un dernier axe s'intéressait à l'évolution des taux de calprotectine fécale chez les patients atteints de la mucoviscidose et traités par un modulateur de la protéine CFTR (Lumacaftor/Ivacaftor) (Partie 2.4 des résultats).





# Matériels et Méthodes

---



Notre travail et manuscrit étant présentés sous forme d'articles, nous avons choisi de détailler dans la partie « Matériels et Méthodes » les choix et déploiement des outils de bio-informatique que nous avons effectués tout au long de ce travail. En effet, ces outils évoluent constamment et rapidement. Entre le début et la fin des travaux présentés, de nombreux outils et méthodes d'analyse bio-informatique ont évolué. Leur choix ou sélection au fil de notre travail est résumé ci-après. Ces outils nous ont permis d'effectuer de façon efficiente l'analyse des données des mycobiotés et microbiotes, leur interprétation couplée aux données biocliniques et l'étude de leur évolution dans l'analyse longitudinale des patients sous Lumacaftor/Ivacaftor.

Enfin, les approches initiées pour explorer *in vitro* l'effet du microbiote intestinal sur les cellules épithéliales intestinales humaines par culture monocouche ou coculture *in vitro* de cellules CACO2 sont présentées dans une seconde partie, les autres éléments du matériel et méthode étant détaillés dans chaque article.

## **1 METHODES D'ANALYSE METAGENOMIQUE**

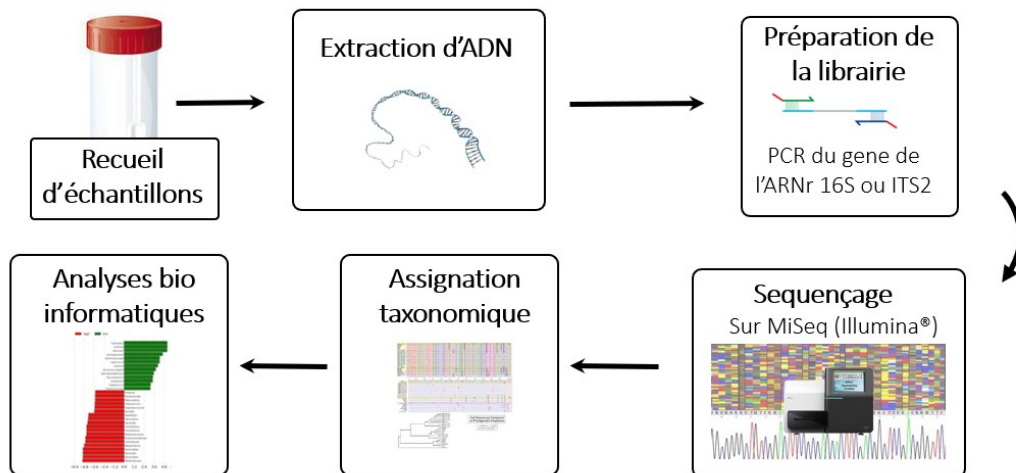
---

### **1.1 METAGENOMIQUE CIBLEE**

#### **1.1.1 Principes**

Afin d'étudier la diversité des espèces présentes dans un milieu donné, différentes méthodes de métagénomique ont émergé, permettant de caractériser les communautés microbiennes présentes en séquençant leur génome et en s'affranchissant ainsi de l'étape de culture (Brooks et al., 2015; Vandenberg et al., 2019). Les méthodes de métagénomique ciblée, ou métabarcoding, amplifient et séquent un locus spécifique (Figure 8), afin de discriminer et répertorier les espèces, tandis que les méthodes « shotgun » fragmentent et séquent l'ADN total sans étape d'amplification par PCR préalable. La métagénomique « shotgun » permet de caractériser la composition taxonomique, mais aussi la fonction des gènes présents dans le milieu. Cependant, cette dernière méthode comporte de nombreux défis techniques et bio-informatiques, notamment pour l'alignement des reads.

Les méthodes de métagénomique ciblée ont connu un essor depuis le début des années 2010, et constitue actuellement la méthode de métagénomique la plus utilisée pour analyser les microbiotes. Nous avons donc utilisé cette approche pour nos travaux.



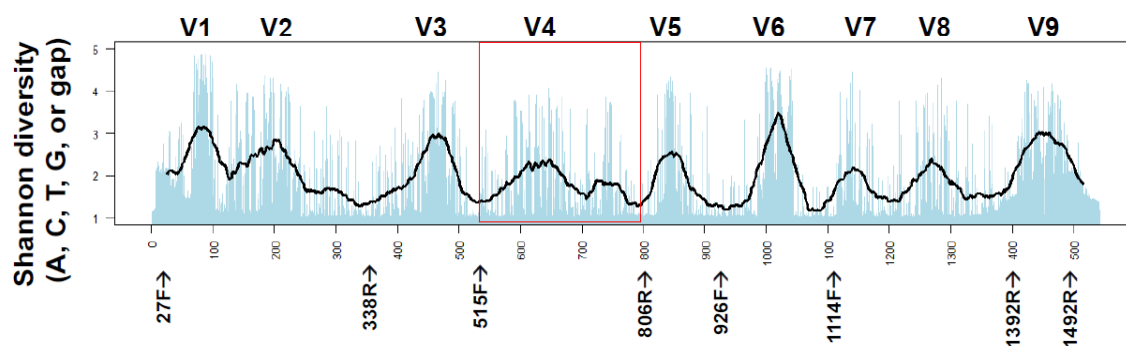
**Figure 8. Les différentes étapes de métagénomique ciblée**

### 1.1.2 Choix des séquences d'intérêt et des amorces.

Le choix précis des séquences d'intérêt est essentiel pour la métagénomique ciblée. Il convient de choisir des gènes et loci présentant des régions hypervariables, permettant de discriminer les différents taxons, comprises entre des régions hautement conservées entre les taxons pour permettre l'amplification du locus cible chez une majorité d'espèces avec des amorces universelles (Figure 9). De plus, le fragment amplifié doit être bien référencé dans les bases de données utilisées pour l'assignation (par exemple Greengenes, Silva ou NCBI pour les bactéries et UNITE, ISHAM ou RDP pour les champignons) et sa longueur être compatible avec les technologies de séquençage utilisées. Pour un séquençage réalisé avec un MiSeq en 2x250 paire de bases, Illumina recommande l'amplification d'une région d'intérêt d'environ 450 paires de bases pour avoir un chevauchement d'au moins 50 nucléotides.

Les amorces sens 341F de séquence CCTACGGGNGGCWGCAG (forward) et antisens 805R de séquence GACTACHVGGGTATCTAATCC (reverse) ont donc été utilisées pour les données bactériennes (Klindworth et al., 2013). Ciblant spécifiquement les régions V3 et V4 du gène codant pour l'ARN 16S, elles amplifient une région d'environ 465 pb.

Pour les données fongiques, les amorces forward-ITS7F de séquence GTGARTCATCGAATCTTT et reverse-3271R de séquence GATATGCTTAAGTTCAGCGGGT ciblent la région ITS2. Cette région a une taille extrêmement variable selon les espèces (Ihrmark et al., 2012).



**Figure 9. Les différentes régions hypervariables du gène de l'ARNr 16S**

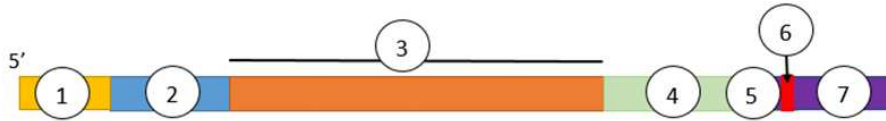
Cartographie des régions hypervariables de V1 à V9 et de l'emplacement des différentes amorces (flèches noires). L'indice de Shannon (indice de diversité) de chaque base est indiqué par les histogrammes bleus. La moyenne de cet indice, sur une fenêtre de 50 paires de bases, est indiquée par la ligne noire, définissant ainsi les régions hypervariables du gène de l'ARNr 16S. La région séquencée dans notre étude est délimitée par le carré rouge, d'après (Lundberg et al., 2013).

### 1.1.3 Extraction des ADN

Les extractions des ADN ont été faites à l'aide des kits commercialisés PowerSoil (pour les crachats) et PowerFecal (pour les selles) de chez Qiagen® (Lim et al., 2020), qui comprennent une lyse chimique (enzymatique) associée à une lyse mécanique, comme recommandé pour l'étude du microbiote et du mycobiote (Santiago et al., 2014; Costea et al., 2017).

### 1.1.4 Préparation des bibliothèques

Les étapes suivantes ont été réalisées soit au tout début par la société Genoscreen (Soret et al.) et récemment sur la Plateforme Génome Transcriptome de l'Université de Bordeaux, à l'INRAE Pierroton (Cestas), sous la coordination d'Erwan Guichoux. Une fois l'ADN extrait, la région d'intérêt (V3-V4 ou ITS2) est amplifiée par Polymerase Chain Reaction (PCR) afin de synthétiser une quantité suffisante pour l'étape de séquençage haut-débit et insérer les « sequencing primers », qui permettent d'initier l'élongation lors du séquençage (Figure 8). Une seconde PCR, dite de « Multiplexage », était ensuite réalisée pour insérer les adaptateurs requis par la méthode Illumina et pour taguer par un index spécifique chaque prélèvement (Figure 10).

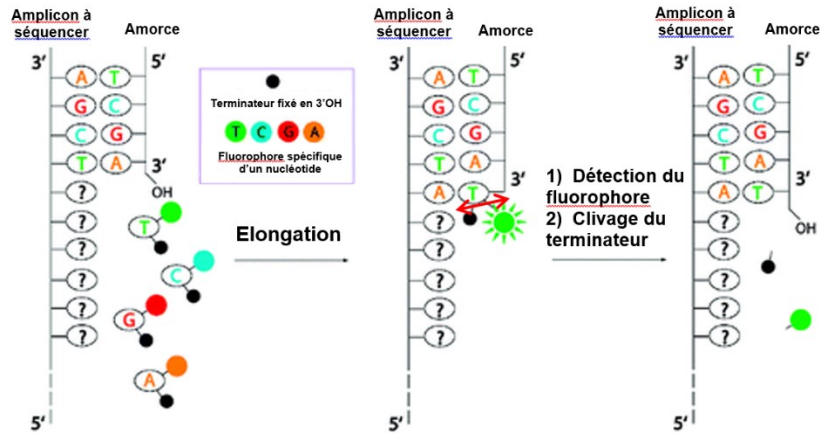


- 1 : Séquence qui va se lier sur la flowcell (sur la séquence P5)
- 2 : Fragment complémentaire du « Sequencing primer 1 », utilisé pour le séquençage du fragment
- 3 : Fragment d'intérêt comprenant la région hypervariable à séquencer
- 4 : Fragment complémentaire du « Sequencing primer 2 », utilisé pour le séquençage du fragment
- 5 : Fragment complémentaire de l' « indexing primer », utilisé pour la lecture de l'index
- 6 : Index (6 nucléotides)
- 7 : Séquence complémentaire de la partie qui va se lier sur la flowcell (sur la séquence P7)

**Figure 10. Schéma d'un amplicon final sens**

### 1.1.5 Séquençage

La technologie du MiSeq par Illumina® en 2x250 paires de bases a été utilisée. Le séquençage se fait en « paired-end » : les deux extrémités du même fragment sont séquencées et le séquençage génère donc 2 fichiers Fastq (avec les reads R1 et R2). Les séquenceurs Illumina® utilise la technique de séquençage par terminateurs réversibles (sequencing by synthesis en anglais) (Guo et al., 2010). Le séquençage se fait par cycle. Chaque cycle correspond à l'incorporation d'un nucléotide marqué en 3'OH par un fluorophore (d'une couleur spécifique à chacune des 4 bases A, T, C, ou G). Ce fluorophore permet d'identifier la base incorporée et d'empêcher la suite de l'élongation. Une fois le cycle fini et le fluorophore lu, le terminateur est enlevé par ultraviolet violet, libérant ainsi le groupement 3'OH et permettant l'incorporation du nucléotide suivant (Figure 11).



**Figure 11. Principe du séquençage par terminateurs réversibles**

D'après Guo *et al.*, 2010

### 1.1.6 Analyse des données de séquençage et assignation taxonomique

Après vérification de la qualité de l'expérimentation (ou run de séquençage), les données de séquençage (ou raw data) sont analysées à l'aide d'outils bio-informatiques pour vérifier la qualité des séquences, assembler les reads Forward (R1) et Reverse (R2), éliminer les chimères (séquences produites par erreur) et enfin assigner les séquences à une taxonomie.

Depuis quelques années, plusieurs méthodes d'analyses de métagénomique ciblée existent pour assigner des séquences d'ADN à une taxonomie donnée (Figure 12) (Callahan *et al.*, 2017; Z *et al.*, 2018). Deux approches sont couramment utilisées pour caractériser les communautés microbiennes en résumant les séquences brutes lues dans un tableau de comptage des séquences : la méthode dite par clustering et la méthode dite par denoising.

La première méthode développée, à savoir la méthode par clustering, est basée sur la notion d'Unité Taxonomique Opérationnelle (ou Operational Taxonomic Unit, OTU). Les séquences sont regroupées en OTU sur la base d'une matrice de distance avec un seuil de similarité spécifié (généralement 97 %), ce qui réduit le taux d'erreurs interprétées à tort comme une variation biologique (Acinas *et al.*, 2005; Glassman and Martiny, 2018). Différentes méthodes de regroupement existent : « de novo » (les séquences sont regroupées en OTU en fonction de leur similarité 2 à 2) ; « closed-reference » (les séquences sont alignées et comparées aux séquences d'une base de données de référence et assignées au cluster dont la séquence est la plus proche) ; « open-reference » (les séquences sont regroupées avec la méthode « closed-reference », les séquences restantes sont regroupées avec la méthode « de novo »). Deux outils bio-informatiques



majeurs sont largement utilisés pour permettre la création des OTUs : QIIME et MOTHUR. Cependant, les OTU sous-estiment la diversité, en regroupant des séquences réellement différentes, mais avec un taux de similarité supérieur au seuil choisi. De plus, il a été reproché à ces méthodes de ne pas utiliser les scores de qualité des séquences.

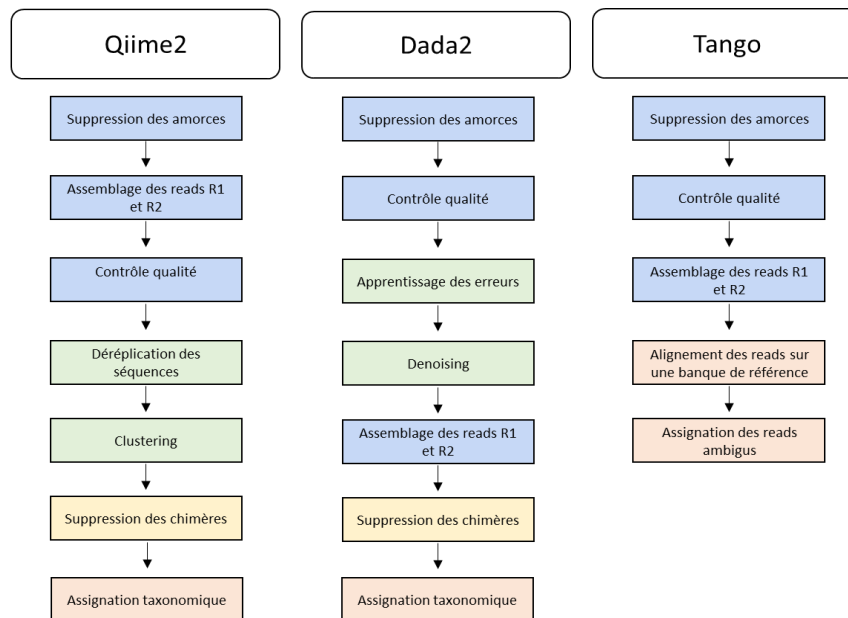
Plusieurs méthodes basées sur le partitionnement, plutôt que le regroupement, ont donc émergé. La plus connue actuellement est DADA2 (Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2) (Mandal et al., 2015; Callahan et al., 2016a). D'une façon générale, ces méthodes se basent sur deux postulats :

- les abondances des reads : les reads provenant d'une séquence biologique réelle ont une plus grande probabilité d'être observés que des reads avec des erreurs de PCR/séquençage (Callahan et al., 2017).

- les distances : les reads peu abondants et dont seulement quelques bases diffèrent d'un read plus abondant sont probablement des reads avec insertions d'erreur ou de séquençage.

L'algorithme DADA2 (Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2) se base donc sur les critères d'abondance, de distance et aussi de qualité. Lorsque deux séquences diffèrent de seulement quelques nucléotides, si une des 2 séquences est peu abondante et que le score de qualité de cette séquence est faible au niveau des nucléotides qui diffèrent, alors la séquence sera attribuée à la séquence la plus abondante, sinon elle constituera une nouvelle séquence biologique. Chaque séquence biologique est définie comme un ASV (Amplicon Sequence Variant). Un consensus croissant s'est notamment dégagé sur le fait que des méthodes de denoising, comme DADA2, permettent une meilleure évaluation de la diversité et permettent d'améliorer la résolution des taxons de basse fréquence, par rapport aux méthodes par clustering (OTU) (Callahan et al., 2017).

D'autres méthodes existent, telles que les méthodes dites d'« assignment first », qui assignent chaque séquence à une taxonomie. La méthode de Tango développée partiellement par Laboratoire Bordelais de Recherche en Informatique (CNRS/LaBRI, Université de Bordeaux) se base sur cette approche (Alonso-Aleman et al., 2014). Les séquences sont alignées sur une base de référence avec des outils d'alignement comme BWA ou bowtie. Cependant, les séquences de certains organismes étant proches, les séquences de certains reads, nommés reads ambigus, peuvent s'aligner sur des séquences de référence d'organismes différents. L'algorithme utilise alors un arbre phylogénétique pour trouver l'assignation optimale de chaque read ambigu. L'objectif étant d'assigner le read à un seul nœud de l'arbre phylogénétique.



**Figure 12. Représentation des différentes étapes des pipelines pour chaque méthode de traitement et assignation des reads**

## 1.2 APERÇU DES ANALYSES STATISTIQUES UTILISEES EN METAGENOMIQUE CIBLEE

D'une façon générale, les approches actuelles sur le microbiote sont dominées par deux questions : (i) caractériser la relation entre la composition d'un microbiote et l'état de santé de l'hôte ou l'évolution d'une maladie, et (ii) comprendre les facteurs génétiques, cliniques, thérapeutiques, biologiques et/ou environnementaux qui impactent la composition du microbiote. Les objectifs finaux de ces approches sont de pouvoir prédire, prévenir, diagnostiquer et/ou améliorer la prise en charge thérapeutique des pathologies par la modulation du microbiote. Cependant, les interactions entre l'environnement, le microbiote et son hôte sont dynamiques et complexes, nécessitant des approches statistiques adaptées dans le contexte des analyses de données de grande dimension que représente le microbiote.

En métagénomique, l'hypothèse statistique nulle est utilisée et peut-être : il n'y a pas de différence de composition microbienne entre les différents groupes étudiés (par exemple, malade/non malade, ou exposé ou non à un facteur, avant/après traitement...). Pour tester cette hypothèse, différents critères de jugements peuvent être pertinents, principalement : l'alpha-

diversité<sup>4</sup>, la bêta-diversité<sup>5</sup> ou l'abondance de micro-organismes spécifiques ; ces critères conditionnent notamment le choix des tests statistiques à utiliser. Nous allons donc exposer les principales approches statistiques que nous avons appréhendées au cours de notre travail et qui permettent de comparer la composition du microbiote entre différents groupes, voire longitudinalement, dans le temps.

### 1.2.1 Méthodes statistiques standards

Une première approche peut être effectuée en comparant les indices d'alpha diversité entre les groupes. Selon que ces données soient normalement ou non distribuées, et en fonction du nombre de conditions/groupes expérimentaux, différents tests peuvent être utilisés.

Le t-test et son homologue non paramétrique, le test de Wilcoxon-Mann-Whitney, sont largement utilisés dans les études microbiologiques pour comparer les variables continues entre deux groupes, comme l'alpha-diversité *a priori* (Xia and Sun, 2017). Ces tests ont également été utilisés pour comparer l'abondance relative de différents taxons entre deux groupes, mais il convient de réaliser une correction de tests multiples (par exemple, méthode de Benjamini-Hochberg) (Benjamini and Hochberg, 1995).

Lorsque plus de deux groupes sont comparés, l'ANOVA ou son équivalent non paramétrique, le test de Kruskal-Wallis, sont alors employés. Enfin, un test du Chi<sup>2</sup> peut s'utiliser pour comparer les données catégorielles du microbiome, comme par exemple des différences entre les groupes du taux de présence d'un taxon spécifié *a priori* (Xia and Sun, 2017).

### 1.2.2 Outils statistiques multivariés

Les associations entre des covariables (facteurs cliniques, thérapeutiques, biologiques, génétiques, environnementaux ...) et la composition des communautés microbiennes peuvent être étudiées par différentes méthodes ou modèles statistiques multivariés. La plupart des outils statistiques multivariés utilisés dans l'étude du microbiome sont d'ailleurs issus des domaines de la recherche écologique et des sciences de l'environnement (Xia and Sun, 2017).

---

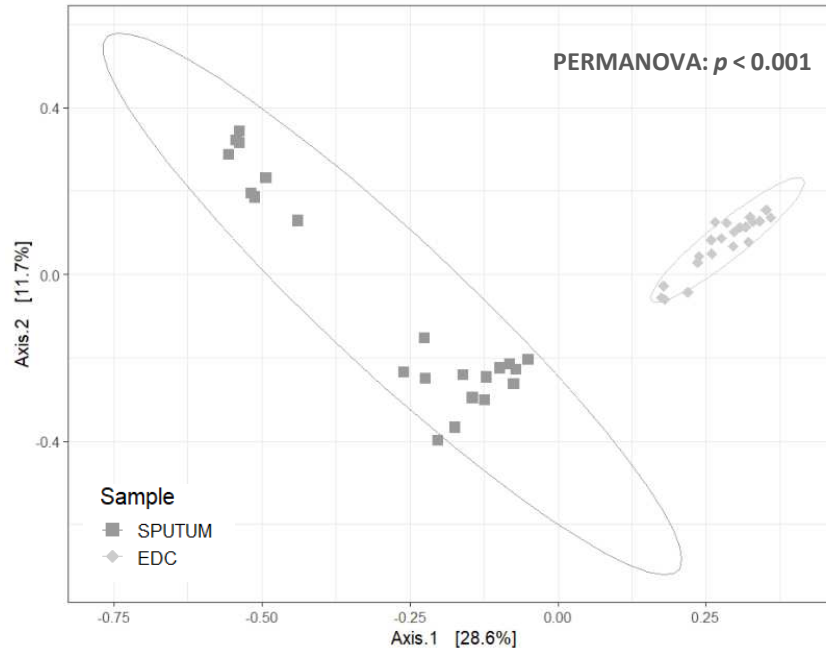
<sup>4</sup> L'alpha-diversité représente le nombre d'espèces différentes d'une communauté donnée. Par exemple le nombre de plantes d'une forêt ou le nombre de microorganismes au sein des voies aériennes. Plusieurs indices peuvent être utilisés, dont l'indice de Shannon qui permet d'exprimer la diversité en prenant en compte le nombre d'espèces et l'abondance des individus au sein de chacune de ces espèces. Cet indice est donc sensible aux variations des espèces les plus rares. L'indice de Simpson quant à lui est plus sensible aux variations des espèces les plus abondantes.

<sup>5</sup> La bêta-diversité consiste à comparer la diversité des espèces entre écosystèmes, comme par exemple entre deux groupes de patients (malades *versus* sains).

En raison de la grande dimensionnalité, de la non-normalité et de la structure phylogénétique des données du microbiote, il est difficile de tester directement l'association entre les covariables potentielles et la composition du microbiome en utilisant simplement les abondances relatives des OTU et des ASV. En général, les analyses multivariées utilisent une méthode prenant en compte la relation phylogénétique des éléments de mesure de la distance (par exemple, Bray-Curtis), puis comparent les distances estimées entre les échantillons. Plusieurs tests de comparaisons sont disponibles. Les plus utilisés dans la métagénomique sont l'analyse multivariée des variances par permutations (PERMANOVA) et l'analyse des similarités entre groupes (ANOSIM).

La méthode PERMANOVA est actuellement l'une des méthodes non paramétriques les plus utilisées pour ajuster des modèles multivariés aux données microbiologiques. Elle a été proposée par Anderson et McArdle pour appliquer la puissance de l'ANOVA à des ensembles de données écologiques multivariées (Anderson, 2001; McArdle and Anderson, 2001). PERMANOVA est généralement utilisée avec une méthode de mesure de distance de bêta-diversité, telles que la mesure de distance UniFrac ou de dissimilarité de Bray-Curtis, pour tester l'hypothèse nulle se référant au fait que les centroïdes et la dispersions sont équivalents pour tous les groupes (Figure 13) (Yan et al., 2016; Vandenberg et al., 2020a).

ANOSIM est une autre méthode multivariée répandue dans les études microbiologiques. Elle est utilisée pour comparer la similarité au sein d'un groupe et entre les groupes, en utilisant également une mesure de distance (McCord et al., 2014). Elle teste l'hypothèse nulle selon laquelle la similarité moyenne entre les échantillons au sein d'un groupe est la même que la similarité moyenne entre les échantillons appartenant à des groupes différents (Giatsis et al., 2014).



**Figure 13. Comparaison de la composition de la communauté fongique d'expectorations (« Sputum », en gris foncé) de patients asthmatiques avec celle de pièges à poussière (« EDC », en gris clair) laissés ouvert un mois dans la chambre des patients.**

La figure représente une analyse en composante principale (PCoA) basée sur la mesure de dissimilarité de Bray-Curtis entre les échantillons. L'analyse des centroïdes et de la dispersion des échantillons des deux groupes (« Sputum » et « EDC ») montre deux groupes bien distincts, avec un PERMANOVA significatif ( $p < 0,001$ ), et illustre une signature individuelle des expectorations par rapport aux pièges à poussières. D'après Vandenberg *et al.*, 2020.

### 1.2.3 Modèles statistiques pour l'étude d'abondance différentielle

#### 1.2.3.1 Modèles utilisant la distribution binomiale négative

Dans les études de métagénomique, après avoir estimé la composition d'une communauté microbienne à un niveau taxonomique donné, les chercheurs sont souvent intéressés à identifier les taxons (OTU ou ASV) qui présentent une abondance différentielle entre les différents groupes, c'est-à-dire avec une proportion moyenne significativement différente entre deux ou plusieurs groupes d'échantillons.

En métagénomique, un échantillon peut être considéré comme une population de fragments d'ADN, et chaque taxon comme un sous-ensemble de fragments d'ADN pour lesquels la taille de la population doit être estimée. Ainsi, on peut considérer le séquençage d'un échantillon d'ADN comme un échantillonnage aléatoire (tirages répétés) de chacun de ses fragments d'ADN, dans le

but d'estimer l'abondance relative de chaque taxon dans la population (McCarthy et al., 2012). Si chaque fragment d'ADN a la même chance d'être sélectionné pour le séquençage, et que les fragments sont sélectionnés indépendamment, alors le nombre de lectures pour un taxon donné devrait suivre une distribution de Poisson<sup>6</sup>. Cependant, une des conditions d'application d'un modèle de distribution de Poisson est l'égalité de la moyenne et de la variance, or, dans le cas de données de métagénomique, cette condition n'est pas respectée du fait de la surdispersion<sup>7</sup> des données. Pour prendre en compte cette surdispersion, des outils statistiques basés sur la distribution binomiale négative<sup>8</sup> ont été développés tout d'abord dans le domaine de la transcriptomique, avant d'être extrapolés à la métagénomique (Xia et al., 2018). Les plus utilisés et recommandés sont actuellement les modèles edgeR ou DESeq2 (McMurdie and Holmes, 2014). edgeR et DESeq2 diffèrent principalement dans la façon dont ils normalisent les données. edgeR peut être mis en œuvre avec différentes méthodes de normalisation, mais la plus recommandée est la méthode TMM (Trimmed Mean of M-values), qui tente de surmonter le problème des données compositionnelles<sup>9</sup> de séquençage ("la proportion de lectures attribuées à un taxon donné dans un échantillon dépend de l'abondance de l'ensemble des taxons de l'échantillon et non de la seule abondance du taxon"). DESeq2 tient compte des différences de profondeur de séquençage entre les échantillons.

#### 1.2.3.1.1 edgeR

Le paquet R *edgeR* reprend le modèle développé par Robinson et Smyth (Robinson and Oshlack, 2010; Robinson et al., 2010). Le processus d'analyse comprend trois procédures

---

<sup>6</sup> Le modèle de Poisson est le modèle le plus populaire pour les données de comptage. Il s'agit d'une loi de probabilité qui décrit le comportement du nombre d'événements se produisant dans un intervalle de temps donné, si ces événements se produisent avec une fréquence moyenne connue et de manière indépendante. Par exemple, une loi de Poisson peut être utilisée pour estimer la probabilité que  $k$  voitures passent dans une rue donnée pendant une journée, sachant qu'en moyenne,  $\lambda$  voitures passent par heure.

<sup>7</sup> On parle de surdispersion lorsque la variance croît plus vite que la moyenne des comptages. C'est le cas en métagénomique, lorsqu'un taxon est absent chez beaucoup d'individus mais peut être présente en plusieurs milliers d'exemplaires dans un prélèvement. La variance est alors beaucoup plus grande que la moyenne.

<sup>8</sup> La loi Binomiale Négative apparaît dans l'étude du nombre d'événements pouvant se réaliser dans le temps et qui n'ont pas la même probabilité de se réaliser. Elle autorise donc une plus grande hétérogénéité des individus, en prenant en compte un paramètre de dispersion supplémentaire, et s'ajuste donc mieux aux données indiquant une surdispersion.

<sup>9</sup> L'ensemble des proportions somme à 1.

principales, à savoir la normalisation, l'estimation de la dispersion et le test d'expression différentielle.

edgeR estime les changements relatifs des niveaux d'expression entre les conditions, mais n'estime pas directement les niveaux d'expression absolus. Ainsi, l'objectif de la normalisation utilisée dans edgeR est d'identifier et de supprimer les variations entre les échantillons liées aux biais techniques. Dans l'ensemble, la stratégie globale de normalisation utilisée dans edgeR consiste à choisir une base de référence appropriée, puis à exprimer le nombre d'échantillons par rapport à cette base de référence. Il existe plusieurs approches de normalisation applicables dans edgeR, sachant que la méthode par défaut est la méthode TMM (Trimmed Mean of M-values). Cette méthode de normalisation se base sur l'hypothèse selon laquelle la plupart des gènes ne sont pas différentiellement exprimés. Le facteur TMM est calculé pour chaque échantillon, l'un d'eux étant considéré comme l'échantillon de référence et les autres comme des échantillons tests. Pour chaque échantillon test, le facteur TMM est la moyenne pondérée des log-ratios entre ce test et la référence, après exclusion des taxons les plus abondants et des taxons ayant les plus forts log-ratios.

L'étape suivante consiste à estimer le paramètre de dispersion pour chaque taxon (OTU ou ASV), c'est-à-dire la variabilité biologique intra-groupe. Ensuite, l'abondance différentielle entre les deux groupes est testée en utilisant soit le test exact de Fisher ajusté avec la méthode de Benjamini-Hochberg, soit un modèle linéaire généralisé (GLM).

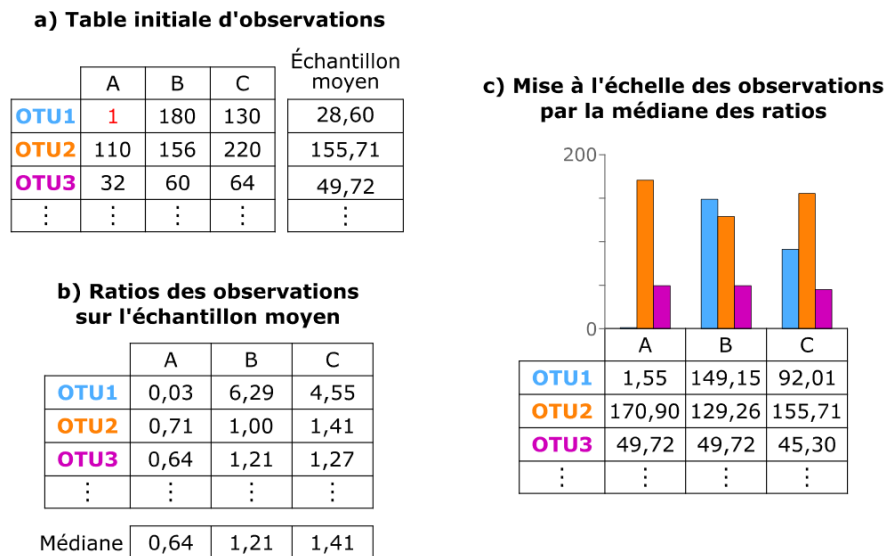
#### 1.2.3.1.2 DESeq2

DESeq est une autre technique de stabilisation de la variance permettant de modéliser les données métagénomiques sur dispersées, qui a été recommandée et adaptée pour les données de comptage de métagénomique (McMurdie and Holmes, 2014). La méthode DESeq2 a été publiée en 2014, mais l'ensemble est continuellement mis à jour (Love et al., 2014).

L'analyse d'expression différentielle avec DESeq2 comporte plusieurs étapes. La première étape est la normalisation du jeu de données pour tenir compte des différences de profondeur des échantillons, avec la construction d'un échantillon représentatif moyen, contenant la moyenne sur tous les échantillons du nombre de reads par taxon (OTU ou ASV) (Figure 14a). Ensuite, pour chaque observation, DESeq2 effectue le ratio entre le nombre de reads du contage initial et son équivalent dans l'échantillon moyen (Figure 14b). Enfin, pour chaque échantillon, chaque observation initiale est divisée par la médiane des ratios de l'échantillon (Figure 14c).

Les étapes suivantes sont l'estimation des dispersions pour chaque taxon puis la réduction des estimations de la dispersion des taxons vers les valeurs de dispersion attendues, et enfin l'application d'un modèle linéaire généralisé pour chaque taxon afin d'étudier leur abondance différentielle.

Une des limites de ces deux modèles est le taux élevé de fausses découvertes (Weiss et al., 2017).



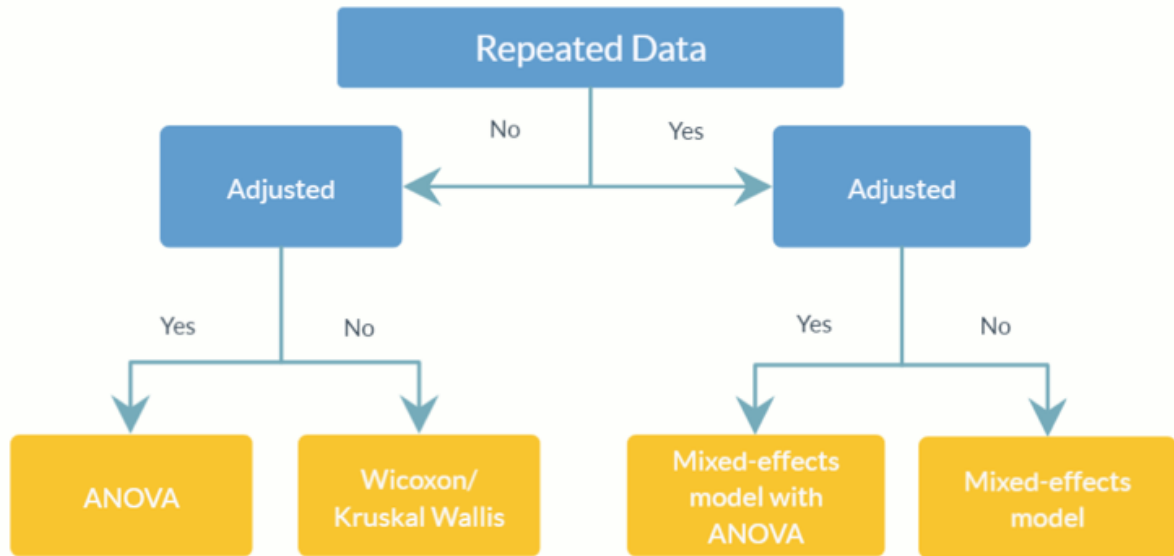
**Figure 14. Méthode de normalisation selon DESeq2, illustration tirée de la thèse de L. Siegwald « Solution d'amélioration des études de métagénomique ciblée » (2017).**

### 1.2.3.2 Modèle d'analyse des compositions de microbiote : ANCOM

ANCOM (Analysis of Composition of Microbiomes) est un algorithme développé pour tenir compte des contraintes de composition afin de réduire les fausses découvertes dans la détection des différences d'abondance des taxons microbiens (Figure 15) (Mandal et al., 2015). ANCOM permet aux chercheurs de comparer l'abondance des taxons microbiens dans deux ou plusieurs populations, notamment en détectant les tendances dans le temps pour des études longitudinales ou transversales, tout en ajustant les covariables si nécessaire. Basé sur les log-ratios de composition, la méthode ANCOM compare deux à deux le rapport logarithmique de l'abondance de chaque taxon à l'abondance de tous les taxons restants. Il s'agit d'une analyse stringente qui maintient un taux de fausses découvertes (FDR) bas pour toutes les tailles d'échantillons. Les



résultats sont donc considérés comme sûrs dans la littérature. Cependant, sa sensibilité est faible pour les petits jeux de données (< 20 échantillons par groupes). Une normalisation au préalable est nécessaire (tout en évitant la transformation en proportion (%)). La raréfaction préalable est ici plutôt déconseillée, mais peut être appliquée si les tailles de librairies sont très variables.

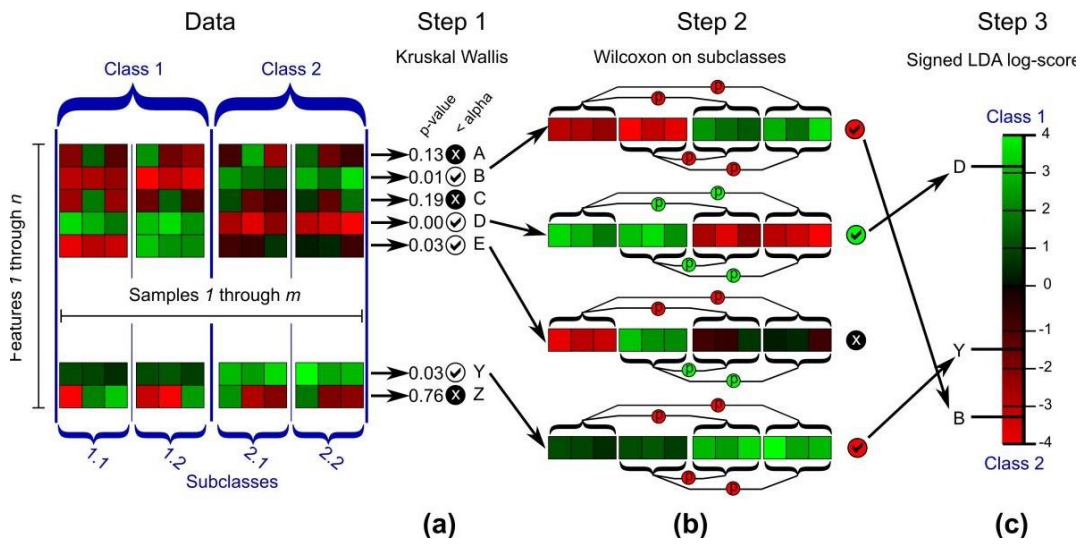


**Figure 15 : Tests utilisés dans la méthode ANCOM**

Source : <https://github.com/FrederickHuangLin/ANCOM>

### 1.2.3.3 Approche statistique et graphique d’expression différentielle de taxons entre plusieurs groupes ou conditions expérimentales : LefSe

L’analyse par linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) est un algorithme développé principalement pour les données de métagénomique de grande dimension contenant des abondances de taxons ou de gènes (Segata et al., 2011). La figure 16 est une représentation schématique des étapes statistiques et de calcul mises en œuvre dans LefSe. *In fine*, LefSE permet de représenter graphiquement les données de séquençage haut-débit en mettant en lumière les différences significatives entre les taxons (OTUs ou ASVs) des différents groupes analysés.



**Figure 16. Etapes statistiques utilisées dans LefSe, d'après Segata *et al.*, 2011**

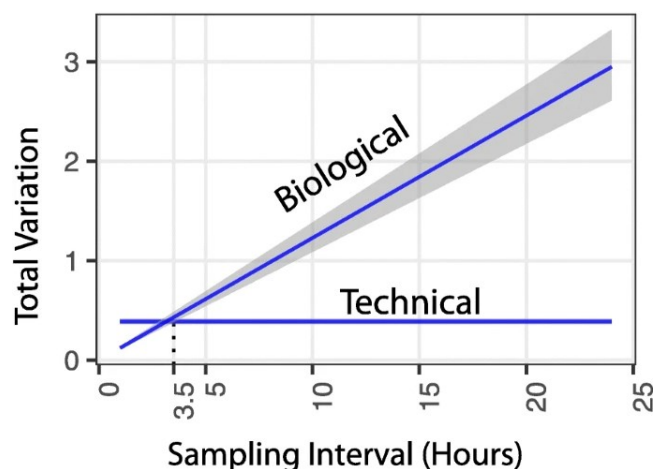
Les données d'entrée consistent en une collection de  $m$  échantillons (colonnes), chacun composé de  $n$  caractéristiques numériques (lignes, représentant chaque taxon par exemple, généralement normalisées par échantillon, le rouge représentant les valeurs élevées et le vert les valeurs faibles). Ces échantillons sont étiquetés avec une classe (prenant deux valeurs possibles ou plus) qui représente la covariable séparant les échantillons (par exemple traité/non traité) ; ils peuvent également avoir une ou plusieurs étiquettes de sous-classe reflétant des regroupements à l'intérieur de la classe. (a) Étape 1 consiste en un test de Kruskal-Wallis pour analyser toutes les caractéristiques (taxons), en vérifiant si les valeurs des différentes classes sont distribuées de manière différentielle. Les caractéristiques qui ne confirment pas l'hypothèse nulle sont analysées plus en détail à l'étape 2. (b) L'étape 2 utilise un test de Wilcoxon par paire pour vérifier si toutes les comparaisons entre les sous-classes au sein des classes concordent de manière significative avec la tendance du niveau de la classe. (c) Le sous-ensemble de vecteurs qui en résulte est utilisé pour construire un modèle d'analyse linéaire discriminante (LDA) à partir de laquelle la différence relative entre les classes est utilisée pour classer les caractéristiques (taxons). Le résultat final consiste donc en une liste de caractéristiques (taxons) qui sont discriminantes par rapport aux classes, cohérentes avec le regroupement des sous-classes au sein des classes, et classées selon la taille de l'effet avec lequel elles différencient les classes.

#### 1.2.3.4 Analyses longitudinales

La prise de conscience de la contribution des microbiotes dans la physiologie et de la santé humaines a conduit à étudier leur rôle dans le diagnostic, le traitement et la prévention des pathologies humaines (Ley et al., 2006; Marchesi et al., 2011; Human Microbiome Project Consortium, 2012). Ces approches sont étroitement liées à l'appréciation de la variabilité temporelle des communautés microbiennes et donc à des analyses longitudinales développées très récemment. L'avantage des études longitudinales est que le sujet est son propre témoin, diminuant ainsi l'impact de la variation intra-sujet bien connue et documentée dans les analyses du microbiote humain, et permettant ainsi d'identifier plus facilement l'évolution au cours du temps.

Cependant, l'analyse répétée dans le temps d'une communauté microbienne, parfois à intervalles variables, comporte des spécificités et des défis statistiques (Caporaso et al., 2011; David et al., 2014a, 2014b; Gerber, 2014; Faust et al., 2015; Silverman et al., 2018b).

En particulier, une tâche courante dans l'analyse des données microbiologiques longitudinales est d'inférer les trajectoires de la communauté. Par exemple, Caporaso *et al.* ont étudié la variabilité naturelle des microbiotes humains sur une période de deux ans (Caporaso et al., 2011). Cette analyse de l'évolution des communautés microbiennes nécessite des méthodes bio-informatiques et statistiques qui prennent en compte la variabilité biologique des microbiotes (c'est-à-dire le « signal »), mais aussi la variabilité technique (c'est-à-dire le « bruit », comme par exemple, la gestion des contaminations ou le sous-échantillonnage aléatoire) (Figure 17) (Silverman et al., 2018a; Äijö et al., 2018; Shenhav et al., 2019). Des mesures complémentaires telles que des répliquats ou de témoins positifs et négatifs peuvent également être utiles pour séparer le signal biologique du bruit technique.



**Figure 17 : Effet de la variation biologique (« signal ») et technique (« bruit ») à travers le temps, dans un modèle d'intestin artificiel avec recueil d'échantillon horaire.** Dans cet exemple, la variation biologique sera plus faible que la variation technique pour un intervalle d'échantillonnage inférieure à 3,5 heures. D'après Silverman *et al.* 2018.

Les études longitudinales du microbiote peuvent également inclure de nombreux modèles temporels différents tels que des effets cycliques (par exemple, les effets saisonniers ou circadiens), des effets à long terme, ou même des effets retardés sur les changements de la composition de la communauté microbienne (par exemple, perturbations post-antibiotiques). C'est le cas de l'étude de Yassour *et al.* (Yassour et al., 2016), qui se concentre sur les effets dans le

temps d'un facteur externe (la prise d'antibiotiques) sur le microbiome intestinal. La modélisation du ou des facteur(s) externe(s) nécessite des modèles dynamiques capables d'inclure des covariables et des effets potentiellement décalés ou non linéaires sur le microbiote (Gerber et al., 2012; Gibson and Gerber, 2018).

De grandes études longitudinales ont également été réalisées dans le but d'étudier la valeur prédictive de la composition du microbiote dans la survenue d'une maladie (par exemple, une poussée de Maladie Inflammatoire Chronique Intestinale (MICI) ou dans la réponse à un traitement (Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium, 2014). Toutes ces questions nécessitent des modèles prédictifs qui peuvent prévoir les compositions microbiennes futures en fonction d'une composition antérieure (Sankaran and Holmes, 2017; Shenhav et al., 2019).

Dans ces différents exemples, l'analyse statistique doit prendre en compte plusieurs éléments sur le plan statistique. Tout d'abord, les observations ne sont pas indépendantes, puisqu'il y a par définition plusieurs mesures au cours du temps pour un même individu. Cela nécessite donc d'inclure la corrélation entre les mesures. Il faut également prendre en compte les données manquantes et les perdus de vue. De plus, il peut exister un mélange de données fixes (sexe, antécédents ...) et de données évoluant au cours du temps (activité de la maladie, traitement, environnement, ...).

Etant donné que la majorité des études microbiologiques longitudinales réalisées à ce jour font appel au séquençage à haut débit, il faut prendre en compte également les biais liés à cette technique, qui ne se limitent pas aux mesures longitudinales (Brooks et al., 2015). Un des biais consiste au sous-échantillonnage aléatoire des échantillons. En effet, la préparation de la librairie correspond à une procédure séquentielle où, à chaque étape, l'ADN est sélectionné au hasard, traité, puis inclus dans l'étape suivante. Le caractère aléatoire de ce processus introduit une certaine incertitude dans les mesures des communautés microbiennes et entraîne une compétition entre les taxons pour être comptés : la surreprésentation d'un taxon induisant une sous-représentation des autres taxons (Figure 18 et 19). Pour prendre en compte ces biais d'échantillonnage, deux solutions standard consistent soit à réaliser des répliquats techniques, soit à prélever des échantillons plus fréquemment. Si la première solution peut être facilement réalisable, la seconde est plus contraignante et nécessite que les trajectoires longitudinales varient régulièrement et lentement par rapport à la fréquence d'échantillonnage. Si l'incertitude dans l'estimation de l'abondance relatives des taxons a été étudiée et semble exister sans être pour autant un frein majeur à l'analyse du microbiote humain (Ji et al., 2019), elle doit également être prise en compte dans les analyses (Gloor et al., 2016). Les modèles basés sur la distribution

multinomiale<sup>10</sup> est l'exemple d'un tel modèle (Silverman et al., 2018b). Ils traitent l'incertitude des comptages plutôt que de transformer directement les comptages en abondances relatives, et permettent également de modéliser la concurrence entre les taxons plutôt que de traiter les comptages de chaque taxon indépendamment. De plus, la distribution multinomiale peut également modéliser les valeurs zéro excédentaires qui peuvent être dues à la surreprésentation d'un taxon entraînant la chute des autres taxons en dessous de la limite de détection du séquençage. Un exemple de ce type de modèle est la méthodologie ANCOM-BC (pour Analyse des compositions des microbiomes avec correction du biais) très récemment proposée par Lin *et al.*, incluse dans le package R *ANCOMBC*, qui estime la part d'échantillonnage et corrige le biais induit par les différences inter-échantillons (Lin and Peddada, 2020).

Si la distribution multinomiale peut aider à prendre en compte l'incertitude découlant de l'échantillonnage aléatoire, elle ne suffit pas à elle seule à modéliser d'autres sources de variation technique des données observées. Des études ont montré que de nombreuses étapes, notamment l'extraction de l'ADN, l'amplification lors de la PCR ciblée, le séquençage des amplicons, ou même le prélèvement et le stockage des échantillons, peuvent avoir un impact sur la composition microbienne mesurée (Zhou et al., 2011; Kennedy et al., 2014; Rosenthal et al., 2014; Brooks et al., 2015; Wagner Mackenzie et al., 2015; Sinha et al., 2017; Lim et al., 2018). La mesure et la correction des biais techniques sont donc des questions cruciales en métagénomique, mais peu de solutions existent à ce jour. Des travaux notables sur le sujet méritent d'être cités pour la gestion des contaminants et/ou « bruit de fond » en séquençage haut débit, et ont donné lieu aux packages *decontam* et *microDecon* sur R (Davis et al., 2018; McKnight et al., 2019). Des modèles statistiques tiennent également compte de ces autres sources de variabilité, comme la distribution multinomiale de Dirichlet<sup>11</sup> (en anglais, Generalized Multinomial-Dirichlet) (Silverman et al., 2018b).

---

<sup>10</sup> La loi multinomiale correspond au résultat d'un certain nombre de tirages indépendants d'une variable aléatoire avec un nombre fini de valeurs possibles et une probabilité fixe associée à chaque valeur. Elle modélisera par exemple le résultat de  $N$  observations pour lesquelles  $k$  valeurs sont possibles. Un exemple simple est la modélisation de  $N$  jets d'un dé à six faces.

<sup>11</sup> La distribution multinomiale de Dirichlet est une extension multivariée de la distribution bêta-binomiale.

La distribution bêta-binomiale quant à elle modélise le nombre de « succès » obtenu pour  $n$  tirages d'une variable de Bernoulli (une variable aléatoire qui n'admet que deux issues : « succès » ou « échec ») dont le paramètre aléatoire change à chaque tirage et suit une loi bêta.

La loi bêta-binomiale peut être illustré par un modèle d'urne contenant  $\alpha$  boules rouges et  $\beta$  boules noires. On effectue alors des tirages aléatoires. Après chaque tirage, on remplace la boule et on ajoute une boule de la même couleur. Si on répète cette opération  $n$  fois, alors la probabilité de tirer  $\kappa$  boules rouges suit une loi bêta-binomiale de paramètres  $n$ ,  $\alpha$  et  $\beta$ . Il est à noter que si après les tirages on remplace seulement la boule tirée, alors la loi est binomiale.

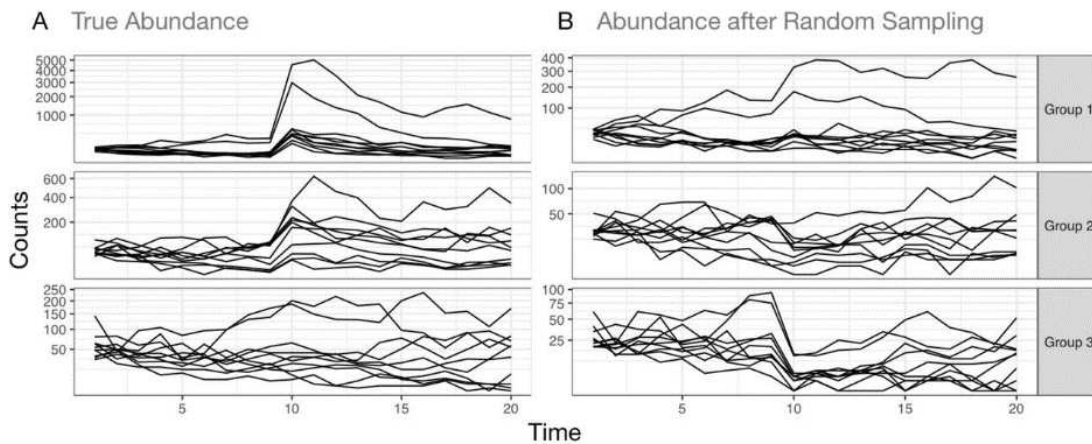
La capture d'autres sources de biais techniques comme le biais d'extraction de l'ADN ou le biais de la PCR reste un problème en suspens à ce jour, même si plusieurs études se sont penchées sur ces questions (Ji et al., 2019; Angebault et al., 2020). Cependant, les biais systématiques, contrairement aux erreurs liées au sous-échantillonnage aléatoire, peuvent être mis de côté dans de nombreuses situations où les objectifs spécifiques de l'étude ne sont pas affectés par cette variation technique si elle est considérée constante pour tous les échantillons. Par exemple, si le but d'une étude est d'identifier comment la structure de la communauté change au fil du temps, un biais systématique tel que la sous-représentation constante des actinobactéries dans toutes les données observées, peut ne pas affecter les résultats dans leur globalité. En revanche, si l'objectif d'une étude est de déterminer quel taxon est le plus abondant à un moment donné, cette sous-représentation peut affecter significativement l'inférence.

Un autre objectif commun est de déduire la relation entre des facteurs externes et les variations de compositions du microbiote. Par exemple, l'étude des différences d'évolution du microbiote entre un groupe de patients traités et un groupe contrôle ou non-traité. Cette étude nécessite une analyse longitudinale et l'incorporation d'une covariable binaire indiquant la prise ou non du traitement à l'étude. Le package R *metamicrobiomeR* propose à ce titre un modèle GAMLSS-BEZI (pour Generalized Additive Model for Location, Scale and Shape with zero inflated beta family) adapté à ce type de question biologique (Ho et al., 2019).

D'autres problématiques peuvent nécessiter d'inclure des métadonnées qui varient dans le temps, comme le pH de l'environnement, pour étudier l'impact de ces facteurs dynamiques sur une communauté microbienne. Il existe donc des méthodes statistiques qui permettent de prendre en compte des covariables externes dynamiques dans des analyses longitudinales. C'est le cas en particulier, des modèle MALLARD et Fido introduits par Silverman et al., qui permettent de faire varier les covariables externes dans le temps (Silverman et al., 2018a, 2019).

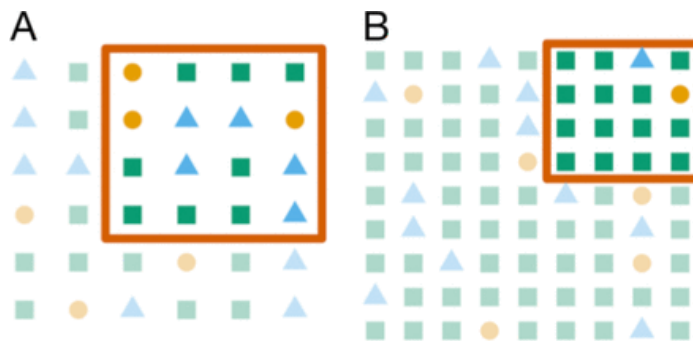
---

La distribution multinomiale est une extension multivariée de la distribution bêta-binomiale. Il n'y plus deux couleurs de boules dans l'urne, mais un nombre  $\chi$ . Notons que chaque tirage modifie la probabilité d'obtenir une couleur donnée. Cette modification s'atténue d'ailleurs avec le nombre de tirages, puisque l'effet marginal de l'ajout d'une boule supplémentaire diminue avec l'augmentation du nombre total de boules dans l'urne.



**Figure 18 : Les effets de l'échantillonnage aléatoire peuvent conduire à des conclusions erronées dans les études longitudinales.**

(A) Une étude longitudinale a été simulée pour suivre l'évolution d'un modèle microbien comprenant 3 groupes de 10 taxons sur 20 points dans le temps. Au temps 10, a été simulé l'administration d'un prébiotique. Les 10 taxons du groupe 1 ont été simulés pour croître rapidement en réponse au prébiotique. Les 10 taxons du groupe 2 ont été simulés pour croître modérément (la moitié de la réponse du groupe 1) en réponse au prébiotique. Les 10 taxons du groupe 3 ont été simulés pour ne pas répondre au prébiotique. (B) Chaque échantillon a été sous-échantillonné aléatoirement pour obtenir une profondeur de séquençage uniforme entre les 3 groupes. Ce type de sous-échantillonnage simule l'étape de mise en commun des échantillons effectuée dans le cadre du séquençage multiplex, où l'ADN de chaque échantillon est sous-échantillonné à une profondeur uniforme entre les échantillons, afin d'obtenir une couverture uniforme de la profondeur de séquençage dans tous les échantillons. Nous pouvons alors constater que les bactéries des groupes 2 et 3 affichent désormais un déclin marqué en réponse au prébiotique. De même que les bactéries du groupe 1 qui n'avaient pas l'effet post-prébiotique le plus important semblent ne plus présenter d'augmentation. Cet effet reflète la concurrence à compter qui est introduite par l'échantillonnage aléatoire. D'après Silverman *et al.*, 2018a.



**Figure 19 : L'échantillonnage aléatoire limite l'interprétation des abondances relatives des différents taxons microbiens.**

Les panneaux A et B illustrent l'échantillonnage (carré rouge) de deux écosystèmes microbiens avec trois types de bactéries (représentés par des cercles orange, des carrés verts et des triangles bleus). Dans le panneau A, la mesure de trois taxons orange ne reflète qu'une taille d'échantillon arbitraire (et non l'abondance absolue des taxons orange). De plus, mesurer trois taxons orange et cinq taxons bleus fournit un ratio qui ne reflète pas le ratio de l'ensemble de l'écosystème. Le panel B représente l'échantillonnage d'un écosystème identique à celui du panel A, mais avec une augmentation du nombre absolu de taxons verts, alors que le nombre de taxons orange et bleu est inchangé. Comme la taille globale de l'échantillonnage est fixe, il est probable qu'un échantillon aléatoire comptera moins de taxons orange et bleus et plus de taxons verts. Par rapport au panel A, les chercheurs peuvent alors être amenés à croire que le panel B contient plus de taxons verts et moins de taxons bleus et oranges alors qu'en réalité seul le vert a changé. D'après Silverman *et al.*, 2018a.

## 1.3 DEMARCHES UTILISEES DANS NOTRE TRAVAIL POUR L'ANALYSE LONGITUDINALE DU MICROBIOTE

### 1.3.1 Alpha diversité

Pour les analyses transversales à un point donné, un test de Wilcoxon-Mann-Whitney et des modèles de régression linéaire (fonction *lm* dans R) ont été utilisés pour comparer l' $\alpha$ -diversité entre les différents groupes de patients. Nous avons d'abord évalué les associations univariées entre les covariables pertinentes et l' $\alpha$ -diversité. Les covariables avec une valeur  $p \leq 0,1$  dans l'analyse univariée ont été utilisés pour construire les modèles multivariés, avec l' $\alpha$ -diversité comme variable à expliquer, en utilisant une méthode pas à pas descendante. Pour les analyses longitudinales, des modèles de régression linéaire à effets mixtes (LME)<sup>12</sup> avec les packages R *lme4* et *lmerTest* ont été utilisés pour tenir compte de l'échantillonnage en série.

### 1.3.2 Béta diversité

L'analyse permutacionnelle multivariée de la variance (PERMANOVA) du package *vegan* a été utilisée pour tester les dissimilarités de composition des communautés microbiennes ( $\beta$ -diversité) entre les groupes, sur la base de matrices de distance de Bray-Curtis (Oksanen et al., 2020). PERMANOVA teste l'hypothèse nulle selon laquelle les centroïdes et la dispersion des objets à travers plusieurs groupes sont équivalents, par conséquent, la signification indique que les objets se regroupent différemment (centroïde et/ou dispersion différents) à travers les groupes.

### 1.3.3 Différence d'abondance

Les taxons dont l'abondance différée entre deux groupes donnés ont été mis en évidence par DESeq2 (Love et al., 2014). Pour les comparaisons longitudinales, l'analyse DESeq2 était ajustée pour le patient (DiGiulio et al., 2015). En raison de la possibilité élevée de taux de faux positifs en utilisant DESeq2 (Weiss et al., 2017), nous avons également utilisé la méthode d'analyse de la composition des microbiomes (ANCOM) (Mandal et al., 2015), inclus dans le package R ANCOM 2.0, afin d'affiner notre identification des taxons qui différaient entre les groupes. Pour

---

<sup>12</sup> Par rapport au modèle linéaire (généralisé) classique, les modèles linéaires mixtes (GLMM dans la littérature anglo-saxonne) considèrent, en plus des effets fixes (exemple, le temps), des effets aléatoires (exemple, le patient) qui permettent de refléter la corrélation entre les unités statistiques. Ce type de données en cluster s'observe lorsque des unités statistiques sont groupées ensemble, en raison d'une corrélation intra-unité (données longitudinales) par exemple.



l'interprétation, la significativité était définie par un test  $W > 0,7$ <sup>13</sup>. Pour l'analyse multivariée, qui prend en compte des covariables externes, un modèle de régression linéaire multinomiale a été utilisé, avec la fonction *pibble*, du package R *fido* (Silverman et al., 2018a, 2019).

#### **1.4 SYNTHÈSE DES SCRIPTS R UTILISÉS AU COURS DE NOTRE TRAVAIL**

Pour plus de clarté dans l'exposé de notre travail, les différents scripts R, comprenant l'assignation avec DADA2, les étapes de preprocessing, analyses avec phyloseq notamment pour l'alpha-diversité, bêta-diversité et abondance différentielle, et les différents modèles longitudinaux que nous avons appréhendés et utilisés pour l'analyse de nos données sont détaillés dans les Annexes 1 à 4.

---

<sup>13</sup> L'ANOVA utilise le test W pour déterminer si la variabilité entre les moyens de groupe est plus grande que la variabilité des observations à l'intérieur des groupes. Si ce rapport est suffisamment élevé, vous pouvez conclure que toutes les moyennes ne sont pas égales.

## **2 EXPLORATION IN VITRO DE L'EFFET DU MICROBIOTE INTESTINAL SUR CELLULES EPITHELIALES HUMAINES (CACO2)**

---

En parallèle de l'analyse des données de séquençage haut débit et de leurs liens avec les données clinico-biologique des patients, nous avons initié une approche *in vitro* qui vise à étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les relations physiopathologiques entre microbiote, microbiote, et réponse inflammatoire et immune de l'hôte. Ainsi, lors de nos premiers travaux, le microbiote fécal d'enfants atteints de mucoviscidose a été étudié après extraction d'ADN et séquençage de la région V4 de l'ADNr 16S sur séquenceur MiSeq (Enaud et al., 2019). Les patients ont préalablement été répartis en deux groupes en fonction de leur taux de calprotectine fécale : sans inflammation digestive (patients avec une calprotectine fécale < 250 µg/g) et avec inflammation digestive (patients avec une calprotectine fécale > 250 µg/g). La composition du microbiote fécal a été comparée entre ces deux groupes et a montré une dysbiose associée à l'inflammation. Pour étayer ces données sur le plan physiopathologique, nous avons mis en place au sein du laboratoire un modèle de challenge *in vitro* de cellules épithéliales intestinales (lignée CACO2) par des filtrats de microbiotes. Après préparation des solutions pour le challenge, ce travail a fait l'objet du master 2 de Mme Candice Tetard, co-encadré par le Pr. Laurence Delhaes et moi-même.

### **2.1 SURNAGEANTS DE SELLES**

Deux cents cinquante microgrammes de 4 selles de patients sans inflammation intestinale (patients avec une calprotectine fécale < 250 µg/g) et ceux de 4 selles patients avec inflammation intestinale (patients avec une calprotectine fécale > 250 µg/g) ont été remises en suspension dans du BHI (Brain Heart Infusion) sous hotte PSM2. Après homogénéisation rapide (vortex, 5 min) puis centrifugation (10 000 G pendant 15 minutes à 4°C), les surnageants ont été filtrés à l'aide d'un filtre de 0,2µm.

Les surnageants filtrés de selles de quatre patients sans inflammation intestinale (patients avec une calprotectine fécale < 250 µg/g) ont été mélangés, afin de limiter l'effet de la variabilité inter-individuelle du microbiote, pour créer un pool « non inflammatoire » et stimuler les différentes cultures. Il en a été de même pour les surnageants filtrés de selles de quatre patients avec inflammation digestive (patients avec une calprotectine fécale > 250 µg/g), pour créer un pool « pro- inflammatoire ». Chacun des pools a été mis en culture pendant sur gélose chocolat et

gélose Sabouraud pour vérifier l'absence de croissance de microorganismes bactériens ou fongiques avant les challenges.

## **2.2 CULTURES CELLULAIRES**

### **2.2.1 CACO2**

La lignée de cellules épithéliales CACO2 est la lignée cellulaire la plus utilisée comme modèle intestinal. Cette lignée a été isolée à partir d'un adénocarcinome colorectal prélevé chez un patient caucasien de 72 ans. Une couche monocellulaire de CACO2 est utilisée ici comme modèle *in vitro* de barrière intestinale, car après confluence et différenciation les CACO2 sont capables d'exprimer les caractéristiques de cellules intestinales adultes comme les entérocytes.

Elles sont capables de produire des cytokines (notamment IL-6, IL-9, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL-15) (Verhoeckx et al., 2015), en réponse à d'autres cytokines et/ou à des stimuli tels que le lipopolysaccharide (LPS) présent sur les membranes de certaines bactéries (Maccaferri et al., 2012).

Des cellules CACO2 provenant du laboratoire INSERM U1053-UMR BaRITOn ont été utilisées comme modèle épithélial *in vitro*. Nous les avons cultivées dans du milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose Sigma) (Natoli et al., 2012) avec :

- 1% d'acides aminés non essentiels : MEM (non essential amino-acid solution – Sigma®)
- 1% d'antibiotiques : Penicillin-Streptomycin (Sigma®)
- 10% de sérum de veau foetal (Eurobio®)

Les cellules étaient contenues dans des flasques de 75cm<sup>2</sup> (Falcon®), conservées dans une étuve à 37°C et en présence de 5% de CO<sub>2</sub>, avec changement de milieu (200  $\mu$ L/ puit) 3 fois par semaine et passage dès que les cellules étaient à 50% de confluence (Natoli et al., 2012). Les cellules CACO2 ont été utilisées après 20 à 25 passages.

### **2.2.2 THP-1**

La lignée cellulaire THP-1 a été isolée à partir du sang périphérique d'un patient de 1 an atteint de leucémie aiguë monocyttaire. Elle est donc caractérisée en tant que lignée cellulaire monocyttaire (Tsuchiya et al., 1980). Ces cellules peuvent être cultivés *in vitro* jusqu'à 25 passages et peuvent se différencier en macrophages sous traitement au phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA) (Baxter et al., 2020).

Des cellules THP-1, provenant de l'UMR 516 - Immunoconcept Bordeaux, ont été utilisées en co-culture avec les cellules CACO2. Jusqu'à l'expérimentation de co-culture, elles ont été cultivées en milieu de culture RPMI (Gibco®) (Baxter et al., 2020) avec :

- 100U/mL de Penicilline et 100µg/mL de streptomycine
- 2mM de glutamine
- 10% de sérum de veau fœtal (SVF).

Les cellules étaient contenues dans des flasques de 75cm<sup>2</sup> (Falcon®), cultivée dans un incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>, à la concentration optimale de 500 000 cellules/mL. Il y a eu 17 passages avant l'activation en macrophage avec ajout de Phorbol-12-Myristate-13-Acétate (PMA) à la concentration de 5ng/mL (Baxter et al., 2020).

### 2.2.3 Co-culture CACO2 – THP 1

Nous avons mis en place un modèle de co-culture de cellules CACO2 avec des cellules immunitaires (THP-1), afin d'intégrer les interactions cellules épithéliales/cellules immunitaires dans notre modèle. Nous avons utilisé des multi-plaques de 24 puits constituées de deux compartiments distincts (apical et basal) séparés par une membrane poreuse (diamètre des pores : 0,4 µm), dans lesquels les deux types cellulaires ne sont donc pas en contact direct (Ponce De Leon Rodriguez, 2019). Dans les inserts (compartiment apical) ont été déposées les cellules CACO2 à la concentration de 50 000 cellules par puits avec du milieu de culture DMEM pour obtenir, après confluence, environ 100 000 cellules par puits (temps de doublement des CACO2 : 62h).

Les cellules THP-1 étaient elles déposées dans le compartiment basal à la concentration de 50 000 cellules par puits, puis mises en contact avec le PMA pendant 24h pour obtenir leur différenciation en macrophages.

Ensuite les cellules CACO2 et THP-1 différenciées ont été mises en co-culture en plaque de 24 puits pendant 24h en milieu de culture DMEM pour être stimulées.

## 2.3 STIMULATION

Afin d'étudier le rôle du microbiote dans la réponse immune et inflammatoire de l'épithélium intestinal, nous avons stimulé les différentes cultures cellulaires en les mettant en contact avec :

- Du milieu de culture seul (DMEM avec 10% de SVF) pour les témoins négatifs

- Du LPS à la concentration de 1µg/mL associé à de l'interféron-γ (IFN-γ) à la concentration de 10ng/mL (Kasper et al., 2016; Couto et al., 2017)
- Surnageants filtrés et poolés de selles de patients avec inflammation digestive (Calprotectine > 250 µg/g), dans du DMEM dilués au 1/10<sup>e</sup>, 1/100<sup>e</sup>, 1/1000<sup>e</sup>
- Surnageants filtrés et poolés de selles des patients sans inflammation digestive (Calprotectine < 250 µg/g), dans du DMEM dilués au 1/10<sup>e</sup>, 1/100<sup>e</sup>, 1/1000<sup>e</sup>

### 2.3.1 Stimulation des CACO2

Pour la stimulation, les cellules CACO2 étaient mises en contact avec 200µL de chaque condition décrite précédemment (DMEM avec SVF, LPS ou surnageants de selles poolés).

Deux types de stimulations ont été mis en œuvre :

- Des stimulations ponctuelles de 1h, 6h et 24h de contact :
- Des stimulations chroniques d'une durée totale de 6 semaines, comportant un changement de milieu tous les 3 jours et un passage par semaine où 50% des cellules étaient remises en puits pour poursuivre la stimulation et 50% des cellules conservées à -80°C pour l'étude de la réponse immune et inflammatoire.

### 2.3.2 Stimulation en co-culture CACO2 - THP-1

Après 24h de co-culture, les cellules CACO2 (compartiment apical) et les cellules THP-1 (compartiment basal) ont été mises en contact avec 200µL de chaque condition pendant 24h.

## 2.4 LYSE CELLULAIRE ET ANALYSES MOLECULAIRES

### 2.4.1 Lyse cellulaire

A la fin de chaque stimulation, le milieu de culture était aspiré et conservé dans un microtube à -80°C pour d'éventuelles analyses (protéomiques, Western Blot et/ou ELISA, ...).

Sur chaque tapis cellulaire étaient déposés 350µL de RLT-β-ME (solution de purification des RNases avec 10µL de β-mercaptoethanol (β-ME) pour 1mL de tampon RLT de Qiagen®). Le β-ME est un agent réducteur qui dénature de manière irréversible les RNases en réduisant les liaisons disulfures et en détruisant la conformation native nécessaire à la fonctionnalité des

enzymes. Il est associé au tampon RLT qui contient de l'isothiocyanate de guanidinium ayant un effet dénaturant fort pour que toutes RNases présentes dans le matériel à extraire soient complètement inactivées.

Après plusieurs aller-retours à la micro-pipette, la totalité des cellules était aspirée et déposée dans un microtube conservé à -80°C.

#### 2.4.2 **Extraction des ARN**

Nous avons utilisé le kit RNeasy® Mini Kit (Qiagen), selon les recommandations du fabricant, afin d'extraire les ARN.

#### 2.4.3 **Réalisation de RT-qPCR**

Nous avons utilisé les kits iScript reverse transcription supermix for RT-qPCR et Supermix SYBR de Bio-Rad® pour la réalisation de la rétrotranscription et des PCR quantitatives, respectivement.

Notre objectif étant d'étudier la réponse immune et inflammatoire par RT-qPCR, nous avons choisi comme gènes de ménages (contrôles endogènes) :

- 3 gènes de ménages pour les cellules CACO2 : PPIA, RPLP13, RPLP0, dont l'ubiquité et la constance ont été analysées *via* le logiciel Best-Keeper 1 ;
- 2 gènes de ménages pour les cellules THP-1 : RPLP-0, ACTB (Ponce De Leon Rodriguez, 2019).

Pour les gènes d'intérêts : 9 cytokines et chimiokines augmentées en cas d'inflammation digestive dans les MICI (Neurath, 2014) ou dans la mucoviscidose (Raia et al., 2000) ainsi que 2 enzymes ayant un rôle dans la réponse inflammatoire (INOS et COX2) (Ponce De Leon Rodriguez, 2019) et 2 protéines impliquées dans les voies de signalisation de l'autophagie (mTOR et AMPK) ont été sélectionnées :

- TGFβ : cytokine anti- inflammatoire, produite par les cellules CACO2, en cas d'inflammation digestive dans les MICI
- TNFα : cytokine pro- inflammatoire produite par les cellules CACO2, augmentée en cas d'inflammation digestive dans les MICI
- IFNγ : cytokine pro- inflammatoire augmentée en cas d'inflammation digestive dans les MICI et la mucoviscidose
- IL-1β : cytokine augmentée en cas d'inflammation digestive dans les MICI et la mucoviscidose
- IL-2 : cytokine augmentée en cas d'inflammation digestive dans les MICI et la mucoviscidose

- IL-6 : cytokine produite par les cellules CACO<sub>2</sub>, cytokine augmentée en cas d'inflammation digestive dans les MICI
- IL-8 : cytokine produite par les cellules CACO<sub>2</sub>, augmentée en cas d'inflammation digestive dans les MICI et la mucoviscidose
- IL-10 : cytokine anti- inflammatoire diminuée en cas d'inflammation digestive dans les MICI
- INOS : enzyme considérée comme un marqueur de l'inflammation (catalyse la réaction de production de l'oxyde nitrique par les macrophages lors de l'inflammation)
- COX 2 : enzyme considérée comme un marqueur de l'inflammation (catalyse la réaction de production des prostaglandines et thromboxanes lors de l'inflammation)
- mTOR : senseur de l'état métabolique de la cellule, impliqué dans les voies de signalisation de l'autophagie en l'inhibant
- AMPK : gène codant pour une protéine dont l'activation induit l'autophagie.

L'ensemble des amorces qui ont été utilisées est présenté en Annexe 5. Pour chaque condition expérimentale un duplicat de qPCR était réalisé. Nos contrôles endogènes étaient la moyenne des gènes de ménages pour une condition donnée. Les résultats des qPCR étaient exprimés en Fold Change par rapport à nos témoins négatifs (stimulation avec du DMEM seul).

#### 2.4.4 Etude de la viabilité cellulaire

Afin de vérifier que nos solutions de stimulation n'étaient pas toxiques pour les cellules, nous avons estimé la viabilité cellulaire en utilisant le kit colorimétrique ELISA BrdU (Roche®).

La synthèse d'ADN a été observée par méthode colorimétrique ELISA grâce au protocole BrdU basé sur la mesure de l'incorporation de BrdU pendant la synthèse de l'ADN (à la place de la thymidine). Les cellules (CACO<sub>2</sub> et THP-1) ont été ensemencées dans des plaques 96 puits à la concentration de 5000 cellules par puits avec leurs milieux de culture respectifs (et adjonction de PMA à 5ng/mL pour les THP-1 afin de permettre leur différenciation en macrophage).

Deux puits sans cellules ont été utilisés comme blancs et 10 puits non stimulés comme témoins de viabilité (témoin négatif).

Conformément au protocole de culture décrit précédemment, les cellules étaient stimulées pendant 24h avec 100µL de nos différentes conditions. Après 24h de stimulation, chaque surnageant était aspiré, puis remplacé par 200 µL de FixDenat par puits (solution permettant les fixations et dénaturations). Les cellules étaient incubées 30 minutes à température ambiante. La

solution FixDenat était aspirée avec précaution, remplacée par 100  $\mu$ L de solution de travail anti-BrdU-POD par puits et les cellules étaient incubées à température ambiante, dans le noir, pendant 90 minutes.

Le conjugué d'anticorps était éliminé en aspirant puis en rinçant trois fois les puits avec 200 $\mu$ L d'eau distillée par puits. 100  $\mu$ L de la solution de substrat révélateur étaient ajoutés dans chaque puits, puis les cellules étaient incubées à température ambiante jusqu'à ce que le développement des couleurs notamment dans témoins positifs, soit suffisant pour la détection photométrique (environ 5 minutes). L'absorbance des échantillons était mesurée dans un lecteur ELISA à 370 nm, et permettait une estimation de la prolifération cellulaire.





# Résultats

---





Partie 1 des résultats :  
Microbiote et inflammation pulmonaires  
dans la mucoviscidose

---

# 1 BIOMARQUEURS MICROBIENS ASSOCIES A L'EVOLUTION DE LA FONCTION PULMONAIRE DANS LA MUCOVISCIDOSE

---

Le rôle des colonisations microbiennes (chroniques et transitoires) des voies respiratoires dans la dégradation pulmonaire des patients de la mucoviscidose est maintenant bien admis. Plusieurs modèles prédictifs ont été proposés pour identifier les facteurs microbiens associés à la morbidité et mortalité de la mucoviscidose. Cependant, très peu d'entre eux ont intégré la colonisation des voies respiratoires par des micromycètes, qui est pourtant de plus en plus reconnue comme un acteur clé de l'évolution de la maladie pulmonaire liée à la mucoviscidose (Cui et al., 2013; Kramer et al., 2015; Nguyen et al., 2015).

L'objectif de ce travail (projet « MucoFong 2.0 ») était donc d'évaluer l'association entre l'évolution de la fonction respiratoire (mesurée par le VEMS) et les microorganismes fongiques et/ou bactériens identifiés en culture dans les crachats en se basant sur les données colligées lors du PHRC national multicentrique « MucoFong ».

Les données de 299 patients suivis pendant deux ans dans le cadre du projet français multicentrique "MucoFong" ont donc été réanalysées dans cet objectif. La relation entre les microorganismes identifiés en culture dans les crachats et l'évolution clinique des patients a été analysée longitudinalement, en utilisant le VEMS% comme critère de jugement principal. Un modèle mixte linéaire a été réalisé pour évaluer l'effet d'une colonisation transitoire ou chronique fongique et/ou bactérienne à l'inclusion sur l'évolution du VEMS% sur une période de deux ans.

*Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Candida albicans* ont été associés à une diminution significative du VEMS% au cours du suivi. De plus, ces résultats suggèrent une interaction synergique entre *C. albicans* et les espèces de *Streptococcus non pneumoniae* dans la dégradation de la fonction pulmonaire des patients que nous avons étayée via des cocultures *in vitro*.

Ce premier travail contribue donc à souligner l'implication des communautés microbiennes, et notamment fongiques, dans l'évolution de la fonction pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose, et apporte par ailleurs de nouveaux éléments dans la prédiction de l'évolution de la fonction pulmonaire chez ces patients, dont le rôle de *C. albicans*. Ce travail fait l'objet d'une publication transdisciplinaire, en cours de soumission (version ci-après).

# MICROBIAL BIOMARKERS PREDICTING LUNG FUNCTION DECLINE IN CF: LESSONS FROM THE MUCOFONG PROJECT

Florence Francis<sup>1,2\*</sup>, Raphael Enaud<sup>3-4\*</sup>, Perrine Soret<sup>2,7,8</sup>, Florian Lussac-Sorton<sup>1,3,9</sup>, Marta Avalos<sup>2,7</sup>, MucoFong Investigation Group<sup>10</sup>, Stéphanie Bui<sup>3-5</sup>, Michael Fayon<sup>3-5</sup>, Rodolphe Thiebaut<sup>1,2,7</sup>, Laurence Delhaes<sup>2-4,3,9,10\*\*</sup>

\* These authors contributed equally.

## **Affiliations:**

<sup>1</sup> CHU de Bordeaux, Department of Public Health, F-33000 Bordeaux, France

<sup>2</sup> Univ. Bordeaux, Inserm, Bordeaux Population Health Research Center, UMR 1219, F-33000 Bordeaux, France

<sup>3</sup> Univ. Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33000 Bordeaux, France

<sup>4</sup> CHU de Bordeaux, Univ. Bordeaux, FHU ACRONIM, F-33000 Bordeaux, France

<sup>5</sup> CHU de Bordeaux, CRCM Pédiatrique, CIC, 1401 Bordeaux, France

<sup>6</sup> 6

<sup>7</sup> INRIA SISTM Team, F-33405 Talence, France

<sup>8</sup>Current address: Laboratoire Servier, 50 rue Carnot, 92284 Suresnes cedex, France

<sup>9</sup> CHU de Bordeaux, Service de Parasitologie-Mycologie, F-33000 Bordeaux, France

<sup>10</sup> The Mucofong Investigation Group, France

**\*\*Corresponding author:** Pr. Laurence Delhaes; Univ-Bordeaux, Centre de Recherche Cardio Thoracique de Bordeaux - Inserm U1045 (PTIB), CHU de Bordeaux; Hôpital Xavier Arnozan, Avenue du Haut Lévêque, 33604 Pessac Cedex, FRANCE.

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

## Abstract

**Background:** Several predictive models have been proposed to understand the microbial risk factors associated with cystic fibrosis (CF) evolution, morbidity and mortality. However, very few have integrated fungal airways colonisation, which is increasingly recognized as a key player regarding the evolution of CF lung disease.

**Objective:** To assess the association between the percent predicted forced expiratory volume in 1 second (ppFEV<sub>1</sub>) evolution and the fungal and/or bacterial microorganisms identified in the sputum.

**Methods:** Data collected during the multicentric French project "MucoFong" (299 patients with CF and two-year follow-up) were analysed. The relationship between the microorganisms identified in the sputum and the clinical course of patients was longitudinally analysed, using ppFEV<sub>1</sub> as the main outcome. A linear mixed-model analysis was performed to evaluate the effect of a transient or chronic bacterial and/or fungal infection at inclusion on ppFEV<sub>1</sub> evolution over a two-years period, adjusted for confounding factors.

**Results:** *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Candida albicans* were associated with significant ppFEV<sub>1</sub> decrease during the follow-up. No significant association was found with other fungal colonisations (i.e.: *Aspergillus fumigatus*, *Scedosporium* species). In addition, ppFEV<sub>1</sub> outcome in our model was by 11.26% lower in patients presenting with a transient colonisation with non-*pneumoniae Streptococcus* species compared to other patients, with significant interaction with chronic colonisation by *C. albicans*.

**Conclusion:** These results confirm recently published data and provide new insights into bacterial and fungal colonisation as key factors for the assessment and prediction of lung function decline in CF patients.

**Keywords:** Cystic fibrosis; longitudinal analysis; *Aspergillus fumigatus*.  
*Candida albicans*; Mycobiota



## **1.1 INTRODUCTION**

Cystic fibrosis (CF) is the most common inherited disease in Caucasian populations, affecting about 70 000 individuals in the world (Delhaes et al., 2018). This multisystem disease affects primarily the lungs, causing repeated lung infections and chronic lung inflammation which lead to progressive respiratory failures associated with significant morbidity and early death.

Several predictive models have been proposed to identify risk factors associated with severe lung function decline, morbidity or mortality in CF (Shwachman and Kulczycki, 1958; Liou et al., 2001; Flume et al., 2005; Courtney et al., 2007; Buzzetti et al., 2012; McCarthy et al., 2013; Kerem et al., 2014; MacKenzie et al., 2014; Aaron et al., 2015; Szczesniak et al., 2017; Nkam et al., 2017; Keogh et al., 2018; Marsteller et al., 2019; Liou et al., 2020). These models underscored the importance of several clinical factors including microbial airway colonisation, when assessing morbidity and mortality in CF. However, none of these studies, but two (Flume et al., 2005; Nkam et al., 2017), have taken into consideration fungal flora (mycobiota) of the airways. These two studies were focused on managing spontaneous pneumothorax and scoring the risk of death or lung transplantation (LTLT) in CF respectively [4, 12], and provided data that might be useful for daily practice but need to be handled by other clinicians from other CF centers. In addition, fungi are increasingly recognized as key players in the natural course of CF lung disease and/or as real threats in case of lung transplantation (LT) (Delhaes et al., 2018; Flume et al., 2005; Nkam et al., 2017; Paganin et al., 2015; Reece et al., 2017; Soret et al., 2020).

In the present study, our aim was to determine whether bacterial and/or fungal colonisations of the airways were independently associated with CF patients' lung function evolution in the French national multicentre longitudinal "MucoFong" study.

## **1.2 MATERIAL AND METHODS**

### **1.2.1 Study design and population**

Data collected from the prospective MucoFong project which was supported by the French National Clinical Research program ("PHRC" protocol number 06/1902 (Coron et al., 2018a; Soret et al., 2020)) was used in the present study. The main overall aim of MucoFong was to set-up a standardized mycological analysis of sputa and to estimate fungal prevalence rates in CF, which led to an in-depth analysis of sputa.

### 1.2.2 Ethics

This study was approved by the Institutional Ethics Committees of Lille University Hospital (CPP Number: 06/84); a written informed consent was provided by all participants [18, 19].

Clinical data including standard spirometry, therapeutic, radiological and biological data along with allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) criteria were prospectively collected at each visit. CF participants underwent 3 visits during the 2 years of the follow-up (Coron et al., 2018a).

### 1.2.3 Microbial analysis

Bacterial cultures were performed in agreement with the European CF Society guidelines. Fungal growth was detected using 6 semi-selective media according to the same standardized protocol performed by all the participating centres as previously described (Coron et al., 2018a).

Given their clinical relevance (Cantón et al., 2005a; Kerem et al., 2014; Paganin et al., 2015), the presence of mucoid phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* isolates, and isolates of *Staphylococcus aureus* with methicillin resistance (MRSA) or not (MSSA), *Burkholderia cepacia* complex, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, or *Streptococcus* species was recorded. If bacteria were recorded at least once during the year prior to the visit without meeting the criteria for chronic colonisation, bacterial colonisation was considered transient. Chronic colonisation with *P. aeruginosa* (and by extension with either *S. aureus*, *S. maltophilia*, *B. cepacia* complex and *A. xylosoxidans*) was defined as the presence of bacterial isolates in 3 consecutive cultures with at least 1 month between the positive cultures, during the previous 6 months (Cantón et al., 2005a).

Chronic colonisation with *Aspergillus fumigatus* (and by extension with other fungal species) was deemed present when fungi were isolated in 2 consecutive cultures with at least 1 month between the positive cultures during the previous 12 months (Amin et al., 2010a). Transient fungal colonisation was defined as the presence of a given micromycete in one sample only, either at the inclusion visit or during the year prior to inclusion.

### 1.2.4 Outcome assessment

Given its major role in clinical practice and currently the gold standard measure of disease severity, percent predicted forced expiratory volume in 1 second (ppFEV<sub>1</sub>) was selected as the main outcome variable. Spirometry was carried out in each centre, for routine care, by approved services applying the recommendations of the American Thoracic Society and European

Respiratory Society in force (Pellegrino et al.). Median of this parameter (ppFEV<sub>1</sub>) was modelled to assess the relationship between microbial colonisations at inclusion and lung evolution over the 2 years following inclusion.

#### 1.2.5 Prognostic score assessment

The recently proposed risk score for the prediction of within 3-year death or lung transplantation (LT) (Nkam et al., 2017) was estimated for each patient at inclusion. Based on the 8 predictors proposed, a weighted continuous score was individually calculated, a high prognostic score corresponding to a high risk of LT or death.

#### 1.2.6 Statistical analysis

Analyses were performed using the statistical analysis software SAS version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Descriptive analyses have been performed to summarize the CF population at inclusion and during the follow-up. Continuous variables were presented as mean with standard deviation (Mean  $\pm$  SD) for normal distribution or median with interquartile range (25th–75th percentile, IQR) for non-normal distribution. Qualitative variables are presented as n (%).

As data have been collected repeatedly during the follow-up, a linear mixed model analysis was used to evaluate the effect of transient or chronic colonisations with fungi and/or bacteria at the inclusion on the evolution of ppFEV<sub>1</sub>. The model included a random intercept; parameters were estimated with the maximum likelihood method. A graphical analysis of the data revealed a heterogeneous evolution of ppFEV<sub>1</sub> values among patients throughout the follow-up. It was therefore decided to consider time as a discrete variable (one variable per visit). No additional time interaction was required in the model; therefore the effects of bacteria or fungi were modelled as an average difference of ppFEV<sub>1</sub> from the inclusion onward.

Analysis was adjusted for potential confounding factors (study centre, age, sex, Body Mass Index (BMI), ABPA and gastroesophageal reflux). According to the unadjusted analyses, potential microbial predictors of the outcome such as transient or chronic bacterial and fungal colonisations (yes/no) were initially introduced in the model. Parameters with  $p < 0.25$  in unadjusted analyses were considered for inclusion in the multivariable model. Then a stepwise procedure was performed in multivariable adjusted analyses to select the subset of variables independently associated with the outcome (significant threshold at 0.05).

Accordingly, an initial model including all selected variables at an unadjusted step was performed. Then at each step, before a variable was selected to be removed from the model, a hypothesis test was performed in order to state whether its contribution was significant or not. The procedure ended when all non-significant variables were removed. Estimate fixed effects for significant parameters were reported as  $\beta$  coefficient, confidence interval 95% (95%CI) and  $p$ -value. Residual plots (marginal and conditional) were analysed to check their normality and homoskedasticity.

Given the polymicrobial constitution of CF airways flora, additional analyses were implemented to search for potential interactions between microorganisms. Especially, an interaction between *Candida albicans* and non-*pneumoniae Streptococcus* species documented *in vitro* was explored.

#### 1.2.7 Model robustness

To assess whether the microorganisms identified as associated with a poor ppFEV1 level in the main analysis were also associated with worse prognostic scores, an adjusted linear regression was performed using the prognostic score recently developed (Nkam et al., 2017) as outcome variable.

#### 1.2.8 *In vitro* microbial co-cultures

*Candida albicans* strain ATCC-5314, and two strains of *Streptococcus oralis* and *Streptococcus mitis* isolated from two CF patients (Pr. Lehours, Bacteriology lab of Bordeaux CHU) were used for *in vitro* co-cultures as previously described (Soret et al., 2020). Growth of *C. albicans* alone or in co-culture with *S. oralis*, or *S. mitis* was measured daily for 5 days. At each time point, a diluted sample of microbial BHI mixture was plated on chocolate agars; fungal colony forming units (CFUs) were counted after 24-h of incubation.

### 1.3 RESULTS

#### 1.3.1 Patients characteristics

A total of 299 patients were included in the study, of whom 237 were monitored at each visit during the 2 years of follow-up (Figure 1).

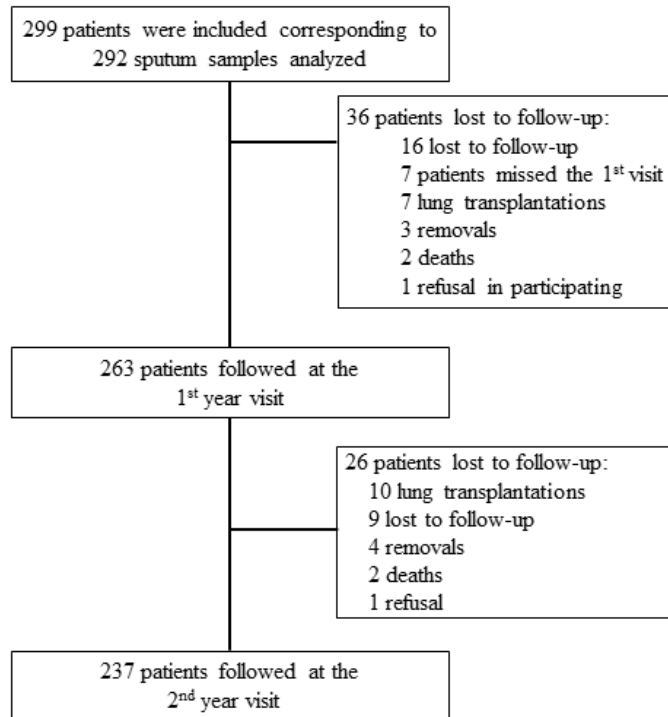
Patients characteristics, lung function results, microbial cultures of sputum and therapeutics at study entrance are summarized in Table 1. Patients were 23.7 ( $\pm 10.9$ ) years old; 143 (47.8%)

were female; 255 (85.3%) had at least one F508del mutation of the *CFTR* gene; the majority had exocrine pancreatic dysfunction (78.6%). The median [IQR] Shwachman-Kulczycki score (S-K score, (Shwachman and Kulczycki, 1958)) was 74.6 [65-90].

Most patients were colonized with *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, non-*pneumoniae Streptococcus* species (including *S. mitis* group species), and to a lesser degree with *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans*, and/or *B. cepacia* complex species (Table 1). *Candida albicans* (45.5%) and *A. fumigatus* (26.8%) were the two major fungal species at inclusion, whereas *Aspergillus flavus* and *Scedosporium* species were isolated respectively in 3% and 4% of patients (Table 1).

Transient and chronic colonisations with *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* or *A. fumigatus* were mainly observed at baseline (Figure 2a and 2b). Less than 5% were chronically colonized with *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans*, *A. flavus*, or with the *Scedosporium* species (Figure 2b). Transient colonisation with non-*pneumoniae Streptococcus* and with *C. albicans* were observed in 9.2% and 26.4% of cases (Figure 2a), a chronic colonisation with *C. albicans* being stated in 31.8% (Figure 2b).

Regarding medications at inclusion, most of the patients received rhDNase (170/299; 59.5%), inhaled antibiotics (86/299; 28.8%), and/or inhaled steroids (168/299; 56.2%). While oral antibiotics, in particular ciprofloxacin formulations, remained the most often prescribed antimicrobial agents (74.9%), intravenous antibiotics were prescribed in 153 cases (51.2%) (Table 1). With respect to ABPA management, antifungal drugs were prescribed during the previous 6 months in 61 patients (20.4%) (Table 1).



**Figure 1. Flowchart showing inclusion and follow-up process of CF patients during MucoFong project**

**Table 1: Characteristics of patients at inclusion (n = 299)**

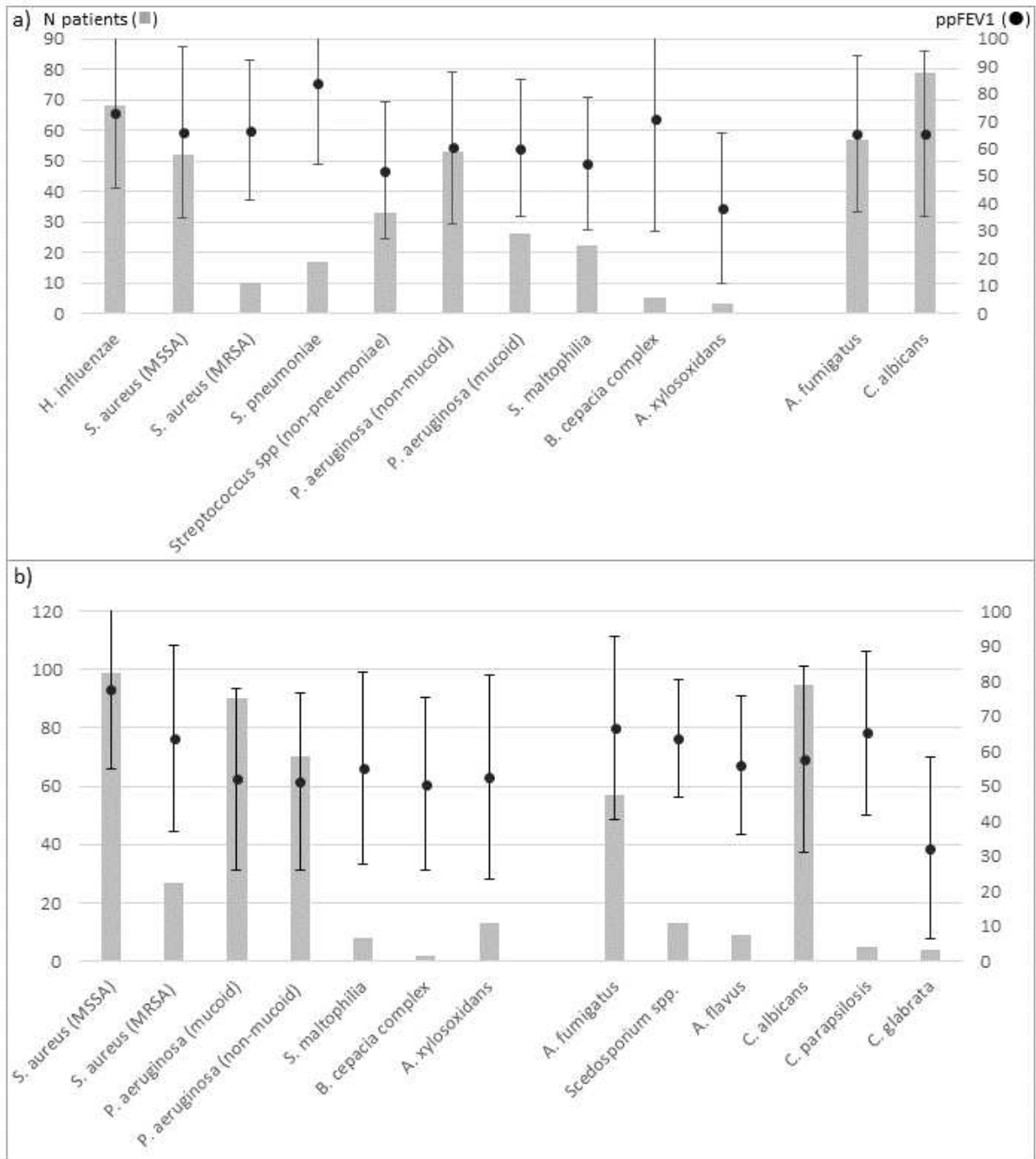
Characteristics	Missing data	N or median or Mean	% or [IQR] or (SD)
Age (years)	0	23.7	(10.9)
Gender (female)	0	143	47.8
CFTR Mutations	0		
F508del/ F508del		119	39.8
F508del/other		136	45.5
Other/other or unknown		44	14.7
Comorbidities	0		
Exocrine pancreatic insufficiency		235	78.6
Diabetes mellitus		83	27.8
Gastroesophageal reflux		73	24.4
ABPA		69	23.1
Chronic sinusitis		58	19.4
Haemoptysis		55	18.4
Concomitant asthma		34	11.4
Pneumothorax		9	3.0
Pulmonary hypertension		5	1.7
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	1	19.9	[17.6-21.3]
Shwachman-Kulczycki score	28	74.6	[65-90]
Number of days of hospitalization during the last 12 months*	10	7	[1-115]
Sputum bacterial cultures positive with	7		
<i>Staphylococcus aureus</i> (methicillin susceptible)		80	27.4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (non-mucoid strains)		75	26.4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (mucoid strains)		77	22.6
<i>Haemophilus influenzae</i>		28	9.6
<i>Staphylococcus aureus</i> (methicillin resistant)		22	7.5
Non-pneumoniae <i>Streptococcus</i> species		19	6.5
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		16	5.5
<i>Alkaligenes xylosoxidans</i>		12	4.1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		5	1.7
<i>Burkholderia cepacia</i> complex		3	1.0
Sputum fungal cultures positive with	10		
<i>Candida albicans</i>		136	45.5
<i>Aspergillus fumigatus</i>		80	26.8
Other molds ( <i>Cladosporium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.)		20	6.7
<i>Scedosporium</i> species		10	4.0
<i>Aspergillus flavus</i>		9	3.0
<i>Candida parapsilosis</i>		5	1.7
Other <i>Aspergillus</i> species		4	1.3
<i>Candida glabrata</i>		3	1.0
Other <i>Candida</i> species		3	1.0

<i>Exophiala dermatitidis</i>		2	0.7
<i>Lomentospora prolificans</i>		1	0.3
Medications	0		
Non-invasive ventilation		21	7.2
Long-term oxygen		32	10.7
Nebulized rhDNase		178	59.5
Inhaled antibiotics		86	28.8
Inhaled steroids		168	56.2
Azithromycin		162	54.2
Oral antibiotic courses during the last 12 months			
0		75	25.1
1 to 3		161	53.8
> 3		63	21.1
Intravenous antibiotics during the last 12 months		153	51.2
Mean number of antibiotic courses		1	[0-2]
Systemic corticosteroids during the last 12 months		70	23.4
Other immunosuppressive treatment		3	1.0
Antifungal treatment during the last 6 months		61	20.4

---

ABPA, Allergic bronchopulmonary aspergillosis; BMI, Body Mass Index; Antifungal treatment was: itraconazole in 48, voriconazole in 14, fluconazole in 4 and posaconazole in 5 of cases. \*Excluding patients without hospitalization.





**Figure 2: FEV1% of predicted values according to microbial transient (a) and chronic (b) colonizations.**

### 1.3.2 ppFEV1 characteristics and univariate analysis

Medians of ppFEV1 were respectively 67 % [43-91] (n = 295 patients), 70 % [41-92] (n = 254 patients) and 69 % [47-91] (n = 231 patients) at inclusion, the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> years of follow-up (Table 2).

At baseline, ppFEV1 were lower in case of a transient colonisation with non-*pneumoniae* *Streptococcus* species (Figure 2a), or chronic colonisation with *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *B. cepacia* complex, *A. xylooxidans*, *C. albicans*, *A. flavus* and *Candida glabrata* (Figure 2b). Unadjusted analysis identified 6 microbial variables associated with a steeper decline of ppFEV1 level compared to patients with no reported colonisation (Table 3). Among them, transient, as well as chronic, colonisation with *P. aeruginosa* (mucoid and non-mucoid strains) or with *C. albicans* was the most significantly associated with a decrease in ppFEV1 level.

**Table 2: ppFEV1 predicted and Health Care Utilization during the 2 years of follow-up**

Variables expressed as median [IQR] or mean ( $\pm$ SD) - (MV)	Inclusion	1 <sup>st</sup> follow-up (year 1)	2 <sup>nd</sup> follow-up (year 2)
ppFEV1	67 [43-91] - (4)	70 [41-92] - (36)	69 [47-91] - (68)
Outpatient visits (n)	4 [3-6] - (1)	4 [3-5] - (5)	4 [1-5] - (13)
Hospital admissions (n)	0 [0-1] - (1)	0 [0-2] - (6)	0 [0-1] - (13)
Days of hospitalization (n)	12.2 ( $\pm$ 16.6) - (10)	13.0 ( $\pm$ 18.3) - (59)	12.7( $\pm$ 16.8) - (22)

Data are presented as median with Interquartile Range [IQR] or mean and standard deviation ( $\pm$  SD) followed by missing values (MV); ppFEV1, Percent predicted Forced expiratory volume in 1 second; Numbers of consultations (hospital admissions) and hospitalizations were recorded during the last 12 months before the visit.

**Table 3: Microbial factors at the inclusion associated with average evolution of ppFEV1 during the 2 years of follow-up based on a Univariate analysis**

Microorganisms	Type of colonisation	$\beta$ coefficient	95%CI	p-value
<i>H. influenzae</i>	T	5.23	[1.47; 11.94]	0.13
<i>S. pneumoniae</i>	T	14.79	[3.47; 26.11]	0.01
non- <i>pneumoniae Streptococcus</i>	T	-6.93	[-18.95; 5.09]	0.25
<i>S. aureus</i> (methicillin susceptible)	T	4.60	[-2.84; 12.04]	0.17
	C	5.69	[-0.71; 12.10]	
<i>S. aureus</i> (methicillin resistant)	T	1.60	[-13.09; 16.28]	0.38
	C	-6.44	[-15.72; 2.84]	
<i>P. aeruginosa</i> (non-mucoid strains)	T	-9.77	[-16.78; -2.76]	< 0.0001
	C	-15.41	[-22.08; -8.75]	
<i>P. aeruginosa</i> (mucoid strains)	T	-19.45	[-28.74; -10.16]	< 0.0001
	C	-13.15	[-19.42; -6.89]	
<i>S. maltophilia</i>	T	-14.19	[-24.22; -4.16]	0.01
	C	-10.26	[-26.44; 5.93]	
<i>B. cepacia</i> complex	T	18.60	[-2.02; 39.23]	0.15
	C	-13.15	[-44.69; 18.40]	
<i>A. xylosoxidans</i>	T	-6.32	[-32.99; 20.35]	0,03
	C	-17.97	[-31.32; -4.62]	
<i>A. fumigatus</i>	T	-2.99	[-10.05; 4.07]	0.69
	C	-1.53	[-8.65; 5.60]	
<i>Scedosporium species</i>	T	/	/	0.22
	C	-7.42	[-22.56 ; 7.52]	
<i>C. albicans</i>	T	-4.74	[-11.23; 1.74]	0.005
	C	-11.03	[-17.62; -4.44]	

T, Transient colonisation; C, Chronic colonisation.

### 1.3.3 Bacterial and fungal colonizations predicted ppFEV1 level

After stepwise selection, colonisation with *S. pneumoniae*, non-*pneumoniae Streptococcus* species, *A. xylosoxidans*, *S. maltophilia*, mucoid and non-mucoid strains of *P. aeruginosa*, and *C. albicans* were included in the multivariable model (Table 4).

Transient as well as chronic colonisation with *S. maltophilia*, *P. aeruginosa*, and *C. albicans* were significantly and independently associated with ppFEV1 deterioration during the two years of follow-up. Furthermore, transient colonisation with non-*pneumoniae Streptococcus* lowered ppFEV1 level by 13.6% ( $\beta=-13.62$ , CI95% [-25.12; -2.12],  $p=0.02$ ). The effect of *A. xylosoxidans* and *S. pneumoniae* colonisation did not reach the significant threshold of 0.05. The positive association between *S. pneumoniae* colonisation and ppFEV1 level identified in the univariate analysis was confirmed in the multivariate model (Table 4).

In an additional analysis, we explored the interaction between *C. albicans* and non-*pneumoniae Streptococcus* species. Hence, the effect of *C. albicans* colonisation on ppFEV1 level was modified by the presence or absence of non-*pneumoniae Streptococcus* species. A trend toward a protective effect ( $p=0.051$ ) of a co-colonisation by *C. albicans* and non-*pneumoniae Streptococcus* was found ( $\beta=14.84$  [-6.41; 36.09] and 6.50 [-11.95; 24.95] for chronic and transient colonisations with *C. albicans* respectively), while a fungal colonisation alone was associated with a negative evolution of ppFEV1 ( $\beta=-12.44$  [-18.87; -6.02] and -6.33 [-12.68; 0.01]) for chronic and transient *C. albicans* colonization respectively).

**Table 4: Microbial factors at inclusion associated with the average evolution of ppFEV1 during the 2-year follow-up in the mixed linear model**

Microorganisms	Type of colonization	$\beta$ coefficient	95%CI	p-value
<i>S. pneumoniae</i>	T	10.92	[0.45; 21.40]	0.04
non- <i>pneumoniae Streptococcus</i> species	T	-13.62	[-25.12; -2.12]	0.02
<i>A. xylosoxidans</i>	T	-3.61	[-26.95; -2.30]	0.06
	C	-14.62	[-32.08; 24.86]	
<i>S. maltophilia</i>	T	-11.93	[-21.38; -2.49]	0.02
	C	-11.93	[-26.83; 4.79]	
<i>P. aeruginosa</i> (non-mucoid strains)	T	-7.54	[-14.30; -0.79]	0.01
	C	-9.63	[-16.61; -2.65]	
<i>P. aeruginosa</i> (mucoid strains)	T	-18.26	[-27.20; -9.31]	< 0.0001
	C	-10.41	[-16.96; -3.87]	
<i>C. albicans</i>	T	- 5.12	[-11.17 ; 0.93]	< 0.01
	C	- 10.26	[- 16.50 ; -4.02]	

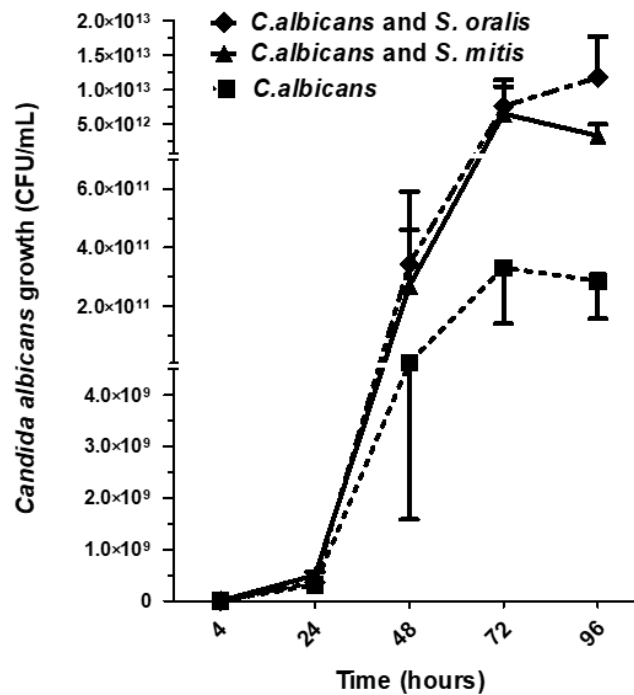
T, Transient colonisation; C, Chronic colonisation; Given the limited number of patients with chronic colonisation by *B. cepacia* species complex (n = 3), *A. flavus* (n = 9), *C. glabrata* (n = 3) and other *Candida* species including *Candida parapsilosis* (n = 3), these microorganisms have not been taken into account in our mixed model; Results were adjusted on medical center, age, sex, BMI, presence of ABPA and/or gastroesophageal reflux disease.

#### 1.3.4 *In vitro* microbial co-cultures

The interaction between *C. albicans* and non-*pneumoniae Streptococcus* was also investigated *in vitro* by co-cultivation of *C. albicans* with either *S. mitis* or *S. oralis*. Co-cultivation of *C. albicans* with *Streptococcus* species significantly enhanced *C. albicans* growth compared to that observed in monocultures (Figure 3).

### 1.3.5 Assessment of the performance of our mixed model using the prognostic score

With the exception of *C. albicans* colonisations, transient and chronic colonisations with *P. aeruginosa*, *A. xylosoxidans*, *S. maltophilia* or non-*pneumoniae* *Streptococcus* were significantly associated with worse adjusted 3-years prognostic scores of death or LT (Nkam et al., 2017) at inclusion (Table 5), confirming the suitable performance of our mixed model.



**Figure 3. Growth curves for *in vitro* co-cultures of *C. albicans* with *S. mitis*, or *S. oralis* compared to culture of *C. albicans* alone.**

*C. albicans* growth (■) expressed in CFU/mL is significantly enhanced by *S. oralis* (◆) and *S. mitis* (●) at day 4 (96 hours) ( $p < 0.05$ ).

**Table 5: Microbial factors at inclusion associated with the prognostic score estimated at inclusion**

Microorganismes	Type of colonisation	$\beta$ coefficient	95%CI	p-value
<i>S. pneumoniae</i>	T	-0.05	[-0.81; 0.71]	0.90
non-pneumoniae <i>Streptococcus</i> spp.	T	0.53	[-0.23; 1.30]	0.17
<i>A. xylosoxidans</i>	T	0.49	[0.84; 2.59]	0.001
	C	1.72	[-1.27; 2.25]	
<i>S. maltophilia</i>	T	0.90	[0.21; 1.55]	0.01
	C	0.88	[-0.18; 1.99]	
<i>P. aeruginosa</i> (non-mucoid strains)	T	0.95	[0.48; 1.43]	< 0.0001
	C	1.30	[0.80; 1.81]	
<i>P. aeruginosa</i> (mucoid strains)	T	0.91	[0.26; 1.56]	0.01
	C	0.41	[-0.07; 0.88]	
<i>C. albicans</i>	T	0.21	[-0.23 ; 0.65]	0.63
	C	0.12	[-0.32 ; 0.56]	

T, Transient colonisation; C, Chronic colonisation; Results were adjusted on medical center, age, sex, BMI, presence of an ABPA and a gastroesophageal reflux disease.

## 1.4 DISCUSSION

In the present work, we used microbial data from the most recent prospective multicentre cohort of French CF patients (MucoFong), based on a standardized sputum assessment protocol (Coron et al., 2018a). A linear mixed model was developed using a wide variety of microbial variables including fungi. It aimed to identify new microbial biomarkers of ppFEV<sub>1</sub> decline, with a statistical model that allowed patients to have varying baseline ppFEV<sub>1</sub> measurements and different rates of change in ppFEV<sub>1</sub> over time, as recently proposed (Albert and Shih, 2010).

Our results were in agreement with previous findings indicating that several concomitant chronic bacterial colonisations at the time of diagnosis (*P. aeruginosa*, *B. cepacia* and *S. maltophilia*) confer worse ppFEV<sub>1</sub> level in CF (Liou et al., 2001; Navarro et al., 2001; Emerson J et al., 2002; Courtney et al., 2007; Dasenbrook et al., 2008; Buzzetti et al., 2012; VandenBranden et al., 2012; Hubert et al., 2013; Aaron et al., 2015; Cogen et al., 2015; Paganin et al., 2015; Li et al., 2017; Nkam et al., 2017; Reece et al., 2017; Marsteller et al., 2019; Andrinopoulou et al., 2020). Transient bacterial colonisations, especially non-*pneumoniae Streptococcus* colonisation, were also factors associated with a worse level of ppFEV<sub>1</sub> in our population. When there was no colonisation with non-*pneumoniae Streptococcus*, *C. albicans* colonisation was associated with a worse level of ppFEV<sub>1</sub>. This last result is congruent with the principal component analysis in which *C. albicans* was more present in sputa from patients with severe CF disease (Paganin et al., 2015). It also supports results which evidenced that *C. albicans* colonisation presages FEV<sub>1</sub> decline (Navarro et al., 2001; Chotirmall et al., 2010), although the clinical relevance of yeast colonisation remains a matter of debate in CF.

Transient colonisation with *S. pneumoniae* at inclusion appeared to be associated with favourable ppFEV<sub>1</sub> evolution, in agreement with previous report showing that *S. pneumoniae* carriage is surprisingly high but not associated with more severe CF disease (Esposito et al., 2016). On the opposite, non-*pneumoniae Streptococcus* carriage was correlated with a negative evolution of ppFEV<sub>1</sub> in our population. Several studies reported the pathogenic potential of species such as *Streptococcus anginosus* or *mitis* group in CF (Hill, 2017; Scott and O'Toole, 2019). There is also evidence to suggest interactions between these streptococci and other microorganisms which increase their growth and/or virulence (Hill, 2017; Scott and O'Toole, 2019). Here we focused on the interaction between non-*pneumoniae* streptococci and *C. albicans* given their significant association with ppFEV<sub>1</sub> decline. As both microorganisms are oral commensals and have already demonstrated their ability to develop detrimental synergistic activity (especially *S. mitis* group species known to be responsible for pulmonary exacerbation in CF) (Xu et al., 2014a; Scott and O'Toole, 2019), we introduced the interaction between *C. albicans*

and non-*pneumoniae* *Streptococcus* species in our linear mixed model. We demonstrated a significant dramatic association between co-colonisation and greater lung function decline. Furthermore, co-cultivation of *C. albicans* with *S. oralis* or *S. mitis* resulted in enhanced growth of *Candida* compared to yeast monocultures (Figure 3), in agreement with previous published data (Xu et al., 2014a; Scott and O'Toole, 2019).

Several potential predictors in particular colonisation with MSSA, MRSA and *A. fumigatus* were not shown to have a significant impact on the primary outcome (ppFEV1 average evolution during the 2 years of follow-up) in our model, in contrast to previous results (Dasenbrook et al., 2008; Hubert et al., 2013; Jennings et al., 2014; Li et al., 2017; Andrinopoulou et al., 2020). However, MRSA prevalence appears to vary according to age and geographical situation in CF (Hubert et al., 2013; Jennings et al., 2014; Marsteller et al., 2019). Regarding colonisation by moulds, the limited number of cases with *Scedosporium* species (n = 10) recorded in the present study may explain the lack of power to reach a significant threshold in the final analysis. Among our CF population, 80 patients (26.8%) had *A. fumigatus* positive cultures at inclusion, including 57 with a chronic colonisation. In agreement with previous studies, we did not find a significant association between *A. fumigatus* colonisation and worse lung function (Nkam et al., 2017; Reece et al., 2017). However, Nkam et al. (Nkam et al., 2017) showed that CF patients who died or underwent lung transplantation were more likely to have been diagnosed with ABPA, with similar prevalence of ABPA between Nkam et al.'s population and ours (18.9%, Table 1 vs 23.1% (Nkam et al., 2017)). Both ABPA and *Aspergillus* sp. carriage have been associated with impaired lung function (Navarro et al., 2001). However, the relationship between chronic colonisation with *A. fumigatus* and lung function recently evaluated using a linear mixed model appeared to exhibit a complex two-way relationship in CF (Noni et al., 2015).

Taken together, these results highlight (i) the pathogenicity of species derived from the oral cavity and usually considered as clinically non-significant, and (ii) the polymicrobial signature of CF airway colonisation which may contribute as a collective entity to the lung function decline (Ratjen et al., 2015; Scott and O'Toole, 2019).

Our study has some limitations. The study targeted an adult population able to produce sputum samples (age median of 22.3 years; CI95%: [16.7-29.9]) leading to a selected population with more severe CF disease. However, the demographic, clinical, biological and therapeutic characteristics of our population were similar to published data (Liou et al., 2001; Conrad et al., 2017; Nkam et al., 2017). In the last decade, linear and nonlinear models have emerged and demonstrated clinical relevance into modelling pulmonary exacerbation or spirometry data in CF (Navarro et al., 2001; Albert and Shih, 2010; Noni et al., 2015; Conrad et al., 2017; Andrinopoulou et al., 2020).



These models identified several bacterial colonisations as factors associated with ppFEV1 level, but a few of them have addressed the mycobiota effect (Navarro et al., 2001; Noni et al., 2015; Reece et al., 2017). Two additional models scoring LT, mortality, and morbidity included the mycobiota (Flume et al., 2005; Nkam et al., 2017). However, estimating CF life expectancy, morbidity, mortality and scoring the risk of LT or death are central but late outcomes, known to depend heavily on the CF patients' characteristics and their access to medical care and medications (Ratjen et al., 2015). Additionally, prognostic factors have changed over time with the growing number of adults with CF, imposing a renewal in assessing lung function evolution and microbial colonisation which may take advantage from next generation sequencing to simultaneously analyse the whole microbial community (bacteria, fungi, and viruses) without a priori knowledge of existing microorganisms (Soret et al., 2020).

To conclude, CF prognosis has dramatically improved over the past decades leading to an urgent need to reappraise the prognostic factors of CF evolution, e.g. routinely assessing fungal colonisation and/or infection that have emerged as a new concern in CF (Navarro et al., 2001; Chotirmall et al., 2010; Noni et al., 2015; Delhaes et al., 2018). Our model combining both items confirm the complex nature of CF lung disease, and provides new insights into bacterial and fungal colonisations as key factors in assessing and predicting lung function evolution in CF. It emphasises the need of regularly monitoring the bacterial and fungal colonisations of CF lungs by using both culturing methods that allow microorganism phenotyping (such as *in vitro* sensitivity to antimicrobial agents) and molecular tools such as targeted metagenomics that provide the opportunity to identify all microbial species (including those difficult to culture) and to generate exhaustive microbial community data.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The Mucofong Investigation Group: Marc Pihet (Angers University Hospital), Emilie Fréal (Lille University Hospital), Yolande Lemeille (Grenoble University Hospital), Claudine Pinel (Grenoble University Hospital), Hervé Pelloux (Grenoble University Hospital), Gilles Gargala (Rouen University Hospital), Loïc Favennec (Rouen University Hospital), Isabelle Accoceberry (Bordeaux University Hospital), Isabelle Durand-Joly (Dunkerque Hospital Center), Frédéric Dalle (Dijon University Hospital), Frédéric Huet (Dijon University Hospital), Annlyse Fanton (Dijon University Hospital), Amale Boldron (Dunkerque Hospital Center), Guy-André Loeuille (Dunkerque Hospital Center), Philippe Domblides (Bordeaux University Hospital), Bérengère Coltey (Marseille University Hospital), Isabelle Pin (Grenoble University Hospital), Catherine Llerena (Grenoble University Hospital), Françoise Troussier (Angers University Hospital), Christine Person (Angers University Hospital), Christophe Marguet (Rouen University Hospital),

Nathalie Wizla (Lille University Hospital), Caroline Thumerelle (Lille University Hospital), Dominique Turck (Lille University Hospital), Anne Prévotat (Lille University Hospital), Benoit Wallaert (Lille University Hospital), Sylvie Leroy (Nice University Hospital), Jean-Philippe Bouchara (Angers University Hospital).

This project was supported by a research grant from “Vaincre La Mucoviscidose”, VLM (MucoFong 2.0; RF20160501626/1/1/275) and the INSERM U1045.



## **2 EFFICACITE A DEUX ANS D'UN TRAITEMENT PAR LUMACAFITOR-IVACAFTOR EN VIE REELLE SUR LES ADOLESCENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE**

---

La combinaison Lumacaftor/Ivacaftor a montré une efficacité à court terme (24 semaines) sur l'évolution de la fonction pulmonaire et de l'IMC dans deux études cliniques de phase 3, chez des patients homozygotes F508del âgés de plus de 12 ans. L'effet positif de Lumacaftor/Ivacaftor sur l'évolution de la fonction pulmonaire et l'IMC a été confirmé à 96 semaines chez les patients de plus de 12 ans par l'étude d'extension PROGRESS (Konstan et al., 2016) et plus récemment, en France, dans l'étude en vie réelle réalisée par Burgel *et al.* (Burgel et al., 2020). Cependant, l'étude PROGRESS concernait surtout des adultes, et l'étude réalisée par Burgel *et al.* n'a été réalisée que pendant un an après l'initiation du traitement.

D'autres études sont donc nécessaires pour confirmer la capacité de Lumacaftor/Ivacaftor à modifier l'évolution de la maladie en vie réelle, en particulier chez les adolescents, qui se trouvent à un stade critique de leur développement et de la maladie. L'objectif de notre travail était donc d'évaluer en vie réelle et de comparer l'évolution des paramètres pulmonaires et nutritionnels 2 ans avant et 2 ans après l'initiation de Lumacaftor/Ivacaftor, chez des adolescents homozygotes F508del.

Dans cette étude de cohorte multicentrique prospective, les enfants (12-18 ans) ont été suivis pendant les deux premières années de traitement par Lumacaftor/Ivacaftor. Nous avons évalué, de manière prospective pendant les deux premières années de traitement et de manière rétrospective pendant les deux années précédant l'initiation du traitement, l'évolution du VEMS%, des scores anthropométriques (poids, taille et IMC), des scores scanographiques et du nombre d'exacerbations et de cures d'antibiotiques. La tolérance et la sécurité du traitement ont également été évaluées.

Quarante adolescents, âgés de 12,0 à 17,4 ans à l'initiation du traitement par Lumacaftor/Ivacaftor, ont été inclus. Bien qu'une diminution ait été constatée au cours des deux années précédant le traitement par Lumacaftor/Ivacaftor, le VEMS% a augmenté de manière significative après le début du traitement et jusqu'aux deux ans de suivi. Lumacaftor/Ivacaftor a également permis une amélioration significative de l'IMC et de la concentration en chlore de la sueur. En revanche, il n'y a pas eu de changement significatif du nombre d'exacerbations et de cures d'antibiotiques ou des scores scanographiques. L'âge en début de traitement était plus bas

chez les bons répondeurs et le traitement a été bien toléré, comme observé dans les essais cliniques.

Au total, cette étude confirme qu'en situation réelle, le traitement à long terme par Lumacaftor/Ivacaftor est bien toléré et est efficace sur l'évolution pulmonaire et nutritionnelle des patients, d'autant plus que le traitement est commencé précocement. Ces résultats suggèrent par ailleurs l'intérêt d'améliorer les connaissances sur l'impact du traitement, en vie réelle, sur l'écosystème pulmonaire et digestif, notamment sur les communautés microbiennes bactériennes et fongiques, et sur l'inflammation. Ci-après la version en cours de soumission de l'article correspondant.

## LONG-TERM OUTCOMES OF LUMACAFITOR-IVACAFITOR ON CYSTIC FIBROSIS ADOLESCENTS IN REAL LIFE

**Stéphanie Bui<sup>a\*</sup>, Alexandra Masson<sup>b\*</sup>, Raphaël Enaud<sup>a,d</sup>, Léa Reditis<sup>c</sup>, Gaël Dournes<sup>d</sup>, François Galode<sup>a</sup>, Cyrielle Collet<sup>a</sup>, Emmanuel Mas<sup>c</sup>, Jeanne Languépin<sup>b</sup>, Michael Fayon<sup>a,d</sup>, Fabien Beaufiles<sup>a,d</sup>, Marie Mittaine<sup>b</sup>.**

*\* Contributed equally as co-first authors*

### **Affiliations:**

<sup>a</sup>Bordeaux University Hospital, Hôpital Pellegrin-Enfants, paediatric Cystic Fibrosis Reference Center (CRCM), Centre d'Investigation Clinique (CIC 1401), F-33000 Bordeaux, France;

<sup>b</sup>Limoges University Hospital, paediatric Cystic Fibrosis Reference Center (CRCM), F-87000 Limoges, France ;

<sup>c</sup>Toulouse University Hospital, paediatric Cystic Fibrosis Reference Center (CRCM), Department of Pediatric-pulmonology, F-31059 Toulouse, France;

<sup>d</sup>Bordeaux University, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, Radiology, F-33000 Bordeaux, France.

**Corresponding author:** Dr Stéphanie Bui

CRCM pédiatrique, Hôpital Pellegrin-Enfants CHU de Bordeaux,  
Place Amélie Raba Léon, 33000 Bordeaux, France

*Email address:* [stephanie.bui@chu-bordeaux.fr](mailto:stephanie.bui@chu-bordeaux.fr)

### **ABSTRACT**

**Background:** The combination of the CFTR corrector Lumacaftor (LUM) and the potentiator Ivacaftor (IVA) has been labelled in France since 2015 for F508del homozygote cystic fibrosis (CF) patients over 12 years. We aimed to evaluate, in real life in F508del homozygote adolescents, changes in pulmonary and nutritional parameters between 2 years before and 2 years after LUM/IVA initiation.

**Methods:** In this prospective multicentre cohort study, children (12-18 years old) were follow-up 2 years after initiation of LUM/IVA. We assessed prospectively during the two years of treatment and retrospectively during the two years before treatment the percentage of predicted forced expiratory volume in 1 second (ppFEV1), anthropometric Z-scores (weight, height, and body mass index (BMI)), the rate of exacerbations and antibiotic courses, and CT-scan scores. Tolerance and safety of the treatment was also assessed.

**Findings:** Forty adolescents aged 12.0 to 17.4 years at LUM/IVA initiation were included. While a decrease was present during the two years prior to treatment, the ppFEV<sub>1</sub> increased significantly after LUM/IVA initiation and became significant after 2 years of treatment. LUM/IVA also improved the BMI Z-score and sweat chloride concentration. By contrast, there was no significant change in exacerbation or antibiotics use rates and in CT-scan scores. Age at LUM/IVA initiation was lower in good responders and associated with ppFEV<sub>1</sub> change during after two years of treatment. LUM/IVA was well tolerated as observed in clinical trials.

**Interpretations:** In real life in F508del homozygote adolescents, long-term LUM/IVA is well tolerated and changes the decreased trajectory of ppFEV<sub>1</sub> all the more so as the age of introduction is early. LUM/IVA also improves nutritional status and sweat chloride concentration but not exacerbation rate or radiological scores.

**Key words:** CFTR potentiator, CFTR corrector, lung function testing, nutritional status, sweat chloride.

**Conflict of interest:** SB, FG, CC, RE, MF conduct clinical trials with Vertex pharmacological agents, on behalf of the European Cystic Fibrosis Society – Clinical Trials Network (ECFS-CTN) and within the scope of ECFS-CTN activities.

### **Contributors' Statement Page**

Dr Bui designed and supervised the study, with contribution from Drs Masson and Mittaine. Drs Bui, Masson, Roditis, Dournes, Galode, Collet, Enaud, Languépin and Mittaine, and Pr Fayon and Mas included and followed the patients; Statistical analysis was performed by Drs Bui, Beaufils and Enaud. Dr Bui Mittaine and Masson were major contributors in writing the manuscript and contributed equally to the manuscript. All authors approved the final manuscript as submitted and agree to be accountable for all aspects of the work.

## 2.1 INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is an inherited genetic disease leading to *Cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) dysfunction. CFTR is a channel located at the apical membrane of epithelial cells involved in active excretion of chloride in various organs such as lungs (Rowe et al., 2005; Lubamba et al., 2012; Bui et al., 2016; Talamo Guevara and McColley, 2017). Among more than 2000 mutations of the CFTR gene, the homozygous F508del represents the most frequent in France with a prevalence of up to 41% of patients (Guilloud-Bataille et al., 2000). This mutation leads to a processing and trafficking defect of the CFTR protein resulting in an early degradation or a dysfunctional protein expressed into the apical membrane of cells (Van Goor et al., 2011; Bui et al., 2016; Talamo Guevara and McColley, 2017). As consequence, epithelial mucus secretion is dehydrated promoting pulmonary infection (Singh et al., 2019) and organ injury (e.g., pancreatic insufficient) leading to impaired lung function, growth and nutritional outcomes (Yen et al., 2013; Konstan et al., 2017; McColley et al., 2019). Therapeutic approaches over the last 20 years based on symptomatic treatments (physiotherapy, fluidifiers, pancreatic enzymes...) (Sermet-Gaudelus et al., 2010a; Farrell et al., 2017) slowed down the progression of CF and enhanced life expectancy (Yen et al., 2013; Talamo Guevara and McColley, 2017). Nevertheless, CF remains a severe disease, in which pulmonary exacerbations and poor nutritional status contribute to progressive lung function decline and death in young adults (Yen et al., 2013; Konstan et al., 2017; Talamo Guevara and McColley, 2017; McColley et al., 2019; Rubin et al., 2019).

Recently, new therapeutic approaches in CF have been developed to improved cell chloride secretion by targeting the defect in F508del CFTR folding using in association the CFTR corrector Lumacaftor (LUM) (enhances trafficking and processing), and the CFTR potentiator Ivacaftor (IVA) (increases the channel opening probability) (Bui et al., 2016; Talamo Guevara and McColley, 2017). Phase III studies have demonstrated good tolerance of the Lumacaftor/Ivacaftor association (LUM/IVA) and significant potential benefits in youngest children aged 2 to 5 years old (McNamara et al., 2019) and 6 to 11 years (Konstan et al., 2017; Ratjen et al., 2017) (e.g., improved body mass index (BMI)), and in adolescents over 12 years of age and adults (i.e., improvement in BMI and percentage of predicted FEV<sub>1</sub> (ppFEV<sub>1</sub>) and decrease in the number of exacerbations/intravenous antibiotic courses) (Wainwright et al., 2015). The positive effect of LUM/IVA on lung function decline and BMI has been confirmed in patients over 12 years by the



96 weeks follow-up PROGRESS study (Konstan et al., 2017) and more recently, in France, in the real-life study performed by Burgel *et al* (Burgel et al., 2020). However, the PROGRESS study mostly included CF adults (Konstan et al., 2017), and the study performed by Burgel followed CF adolescents only for a years after LUM/IVA initiation.

Thus, real-life study are needed to confirm the ability of LUM/IVA to change the course of the disease and to evaluate its long-term effects, particularly in adolescents, who are at a critical stage of their development.

For these reasons, we have conducted a paediatric prospective real-life cohort study including F508del homozygote adolescents followed-up within the French South-Western network 2 years before and 2 years after LUM/IVA initiation. Our primary objective was to compare the changes in ppFEV<sub>1</sub> in the 2 years before and the two years after the start of LUM/IVA treatment. The secondary objectives were to assess (i) the evolution of clinical (*i.e.* anthropometric parameters (weight, height and BMI expressed as Z-scores) and number of pulmonary exacerbation, antibiotic use), biological (*i.e.* sweat chloride concentration) and radiological (*i.e.* the Bhalla CT-scan score with the percentage High Attenuation Volume (%HAV) mucus secretions sub-score) parameters; (ii) to identify parameters associated with response to treatment; (iii) to assess the tolerance to treatment.

## **2.2 METHODS**

### **2.2.1 Study design**

The study was conducted prospectively between February 2016 and December 2018 within the French South-West network of paediatric CF centres (Tertiary-Care University Hospitals in Bordeaux, Toulouse, and Limoges). This study included CF adolescent (12 to 18 years old) eligible for LUM/IVA treatment (F508del homozygotes aged 12 years and older), followed up in one of the French South-West network of paediatric CF centres, and not included in other CFTR modulator protocols study. Patients having stopped LUM/IVA within 3 months after initiation of treatment were excluded from analyses. It was a non-interventional study. Indeed, LUM/IVA has been approved by the Food and Drug Administration and the European Medicines Agency, and labelled in France since 2015 for CF patients with F508del homozygous CFTR mutation over 12 years of age. Thus, at the time of the patient follow-up period, LUM/IVA was prescribed as part of routine patient's care. In addition, the use of the data collected and analysed for the study were exclusively

extracted from the patients' medical records after having obtained their informed consent. In this context and according to the French law in force, the approval of an ethics committee was not required.

### 2.2.2 Data collected

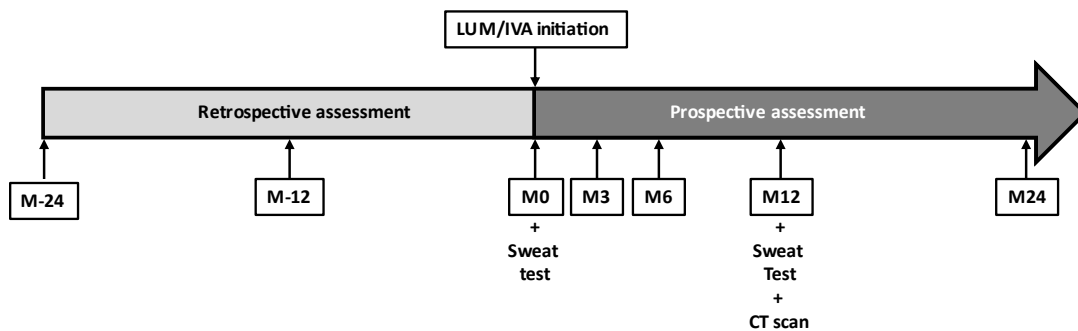
All children were followed prospectively every 3 months before and after LUM/IVA initiation as part of their disease follow-up. The study chronology was presented in Figure S1. Briefly, Weight, height, BMI, ppFEV<sub>1</sub> were assessed the day of LUM/IVA initiation (M<sub>0</sub>) and at 3, 6, 12 and 24 months (M<sub>3</sub>, M<sub>6</sub>, M<sub>12</sub> and M<sub>24</sub>) after treatment initiation during patients' routine clinical visits. To assess the effect of LUM/IVA treatment on the disease course, these parameters were retrospectively collected 12 and 24 months (M-12 and M-24) prior to the initiation of LUM/IVA. Anthropometric data (weight, height, and BMI) were expressed as Z-score using the Global Lungs Initiative 2012 software. To avoid the effects of exacerbations, we chose the best ppFEV<sub>1</sub> value at 1 and 2 years (+ 1 month) before and after the start of LUM/IVA. Good responders were defined as a greater than 5% in ppFEV<sub>1</sub> gain, as previously described (Wainwright et al., 2015; Elborn et al., 2016; Masson et al., 2019). The number of oral/intravenous antibiotics courses and the number of exacerbations that occurred in the two years following treatment initiation and in the two years prior to treatment were collected. A sweat test was performed at M<sub>0</sub> and M<sub>12</sub> according to European recommendations (Sermet-Gaudelus et al., 2010b).

Both the visual CT Bhalla score (Bhalla et al., 1991) and the automated measurement of percentage High Attenuation Volume (%HAV)-score (Chassagnon et al., 2018) were determined using the Pulmo3D Syngo software (Siemens, Erlangen, Germany) by two radiologists of the Bordeaux Hospital for centralised interpretation from CT scans performed in the radiology department of inclusion centres before initiation and after one year of treatment.

To assess treatment tolerance, plasma liver enzyme were monitored prior to LUM/IVA treatment initiation and at each visit during first year and annually thereafter. Eye examinations were performed prior to the start of treatment and monitored at one year. We also collected clinical regarding side effects at each visit.

### 2.2.3 Statistics

Analyses were performed only on available data with R software® (version 4.0). Figures were done with Prism software® (version 5.1). Analyses concerned the entire population or comparison between subgroups of patients according the presence or the absence of impaired lung function (ppFEV<sub>1</sub> <80%) or according Z-scores BMI (Z-scores <0 vs Z-scores ≥0) at LUM/IVA initiation. Normality was assessed using Q-Q plots. Parametric variables were compared using student t-tests or ANOVA and results were expressed as mean ± standard deviation (SD). Nonparametric variables were compared with Mann-Whitney test for unpaired values or Wilcoxon test for paired ones and with T-test for parametric variables. Results were expressed at the mean±standard deviation or with the median and interquartile [IQR]. Categorical variables were expressed in absolute values and in percentage. Categorical variables were performed using the Fisher's exact test or Chi square test. Correlation were performed using Spearman test. A p-value <0.05 was considered significant.



**Figure S1. Study design and chronology**

Patients were included at Lumacaftor/Ivacaftor (LUM/IVA) Initiation (M0). At 3 (M3), 6 (M6), 12 (M12) and 24 (M24) months of treatment, height, weight, body mass index, last lung function testing results were assessed prospectively. These parameters were also assessed retrospectively at 24 (M-24) and 12 (M-12) months before LUM/IVA initiation. A sweat test was performed at M0 and M12. Computed tomography scans were performed at M12. Side effects of LUM /IVA treatment were assessed at each visit after initiation.

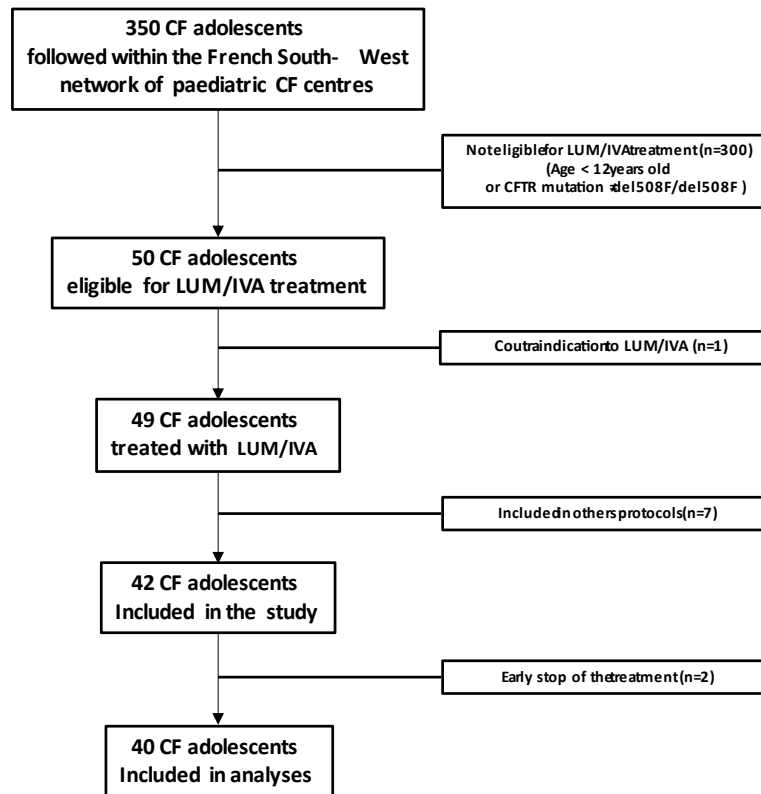
## 2.3 RESULTS

### 2.3.1 Population characteristics

Among the 350 CF adolescents followed within the French South-West network of paediatric CF centres, 50 were eligible for LUM/IVA treatment of whom, one had a contraindication of LUM/IVA (severe cirrhosis) and 7 were included in new therapy protocols (Figure 1). LUM/IVA was initiated in the remaining 42 included patients but two stopped LUM/IVA treatment early (<3 months) and were excluded from the analyses (Figure 1).

The main characteristics of the 40 adolescents at initiation of LUM/IVA are summarized in Table 1. Except a ppFEV<sub>1</sub> and a BMI Z-score lower in patients with impaired lung function (ppFEV<sub>1</sub><80%) than in those without, there was no significant difference between the two groups at Mo (Table 1). Except for anthropometric parameters (*i.e.*, Weight, Height and BMI Z-scores), there was no difference between patients with or without BMI Z-scores <0 at Mo (Table 1).

**Figure 1. Flow chart**



CF : Cystic fibrosis ; LUM/IVA: Lumacaftor/Ivacaftor association; del508F/del508F: Homozygous deletion of the codon for phenylalanine at position 508 in the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene.

**Table 1. Patients' characteristics at LUMACAFITOR/IVACAFITOR initiation**

	Total	ppFEV1 <80% at M0	ppFEV1 ≥80% at M0	<i>p</i> 1	BMI Z-score <0 at M0	BMI Z-score ≥0 at M0	<i>p</i> 2
N	40	18	22		24	16	
Age (years)	13.9 + 1.7	13.5 + 1.8	14.2 + 1.5	0.111	13.8 + 1.7	14.0 + 1.8	0.814
Male	22/40 (55.0)	8/18 (44.4)	14/22 (63.6)	0.339	14/24 (58.3)	8/16 (50.0)	0.748
Weight Z-score	-0.40 + 1.01	-0.71 + 1.02	-0.15 + 0.94	0.134	-1.00 + 0.70	0.51 + 0.63	<0.001
Height Z-score	-0.37 + 1.06	-0.41 + 1.17	-0.34 + 0.99	0.860	-0.66 + 1.07	0.06 + 0.91	0.030
BMI Z-score	-0.28 + 1.00	-0.68 + 0.97	0.04 + 0.94	0.036	-0.92 + 0.61	0.75 + 0.52	<0.001
Past history							
Meconial ileus	2/40 (5.0)	1/18 (5.6)	1/22 (4.5)	1.000	1/24 (4.2)	1/16 (6.3)	1.000
DIOS	1/40 (2.5)	0/18 (0.0)	1/22 (4.5)	1.000	0/24 (0.0)	1/16 (6.3)	0.400
CFRD	2/40 (5.0)	0/18 (0.0)	2/22 (9.1)	0.492	1/24 (4.2)	1/16 (6.3)	1.000
CFLD	9/40 (22.5)	6/18 (33.3)	3/22 (13.6)	0.253	7/24 (29.2)	2/16 (12.5)	0.272
<i>P. Aeruginosa</i> colonization							
None	18/40 (45.0)	7/18 (38.9)	11/22 (50.0)		10/24 (41.7)	8/16 (50.0)	
Intermittent	11/40 (27.5)	5/18 (27.8)	6/22 (27.3)	0.713	8/24 (33.3)	3/16 (18.8)	0.598
Chronic	11/40 (27.5)	6/18 (33.3)	5/22 (22.7)		6/24 (25.0)	5/16 (31.3)	
<i>S. Aureus</i> colonization							
None	8/40 (20.0)	4/18 (22.2)	4/22 (18.2)		5/24 (20.8)	3/16 (18.8)	
Intermittent	3/40 (7.5)	0/18 (0.0)	3/22 (13.6)	0.264	1/24 (4.2)	2/16 (12.5)	0.618
Chronic	29/40 (72.5)	14/18 (77.8)	15/22 (68.2)		18/24 (20.8)	11/16 (68.8)	
ppFEV1	83.3±18.3	68.2±12.7	95.6±11.7	<0.001	80.1 + 18.2	88.1 + 18.0	0.109
Treatment							
PERT U/Kg/j	7302 + 1727	7554 + 1887	7107+1609	0.506	7741 + 1738	6600 + 1507	0.116
Proton pump inhibitor	21/40 (52.5)	9/18 (50.0)	12/22 (54.5)	1.000	13/24	8/16 (50.0)	1.000
ursodeoxycolic acid	16/40 (40.0)	7/18 (38.9)	9/22 (40.9)	1.000	10/24 (41.7)	6/16 (37.5)	1.000
Laxative treatment	5/40 (12.5)	0/18 (0.0)	5/22 (22.7)	0.053	1/24 (4.2)	4/16 (25.0)	0.138
Inhaled antibiotic	17/40 (42.5)	10/18 (55.6)	7/22 (31.8)	0.200	10/24 (41.7)	7/16 (43.8)	1.000

M0: Day of Lumacaftor/Ivacaftor initiation; ppFEV1: Percent of predicted Forced Expiratory Volume in 1 second; BMI: Body Mass Index; DIOS: Distal intestinal obstruction syndrome. CFRD: Cystic fibrosis related diabetes; CFLD: Cystic Fibrosis Liver Disease; *P. Aeruginosa* : *Pseudomonas Aeruginosa* ; *S. Aureus*: *Staphylococcus Aureus*; PERT: Pancreatic enzymes replacement therapy.

Results are expressed as n/N (%) for categorical variables or as mean ± standard deviation.

Comparisons between patients with ppFEV1<80% compared to those with ppFEV1≥80% at M0 (*p*1) or between (patients with BMI Z-score<0 compared to those with BMI Z-score≥0 at

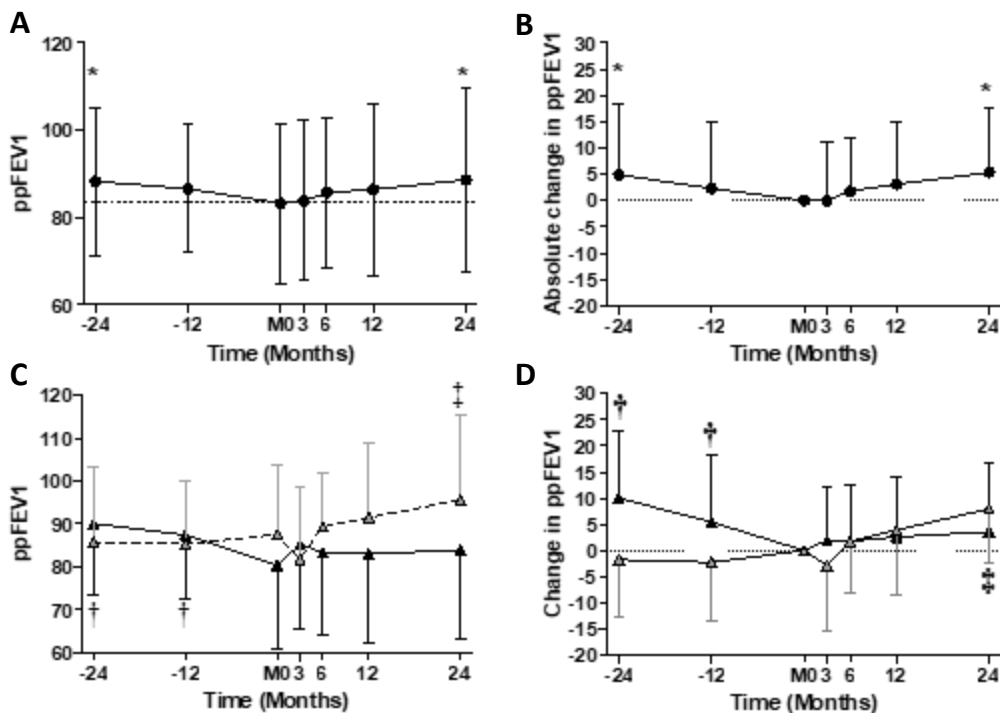
Lumacaftor/Ivacaftor initiation (*p*2) were performed using Fisher's exact test for categorical variables or Mann-Whitney test for quantitative variables. A *p* value ≤ 0.05 was considered significant. Results are median [IQR<sub>25</sub>-IQR<sub>75</sub>]

### 2.3.2 LUM/IVA changes lung function trajectory in adolescents with cystic fibrosis

In the two years prior to LUM/IVA treatment, the ppFEV1 decreased significantly from M-24 and M0 (*p*=0.008) whereas after LUM/IVA initiation there was a significant increased from M0 to M24 (*p*=0.027) (Figure 2A). Indeed, between M-24 and M0, the ppFEV1 decreased by -4.4% and between M0 and M24, it increased by +7.4% (Figure 2B). The ppFEV1 measured at M3, M6

and M12, as well as at M-12, were not significantly different compared to that measured at Mo (Figure 2A-B).

In patients with low BMI (Z-score BMI < 0) at LUM/IVA initiation, the ppFEV1 significantly decreased between M-24 or M-12 and Mo and did not change significantly after LUM/IVA initiation (Figure 2C-D). By contrast, in patients with Z-score BMI > 0 at LUM/IVA initiation, the ppFEV1 was not different at M-24, M-12, M3, M6 and M12 but significantly increased at M24 compared to Mo (figure 2C-D).

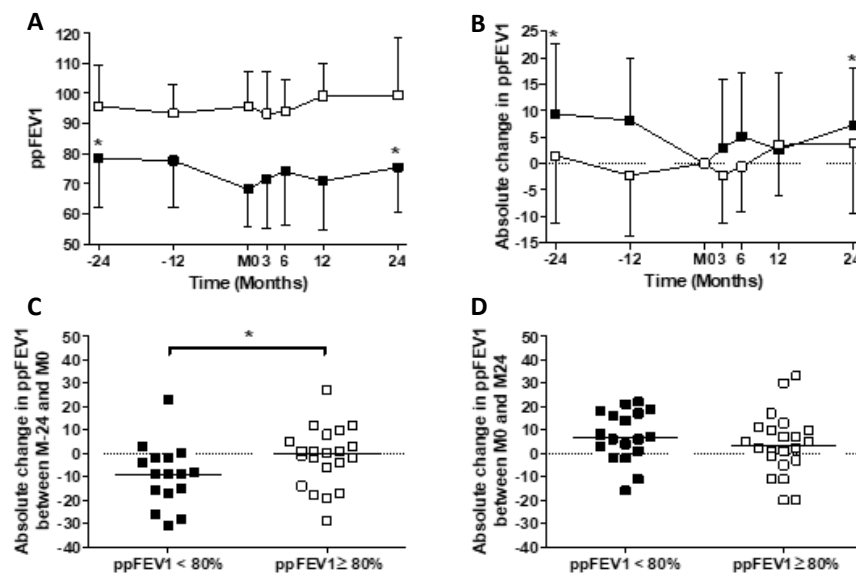


**Figure 2. Evolution of the percentage of predicted flow expiratory volume in 1 second (ppFEV1) before and after Lumacaftor/Ivacaftor (LUM/IVA) initiation**

BMI: Body mass index.

Evolution and absolute change of the ppFEV1 from 2 years before to 2 years after Lumacaftor/Ivacaftor (LUM/IVA) initiation (Mo) in the entire population (solid black circle) (A and B respectively) or in subgroups according the presence (solid black triangle) or the absence (solid grey triangle) of BMI Z-score at Mo (C and D). Data are plotted at each timepoint using all available and were represented at the mean±standard deviation. Comparisons with data obtained at Mo were performed using Wilcoxon paired test. \*, † and ‡ indicate p<0.05 respectively in the entire population, in patients with Z-score BMI < 0 and in patients with Z-score BMI ≥ 0.

In patients with impaired lung function (ppFEV<sub>1</sub> <80%) at LUM/IVA initiation, the ppFEV<sub>1</sub> increased significantly from M0 to M24 while it decreased significantly from M-24 or M-12 to M0 (Figure 3A). By contrast, in patients without impaired lung function at LUM/IVA initiation, the ppFEV<sub>1</sub> measured at M-24, M-12, M3, M6, M12 and M24 were not different compared to that measured at M0 despite a slight but not significant improvement after LUM/IVA initiation (Figure 3A). Indeed, in adolescents with a ppFEV<sub>1</sub> < 80% at LUM/IVA initiation, the absolute change in ppFEV<sub>1</sub> was -9.4±13.3% between M-24 and M0 and was +7.3±10.8% between M0 and M24 (Figure 3B). In patients without impaired lung function at LUM/IVA initiation, the absolute change in ppFEV<sub>1</sub> was -1.5±12.7% between M-24 and M0 and +3.8±13.3% between M0 and M24 (Figure 3B). Moreover, the decrease in ppFEV<sub>1</sub> in the two years prior LUM/IVA initiation was higher in patients with impaired lung function than those without (Figure 3C) whereas the absolute change in ppFEV<sub>1</sub> from M0 to M24 was not different between the two group (Figure 3D) as well as between M-24 and M24 (ppFEV<sub>1</sub> change : -2.8±17.9 vs 3.4 ±15.8, p=0.086).



**Figure 3. Evolution of the percentage of predicted flow expiratory volume in 1 second (ppFEV<sub>1</sub>) according the presence or the absence of ppFEV<sub>1</sub><80% at Lumacaftor/Ivacaftor (LUM/IVA) initiation**

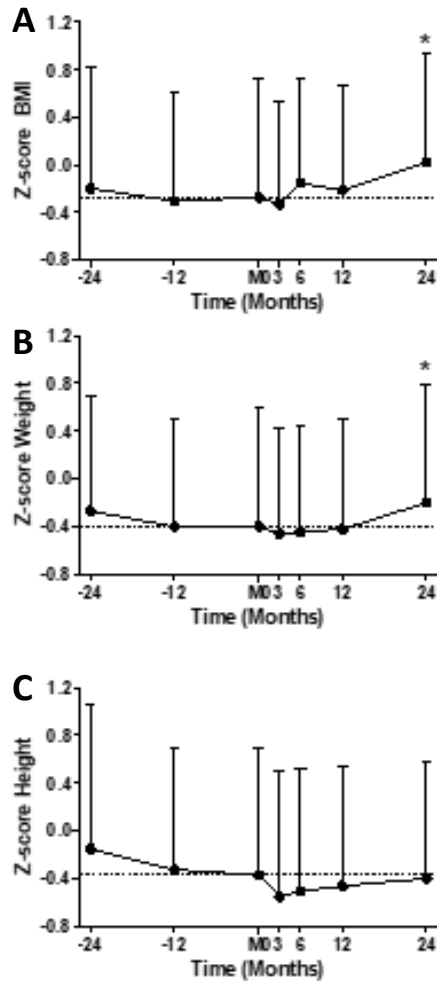
Evolution (A) and absolute change (B) of the ppFEV<sub>1</sub> from 2 years before to 2 years after Lumacaftor/Ivacaftor (LUM/IVA) initiation (M0) in patients with (solid square) or without (empty square) (ppFEV<sub>1</sub> < 80% at initiation. Data are plotted at each timepoint using all available and were represented at the mean±standard deviation and comparisons with data obtained at M0 were performed using Wilcoxon paired test. Absolute change in ppFEV<sub>1</sub> from 24 months before (M-24) to M0 (C) and from M0 to 24 months after initiation (M24) (D) according the presence or the absence of ppFEV<sub>1</sub><80% at M0. Each patient was represented by a plot and bar represent the median and comparisons were performed using Mann-Whitney test. \* p<0.05.

### 2.3.3 LUM/IVA improves anthropometric parameters in adolescents with cystic fibrosis

Compared to M<sub>0</sub>, a significant increase ( $0.31 \pm 0.66$ ) in BMI Z-score was obtained after 24 months of LUM/IVA treatment whereas no significant change was identified 24 of 12 month before initiation or at M<sub>3</sub>, M<sub>6</sub> and M<sub>12</sub> (Figure 4A). The improvement was related to a significant increase in Weight Z-score between M<sub>0</sub> and M<sub>24</sub> (Figure 4B) since no significant change was observe in Height Z-score before or after treatment (Figure 4C).

The Z-score BMI of patients with Z-score BMI < 0 at LUM/IVA initiation decreased significantly between M-24 and M<sub>0</sub> but increased significantly after as early as 6 months of treatment (figure 5A). By contrast, in patients with Z-score BMI  $\geq 0$  at LUM/IVA initiation, the Z-score BMI did not change significantly from M-24 to M<sub>24</sub> (Figure 5A). As consequence, the improvement in Z-score BMI between M<sub>0</sub> and M<sub>24</sub> was higher in patients with Z-score BMI < 0 at LUM/IVA initiation than in those without (Figure 5B) and was not different between the two group from M-24 to M<sub>24</sub> (Figure 5C). For both patients with and those without FEV<sub>1</sub> < 80% at LUM/IVA initiation, the improvement in the Z-score BMI became significant after 24 months of treatment whereas the Z-score BMI did not evolve significantly in the two years before treatment (Figure 5D).

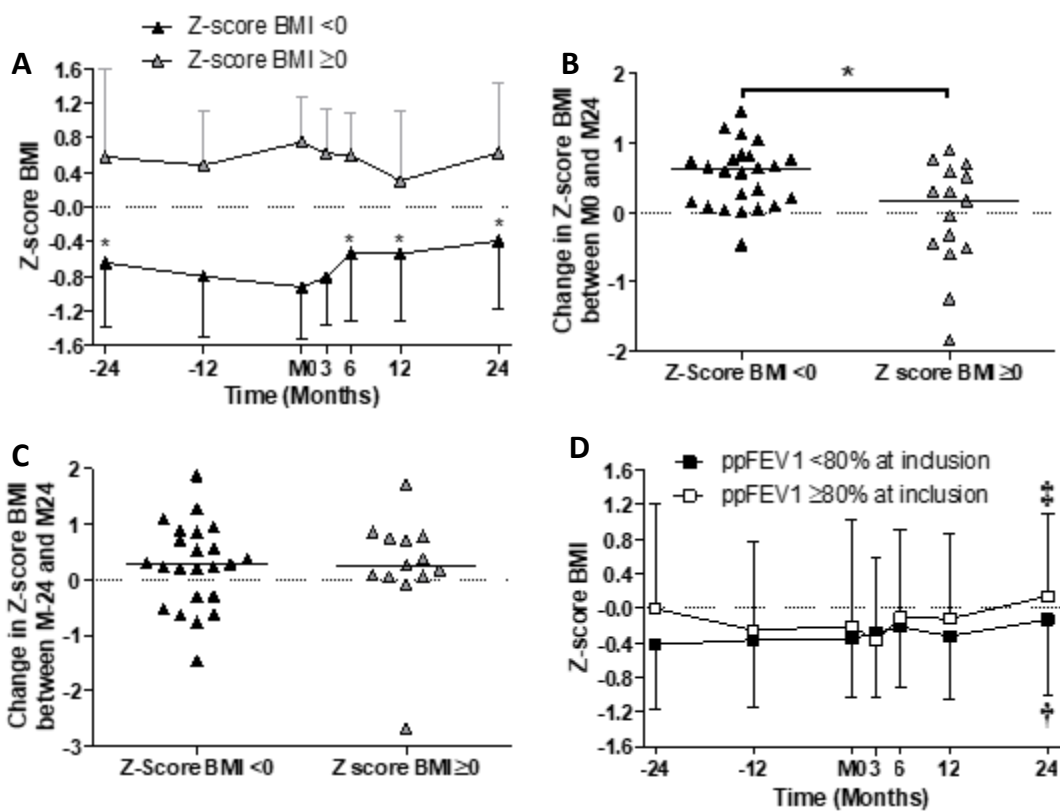




**Figure 4. Evolution of anthropometric parameters before and after Lumacaftor/Ivacaftor (LUM/IVA) initiation**

BMI: Body mass index.

Evolution of BMI Z-score (A), Weight Z-score (B) and Height Z-score (C) from 2 years before to 2 years after LUM/IVA initiation (Mo). Data are plotted at each timepoint using all available and were represented at the mean±standard deviation. Comparisons with data obtained at Mo were performed using Wilcoxon paired test. \* p<0.05.



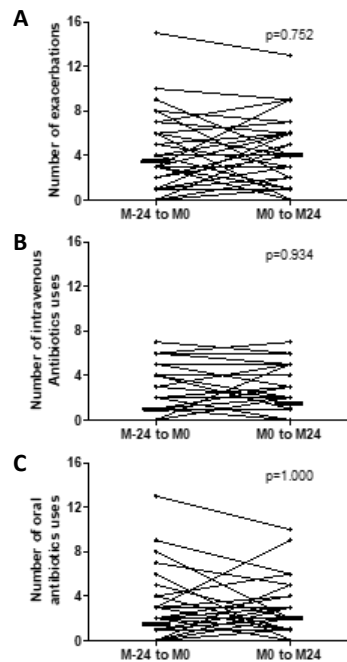
**Figure 5. Evolution of BMI Z-score before and after Lumacaftor/Ivacaftor (LUM/IVA) initiation according baseline BMI or lung function.**

Evolution of BMI Z-score before and after Lumacaftor/Ivacaftor (LUM/IVA) initiation (M0) according the presence (solid black triangle) or the absence (solid grey triangle) of BMI Z-score at M0 (A) or according the presence (solid square) or the absence (empty square) of percentage of predicted forced expiratory volume in 1 second (ppFEV1) < 80% at M0. Data are plotted at each timepoint using all available and were represented at the mean $\pm$ standard deviation and comparisons with data obtained at M0 were performed using Wilcoxon paired test. Change in BMI Z-score from M0 to 24 months (M24) after initiation (C) and from 24 months before initiation (M-24) and M24 (D). Each patient was represented by a plot and bar represent the median and comparisons were performed using Mann-Whitney test. \*, † and ‡ indicate p<0.05.

### 2.3.4 LUM/IVA decrease sweat chloride concentration in adolescents with cystic fibrosis

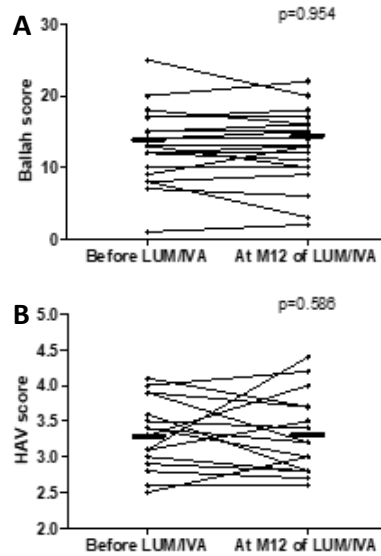
There was no difference in the number of exacerbations, oral or intravenous antibiotic use in the two years before and after LUM/IVA initiation (Figure S2A-C). Twenty-five patients underwent a CT scan before the start and after one year of treatment. The Bhalla or HAV scores did not change significantly one year after LUM/IVA initiation (Figure S3A-B).

By contrast sweat chloride improved significantly, but without normalizing, from LUM/IVA initiation to M12 (Figure 6A). The difference was significant for patients with or without impaired lung function at LUM/IVA initiation at M0 (Figure 6B). The difference was also significant for patients with Z-score BMI <0 at LUM/IVA initiation but not for those with Z-score BMI ≥0 at initiation whose had lower sweat chloride concentration (Figure 6C). This significant improvement of sweat chloride concentration was observed both good and not responders (increase in ppFEV1 ≥ 5%) (Figure 6D).



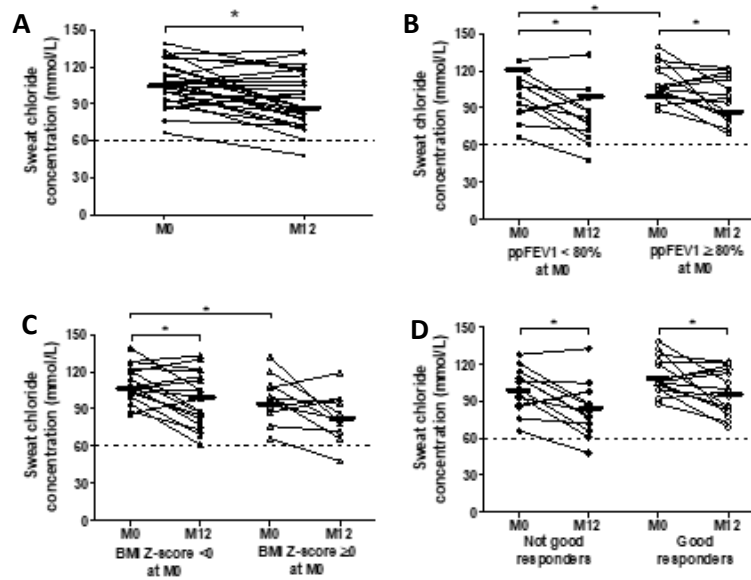
**Figure S2. Change in number of exacerbation or antibiotics uses after Lumacaftor/Ivacaftor initiation**

The number of exacerbation (A), intravenous antibiotics uses (B) and oral antibiotics uses (C) assessed after two years of treatment by Lumacaftor/Ivacaftor initiation (M0 to M24) were compared with those obtained in the two years prior Lumacaftor/Ivacaftor initiation (M-24 to M0). Patients data are presented with the median (large bar). Comparisons were performed using Wilcoxon paired test.



**Figure S3. Change in Computed tomography scan scores after Lumacaftor/Ivacaftor initiation**

The Ballah (A) and HAV score (B) assessed after 12 months of Lumacaftor/Ivacaftor treatment (M12) were compared to those determined on scan performed before Lumacaftor/Ivacaftor initiation. Patients data are presented with the median (large bar). Comparisons were performed using Wilcoxon paired test.

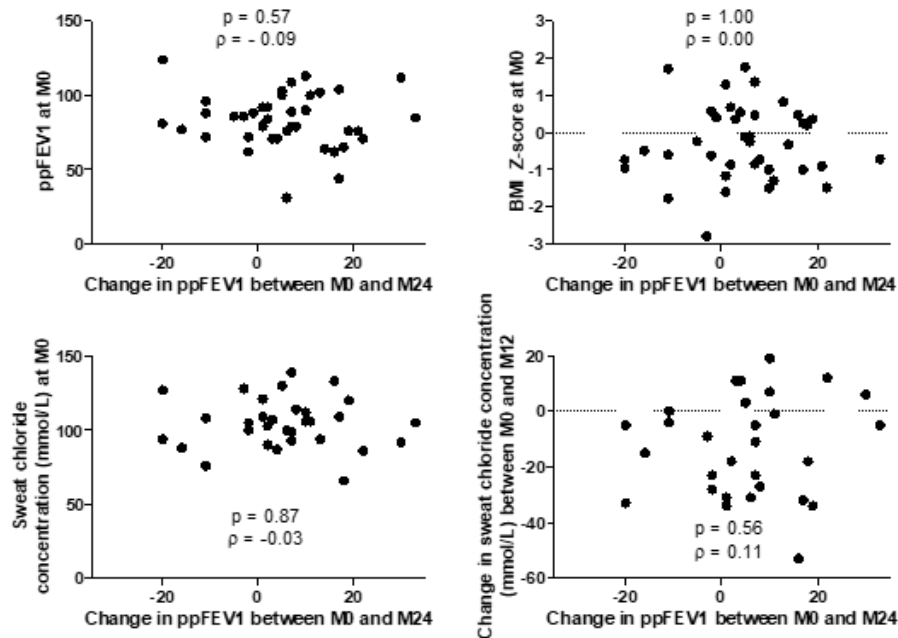


**Figure 6. Change in sweat chloride concentration after a year of LUM/IVA treatment**

Change in sweat chloride concentration after a year of LUM/IVA treatment in the entire population (A) or according the presence or the absence of ppFEV1 < 80% (B) or BMI-Z score < 0 at Mo (C) or according the response to treatment (D). Each patient was represented by a plot and bar represent the median. Comparisons were performed using Mann-Whitney test. \* p<0.05.

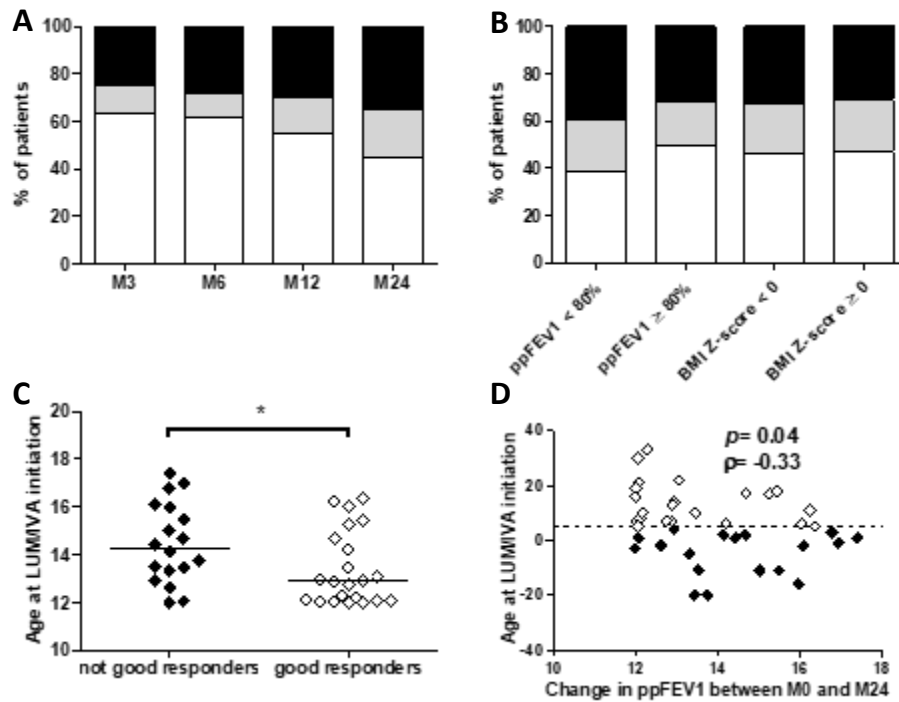
### 2.3.5 The number of good responders increased in time and was associated to age at LUM/IVA initiation.

During the LUM/IVA treatment good responders increasing with time to concern 22/40 (55%) patients after two years (Figure 7A). Among these 22 patients, 14 (35% of the entire population) had an improvement in ppFEV1 over 10% after two years of treatment (Figure 7A). After 2 years of treatment, there was no differences in the percentage of good responders according to the presence or the absence of impaired lung function or BMI Z-score < 0 at LUM/IVA initiation (Figure 7B). There was no association between ppFEV1 change after two years of treatment and the ppFEV1 (Figure S4A), BMI Z-score (Figure S4B) or sweat chloride concentration (Figure S4C) at M0 nor with change in sweat chloride concentration between M0 and M12 (Figure S4D). However, when we compared good and not good responders, we identify that only age at LUM/IVA initiation was significantly different and lower in good responders (Figure 7C). Moreover, there was a reverse correlation between age at M0 and change in ppFEV1 after 2 years of treatment (Figure 7D).



**Figure S4. Associations between ppFEV1 change after 2 years of LUM/IVA treatment parameters assessed at initiation.**

After two years of treatment the ppFEV1 change was not associated with the ppFEV1 (A), the BMI Z-score (B), the sweat chloride concentration (C) at M0 nor with change in sweat chloride concentration between M0 and M12 (D). Correlation was performed using Spearman test and the coefficient of correlation  $\rho$  was indicated. A p value under 0.05 was consider significant.



**Figure 7. Identification of good responders to treatment by LUM/IVA**

The percentage of Patients without a good response to treatment (ppFEV1 change <5%) is represented in white and that of good responders (ppFEV1 change >5%) in grey. Percentage of good responders with ppFEV1 change >10% are represented in black. Evolution of the percentage of good responders over time after LUM/IVA initiation (A). Percentage of good responders after 2 years of treatment by LUM/IVA the presence or the absence of ppFEV1 < 80% or BMI-Z score < 0 at Mo (B). Comparison of age at LUM/IVA according the response to treatment after 24 months (C). Correlation between age at LUM/IVA initiation and ppFEV1 change between LUM/IVA initiation (Mo) and 24 months after initiation (M24) (D). Comparisons were performed using Chi square test for proportion of good responders or t-test for age. Correlation was performed using Spearman test and the coefficient of correlation  $\rho$  was indicated. \*  $p < 0.05$ .

### 2.3.6 LUM/IVA is well tolerated, and adherence is satisfactory

Side effect observed in the 40 patients included were: transient chest tightness (n=1), increased anxiety (n=1), transient diarrhoea (n=3), increased aspartate and alanine aminotransferase greater than 5 times the upper limit of normal (n=1). Except for this last patient who transiently interrupted the treatment, all the other all others continued the treatment for at least two years. No cataract or lens opacities were detected.

Early cessation of treatment (< 3 months) occurs only for two patients due to in one case and therapeutic non-observance in the context of social difficulties in the other case.

## 2.4 DISCUSSION

The present study demonstrated the long-term effectiveness and safety of LUM/IVA on pulmonary and nutritional outcomes in CF adolescents in real life. Indeed, we found a significant improvement in the ppFEV<sub>1</sub>, from worsening the two previous years of treatment to a significant increase during the two years of LUM/IVA therapy, particularly in patients with ppFEV<sub>1</sub><80% or BMI Z-score<0 at LUM/IVA initiation. We also demonstrated a concomitant improvement in BMI Z-score and sweat chloride concentration after LUM/IVA treatment.

The impact of LUM/IVA on ppFEV<sub>1</sub> appears to be greater in the adolescents in the present study compared to that reported in industry phase III randomized controlled trials TRANSPORT (+2 to 4% after 24 weeks of LUM/IVA) (Wainwright et al., 2015) and PROGRESS (+0.5% at 96 weeks) (Konstan et al., 2017). In the long term, the PROGRESS study identified in treated patients a slowing-down of lung function decline compared to paired non-treated patients from the US registry but with the persistence of a declining trend in the ppFEV<sub>1</sub> (Konstan et al., 2017) while we showed an increased in ppFEV<sub>1</sub> in treated patients in our study. However, both the TRANSPORT and PROGRESS study mainly involved CF adults whereas we focused on CF adolescents (Wainwright et al., 2015; Konstan et al., 2017). Moreover, our results are relevant with the slowing-down of lung function decline after a year of LUM/IVA treatment in CF adolescents included in the French real-life cohort (Burgel et al., 2020), or those of the study performed by Loukou *et al.* (Loukou et al., 2020). Moreover, we have confirmed the long term effect of LUM/IVA treatment in a such population with a percentage of good responders close to that previously described (Masson et al., 2019). We also demonstrated some benefit for adolescents with impaired lung function or BMI Z-score <0 but also in those with normal ppFEV<sub>1</sub> or BMI Z-score > 0 at the start of the treatment (i.e., ≈50% of good responder). Moreover, we highlighted a reverse correlation between the age at LUM/IVA initiation and improvement in ppFEV<sub>1</sub> after 2 years of treatment. This reinforced the benefit of an early initiation of the treatment at a younger age regardless pulmonary function or growth parameters. This was relevant with the improvement in lung clearance index at 24 weeks of treatment in younger patients (9.1±1.53 years old) with normal lung function previously described (Milla et al., 2017).

Interestingly, we observed significant improvement in growth parameters (*i.e.*, weight and BMI Z-score), particularly in adolescents with poor BMI Z-scores at the start of LUM/IV as demonstrated in younger patients included in LUM/IVA phase III (Milla et al., 2017) or in CF adults (Konstan et al., 2017).

As previously described in industry sponsored and larger real life studies (Wainwright et al., 2015; Konstan et al., 2017; Milla et al., 2017; McNamara et al., 2019; Burgel et al., 2020), we confirmed the improvement by LUM/IVA in CFTR functioning with the significant decrease in sweat chloride concentration, particularly in the most severe patients (low ppFEV<sub>1</sub> or BMI). However, we did not find difference in sweat chloride concentration improvement between responders and non-responders, nor association between this parameters and improvement in ppFEV<sub>1</sub> or BMI Z-score as previously demonstrated (Masson et al., 2019).

In contrast, we could not confirm the decrease in pulmonary exacerbation rates and antibiotics consumption in real life by LUM/IVA in CF adolescents as found in placebo-controlled and long-term industry sponsored studies (*i.e.*, decrease in exacerbation rates by 30 to 39%) (Wainwright et al., 2015; Konstan et al., 2017) or in a previous real life study (*i.e.*, decrease in exacerbation rates by 54%) (Tong et al., 2020). However, in these last study, patients were older ( $31 \pm 11.6$  years old) (Wainwright et al., 2015; Konstan et al., 2017; Tong et al., 2020) and/or have worse lung function (ppFEV<sub>1</sub>:  $37.4\% \pm 11.3$ ) (Tong et al., 2020) and/or have a higher rate of exacerbations treated by intravenous antibiotics ( $3.4 \pm 2.4$ /year) at the time of initiation of LUM/IVA (Tong et al., 2020) compared to our patients. Moreover, adolescents in our cohort have had less than 2 exacerbations per year, and less than 1 intravenous antibiotic course per year, thus the effect of LUM/IVA would be more difficult to demonstrate. In agreement with our results, in young adults with F508 homozygote mutations, Tessel *et al.* found no difference in the annualised rate of exacerbations (Tesell et al., 2019).

We did not find difference in Bhalla (Bhalla et al., 1991) score or HAV (Chassagnon et al., 2018) scores after a year of treatment as demonstrated in CF adults with advanced disease only. However, such results have not been demonstrated in CF children, who had lower level of disease severity. Indeed, CT scans were not included in the industry sponsored clinical trials of LUM/IVA involving CF children (Wainwright et al., 2015; Konstan et al., 2017; Ratjen et al., 2017; McNamara et al., 2019). In addition our results are in agreement with the lack of modification in the visual Eichinger score previously demonstrated in CF before and after a treatment despite a lung clearance index improvement (Stahl et al., 2019). However, a possible lack of sensitivity in the imaging scores may have impacted these results, as the visual scores may not detect a variation of less than 50% in lung injury due to their scoring systems (Stahl et al., 2019). Nevertheless, it does not reduce the interest to treat the young patients before irreversible lesions are established. To note, this lack of results in the imaging scores could also be the consequence of scans performed



too early, since the results on ppFEV<sub>1</sub> or BMI were only significant after 2 year of treatment in our population.

In our study, the side effects of the treatment were consistent with those observed in industry-sponsored studies (Wainwright et al., 2015; Konstan et al., 2017; Milla et al., 2017) or real-life cohorts (Burgel et al., 2020; Loukou et al., 2020) and in favour of good tolerability and patients' adherence. Interestingly, we observed psychological side-effect such as increased anxiety and depression, previously described in real life (McKinzie et al., 2017) but not in industry sponsored studies (Wainwright et al., 2015; Konstan et al., 2017; Milla et al., 2017).

Our study had several limitations. firstly, the number of patients included is low compared other real-life study but corresponded to 84% of patients eligible for LUM/IVA treatment. Second, spirometric tests at two years and one year before and after To were selected to match the best ppFEV<sub>1</sub> obtained at  $\pm 1$  month from the timepoint. However, we use this method to avoid the effect of exacerbation, which can temporarily be associated to decreased ppFEV<sub>1</sub>. Thirdly, data before treatment were assessed retrospectively but concerned standardised elements of CF patients follow-up consultations performed in the South-West network, which are filled prospectively and used for the national registry, decreasing the bias of missing data. Fourthly, only exacerbations requiring antibiotics have been considered whereas less severe paediatric exacerbations may be due to viral infections.

## **2.5 CONCLUSION**

We confirm that, in adolescents, real-life LUM/IVA changes the evolution over time and in the long term, from degradation before treatment to an improvement after treatment, of ppFEV<sub>1</sub> and BMI Z-score which have been associated to survival in cystic fibrosis. The treatment also restores CFTR function observed as observed in younger patients with a good tolerability and an early introduction appeared to promote a good response to the treatment.

At the time of emergence of different CFTR modulators, real-life studies help the clinicians to determine what types of results are to be expected according to age groups and to identify factor promoting good response such as an early intervention.

### 3 EVOLUTION DES MYCO-MICROBIOTES PULMONAIRES SOUS LUMACAFITOR-IVACAFITOR : ETUDE OBSERVATIONNELLE « LUM-IVA-BIOTA »

---

La prise en charge de la mucoviscidose est aujourd'hui marquée par l'apparition des modulateurs de la protéine CFTR, dont la combinaison Lumacaftor/Ivacaftor pour les patients homozygotes F508del. Les critères d'évaluation de l'efficacité de ce traitement reposent essentiellement sur l'évolution du VEMS, le nombre d'exacerbations, l'IMC ou la qualité de vie. Mais, il est essentiel de documenter l'effet de ce traitement sur l'écosystème pulmonaire des patients. L'objectif de la cohorte nationale « Lum-Iva-Biota », coordonnée par le Pr L. Delhaes et moi-même, était donc d'étudier l'évolution du myco-microbiote et de l'inflammation pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose et débutant un traitement par Lumacaftor/Ivacaftor.

Dans cette première étude, 78 patients de plus de 12 ans ont été inclus, dont 42 avec deux reliquats d'expectorations conservés aux visites d'initiation et de 6 mois post-traitement (ce groupe de 42 patients était comparable en termes d'évolution clinique à celui de la population globale). L'analyse des microbiote et mycobiote pulmonaires a été réalisée par séquençage MiSeq (Illumina) des régions V3-V4 de l'ARNr 16S et ITS2 en collaboration avec notre plateforme (PGTB - Cf. matériel et méthode). L'inflammation pulmonaire a été évaluée par le dosage ELISA de la calprotectine.

L'âge médian de la cohorte était de 19 ans (IQR: 13; 28) et le VEMS moyen de 67,9% ( $\pm 21,6$ ). Alors qu'une amélioration significative de l'IMC (gain moyen de 0.72 kg/m<sup>2</sup>,  $p < 0.01$ ) et du nombre de cures d'antibiotiques intraveineuses ( $p = 0.013$ ) a été constatée sous Lumacaftor/Ivacaftor, aucun changement significatif des alpha- et bêta- diversités bactériennes et fongiques, de l'abondance de pathogènes spécifiques ou de modification du taux de calprotectine n'a été observé à 6 mois de traitement par Lumacaftor/Ivacaftor pour l'ensemble des 42 patients. Cependant, chez les 15 patients qui n'étaient pas colonisés par *Pseudomonas aeruginosa* à l'initiation du traitement, le taux de calprotectine était plus bas avant traitement, et une amélioration significative de l'alpha-diversité bactérienne a été observée après 6 mois de traitement.

Cette étude décrit pour la première fois l'évolution du microbiote/mycobiote et de l'inflammation pulmonaires chez les patients traités par Lumacaftor/Ivacaftor. Ces résultats confortent l'idée que les modulateurs de la protéine CFTR doivent être commencés le plus tôt possible, *a fortiori* avant que le patient soit colonisé à *P. aeruginosa*, afin d'agir efficacement sur l'écosystème pulmonaire et notamment de restaurer la diversité microbienne pulmonaire.

Nous sommes en train de réaliser des qPCR pour quantifier l'abondance de *P. aeruginosa* et le manuscrit est en cours de relecture par les co-auteurs.

# **IMPACTS OF LUMACAFITOR-IVACAFITOR ON THE AIRWAY MICROBIOTA/MYCOBIOTA ARE MORE SIGNIFICANT IN PATIENTS UNCOLONIZED WITH *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

## **3.1 BACKGROUND**

Cystic fibrosis (CF) is the predominant genetic disease in the Caucasian population, caused by mutations in the gene encoding the CF transmembrane conductance regulator (CFTR) protein. The corresponding defective ion transport results into multiple organ dysfunction, but airway colonization and infection, pulmonary inflammation, and malnutrition are among the most important prognostic factors in CF patients with CF (O'Sullivan and Freedman, 2009).

CF airway are now considered to be a polymicrobial niche, and advances in next-generation sequencing allowed to well-characterize its microbiota and mycobiota (Coburn et al., 2015b; Acosta et al., 2018; Soret et al., 2020). Airway dysbiosis has been associated with lung disease severity in CF patients and is now recognized as a biomarker of the disease evolution. In particular, the airway microbiota alpha-diversity has been inversely correlated with pulmonary inflammation and positively correlated with body-mass index (BMI) and Forced Expiratory Volume in 1s expressed as percent predicted (ppFEV<sub>1</sub>). Microbiota alpha-diversity has been also shown to be predictive of the disease evolution (Acosta et al., 2018; Quinn et al., 2019; Frey et al., 2021).

In the last decade, therapeutic management of CF patients has been marked by the development of CFTR protein modulators. In 2015, lumacaftor and ivacaftor combination (respectively CFTR corrector and potentiator able to partially restore ion transport in epithelium cells) became the first CFTR modulator approved for F508del homozygous patients. While lumacaftor-ivacaftor safety has been well-documented (Elborn et al., 2016), treatment with lumacaftor-ivacaftor combination showed significant improvements in ppFEV<sub>1</sub>, pulmonary exacerbations, BMI and sweat chloride concentration (Wainwright et al., 2015; Burgel et al., 2020). However, the incomplete correlation between improvement in lung function and sweat chloride level suggests that patients response to lumacaftor-ivacaftor is multifactorial (Aalbers et al., 2020b). In parallel, an observed heterogeneity of the clinical response to lumacaftor-ivacaftor therapy has been described over the 6 first months (Masson et al., 2019). Limited data have addressed the evolution of CF airway microbiota and inflammation under lumacaftor-ivacaftor, although both are recognized biomarkers of lung function evolution (Gray et al., 2010; Bernarde et al., 2015; Acosta et al., 2018; Cuthbertson et al., 2020; Frey et al., 2021). Furthermore, airway colonizations,

especially with *Pseudomonas aeruginosa*, are crucial elements to understand the impact of CFTR modulators on lung ecosystem (Harris et al., 2020).

In this context, we hypothesize that improvements of CFTR function following an initiation of lumacaftor-ivacaftor treatment will be associated with changes in the airway bacterial and fungal microbiota as well as changes in the local inflammation. In the current study, we determined associations between airway microbiota/mycobiota, local inflammation, and clinical outcomes by using sputum samples from a multicentre cohort of CF patients aged 12 and over prospectively followed up before and 6 months after initiation of lumacaftor-ivacaftor treatment.

## **3.2 METHODS**

### **3.2.1 Study design and patients**

Patients enrolled in the Lum-Iva-Biota longitudinal observational cohort study were F508del homozygous patients aged 12 and over, followed in one of 6 French CF centres participating in the study, initiating lumacaftor-ivacaftor between December 2015 and June 2018.

After performing conventional microbial analyses required for the routine care, spontaneously expectorated sputa with sufficient volume remaining at the treatment initiation (M0) and after 6 months (M6) of treatment were frozen on site and shipped on dry ice to the Mycology department of Bordeaux University Hospital for centralized analyses.

In parallel, at both visits, patient clinical status was documented using demographic data, growth parameters, ppFEV<sub>1</sub> values, microbial airway colonization, inhaled, oral or intravenous (IV) antibiotic and/or antifungal courses for pulmonary exacerbation management, and number of days of hospitalization. These data was collected from medical records or French CF register (Burgel et al., 2020). Number intravenous antibiotic courses were recorded in the 12 months preceding each visit.

The data collected and analysed were obtained exclusively from patients' medical records or remaining samples, and no specific interventions were performed for this study. In this context, according to the French law in force at the start of the study, the approval of an ethics committee was not required. All patients, or their guardians as applicable, received information about the study; a non-opposition for using their remaining sputum samples was collected in each case. Samples were part of the Bordeaux's centre for biological collections (CRB of Bordeaux CHU, authorization number: AC-2014-2166, which meets all the conditions of the Ministry of Research

(reporting number DC-2014-2164)). This study was registered with ClinicalTrials.gov, number NCT03565692.

### 3.2.2 Microbial cultures of sputum samples

Microbial cultures of sputum were performed as part of routine care. At the microbiology level, the presence isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, Haemophilus influenza, *Staphylococcus aureus* with methicillin resistance (MRSA) or not (MSSA), *Burkholderia cepacia* complex, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, or *Aspergillus fumigatus* was recorded from microbiological culturing. Furthermore, chronic colonization with *P. aeruginosa* defined as the presence of *P. aeruginosa* isolates in 3 consecutive cultures with at least one month between the positive cultures during the previous 6 months (Cantón et al., 2005b), and/or chronic colonization with *A. fumigatus* defined as 2 sputum cultures positive for *A. fumigatus* during the last 12 months with at least one-month interval between the 2 positive sputa (Amin et al., 2010b) were documented.

### 3.2.3 Sputum sample collection

Sputum samples were mixed with an equal volume of sputasol (Oxoid, Basingstoke, UK) for 30 min at 37°C, then centrifuged at 3000 rpm (1500 g) for 10 min, as previously described (Coron et al., 2018b; Soret et al., 2020). Supernatants and pellets were separately frozen at -20°C for biomarkers assessments and DNA extraction, respectively.

### 3.2.4 Calprotectin dosages

As calprotectin is functionally related to the activation of neutrophils, we assessed it to evaluate airway inflammation. Determination of calprotectin levels in sputum supernatants was carried out using quantitative sandwich ELISA based on reagents EK-MRP8/14 (S100A8/9 - Buhlmann Laboratories, AG; Schonenbuch, Switzerland) according to the manufacturers' instructions, as previously described (Gray et al., 2010; Boyko et al., 2020).

### 3.2.5 Galactomannan dosages

As GM is secreted by *Aspergillus* hyphae (and not by spores) during mould growth, we assess it to better estimate the natural history of *Aspergillus* colonization in CF patients. The sputum supernatants were used to perform the Aspergillus GM antigen test (Platelia Aspergillus EIA, BioRad®, Marnes-La-Coquette, France). Samples with an GM index >1 were considered positive (Fréalles et al., 2009; Baxter et al., 2013).

### 3.2.6 DNA extraction, 16S rRNA and ITS2 amplicon sequencing

DNA was extracted from sputum pellets by using a DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, Les Ulis, France). Negative extraction controls (250 µL of DNA-free water, as an extraction blank) were processed using the same protocol. The microbial diversity and taxonomic composition of samples were assessed by using the variable 3–variable 4 (V3–V4) region of the bacterial 16S rRNA gene and the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of the fungal rDNA (Vandenborgh et al., 2020b).

The respective primers used to amplify the V3–V4 and ITS2 loci were: 16S-forward, TACGGRAGGCAGCAG; 16S-reverse, CTACCNGGGTATCTAAT; ITS2-forward, GTGARTCATCGAATCTTT; and ITS2-reverse, GATATGCTTAAGTTCAGCGGGT, as previously described (Vandenborgh et al., 2020b). In addition to the extraction blanks, library blanks and two positive controls (in house artificial bacterial and fungal communities) were processed and sequenced alongside the CF patient samples, then used to validate the experimental procedures. Briefly, PCR amplification was performed by using barcoded primers (at a final concentration of 0.2 µM) with an annealing temperature of 50°C for 30 cycles and mixed in equimolar amounts to be sequenced. Next-generation sequencing (NGS) was performed by using 250-bp paired-end technology on the MiSeq platform (Illumina, San Diego, Calif) with V3 chemistry at the PGTB platform of Bordeaux University.

### 3.2.7 Bacterial and fungal sequence analysis

The bacterial and fungal reads were demultiplexed, then 16S and ITS2 primers were removed using CutAdapt, with no mismatch allowed within the primer sequences. All samples were processed through the DADA2 pipeline in R (version 4.0.3) for quality filtering and trimming, dereplication, and merging of paired-ends reads (Callahan et al., 2016a, 2016b, 2017). According

to a recent evaluation (Pauvert et al., 2019), only forward (R1) sequences were analysed with DADA2 and no filter other than the removal of low-quality and chimeric sequences were applied for characterizing the fungal community. Two distinct ASV table were constructed and taxonomy was assigned from Silva database (release 138) for bacterial ASVs and the Unite database (release 8.2) for fungal ASVs. We used the mock communities to avoid a non-efficient sequencing experiment, and the negative controls to identify and remove potential reagent contaminants of bacterial and fungal microbiota with *microDecon* R package (McKnight et al., 2019). ASVs present in less than 1% of samples were removed (Callahan et al., 2016b).

The final mean read counts were 31273 (standard deviation [SD],  $\pm 10415$ ) for 1511 bacterial ASVs and 5550 (SD,  $\pm 8334$ ) for 598 fungal ASVs (9 samples, from 8 patients, with less than 100 fungal sequences were removed from the final ITS2 analyses).

### 3.2.8 Statistical analyses

Within-samples alpha-diversity metrics (Observed ASVs, Simpson and Shannon indexes) were generated by using *phyloseq* R package. For cross-sectional analyses, at a specific time, significant differences in alpha-diversity were determined using Wilcoxon rank sum. For the longitudinal analyses, Wilcoxon signed-rank test were used to account for serial sampling.

To compute beta-diversity, we first rarefied the ASVs table (using *phyloseq*'s *rarefy\_even\_depth* function) at a minimum sequence depth. Between sample beta-diversity differences (measured using Bray Curtis dissimilarity) were tested using a permutational multivariate ANOVA (PERMANOVA) from *vegan* R package with 10,000 permutations, while accounting for individual identity as a covariate.

DESeq2 (Love et al., 2014) was used to perform two-class testing for differential relative abundance. Paired tests (by subject) were used when comparing pre- versus post-treatment initiation.

Results were expressed as mean ( $\pm$  standard deviation (SD)) for parametric variables, median (interquartile range (IQR)) for non-parametric variables or in absolute values and percentage (n/N (%)) for categorical variables. Non-parametric Wilcoxon–Mann–Whitney test was used to compare quantitative variables between groups. Correlations were calculated using Spearman method. McNemar's test and Wilcoxon signed-rank test were used as statistical test for paired nominal data and for quantitative data, respectively. Statistical analysis was performed with R studio program (version 1.3.1056 for Windows™); a p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## 3.3 RESULTS

### 3.3.1 Clinical characteristics and outcomes with lumacaftor-ivacaftor treatment

Between the 1<sup>st</sup> of December 2015 and the 30<sup>th</sup> of June 2018, 78 CF patients (36 (46%) adolescents and 42 (54%) adults) who initiated treatment with lumacaftor-ivacaftor in one of the 6 centres involved in Lum-Iva-Biota study (CRCM centres of Bordeaux, Brest, Foch, Grenoble, Marseille and Robert Debré) and who produced spontaneous sputa were included. Clinical characteristics at baseline are summarized in Table S1. All received continuous lumacaftor-ivacaftor treatment and were followed up over 6 months, but 42 (54%) had spontaneous sputum samples that underwent targeted metagenomics analysis at this second visit (Supplementary Figure S1). At baseline, patients with M6 sputum samples had significantly lower ppFEV<sub>1</sub>, less methicillin-susceptible *S. aureus* colonization, and more *P. aeruginosa* colonization and inhaled corticosteroids (Supplementary Table S1). No other significant differences on clinical characteristics were observed between subgroups of patients with and without M6 sputum samples (Supplementary Table S1).

Clinical evolution between treatment initiation and 6 months of follow-up of all patients at are presented in Table 1. Despite no significant changes in ppFEV<sub>1</sub>, a significant increase of BMI (mean, +0.72 kg/m<sup>2</sup>) was observed in the overall population and in adult patients (mean, + 0.36 kg/m<sup>2</sup>,  $p = < 0.01$ ), whereas Z-score was stable in adolescents. Patients had also a significant decrease in IV antibiotic courses (Table 1).



**Table 1. Changes after 6 months of lumacaftor-ivacaftor for all patients and for the subgroup of patients with Mo and M6 sputum samples**

	All patients		p	Patients with Mo-M6 samples		p
	Initiation	At 6 months		Initiation	At 6 months	
<b>ppFEV<sub>1</sub></b>	67.9 (±21.6)	69.8 (±24.9)	0.16	61.9 (±22.1)	63.9 (±25.2)	0.34
<b>BMI, kg/m<sup>2</sup></b>	19.4 (±2.73)	20.1 (±2.48)	<b>&lt;0.001</b>	19.2 (±2.17)	19.8 (±2.14)	<b>&lt;0.01</b>
<b>BMI, Z-Score</b>	0.16 (±4.46)	-0.36 (±0.87)	0.41	-0.62 (±0.81)	-0.43 (±0.92)	0.24
<b>≥1 IV antibiotic courses *</b>	42 (57%)	29 (39%)	<b>&lt;0.01</b>	25 (62%)	17 (41%)	<b>0.013</b>
<b>Pulmonary carriage</b>						
MSSA	47 (60%)	33 (48%)	0.06	21 (50%)	14 (37%)	0.18
MRSA	12 (15%)	10 (14%)	1	8 (19%)	6 (16%)	1
<i>H. influenzae</i>	7 (9%)	7 (10%)	1	3 (7.1%)	5 (13%)	0.68
<i>B. cepacia</i>	2 (2.6%)	1 (1.4%)	NA**	1 (2.4%)	0	NA
<b>Pulmonary colonization</b>						
<i>P. aeruginosa</i>	42 (54%)	35 (49%)	0.72	27 (64%)	22 (59%)	1
<i>A. fumigatus</i>	23 (37%)	23 (36%)	0.62	14 (48%)	17 (50%)	1
<b>Sputum supernatant dosages</b>						
Calprotectin (µg/mL)	3808 (±2161)	-	-	3973 (±1758)	3594 (±1464)	0.48
Patients with GM index > 1	21 (29%)	-	-	13 (32%)	17 (45%)	0.18

\* These criteria were evaluated during the previous year of the visit; \*\*NA: Not applicable

Data are mean (±SD), median [IQR] or n (%).

BMI : body mass index; ppFEV<sub>1</sub> : percent predicted forced expiratory volume in 1 sec ; OD : Optical Density

MSSA : methicillin-susceptible *S. aureus* ; MRSA : methicillin-resistant *S. aureus*

Regarding the subgroup of 42 patients with sputum samples at M0 and M6, the clinical evolution was comparable to the whole population (Table 1). We therefore focused on this subgroup of 42 patients to study lung microbiota/mycobiota and sputum biomarkers (GM and calprotectin) at baseline and after lumacaftor-ivacaftor initiation (M6).

### 3.3.2 Sputum biomarkers (GM and calprotectin) at baseline of lumacaftor-ivacaftor treatment

At baseline, 21 (29%) of the 42 patients had a positive GM index, but no significant association was observed between levels of GM and *A. fumigatus*, nor other characteristics at baseline colonization. On the other side, median of sputum calprotectin levels was 4195 µg/mL [3234; 4631], and reversely correlated with ppFEV1 ( $r = -0.41$ ,  $p = 0.01$ , Table 2). Sputum calprotectin levels were significantly higher in patients with *P. aeruginosa* colonization ( $p = 0.006$ ) or azithromycin treatment ( $p = 0.003$ ) at baseline and trended to be higher in patients with inhaled antibiotics ( $p = 0.06$ ) (Table 3, Fig. 1). We did not identify any association or correlation between sputum calprotectin and others microbial colonization (including *A. fumigatus*), treatment or patient characteristics at baseline (Tables 2 and 3).

In addition, sputum calprotectin levels were negatively correlated with bacterial alpha-diversity indexes but not fungal alpha-diversity indexes ( $r = -0.41$ ,  $p = 0.01$  and  $r = -0.48$ ,  $p = 0.003$ , respectively for Shannon and Simpson bacterial indexes).

**Table 2. Sputum calprotectin at baseline according to quantitative parameters of the whole population and the subgroup of CF patients (n=36)**

	Spearman's r	p-value
Age	0.28	0.1
BMI	0.1	0.52
ppFEV1	-0.41	<b>0.01</b>
Bacterial Shannon Index	-0.41	<b>0.01</b>
Bacterial Simpson Index	-0.48	<b>0.003</b>
Fungal Shannon Index	-0.14	0.33
Fungal Simpson Index	-0.13	0.35

**Table 3. Sputum calprotectin at baseline according to qualitative parameters of disease and treatment characteristics (n=36)**

		n(%)	Median	IQR	p-value
MSSA carriage	Yes	19 (53)	4232	(3727;4599)	0.51
	No	17 (47)	4158	(3155;4609)	
MRSA carriage	Yes	6 (17)	4278	(4186;4642)	0.44
	No	30 (83)	3955	(3179;4582)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> colonization	Yes	25 (69)	4413	(3948;4760)	<b>0.006</b>
	No	10 (28)	3168	(2141;3845)	
<i>Aspergillus fumigatus</i> colonization	Yes	6 (17)	3695	(3224;4158)	0.64
	No	13 (36)	3962	(3155;4413)	
Inhaled antibiotics	Yes	25 (69)	4285	(3806;5076)	0.06
	No	10 (28)	3727	(2774;4261)	
Azithromycin	Yes	23 (64)	4285	(3911;4886)	<b>0.03</b>
	No	13 (36)	3456	(2638;4232)	
Dornase alfa	Yes	27 (75)	3962	(3217;4653)	0.38
	No	7 (20)	4271	(3925;4590)	
Inhaled corticosteroids	Yes	28 (78)	4252	(3227;4839)	0.42
	No	7 (19)	3948	(3319;4287)	

MSSA : methicillin-susceptible *S. aureus* ; MRSA : methicillin-resistant *S. aureus*

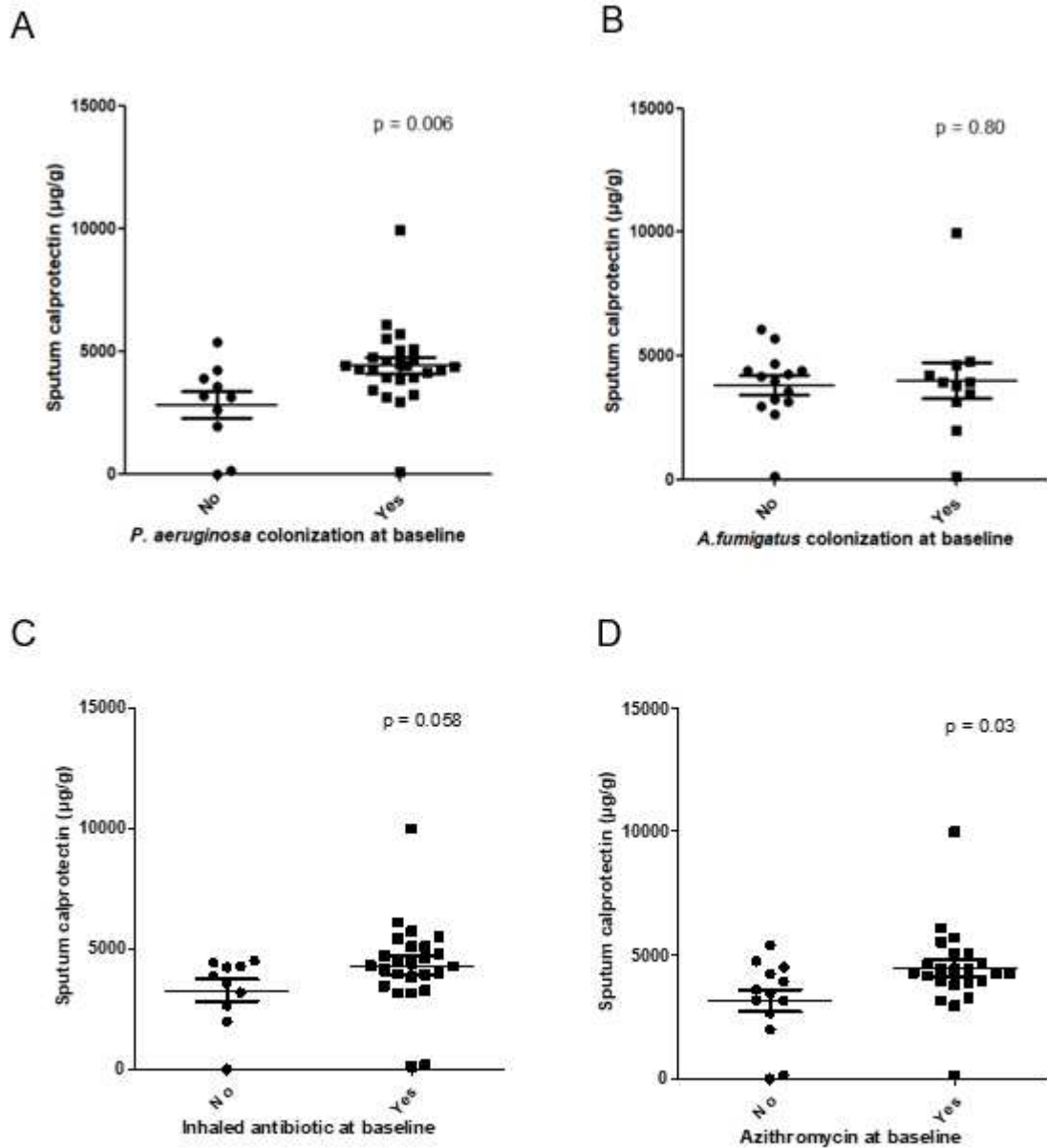
### 3.3.3 Microbiota and mycobiota at baseline of lumacaftor-ivacaftor treatment

Bacterial genera were dominated by *Pseudomonas* (21%), followed by *Prevotella* (16%), *Veillonella*, *Staphylococcus* and *Streptococcus* each represented 10% of the bacterial ASVs. *Haemophilus* and *Burkholderia* accounted for 2% and 1% of bacterial ASVs respectively (Supplementary Figure S2A). Fungal genera were dominated by *Candida* (31%), followed by *Malassezia* (13%) and *Saccharomyces* (6%). *Aspergillus* represented 5% of the fungal ASVs (Supplementary Figure S2B).

Several moderate modifications or trends in alpha- and/or beta-diversity of microbiota and, to a lesser extent of mycobiota, were observed according to clinical criteria. Among them, patients with ppFEV1  $\geq$  80% had a distinct microbiota in beta-diversity (PERMANOVA: p = 0.02) compared to patients with ppFEV1 < 80% at baseline. Patients with ppFEV1 < 80% showed decreased

abundances of *Porphyromonas* spp., *Fusobacterium* spp., *Neisseria* spp., and *Rothia* spp., and increased abundances of *Prevotella* spp. Alpha-diversity indexes trended to be lower, although not statistically significant, in patients with ppFEV<sub>1</sub> < 80% (Supplementary Figure S3). Sputum mycobiotas were not significantly different in alpha- or beta-diversity at baseline (M0) according to lung function (ppFEV<sub>1</sub> ≥ 80% versus ppFEV<sub>1</sub> < 80%; Supplementary Figure S3).

Regarding colonization status, patients colonized with *A. fumigatus* at baseline had a microbiota significantly different in beta-diversity, compared to uncolonized patients (PERMANOVA: p = 0.02, Supplementary Figure S4A). While no significant difference in mycobiota alpha- and beta-diversity between colonized and uncolonized patients was observed, *A. fumigatus* colonization was associated with increased bacterial alpha-diversity indexes (Supplementary Figure S4B). Distinctive bacterial ASVs belonging to genus of *Alloprevotella* spp., *Staphylococcus* spp., *Actinomyces* spp., *Fusobacterium* spp., *Leptotrichia* spp., *Prevotella* spp., and ASVs belonging to *S. aureus* and *Fusobacterium periodonticum* (Supplementary Table S2) were differentially observed at baseline in colonized patients with *A. fumigatus*, compared to uncolonized patients. Conversely, patients with *P. aeruginosa* colonization at baseline had airway microbiota and mycobiota significantly different in beta-diversity, compared to uncolonized patients (PERMANOVA: p = 0.01 and 0.04, respectively) (Fig. 2A, and 2B). Bacterial alpha-diversity indexes (Observed ASVs indexes significantly different in Fig. 2C), but not mycobiota indexes (Fig. 2D), trended to be lower in patients with *P. aeruginosa* colonization at baseline. Distinctive bacterial and fungal ASVs belonging to genus of *Prevotella*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Porphyromonas*, *Actinomyces*, *Blastobotrys*, *Saccharomyces* and *Candida* (Supplementary Table S2) were differentially observed at baseline in colonized patients with *P. aeruginosa*, compared to uncolonized patients.



**Figure 1. Sputum calprotectin at baseline. according to disease and treatment parameters**  
 (A) According to *Pseudomonas aeruginosa* (n=37) and (B) *Aspergillus fumigatus* (n=25) colonizations, and  
 (C) Inhaled antibiotics (n=36) and (D) azithromycin (n=37) use at baseline.

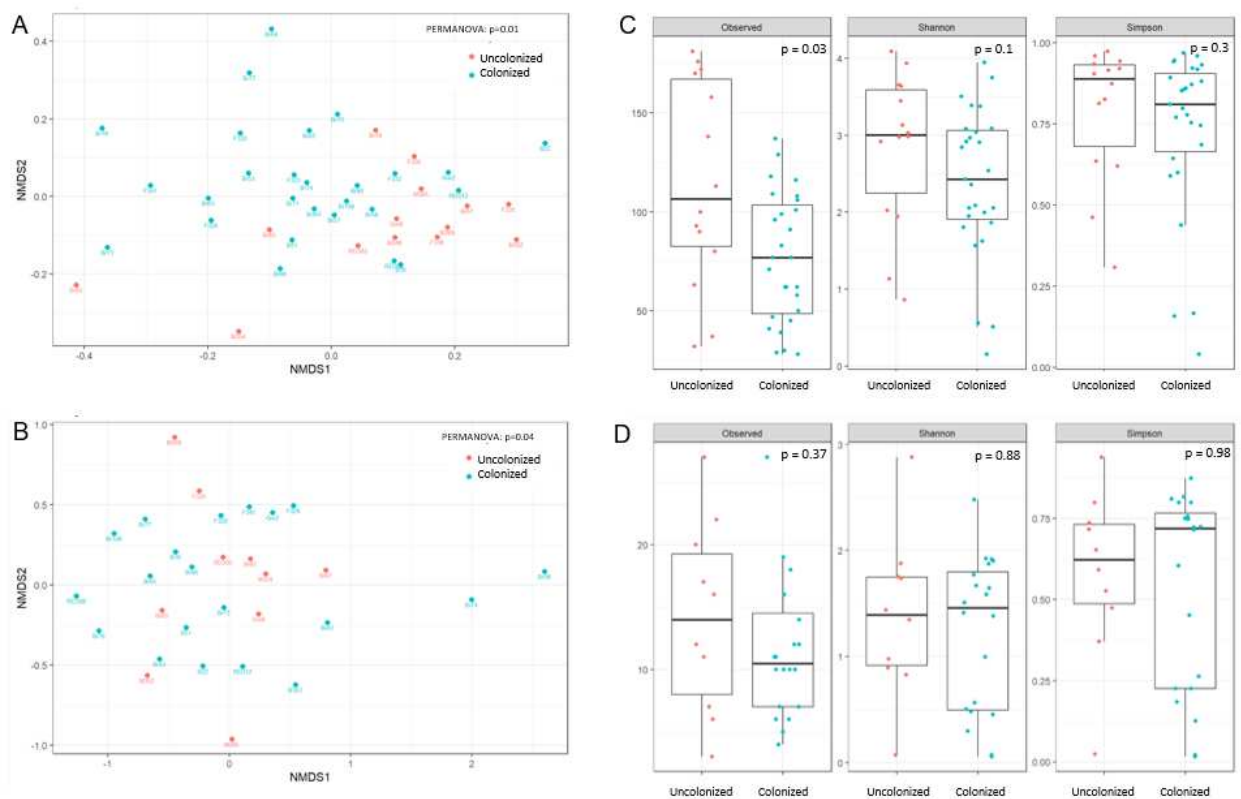
### 3.3.4 **Changes in inflammation and microbiota/mycobiota under lumacaftor-ivacaftor**

No significant changes in sputum calprotectin levels were seen in our cohort after 6 months of lumacaftor-ivacaftor treatment (Table 1). Any correlation between the M0-M6 evolution of calprotectin and other clinical or biological parameters (ppFEV<sub>1</sub>, BMI, bacterial and fungal alpha-diversity indexes) has been observed.

Airway microbiota and mycobiota were not significantly different in alpha- and beta-diversities between baseline and at 6 months of lumacaftor-ivacaftor treatment. Following treatment, DESeq2 analysis revealed that *Veillonella* spp., *Prevotella* spp., *Rothia* spp. and *Atopobium* spp. increased, while *Staphylococcus* spp., *Haemophilus* spp. and *Porphyromonas* spp. decreased after 6 months of lumacaftor-ivacaftor treatment (Supplementary Table S3). There was no change observed in *P. aeruginosa* relative abundance in the subgroup neither changes in GM positivity rate.

According to ppFEV<sub>1</sub> < 80% or ≥ 80% at baseline, we did not observe any difference in alpha- or beta-diversity in microbiota or mycobiota under lumacaftor-ivacaftor therapy in these subgroups. Additionally, there was not any correlation between evolution of ppFEV<sub>1</sub> and evolution of any bacterial or fungal alpha-diversity indexes (data not shown). There was not any significant changes in sputum biomarkers (calprotectin and GM) with lumacaftor-ivacaftor in these two subgroups (ppFEV<sub>1</sub> < 80% or ≥ 80%, data not shown).

Focusing on *A. fumigatus* colonisation status at baseline, no differences in alpha- or beta-diversity in microbiota or mycobiota was identified under lumacaftor-ivacaftor in the subgroup of patients colonized, as well as in the subgroup of uncolonized patients (data not shown). There were not any significant changes in sputum calprotectin levels or in GM positivity rate in these two subgroups (data not shown). In addition, any correlation between the M0-M6 evolution of GM and the other clinical or biological parameters (ppFEV<sub>1</sub>, BMI, bacterial and fungal alpha-diversity indexes) has been observed.



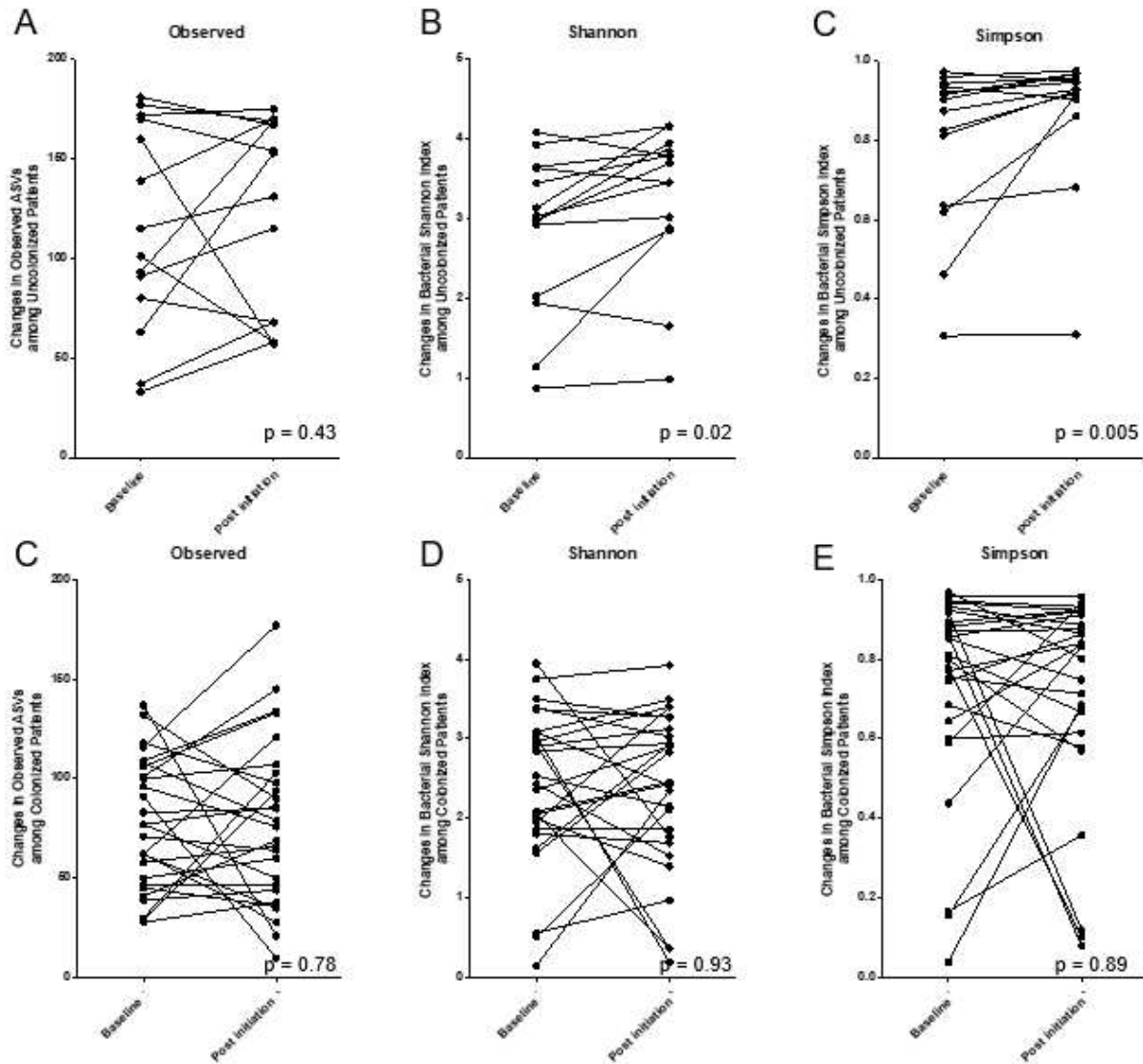
**Figure 2. Bacterial and fungal composition of sputum at baseline according to *P. aeruginosa* colonization**

Comparison of targeted metagenomics data obtained from sputum samples at baseline (at initiation of lumacaftor-ivacaftor) between the patients colonized with *P. aeruginosa* (●) or not (●) for alpha- and beta-diversities of microbiota, and mycobiota. Beta-diversity (NMSD) which assesses differences in microbial composition between samples using a Non-metric multidimensional scaling (NMSD) ordination method with Bray-Curtis distance metric of bacterial (A) and fungal (B) communities is shown to measure the microbiota and mycobiota compositional similarity throughout. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) was used to test sample clustering hypotheses. Alpha-diversity of bacterial (C) or fungal (D) communities are shown using Observed ASV, Shannon and Simpson indexes.

### 3.3.5 **Changes in inflammation and microbiota/mycobiota under lumacaftor-ivacaftor and *P. aeruginosa* colonisation status**

While sputum biomarkers (GM and calprotectin) levels did not change significantly between M0 and M6 of lumacaftor-ivacaftor treatment according to *P. aeruginosa* colonisation status at baseline (data not shown), shifts in the bacterial community occurred more in the *P. aeruginosa* uncolonized patients compared with the patients colonized with *P. aeruginosa* at baseline (Fig. 3). Patients uncolonized with *P. aeruginosa* at baseline had a significant increase in bacterial alpha-diversity indexes after 6 months of lumacaftor-ivacaftor treatment (Fig. 3 A-C), while alpha-diversity indexes did not significantly change in colonized patients (Fig. 3 D-F). We did not observe any significant differences in fungal alpha-diversity indexes or in bacterial and fungal beta-diversities after 6 months of lumacaftor-ivacaftor therapy (data not shown). Comparing M0-M6 microbiota and mycobiota data, DESeq2 analysis revealed a decrease of *Fusobacteria* spp., *Capnocytophage* spp., *Veillonella* spp., TM7x spp., *Rothia* spp., *Atopobium* spp. and *Candida albicans*, and an increase of *Malassezia restricta* in uncolonized patients (Supplementary Table S5). In patients colonized with *P. aeruginosa* at baseline, *Porphyromonas* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. decreased, while *Veillonella* spp., and *Rothia* spp. increased after 6 months under lumacaftor-ivacaftor (Supplementary Table S5 and S6).





**Figure 3. Changes of bacterial alpha-diversity indexes after 6 months of lumacaftor-ivacaftor, according to *P. aeruginosa* colonization at baseline**

In patients without (A-C) and with (D-F) *P. aeruginosa* colonization at baseline

### 3.4 DISCUSSION

To date, clinical studies on lumacaftor-ivacaftor's effects have mainly focused on conventional clinical and biological parameters. In the present study, we assessed evolution of F508del homozygous patients with CF treated with lumacaftor-ivacaftor and combine the conventional clinical and biological parameters to airway microbiota and mycobiota analysis.

In our population of 78 CF patients (36 (46%) adolescents and 42 (54%) adults), we did not observe a significant improvement in ppFEV<sub>1</sub> under treatment, despite continuous exposure to lumacaftor-ivacaftor, while real-life data showed a 3% increase in ppFEV<sub>1</sub> after 6 months of treatment (Burgel et al., 2020). However, the ppFEV<sub>1</sub> evolution is multifactorial (*i.e.* local inflammation or presence of bronchiectasis), as shown by the partial correlation between sweat chloride and ppFEV<sub>1</sub> evolution (Taylor-Cousar et al., 2018; Aalbers et al., 2020a, 2020b). In addition, improvement in ppFEV<sub>1</sub> with lumacaftor-ivacaftor is more difficult to establish in patients with either a good lung function (ppFEV<sub>1</sub> ≥ 90%) or an advanced lung disease (ppFEV<sub>1</sub> < 40%) at baseline, the latter conditions representing one third of the patients in our cohort (Taylor-Cousar et al., 2018; Aalbers et al., 2020a). We did not have data concerning the evolution of sweat chloride, as our study was observational and sweat chloride estimate was not performed at 6 months of treatment in routine care. However, we observed an improvement in BMI and intravenous antibiotic courses, which represent more constant efficacy outcomes in numerous studies (Wainwright et al., 2015; Taylor-Cousar et al., 2018; Aalbers et al., 2020a; Burgel et al., 2020).

It is now well recognized that the lung system ecosystem, including microbial communities and local inflammatory response, is strongly associated to the pathophysiology and morbi-mortality of CF (Quinn et al., 2019). In the era of CFTR modulators, treatment targets should include these data and aim not only at clinical improvement (*i.e.*, improved ppFEV<sub>1</sub>, reduced exacerbations or improved BMI and quality of life) but also at lung ecosystem restoration (*i.e.*, reduced colonization with pathogens, increased microbial diversity or reduced local inflammation). However, very few data are available on airway microbiota evolution under lumacaftor-ivacaftor treatment and none of them addressed the airway mycobiota.

In the present study, no significant changes in airway microbiota and mycobiota were observed in the overall study cohort after 6 months of treatment, in contrast of preliminary results suggesting that lumacaftor-ivacaftor combination could increase bacterial alpha-diversity indexes (Boutin et al., 2019). While we also found no significant changes in the relative abundance of *P. aeruginosa*, current data on the effect of lumacaftor-ivacaftor on *P. aeruginosa* relative abundance are contradictory and inconclusive (Boutin et al., 2019; Neerinx et al., 2020).

At baseline, airway microbiota and mycobiota compositions we observed were consistent with the literature in CF (Kramer et al., 2015; Caverly and LiPuma, 2018). However, the microbial compositions at baseline were influenced by different factors related to the evolution of the disease (i.e., pulmonary function, *P. aeruginosa* or *A. fumigatus* colonizations), which may also affect changes in the microbial communities under modulator treatment. Among them, *P. aeruginosa* colonisation status caught our attention, given (i) its well-known clinical relevance, (ii) its role in microbiota evolution under modulator therapy previously described (Boutin et al., 2019; Harris et al., 2020; Neerinx et al., 2020) and (iii) the correlation between *P. aeruginosa* colonization and sputum calprotectin we identified.

In our cohort, patients who were not colonized with *P. aeruginosa* at lumacaftor-ivacaftor initiation had lower calprotectin levels before treatment and significant improvement in bacterial alpha-diversity after 6 months of treatment.

After 6 months of lumacaftor-ivacaftor, these same patients showed a significant decrease in anaerobes (i.e., *Fusobacterium*, *Veillonella* and *Rothia*), along with an improvement of their alpha-diversity indexes. Several data suggest a contribution of these bacteria to lung damage through interactions with CF pathogens, including *P. aeruginosa*. In fact, these bacteria have the potential to stimulate the growth of *P. aeruginosa* by degrading sputum mucins to generate short-chain amino acids and fatty acids (Flynn et al., 2016). *P. aeruginosa* appears also to use substrates produced by *Rothia* to generate primary metabolites *in vitro* (Gao et al., 2018; Quinn et al., 2019). Additionally, the production of short-chain fatty acids by anaerobes can also lead to an increase in the production of IL-8, a cytokine involved in the inflammatory response (Mirković et al., 2015). We did not find any significant change in inflammation (Calprotectin dosages) under lumacaftor-ivacaftor, even in patients not colonized with *P. aeruginosa* at baseline. However, patients with spontaneous sputum at M6 tended to have a higher calprotectin at baseline compared to patients unable to expectorate at M6. Demonstrating a decrease in airway inflammation in these patients may have been more challenging. In addition, these results are consistent with those observed in CF patients with at least one G551D CFTR allele and treated with ivacaftor (Harris et al., 2020).

While the airway microbiota is described as relatively stable over time, apart from the impact of treatments, it has been shown that the airway mycobiota fluctuates over time and that its composition is conditioned by the inhalation of environmental fungal spores (Kramer et al., 2015). The impact of lumacaftor-ivacaftor treatment on the airway mycobiota is therefore more delicate to analyze, because its effect must be stronger than the spontaneous variation of the mycobiota (Silverman et al., 2018b). However, in the patients not colonized with *P. aeruginosa* at baseline,

we observed that *Candida* spp. abundance decreased under lumacaftor-ivacaftor, whereas *Candida* has been associated with worsening of the disease and significant impairment of lung function (Chotirmall et al., 2010).

There are some limitations to our study. First, targeted metagenomics may not identify all species. To optimize the process, we used a denoising method (DADA2 with ASVs), which allow a better assessment of diversity and improve the resolution of low-frequency taxa, compared to clustering methods (with operational taxonomic unit) (Callahan et al., 2017). Secondly, the use of concomitant treatments (*i.e.*, inhaled antibiotic) may have interfered with the evolution of the microbiota/mycobiota. Furthermore, patients without a M6 sputum sample were less colonized with *P. aeruginosa* and had a higher ppFEV1 at baseline. They can therefore be considered as having a less severe and advanced CF disease at inclusion which may render them less able to expectorate at 6 months, and which may be linked to a different evolution of the airway microbiota/mycobiota and inflammation under lumacaftor-ivacaftor.

To conclude, this study reports for the first time the evolution of the microbiota/mycobiota and lung inflammation in CF patients treated with lumacaftor-ivacaftor. In line with published data demonstrating that alpha-diversity is a relevant marker in microbial community assessment (Decrease of alpha-diversity being correlated with disease severity and progression (Zhao et al., 2012), lung microbiota diversity being also a predictor of progression to early end-stage lung disease (death/transplantation < 25 years) (Acosta et al., 2018)), we combined microbial diversity analysis to clinical and biological parameters of patients under lumacaftor-ivacaftor. Our results highlight the importance of considering the CF lung ecosystem as a whole entity in which microbiome, metabolome and hyper-inflammation collectively contribute to disease progression and have to be better understood as recently reported (Quinn et al., 2019). Especially, by combining clinical and biological conventional parameters to microbiota and mycobiota results, our longitudinal study supports the notion that CFTR protein modulators should be started as early as possible, *a fortiori* before the patient being colonized with *P. aeruginosa*, to act efficiently on the pulmonary ecosystem and to restore airway microbial diversity less associated with inflammatory. These data need to be confirmed, expressly by focusing on 2-11-year-olds patients treated with lumacaftor-ivacaftor.

## **Acknowledgments**

The authors would like to thank the teams of French CF centres participating in the study (CRCM of Bordeaux, Brest, Roscoff, Foch, Grenoble, Marseille and Robert Debré). They also thank the various collaborators who participated in this study: Guillaume Simon, Frederic Perry, Florian Lussac-Sorton, Elena Charpentier, the parasitology and mycology team of the Bordeaux University Hospital, Erwan Guichoux, Marie Massot and the teams from Genome Transcriptome Facility of Bordeaux (INRA), Inserm U1045 unit (CRCTB) and Bordeaux Bioinformatic Center (CBiB).

### 3.5 SUPPLEMENTARY DATA

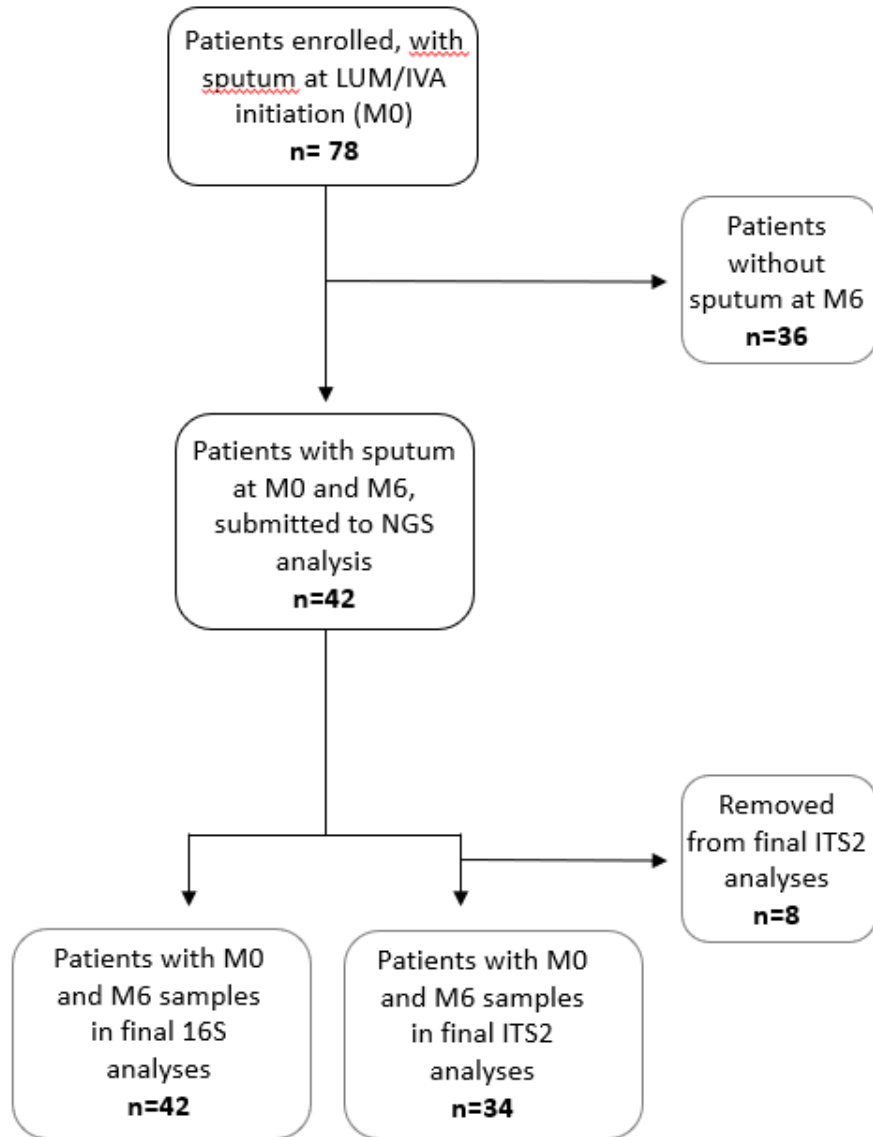
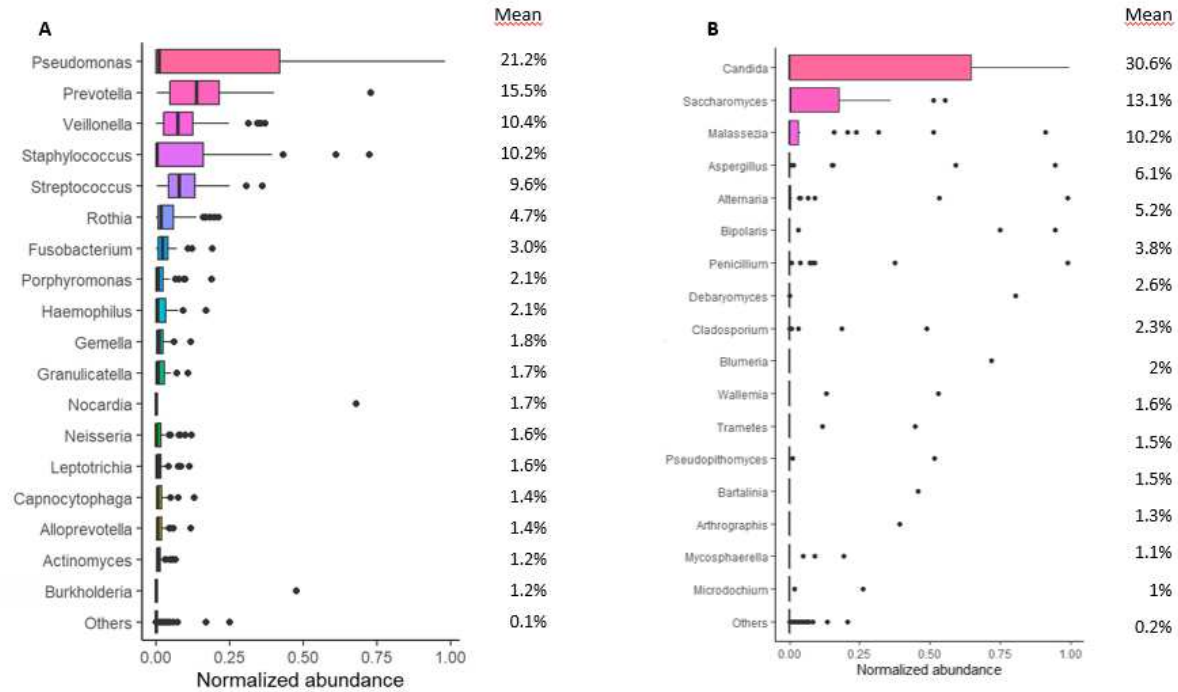
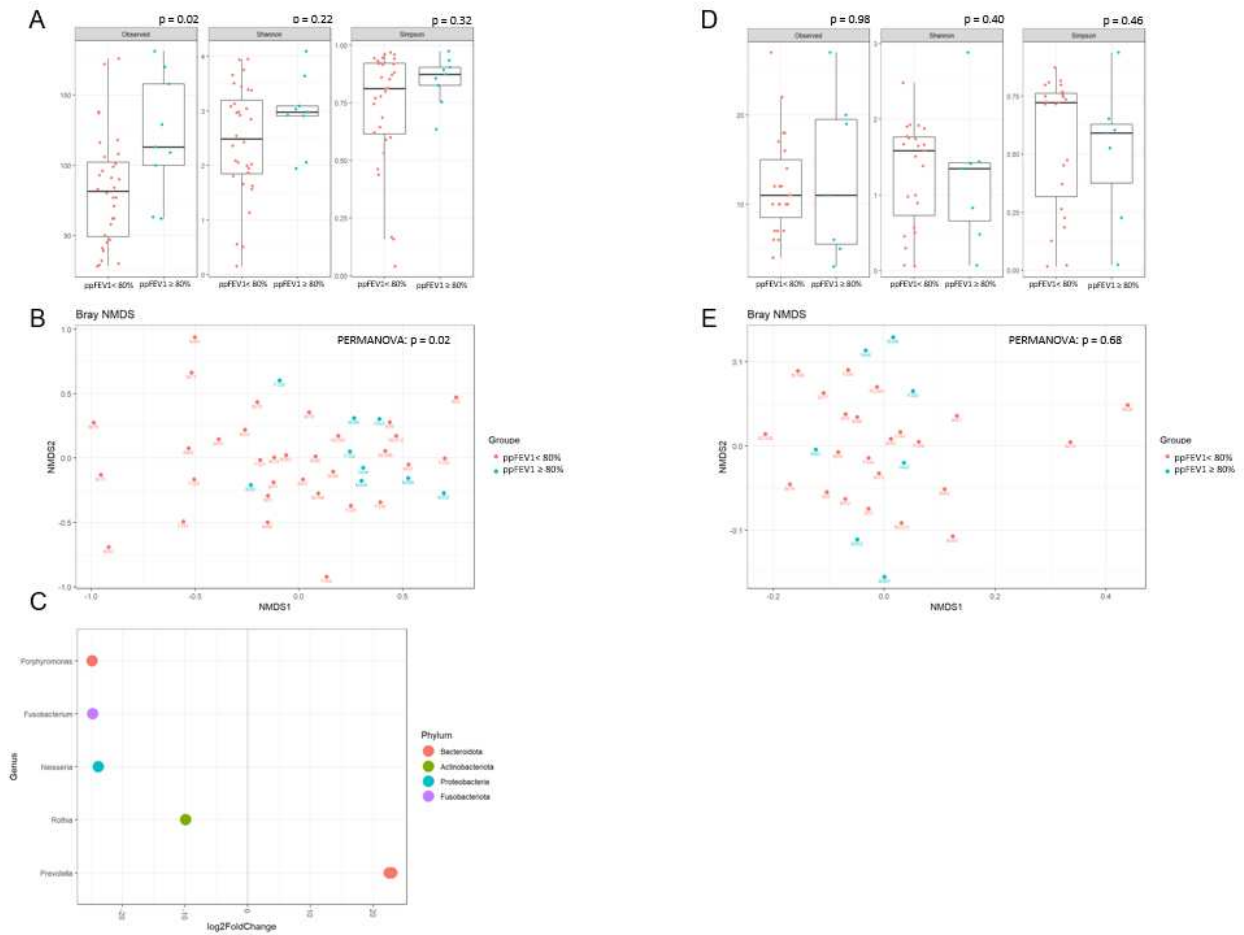


Figure S1. Flowchart of Lum-Iva-Biota study and samples distribution across time.



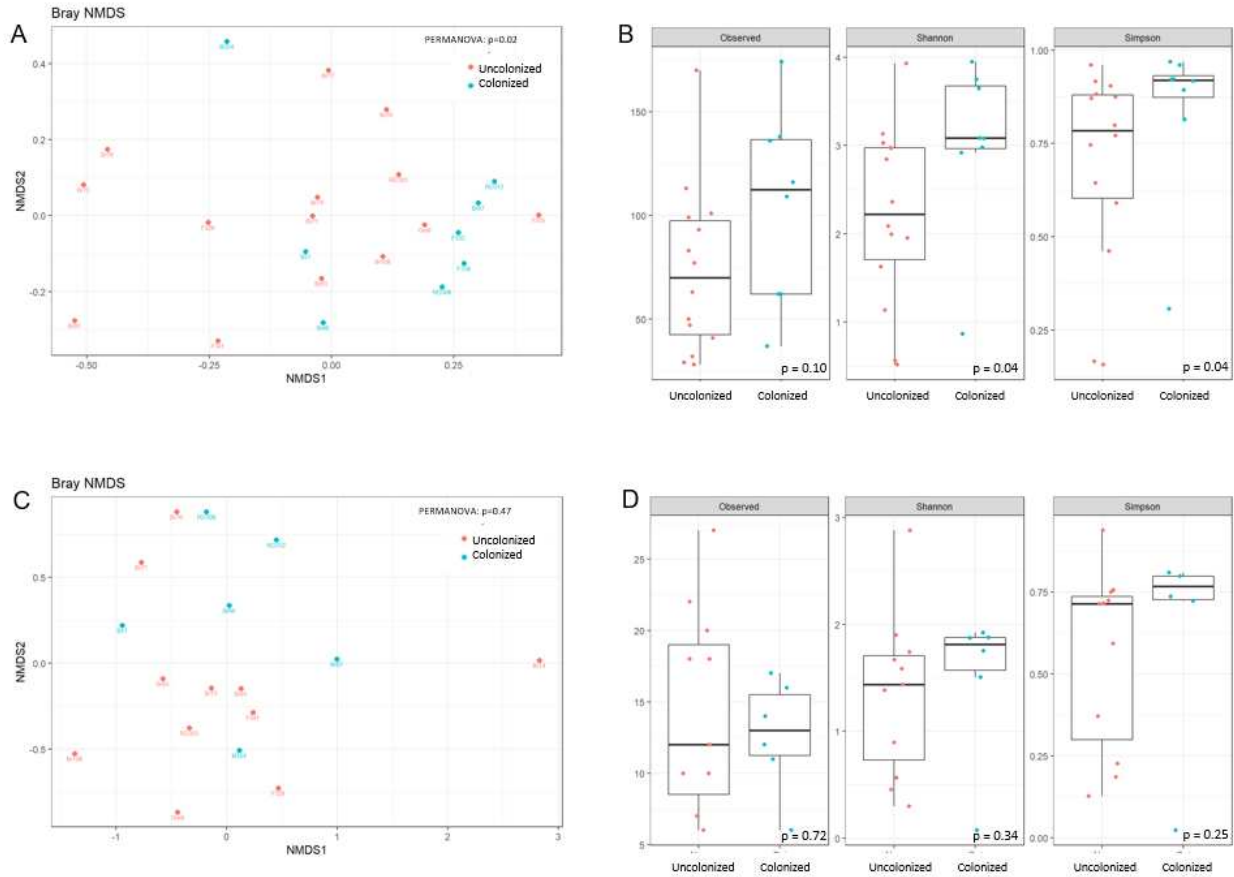
**Figure S2. Bacterial (A) and fungal (B) genera that composed sputum microbial communities of CF patients (n=42) at baseline**

At baseline, bacterial genera were dominated by *Pseudomonas* (21%), followed by *Prevotella* (16%). *Veillonella*, *Staphylococcus* and *Streptococcus* each represented 10% of the bacterial ASVs. *Haemophilus* and *Burkholderia* accounted for 2% and 1% of bacterial ASVs respectively (A). Fungal genera were dominated by *Candida* (31%), followed by *Malassezia* (13%) and *Saccharomyces* (6%). *Aspergillus* represented 5% of the fungal ASVs (B).



**Figure S3. Bacterial and fungal composition of sputum at baseline according to lung function**

Alpha diversity indices (Observed ASVs, Shannon and Simpson) for microbiota (A) and mycobiota (D). Beta diversity which assesses differences in microbiota (B) et mycobiota (E) composition between samples using a Non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination method with Bray–Curtis distance metric. Differential expression (DESeq2) analysis revealed 7 distinctive bacterial ASVs (C), but no fungal ASVs, differentially present in patients with ppFEV1 < 80% at baseline, compared to patients with ppFEV1 ≥ 80%.



**Figure S4. Bacterial composition of sputum at baseline according to *A. fumigatus* colonization**

Comparison of targeted metagenomics data obtained from sputum samples at baseline (at initiation of lumacaftor-ivacaftor) between the patients colonized with *A. fumigatus* (●) or not (●) for alpha- and beta-diversities of microbiota. **(A)** Beta-diversity (NMDS) which assesses differences in microbial composition between samples using a Non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination method with Bray-Curtis distance metric of bacterial communities is shown to measure the microbiota compositional similarity throughout. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) was used to test sample clustering hypotheses. **(B)** Alpha-diversity of bacterial communities are shown using Observed ASV, Shannon and Simpson indexes.



**Table S1. Clinical characteristics at baseline of all patients and for subgroups of patients with and without M6 samples**

	Missin g values	All patients n=78	Patients with M0-M6 samples n=42 (54%)	Patients without M6 sample n=36 (46%)	p-value*
<b>Age (Years)</b>		21.0 (±9.00)	22.6 (±9.0)	19.2 (±8.8)	0.10
<b>Gender (Female)</b>		41 (53%)	19 (45%)	22 (61%)	0.16
<b>ppFEV<sub>1</sub></b>	4	67.9 (±21.6)	61.9 (±22.1)	75.3 (±18.7)	<b>&lt;0.01</b>
<b>BMI, kg/m<sup>2</sup></b>		19.4 (±2.73)	19.2 (±2.17)-0.8	19.6 (±3.25)	0.55
<b>BMI, Z-Score**</b>	2	-0.75 [-1.10; 0.16]	[-1.2; -0.1]	0.65 [-1.1; 0.2]	0.59
<b>≥1 IV antibiotic courses in the previous 12 months</b>	4	42 (57%)	25 (62%)	17 (50%)	0.3
<b>Maintenance pulmonary medications at baseline</b>					
Inhaled antibiotics	1	47 (61%)	27 (66%)	20 (56%)	0.36
Azithromycin		46 (59%)	27 (64%)	19 (53%)	0.41
Dornase alfa	1	61 (79%)	32 (78%)	29 (81%)	0.79
Inhaled corticosteroids		53 (68%)	33 (79%)	20 (56%)	<b>0.03</b>
Oral corticosteroids		3 (3.8%)	2 (4.8%)	1 (2.8%)	1
Inhaled hypertonic saline	5	8 (11%)	4 (11%)	4 (11%)	1
Inhaled bronchodilators	5	62 (85%)	31 (84%)	31 (86%)	0.78
<b>Pulmonary carriage</b>					
MSSA	0	47 (60%)	21 (50%)	26 (72%)	<b>0.05</b>
MRSA	0	12 (15%)	8 (19%)	4 (11%)	0.33
<i>H. influenzae</i>	0	7 (9%)	3 (7.1%)	4 (11%)	0.7
<i>B. cepacia</i>	0	2 (2.6%)	1 (2.4%)	1 (2.8%)	1
<b>Pulmonary colonization</b>					
<i>P. aeruginosa</i>	0	42 (54%)	27 (64%)	15 (42%)	<b>0.05</b>
<i>A. fumigatus</i>	16	23 (37%)	15 (52%)	24 (73%)	0.09
<b>Sputum supernatant dosages</b>					
Calprotectin (µg/mL)	11	3808 (±2161)	3973 (±1758)	3617 (±2568)	0.52
Patient with GM index > 1	5	21 (29%)	13 (32%)	8 (25%)	0.80

\* Comparisons between patients with and without M6 samples; \*\* For adolescents

Data are mean (±SD), median [IQR] or n (%).

BMI : body mass index; ppFEV<sub>1</sub> : percent predicted forced expiratory volume in 1 sec ; OD : Optical Density

MSSA : methicillin-susceptible *S. aureus* ; MRSA : methicillin-resistant *S. aureus*

**Table S2. Distinctive bacterial and fungal ASVs differentially present at baseline in colonized patients with *A. fumigatus*, compared to uncolonized patients**

Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	log2FoldChange	lfcSE	padj
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Alloprevotella	NA	24,7	3	<0.0001
Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	Actinomyces	NA	23,9	3	<0.0001
Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	Actinomyces	NA	23,9	3	<0.0001
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Staphylococcales	Staphylococcaceae	Staphylococcus	aureus	23,1	3	<0.0001
Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	Actinomyces	NA	22,5	3	<0.0001
Bacteria	Fusobacteriota	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium	periodonticum	22,2	3,1	<0.0001
Bacteria	Fusobacteriota	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Leptotrichiaceae	Leptotrichia	NA	22,1	3,1	<0.0001
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	NA	-23,2	3,1	<0.0001
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Alloprevotella	NA	24,7	3	<0.0001
Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	Actinomyces	NA	23,9	3	<0.0001
Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	Actinomyces	NA	23,9	3	<0.0001
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Staphylococcales	Staphylococcaceae	Staphylococcus	aureus	23,1	3	<0.0001
Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	Actinomyces	NA	22,5	3	<0.0001
Bacteria	Fusobacteriota	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium	periodonticum	22,2	3,1	<0.0001

**Table S3. Distinctive bacterial and fungal ASVs differentially present at baseline in colonized patients with *P. aeruginosa*, compared to uncolonized patients**

Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	log2FoldChange	lfcSE	padj
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	NA	24	2,5	<0.0001
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	NA	23,7	3,1	<0.0001
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	NA	22,6	2,9	<0.0001
Bacteria	Fusobacteriota	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium	nucleatum	20,6	2,9	<0.0001
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	NA	8,4	1,7	<0.0001
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pasteurellales	Pasteurellaceae	Haemophilus	parainfluenzae	-23,4	3,1	<0.0001
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	NA	-23,7	3,1	<0.0001
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas	endodontalis	-24	3,1	<0.0001
Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	Actinomyces	NA	-24	3,1	<0.0001
Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Trichomonascaceae	Blastobotrys	raffinosisfermentans	27,1	3,1	<0.0001
Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	Saccharomyces	kudriavzevii	22,8	3,1	<0.0001
Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetales	Candida	albicans	21,5	3,1	<0.0001
Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetales	Candida	parapsilosis	-11,3	3,1	0.006
Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetales	Candida	albicans	-26,3	3,1	<0.0001

**Table S4. Significant changes in bacterial composition of sputum after 6 months of lumacaftor-ivacaftor treatment, compared to the baseline**

Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	log2FoldChange	lfcSE	padj
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Veillonellales	Veillonellaceae	Veillonella	dispar	20.5	3.9	<0.0001
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	NA	20.4	3.9	<0.0001
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	salivae	17.5	3.6	<0.0001
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Veillonellales	Veillonellaceae	Veillonella	tobetsuensis	14.8	3.5	<0.0001
Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Rothia	dentocariosa	14.7	3.6	<0.0001
Bacteria	Actinobacteriota	Coriobacteriia	Coriobacteriales	Atopobiaceae	Atopobium	parvulum	11.9	4.1	0.004
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	NA	-16.6	4.3	0.0001
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Staphylococcales	Staphylococcaceae	Staphylococcus	NA	-19.5	5	<0.0001
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pasteurellales	Pasteurellaceae	Haemophilus	NA	-21.8	5.4	<0.0001
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas	NA	-26.1	7.1	0.0003

**Table S5. Significant changes in bacterial and fungal composition of sputum after 6 months of lumacaftor-ivacaftor treatment in patients uncolonized with *P. aeruginosa* at baseline**

Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	log2FoldChange	lfcSE	padj
Fungi	Basidiomycota	Malasseziomycetes	Malasseziales	Malasseziaceae	Malassezia	restricta	24.5	6.6	0.032
Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Rothia	mucilaginoso	-20.8	5.5	0.037
Bacteria	Patescibacteria	Saccharimonadia	Saccharimonadales	Saccharimonadaceae	TM7x	NA	-21.3	5.3	0.029
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Veillonellales	Veillonellaceae	Veillonella	NA	-21.8	5.6	0.029
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Capnocytophaga	sputigena	-22.5	6	0.037
Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetales	Candida	albicans	-23	6.7	0.042
Bacteria	Fusobacteriota	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium	periodonticum	-24.3	5.5	0.009

**Table S6. Significant changes in bacterial and fungal composition of sputum after 6 months of lumacaftor-ivacaftor treatment in patients colonized with *P. aeruginosa* at baseline**

Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	log2FoldChange	lfcSE	padj
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	NA	20.7	4.5	< 0.001
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Veillonellales	Veillonellaceae	Veillonella	dispar	20.5	4.6	< 0.001
Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Rothia	dentocariosa	15.8	3.5	< 0.001
Bacteria	Firmicutes	Negativicutes	Veillonellales	Veillonellaceae	Veillonella	tobetsuensis	15.1	4.2	0.005
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Staphylococcales	Staphylococcaceae	Staphylococcus	NA	-18.3	6.3	0.039
Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	NA	-19.3	4.4	< 0.001
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Peptostreptococcales	Peptostreptococcaceae	Peptostreptococcus	stomatis	-22.7	6	0.003
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas	NA	-29.2	9.4	0.024
Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas	NA	-30	10.7	0.049



## Partie 2 des résultats : Microbiote et inflammation digestifs dans la mucoviscidose

---





# **1 L'AUGMENTATION DE LA CALPROTECTINE FECALE EST ASSOCIEE A UNE DEGRADATION DES SYMPTOMES GASTRO-INTESTINAUX ET DE LA QUALITE DE VIE CHEZ LES ENFANTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE**

---

Dans la mucoviscidose, le dysfonctionnement de la protéine CFTR au niveau de la muqueuse digestive favorise la survenue d'une inflammation intestinale et d'une dysbiose, qui peuvent induire des symptômes gastro-intestinaux. Chez les patients atteints de mucoviscidose avec une insuffisance pancréatique exocrine, l'inflammation intestinale et la dysbiose sont toutes les deux associées à une augmentation du taux de calprotectine fécale. Cependant, les associations entre le taux de calprotectine fécale, les symptômes gastro-intestinaux et la qualité de vie restent peu étudiées.

Nous avons donc cherché à évaluer ces associations chez les enfants atteints de mucoviscidose avec insuffisance pancréatique exocrine. Le niveau de calprotectine fécale a été mesuré à partir d'échantillons de selles chez 37 enfants. En parallèle, les enfants et leurs parents ont rempli un questionnaire sur les symptômes digestifs (Gastrointestinal Symptoms Scales 3.0 - PedsQL™) et un questionnaire sur la qualité de vie (Quality of Life Pediatric Inventory 4.0 - PedsQL™). Pour ces deux questionnaires, des scores plus bas indiquaient une symptomatologie ou une qualité de vie altérée.

Un dosage de calprotectine fécale supérieur à 250µg/g était associé à des symptômes gastro-intestinaux plus importants, notamment concernant les reflux, les nausées et vomissements et la sensation de gaz et de ballonnements. Ces taux élevés étaient également associés à une moins bonne qualité de vie. De plus, plusieurs items du questionnaire de la qualité de vie étaient corrélés à des scores gastro-intestinaux, suggérant que les symptômes digestifs pouvaient avoir des répercussions significatives sur la qualité de vie.

Ces résultats publiés dans *Journal of Clinical Medicine* (article ci-après) soulignent donc l'importance de prendre en considération l'atteinte digestive dans la prise en charge de patients atteints de mucoviscidose, notamment afin d'améliorer leur qualité de vie.

# INCREASED FECAL CALPROTECTIN IS ASSOCIATED WITH WORSE GASTROINTESTINAL SYMPTOMS AND QUALITY OF LIFE SCORES IN CHILDREN WITH CYSTIC FIBROSIS

**Fabien Beaufile<sup>a,b,c</sup>, Emmanuel Mas<sup>d,e,f</sup>, Marie Mittaine<sup>d</sup>, Martin Addrab<sup>b</sup>, Michael Fayon<sup>a,b,c</sup>, Laurence Delhaes<sup>a,c,d,g</sup>, Haude Clouzeau<sup>a,c</sup>, François Galode<sup>a,c</sup>, Thierry Lamireau<sup>a,c</sup>, Stéphanie Bui<sup>a,b,c</sup> and Raphaël Enaud<sup>a,b,c</sup>**

<sup>a</sup> CHU Bordeaux, CRCM Pédiatrique, CIC 1401, F-33000, Bordeaux, France;

<sup>b</sup> Univ. Bordeaux, INSERM, CRCTB, U1045, CHU Bordeaux, F-33000, Bordeaux, France;

<sup>c</sup> FHU ACRONIM, F-33000, Bordeaux, France;

<sup>d</sup> CHU Toulouse, CRCM Pédiatrique, F-31300, Toulouse, France;

<sup>e</sup> Université de Toulouse, INSERM, INRA, ENVT, UPS, F-31000, Toulouse, France;

<sup>f</sup> Unité de Gastroentérologie, Hépatologie, Nutrition, Diabétologie et Maladies Héréditaires du Métabolisme, Hôpital des Enfants, CHU de Toulouse, F-31300, France;

<sup>g</sup> CHU Bordeaux, Service de Parasitologie-Mycologie, F-33000, Bordeaux, France;

\* **Corresponding author:** Dr Fabien Beaufile ([fabien.beaufile@chu-bordeaux.fr](mailto:fabien.beaufile@chu-bordeaux.fr))

Available at <https://doi.org/10.3390/jcm9124080>.

**Abstract:** In cystic fibrosis (CF), *CFTR* dysfunction leads to digestive disorders that promote intestinal inflammation and dysbiosis enhancing gastrointestinal symptoms. In pancreatic CF patients with pancreatic insufficiency (PI), both intestinal inflammation and dysbiosis, are associated with an increase in the fecal calprotectin (FC) level. However, associations between the FC level, gastrointestinal symptoms, and quality of life (QoL) remain poorly studied. We aimed to assess such associations in CF children with PI. The FC level was measured from stool samples in 37 CF children with PI. Children and their parents completed two questionnaires: The Gastrointestinal Symptoms Scales 3.0 - PedsQL™ and the Quality of Life Pediatric Inventory 4.0 - PedsQL™. Lower scores indicated worse symptomatology or QoL. Thirty-seven CF children were included. A FC level above 250µg/g was associated with worse gastrointestinal symptoms and QoL scores. The FC level was inversely correlated with several gastrointestinal scores assessed by children (*i.e.* Total, “Heart Burn Reflux”, “Nausea and Vomiting” and “Gas and Bloating”). Several QoL scores were correlated with gastrointestinal scores. The FC level was weakly associated with clinical parameters. Some gastrointestinal and QoL scores were related to parameters associated with severity of CF. In CF children with PI, FC level, a biomarker previously related to intestinal inflammation and dysbiosis, was associated with worse digestive symptoms and QoL scores.

**Keywords:** Intestinal inflammation; reflux; nausea; gas; pancreatic insufficiency.

## 1.1 BACKGROUND

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disorder leading to a dysfunctional *cystic fibrosis transmembrane regulator* (*CFTR*) affecting various organs (Rowe et al., 2005; Ratjen et al., 2015). In recent decades, the improvement in patients' care and the emergence of new therapy (*e.g.* *CFTR* modulators) have increased life expectancy in CF (Ratjen et al., 2015). Thus, investigating the impact of extra-respiratory disorders on patient's clinical status or quality of life (QoL) has become necessary.

In the digestive tract, *CFTR* dysfunction leads to dehydration and acidification of intestinal mucus, an alteration in the integrity of the intestinal barrier and a decrease in transit time, innate immunity and the activity of digestive and antibacterial enzymes (Rowe et al., 2005; Ratjen et al., 2015; Munck, 2014). All these elements contribute to intestinal microbiota dysbiosis and bacterial overgrowth (Bruzzese et al., 2004; del Campo et al., 2014; Manor et al., 2016; Coffey et al., 2019; Enaud et al., 2019; de Freitas et al., 2018) promoting chronic intestinal inflammation in CF (Munck, 2014; Enaud et al., 2019). Such inflammation has been demonstrated in CF by endoscopic or wireless capsule endoscopy examinations (Raia et al., 2000; Werlin et al., 2010; Brecelj et al., 2016; Flass et al., 2015). Moreover, this inflammation has also been suggested by an increased level of fecal calprotectin (FC) in CF patients compared to controls (Manor et al., 2016; Coffey et al., 2019; Parisi et al., 2017; Bruzzese et al., 2014, 2004; de Freitas et al., 2018; Dhaliwal et al., 2015), particularly in those with pancreatic insufficiency (PI) (Werlin et al., 2010; Adriaanse et al., 2015; Ellemunter et al., 2017; Stallings et al., 2018; Dhaliwal et al., 2015). Furthermore, in CF patients, an increased FC level was associated with intestinal microbiota disturbances (Ooi et al., 2018; Coffey et al., 2019; Enaud et al., 2019; de Freitas et al., 2018) whereas the FC level was improved by probiotics (Bruzzese et al., 2014; del Campo et al., 2014; Ellemunter et al., 2017; Bruzzese et al., 2004) or *CFTR* modulators (Ooi et al., 2018; Tétard et al., 2020). More recently, we demonstrated that the microbiota dysbiosis of CF children with pancreatic insufficiency having a FC level above 250µg/g had similarities with that described in inflammatory bowel disease (IBD) (*i.e.* Crohn's disease) (Enaud et al., 2019).

In IBD, an increased FC level is associated with worse gastrointestinal (GI) symptomatology and quality of life (QoL) (Chouliaras et al., 2017). In CF, no association has been found between the FC level and digestive symptoms (Rumman et al., 2014; Dhaliwal et al., 2015; Ellemunter et al., 2017). However, in these previous studies, digestive symptoms were not assessed using GI symptoms specific questionnaires (Rumman et al., 2014; Dhaliwal et al., 2015; Ellemunter et al., 2017). By contrast, association between the FC level and QoL in CF has been suggested by the improvement in QoL after probiotic treatment (Jafari et al., 2013; del Campo et al., 2014) concomitant with FC level improvement (del Campo et al., 2014).

Thus, we aimed to assess the association between the FC level and GI symptoms and QoL scores determined using validated questionnaires. The secondary objectives were (i) to compare GI symptoms and QoL scores according several clinical parameters; (ii) to assess the association between the FC level and clinical parameters and (iii) to assess the association between GI symptoms and QoL scores in CF.

## **1.2 METHODS**

### **1.2.1 Design and participants**

This observational, prospective, and bi-centric pilot study involved CF children between 4 to 18 years of age, having exocrine pancreatic insufficiency (fecal elastase < 200 µg/g) followed-up from November 2015 to May 2016 at CF reference centers of Bordeaux and Toulouse, France. Patients previously diagnosed with IBD or celiac disease; patients with diagnosis of an ongoing acute infection; patients previously treated with probiotics or CFTR modulators were excluded. The study was approved by the regional ethical committee “CPP Sud-Ouest et Outremer III” (DC 2015/129). Informed consent was obtained from study participants and their parents.

### **1.2.2 Study design/procedure**

At inclusion visit, we assessed patients’ CFTR mutation, past history (meconial ileus, distal intestinal obstruction syndrome (DIOS), number of hospitalizations, number of exacerbations and number of intravenous (IV) antibiotic cures within the year before inclusion), the presence of chronic colonization (*Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus Aureus*), cystic fibrosis-related diabetes (CFRD) and treatments (pancreatic enzymes replacement therapy (PERT), ursodeoxycholic acid, inhaled antibiotics (ATB), oral ATB prophylaxis, IV ATB). We also assessed clinical data (weight, height and body mass index (BMI) expressed as Z-scores) and the last lung function testing results (percent of predicted value of forced expiratory volume in one second (ppFEV<sub>1</sub>), forced vital capacity (ppFVC), forced mid-expiratory flow between 25% and 75% of forced vital capacity (ppFEF<sub>25-75</sub>), lung total capacity (ppLTC), residual volume (ppRV), residual volume capacity (ppRCF) and resistance of airways (ppRaw)) measured within the past month before inclusion and obtained from patient's medical file. The FC level was determined using ELISA fCAL® kit (Bühlmann, Schönenbuch, Switzerland) on children stool sample collected the day of inclusion. Since we previously demonstrated that CF children with FC level 250 µg/g of stool were associated with an increased dysbiosis (Enaud et al., 2019), we used this threshold to divide patients in Low FC group (FC level ≤ 250 µg/g) and High FC group (FC level > 250 µg/g) .

At inclusion visit, CF children, using self-assessments, and their parents, using heterogeneous assessment, completed a French version of both the Gastrointestinal Symptoms Scales 3.0 - PedsQL™ (Varni et al., 2015) and the Quality of Life Pediatric Inventory 4.0 - PedsQL™ (Varni et al., 2001). The Gastrointestinal Symptoms Scales 3.0 - PedsQL™ was composed of 58 items grouped into 10 dimensional scales (“Stomach Pain and Hurt” (6 items), “Stomach Discomfort When Eating” (5 items), “Food and Drink Limits” (6 items), “Trouble Swallowing” (3 items), “Heart Burn and Reflux” (4 items), “Nausea and Vomiting” (4 items), “Gas and Bloating” (7 items), “Constipation” (14 items), “Blood in Poop” (2 items) and “Diarrhea” (7 items)) (Varni et al., 2015). The Quality of Life Pediatric Inventory 4.0 – PedsQL™ was composed of 23 items grouped into 4 dimensional scales (“Physical Functioning” (8 items), “Emotional Functioning” (5 items), “Social Functioning” (5 items) and “School Functioning” (5 items)) (Varni et al., 2001). Each item was associated with a 5-points response scale from 0 (never) to 4 (almost/always). Each item score was reversed and linearly transformed to a 0 to 100 scale (0=100, 1=75, 2=50, 3=25, 4=0). Thus, lower scores indicate worse GI symptomatology or worse QoL. The dimensional scale and questionnaire Total scores were computed as the sum of the items divided by the number of answered items (Varni et al., 2001, 2015). Scores (Total and dimensional) were calculated by distinguishing the children’s responses from those of their parents (Varni et al., 2001, 2015).

### 1.2.3 Statistical analysis

We used Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA) for the analyses. Results were expressed as median with 95% confidence interval (95% CI) or with minimum and maximum (median [min ; max]) for continuous variables or in absolute values and percentage (n/N (%)) for categorical variables. Comparisons between groups were performed using the Mann-Whitney test for unpaired nonparametric variables. Scores obtained from children and those obtained from their parents were compared using the Wilcoxon’s test. The Fisher’s exact test was used for categorical variables. Correlation coefficients were assessed using univariate Spearman’s test. A *p* value under 0.05 was considered significant. Two-way mixed absolute single measure intraclass correlations were computed to express test-retest reliability between children and parents. Values indicate of poor (<0.5), moderate (0.5-0.75), good (0,75-0.9) or excellent (>0.9) reliability (Koo and Li, 2016).

## 1.3 RESULTS

### 1.3.1 Population characteristics

Of the 43 children recruited, 37 were included in the study and 6 were excluded due to an acute pulmonary or gastrointestinal infection at inclusion. The characteristics of the children are presented in Table 1. The median of age was 10 years they were predominantly boys. They were mostly chronically colonized with *Staphylococcus Aureus* without severe event in past history or severe comorbidities and had a preserved lung function despite a slight decreased FEF<sub>25-75</sub> (Table 1). A half of the patient had been hospitalized within a year prior to inclusion but most often for a recurrent IV ATB therapy than for an exacerbation (Table 1).

The FC level was 70.0 µg/g [50.0 ; 1457.0]. Among the 37 CF children included, 5 were assigned to the High FC group (FC level: 352.0 µg/g [300.0 ; 1457.0]) and 32 to the Low FC group (FC level: 70.0 µg/g [50.0 ; 240.0]). Characteristics of the two groups were presented in Table 1. Patients in the High FC group had significant lower Z-scores height and lower but not significant Z-scores weight or Z-score BMI compared to CF children in the Low FC group (Table 1). While, male sex, homozygous CFTR mutation and *Staphylococcus Aureus* chronic colonization were overexpressed in the High FC group, all other patients' characteristics (*i.e.* past history, comorbidities, lung function, events within a year prior to inclusion and treatments) were not significantly different between the two groups (Table 1).

### 1.3.2 Comparisons between scores obtained from children and their parents

Except for the “Food and Drink Limits” scores (Figure S1), answers to GI symptoms and QoL questionnaires were not significantly different between children and their parents (Table S1). Moreover, except for “Trouble Swallowing” score, each item of the PedsQL™ and the Quality of Life Pediatric Inventory 4.0 – PedsQL™, scores obtained from children and their parents were correlated (Table S1). In addition, the intraclass correlation coefficients (ICC) revealed for each score moderate to good agreements between scores obtained from children and those obtained from their parents (Table S1).

**Table 1. Population's characteristics.**

	All N = 37	Low FC Group N = 32	High FC Group N = 5	<i>p</i>
Male	22 (59.5)	18 (56.3)	4 (80.0)	0.629
Age (years)	10.0 (9.2; 11.6)	9.0 (8.8; 11.3)	14 (7.4–18.0)	0.146
Z-Score Weight	0.64 (0.16; 0.83)	0.80 (0.25; 0.97)	0.01 (–1.33; 0.95)	0.078
Z-Score Height	1.36 (0.6; 1.7)	1.75 (0.78; 1.94)	0.93 (–1.84; 1.58)	0.047
Z-Score BMI	0.09 (–0.33; 0.19)	0.11 (–0.34; 0.22)	–0.46 (–1.03; 0.75)	0.891
CFTR mutation F508del/F508del	21/37 (56.8)	17/32 (53.1)	4/5 (80.0)	0.364
Past history				
Meconial ileus	4 (10.8)	3 (9.4)	1 (20.0)	0.513
DIOS	2 (5.4)	2 (6.3)	0 (0.0)	1.000
CFRD	2 (5.4)	2 (6.3)	0 (0.0)	1.000
Chronic colonization				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9 (24.3)	8 (25.0)	1 (20.0)	1.000
<i>Staphylococcus aureus</i>	26 (70.3)	22 (68.8)	4 (80.0)	1.000
Within a year prior to inclusion				
No. of patients hospitalized	16 (43.2)	14 (43.8)	2 (40.0)	1.000
For Pulmonary exacerbation	6 (16.2)	5 (15.6)	1 (20.0)	1.000
For recurrent IV ATB therapy	10 (27.0)	9 (28.1)	1 (20.0)	1.000
No. of hospitalization per patient	0.0 (0.6; 1.5)	0.0 (0.5; 1.4)	0.0 (–0.7; 3.9)	0.362
No. of IV ATB cures per patient	0.0 (0.6; 1.5)	0.0 (0.4; 1.4)	1.0 (–0.2; 3.8)	0.126
Last lung function				
Time before inclusion (days)	0.0 (1.3; 7.0)	0.0 (1.3; 7.9)	0.0 (–1.0; 3.4)	0.826
ppFVC	95.0 (86.4; 95.5)	95.0 (87.0; 96.2)	95.0 (63.0; 111.0)	0.657
ppFEV <sub>1</sub>	90.0 (79.6; 91.7)	91.0 (79.0; 92.3)	88.0 (62.0; 108.8)	0.824
FEV <sub>1</sub> < 80%	14 (37.8)	12 (37.5)	2 (40.0)	1.000
FEV <sub>1</sub> /FVC (%)	82.2 (76.5; 83.5)	80.6 (75.2; 82.6)	87.1 (76.3; 97.7)	0.162
FEV <sub>1</sub> /FVC < 80%	14 (37.8)	13 (40.6)	1 (20.0)	0.630
ppFEF <sub>25–75%</sub>	73.0 (61.8; 81.7)	73.5 (59.5; 81.5)	70.0 (47.2; 112.0)	0.491
ppTLC <sup>a</sup>	94.0 (90.8; 106.8)			-
ppRV <sup>a</sup>	99.0 (94.3; 127.8)			-
RV/TLC <sup>a</sup>	29.0 (25.1; 32.4)			-
ppRFC <sup>a</sup>	88.0 (86.3; 100.0)			-
ppRaw <sup>a</sup>	66.0 (63.0; 74.5.0)			-
Treatment				
PERT U/Kg/j	7097 (6627; 7813)	6999 (6418; 7745)	8496 (6786; 9420)	0.206
Proton pump inhibitor	11 (29.7)	9 (28.5)	2 (40.0)	0.623
ursodeoxycolic acid	13 (35.1)	11 (34.4)	2 (40.0)	1.000
Laxative treatment	5 (13.5)	4 (12.5)	1 (20.0)	0.538
Inhaled antibiotic	15 (40.5)	13 (40.6)	2 (40.0)	1.000
Oral ATB prophylaxis	6 (16.2)	5 (15.6)	1 (20.0)	1.000
Recurrent IV ATB therapy	15 (40.5)	12 (32.4)	3 (60.0)	1.000

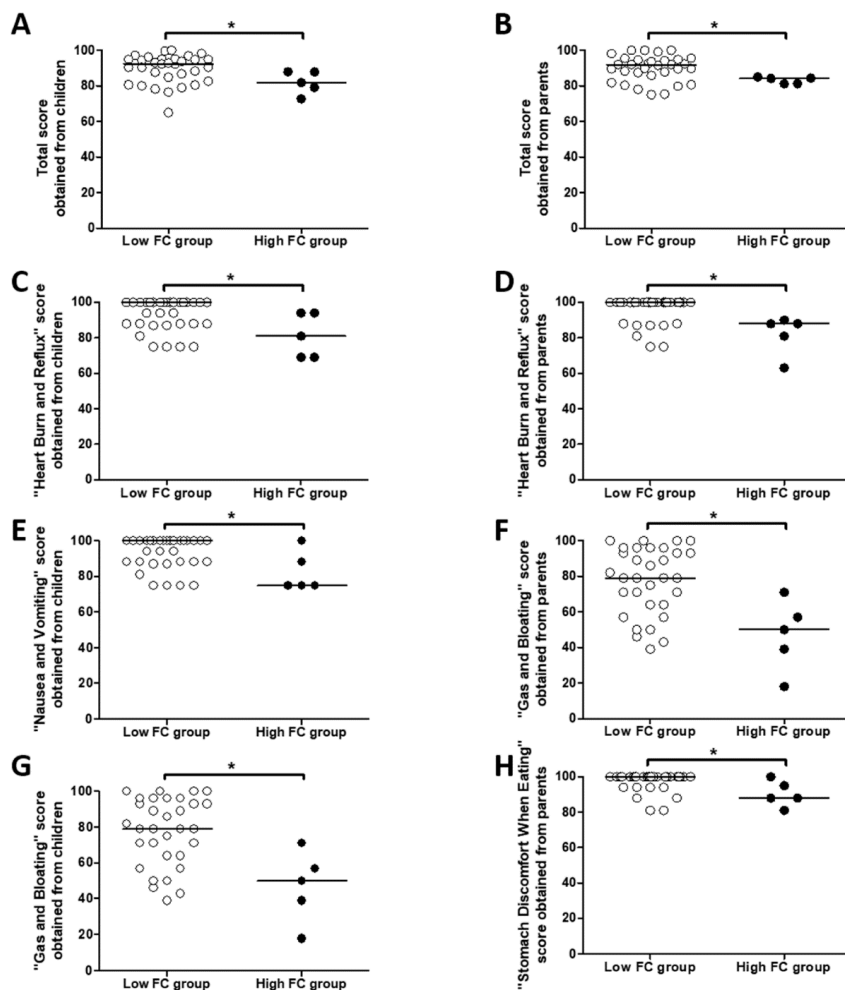
<sup>a</sup>data were available for 27 children in the Low FC group and only 2 children in the High FC group.

FC: Fecal calprotectin; CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; F508del: Deletion of the codon for phenylalanine at position 508; DIOS: Distal intestinal obstruction syndrome. CFRD: Cystic fibrosis related diabetes; No.: number; IV: intravenous; ATB: antibiotic; pp: percentage of predicted; FEV<sub>1</sub>: forced expiratory volume measured in 1 second; FVC: Forced vital capacity; FEF<sub>25–75</sub>: Forced mid-expiratory flow between 25% and 75% of forced vital capacity. TLC: Total lung capacity; RV: Residual volume; RFC: Residual functional capacity; Raw: Resistance airways; PERT: Pancreatic enzymes replacement therapy. Results are presented at the median [95% IC ] for continuous variable and as n/N (%) for categorical variables. Variables were compared using a Mann-Whitney test. A *p* value ≤ 0.05 was considered significant.



### 1.3.3 Increased Fecal calprotectin level is associated with worse gastrointestinal symptomatology

Gastrointestinal Symptoms Scales 3.0 - PedsQL™ scores assessed by children and their parents were significantly lower for the “Total” (Figure 1A-B), “Heart Burn and Reflux” (Figure 1C-D) and “Nausea and Vomiting” (Figure 1E-F) scores in the High FC group compared to the Low FC group (Table S2). In addition, “Gas and Bloating” scores assessed by children (Figure 1G) and “Stomach Discomfort When Eating” scores assessed by parents (Figure 1H) were significantly decreased in the High FC group compared to the Low FC group (Table S2).



**Figure 1. Differences in Gastrointestinal Symptoms Scales 3.0 - PedsQL™ scores according Fecal calprotectin (FC) level.**

Differences between the Gastrointestinal (GI) Total score (A-B), the “Heart Burn and Reflux” score (C-D), the “Nausea and Vomiting” score (E-F), the “Gas and Bloating” score (G) and the “Stomach Discomfort When Eating” score according to the presence (High FC group) or not (Low FC group) of fecal calprotectin level  $>250\mu\text{g/g}$  of stool. Comparisons were performed between scores obtained from children (A, C, E, G) or by their parents (B, D, F, H) with Mann-Whitney tests. \*  $p < 0.05$ .

#### 1.3.4 **Increased Fecal calprotectin level is associated with worse quality of life scores assessed by children**

Quality of Life Pediatric Inventory 4.0 - PedsQL™ scores assessed by children were lower for “Total” (Figure 2A), “Emotional Functioning” (Figure 2B) and “Social Functioning” (Figure 2C) scores in the High FC group compared to the Low FC group (Table S3). None of the scores were significantly different between the two groups according to parents’ answers (Table S3).

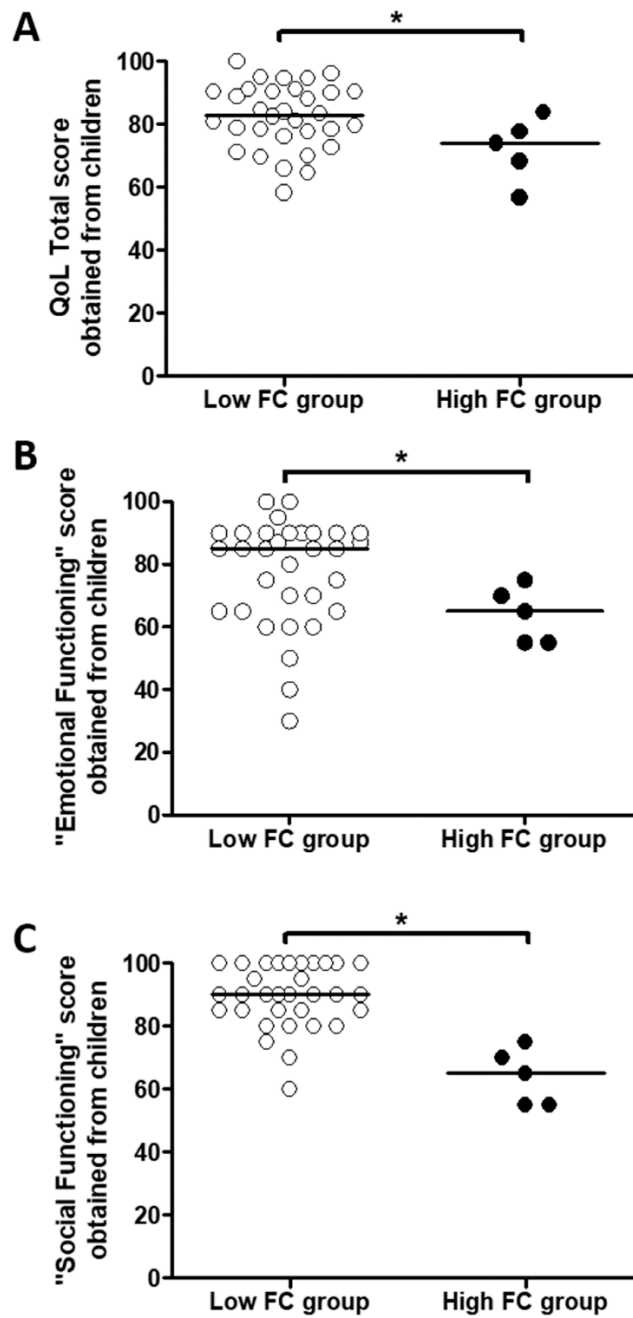
#### 1.3.5 **Associations between the fecal calprotectin level and gastrointestinal and quality of life scores**

We identified reverse correlations between the FC level and Gastrointestinal Symptoms Scales 3.0 - PedsQL™ scores obtained from children (*i.e.* “Total”, “Trouble swallowing”, “Heart Burn and Reflux”, “Nausea and Vomiting” and “Gas and bloating” scores) or from their parents (*i.e.* “Stomach discomfort when eating” and “Heart burn and Reflux” scores) (Table 2). However, we highlighted only a reverse correlation between the FC level and the Quality of Life Pediatric Inventory 4.0 - PedsQL™ “Social Functioning” scores assessed by children (Table 2).

#### 1.3.6 **Association between the fecal calprotectin level and clinical parameters**

There was no significant difference in the FC level according patients’ clinical characteristics (*i.e.* gender, chronic colonization by *Pseudomonas Aeruginosa* or *Staphylococcus Aureus*, hospitalization for exacerbation or recurrent IV ATB treatment with a year), low lung function or treatment (*i.e.* proton pump inhibitor, ursodeoxycholic acid, laxative, inhaled ATB or oral ATB prophylaxis) (Table S4). To note, the FC level seemed higher in patients with homozygous F508del children or treated with proton pump inhibitor and appeared lower in those treated by inhaled ATB but the differences were not significant (Table S4).

There was no significant correlation between FC and clinical parameters (*i.e.* age, Z-score Weight, Z-score Height, Z-score BMI) or lung function testing results (Table S5). There was a weak but not significant correlation between PERT dosage and the FC level (Table S5).



**Figure 2. Differences in Quality of Life Pediatric Inventory 4.0 - PedsQL™ scores according Fecal calprotectin (FC) level.**

Differences between the Quality of life (QoL) Total score (A), the "Emotional Functioning" score (B) and the "Social Functioning" score (C) obtained from children according to the presence (High FC group) or not (Low FC group) of fecal calprotectin level  $>250\mu\text{g/g}$  of stool. Comparisons were performed with Mann-Whitney tests. \*  $p < 0.05$ .

### 1.3.7 **Associations of clinical characteristics and lung function of patients with GI symptoms and QoL**

We then compared GI symptoms and QoL scores between subgroups based on patient's characteristics. Male gender, Oral ATB prophylaxis, ursodeoxycholic or proton pump inhibitor treatment, recurrent IV ATB and *Pseudomonas Aeruginosa* were associated with few lower Gastrointestinal Symptoms Scales 3.0 - PedsQL™ scores (*i.e.* “Gas and Bloating”, “Constipation” scores assessed by children or “Diarrhea” scores assessed by children or their parents) (Table S6) or Quality of Life Pediatric Inventory 4.0 - PedsQL™ scores (Table S7). No other differences were found using the other qualitative variables assessed in the study (*i.e.* mutation type (homozygous or heterozygous), exacerbation within the year prior to inclusion, inhaled ATB, laxative treatment, meconial ileus past history) (data not shown). Among all quantitative variables assessed in this study, only age, Z-score Weight, Z-score Height, PRET dosage, ppFEV<sub>1</sub> and FEV<sub>1</sub>/FVC were correlated to one or more Gastrointestinal Symptoms Scales 3.0 - PedsQL™ or Quality of Life Pediatric Inventory 4.0 - PedsQL™ scores (Table S8).

### 1.3.8 **Quality of life scores are associated to gastrointestinal symptoms scores**

Correlations between GI symptoms and QoL scores are presented in Table 3. Briefly, GI Total scores and GI symptoms scores obtained from children, excepted “Food and Drink limits”, “Trouble Swallowing” and “Blood in Poop” scores were correlated to the “QoL Total” scores (Table 3). Except for the “school functioning” score, QoL scores and the total GI total score obtained from children were correlated. All GI scores obtained from children were correlated with “Social Functioning” scores (Table 3). According to parent's responses, GI Total score was correlated to “QoL Total”, “Emotional Functioning” and “Social functioning” scores. “Gas and bloating”, “Constipation” and “Diarrhea” were the only GI symptoms score correlated to the “QoL Total” scores (Table 3).

**Table 2. Correlation between the FC levels and Gastrointestinal symptoms scales 3.0 - PedsQL™ and to the Quality of Life Pediatric Inventory 4.0 - PedsQL™**

Scores obtained from children and their parents

	$\rho$	$p$
Gastrointestinal Symptoms Scales 3.0 PedsQL™		
By children		
Total	-0.353	0.032
Stomach Pain and Hurt	-0.165	0.330
Stomach Discomfort	-0.274	0.101
When Eating		
Food and Drink Limits	-0.135	0.427
Trouble Swallowing	-0.361	0.028
Heart Burn and Reflux	-0.331	0.046
Nausea and Vomiting	-0.323	0.049
Gas and Bloating	-0.495	0.002
Constipation	0.005	0.977
Blood in Poop	-0.152	0.370
Diarrhea	-0.130	0.444
By parents		
Total	-0.218	0.195
Stomach Pain and Hurt	-0.057	0.737
Stomach Discomfort	-0.358	0.030
When Eating		
Food and Drink Limits	0.037	0.830
Trouble Swallowing	-0.115	0.499
Heart Burn and Reflux	-0.367	0.026
Nausea and Vomiting	-0.060	0.724
Gas and Bloating	-0.231	0.169
Constipation	-0.054	0.751
Blood in Poop	0.008	0.964
Diarrhea	0.047	0.783
Quality of Life Pediatric Inventory 4.0 PedsQL™		
By children		
Total	-0.206	0.222
Physical Functioning	-0.034	0.841
Emotional Functioning	-0.132	0.437
Social Functioning	-0.313	0.049
School Functioning	-0.110	0.516
By parents		
Total	-0.013	0.941
Physical Functioning	-0.043	0.802
Emotional Functioning	0.091	0.591
Social Functioning	-0.211	0.208
School Functioning	0.059	0.728

Correlations were performed using univariate correlation Spearman's test and the coefficient of correlation ( $\rho$ ) was indicated. A  $p$  value  $\leq 0.05$  was considered significant.

**Table 3. Correlations between PedsQL™ – Gastrointestinal symptoms scales 3.0 scores and PedsQL™ - Quality of Life Pediatric Inventory 4.0 scores obtained from children or their parents.**

	QoL Total Score	Physical Functioning	Emotional Functioning	Social Functioning	School Functioning
Obtained from children					
Gastrointestinal Total score	0.63 <sup>a</sup>	0.49 <sup>b</sup>	0.44 <sup>b</sup>	0.74 <sup>a</sup>	0.22
Stomach Pain and Hurt	0.36 <sup>b</sup>	0.27	0.22	0.54 <sup>a</sup>	0.05
Stomach Discomfort	0.34 <sup>b</sup>	0.26	0.21	0.55 <sup>a</sup>	0.15
When Eating					
Food and Drink Limits	0.29	0.24	0.11	0.36 <sup>b</sup>	0.23
Trouble Swallowing	0.29	0.25	0.24	0.42 <sup>b</sup>	0.04
Heart Burn and Reflux	0.40 <sup>b</sup>	0.30	0.28	0.48 <sup>a</sup>	0.21
Nausea and Vomiting	0.37 <sup>b</sup>	0.31	0.19	0.48 <sup>a</sup>	0.26
Gas and Bloating	0.55 <sup>a</sup>	0.41 <sup>b</sup>	0.35 <sup>b</sup>	0.55 <sup>a</sup>	0.40 <sup>b</sup>
Constipation	0.44 <sup>b</sup>	0.47 <sup>b</sup>	0.36 <sup>b</sup>	0.54 <sup>a</sup>	0.11
Blood in Poop	0.22	0.08	0.16	0.32 <sup>b</sup>	-0.05
Diarrhea	0.43 <sup>b</sup>	0.38 <sup>b</sup>	0.35 <sup>b</sup>	0.47 <sup>b</sup>	0.14
Obtained from parents					
Gastrointestinal Total score	0.36 <sup>b</sup>	0.20	0.30 <sup>b</sup>	0.46 <sup>b</sup>	0.28
Stomach Pain and Hurt	0.24	0.10	0.13	0.25	0.27
Stomach Discomfort	0.12	0.08	0.14	0.29	0.06
When Eating					
Food and Drink Limits	0.15	0.13	0.07	0.35 <sup>b</sup>	0.06
Trouble Swallowing	-0.07	-0.12	-0.02	0.25	-0.16
Heart Burn and Reflux	-0.05	0.02	-0.04	0.22	-0.04
Nausea and Vomiting	0.22	0.07	0.07	0.26	0.25
Gas and Bloating	0.37 <sup>b</sup>	0.12	0.40 <sup>b</sup>	0.24	0.29
Constipation	0.37 <sup>b</sup>	0.35 <sup>b</sup>	0.32 <sup>b</sup>	0.36 <sup>b</sup>	0.25
Blood in Poop	0.08	-0.06	0.08	0.17	0.16
Diarrhea	0.38 <sup>b</sup>	0.33 <sup>b</sup>	0.40 <sup>b</sup>	0.33 <sup>b</sup>	0.20

<sup>a</sup>p < 0.001; <sup>b</sup>p < 0.05

Correlations were performed using univariate correlation Spearman's test and the coefficient of correlation was indicated.

## 1.4 DISCUSSION

Taken together, these results demonstrated for the first time that, in CF children with PI, 1) the FC level was associated with GI symptoms scores, 2) a high FC level was associated to a worse QoL scores and 3) that QoL scores were correlated with GI symptoms scores. We also demonstrated that clinical parameters, lung function results or treatments were moderately associated with QoL scores, poorly with gastrointestinal scores and not associated with the FC level, in CF children.

In CF, GI disorders can be related to pancreatic insufficiency, liver injury, dehydration and acidification of the intestinal mucus, inappropriate lower esophageal sphincter relaxation, dysbiosis, intestinal inflammation leading to various digestive symptoms (Gelfond and Borowitz, 2013). Thus, GI symptoms are poorly specific to identify the origin of the troubles. While it is easy to identify pancreatic insufficiency or gastroesophageal reflux, it is more difficult to objectify intestinal inflammation or dysbiosis in daily practice. Indeed, to confirm

intestinal inflammation endoscopic investigation are necessary but are invasive and require bowel preparation. In addition, dysbiosis identification needs microbiota analysis which is not available in daily practice. However, previous studies have demonstrated that dysbiosis (Ooi et al., 2018; Coffey et al., 2019; Enaud et al., 2019; de Freitas et al., 2018) and intestinal inflammation are related to the FC level (Raia et al., 2000; Werlin et al., 2010; Brecelj et al., 2016; Flass et al., 2015). In other chronic diseases affecting digestive tract such as IBD (Chouliaras et al., 2017), the FC level has previously been associated with worse digestive symptomatology. By contrast, in CF, no association between FC level and GI symptoms (*i.e.* Abdominal pain, gas, nausea, vomiting, constipation, abdominal bloating or diarrhea) have been found (Rumman et al., 2014; Dhaliwal et al., 2015; Ellemunter et al., 2017). Thus, our results were in agreement for abdominal pain, constipation and diarrhea but not for “Nausea and vomiting” and “Gas and bloating”. However, in our study, we used a dedicated questionnaire for GI symptoms assessment by contrast with the previous studies investigating symptoms as present or absent (Rumman et al., 2014; Dhaliwal et al., 2015) or using non-specific digestive symptoms questionnaires (*i.e.* the CF-specific Quality of Life questionnaire) (Ellemunter et al., 2017). Moreover, in this last study, all age groups were included (Ellemunter et al., 2017) while our study only included CF children. The association between the FC level and GI symptoms in CF was also supported by the GI Total score and the “Heart Burn and Reflux” score assessed by both children and their parents. Scores were lower in patients with the highest FC levels and inversely correlated to the FC level as observed in IBD (Barratt et al., 2011; Varni et al., 2015). Gastroesophageal reflux is frequently encountered in CF as in chronic digestive diseases associated with dysbiosis, intestinal inflammation or increased fecal calprotectin such as IBD or coeliac disease (Barratt et al., 2011) and could be related to the same mechanism. Thus, an association between the FC level and “Heart Burn and Reflux” score in CF was not surprising (Barratt et al., 2011; Varni et al., 2015). By contrast with other chronic digestive diseases, it was surprising not to find a correlation between the FC level and Abdominal pain or Diarrhea symptoms (Barratt et al., 2011; Varni et al., 2015). However, although these symptoms can be enhanced by factors increasing the FC level such as intestinal inflammation or dysbiosis (Garg and Ooi, 2017; Munck, 2014), they are frequently encountered in CF, particularly in CF patients with PI (Keller, 2005; Gelfond and Borowitz, 2013). In agreement, “Stomach Pain and Hurt” and “Diarrhea” scores were lower in both Low and High FC group compared to most of other symptoms scores. In addition, it was interesting to note that among all clinical characteristic assessed in the study only 6 (*i.e.*, gender, age, PERT dosage, FEV<sub>1</sub>/FVC, oral ATB prophylaxis and *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization) were associated with significant differences in GI symptoms and linked to the disease natural evolution and severity, except for gender.

Improvement of QoL is a major objective in CF et QoL assessment represents a widely accepted clinical endpoint in Clinical trials (Abbott et al., 2011; Royce and Carl, 2011). Thus, identify factors associated to QoL has become necessary to improve physical, social and emotional functioning of patients (Abbott, 2009; Sawicki et al., 2011). We demonstrated that CF children with FC level above 250µg/g, corresponding to patients with high probability of dysbiosis (Enaud et al., 2019), had worse QoL score (i.e. Total, “Emotional Functioning” and “Social Functioning” scores assessed by children) in agreement with previous studies (Jafari et al., 2013; del Campo et al., 2014). We also demonstrated as previously described (Gee et al., 2003; Goldbeck et al., 2007), associations between several markers of disease severity (i.e. ppFEV<sub>1</sub>, chronic colonization of *Pseudomonas aeruginosa*, recurrent ATB (prophylaxis or regular intravenous treatment), ursodeoxycholic acid treatment that indicated hepatic injury) and worse quality of life. By contrast with the study of Gee *et al.* including CF children and adults (Gee et al., 2005), we demonstrated that, in CF children, age was only associated with “Emotional functioning” and “School functioning” and gender was associated with “School functioning”.

As previously described for abdominal pain in CF (Palermo et al., 2006), we highlighted correlations between GI symptoms and QoL scores in particular with QoL Total scores and “Social Functioning” scores. These results reinforced the association between the FC level, GI symptoms and QoL score notably for “Social Functioning”. Interestingly, correlations were greater in number and mostly stronger for the scores obtained from children than those assessed by their parents whereas few statistical differences have been identified between their scores. This contrast between children’s and parents’ answers is commonly found in other chronic diseases, such as asthma, because of a different perception of the chronic disease by children or their parents (Voorend-van Bergen et al., 2013) as represented by only moderate to good agreement between their answers. Indeed, type of symptoms were commonly correctly identified by both children and parents, but intensity, severity or frequency may be drilled differently. Questionnaires used in the study manly focus on frequency of symptoms and it would be interesting to compare children and parents answers according intensity or severity using the more recent score published by Tabori *et al.* (Tabori et al., 2017) which was not available when our study was performed.

Our study had several limitations. Firstly, the number of patients included in the study was low limiting the number of patients with a FC level above 250µg/g of stool. However the number of patients included is comparable with most other studies investigating fecal calprotectin in CF children (Werlin et al., 2010; Pang et al., 2015; Parisi et al., 2017; Coffey et al., 2019).

Secondly the choice of an elevated FC level also limited the number of participants in the High FC group and possibly generated a type I statistical error. However, the number of CF



children in the High FC group was impacted by the lower prevalence of patients with a FC level above 250µg/g than described in the literature (Uchmanowicz et al., 2014; Parisi et al., 2017). It is also important to note that, in the High FC group, male gender, F508del homozygous mutation, *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization were overrepresented despite a statistical significance with the low FC group and Z-score Weight et Z-score were lower. Since these elements may have introduced bias in the analyses, we demonstrated that most of scores which were different according clinical outcomes were not the same compared to those having differences according FC Level. Moreover, our results were supported by a correlation analysis performed with the entire population. This threshold was chosen because we previously demonstrated that patients with a FC level above 250µg/g were associated with microbiota disturbance close to that observed in IBD (Enaud et al., 2019). In addition, this FC threshold was close to the previously published mean of FC in pancreatic insufficiency CF patients, at which 70% of patients had endoscopic lesions (Werlin et al., 2010). Moreover, it corresponds to the threshold predictive of endoscopic lesions in IBD (Lin et al., 2014; Chang, 2015; Carlsen et al., 2017). The characteristics of the High FC group may also suggest that an increased FC level is more frequently encountered in children with CF disease-aggravating factors. This would not be surprising since these factors could participate in the development of dysbiosis and chronic intestinal inflammation responsible for an increase in FC levels which alters weight gain and growth.

Thirdly the FC level can be affected by several parameters such as treatments. Indeed, the FC level is decreased by probiotics (Bruzzese et al., 2014; del Campo et al., 2014; Ellemunter et al., 2017; Bruzzese et al., 2004), CFTR modulators (Ooi et al., 2018; Tétard et al., 2020) or antibiotic treatments in context of pulmonary exacerbations (Schnapp et al., 2019). For this reason, we excluded patients treated with probiotics. We also excluded those treated with CFTR modulator because before the inclusion visit, effect of this treatment on the FC level was unknown (Ooi et al., 2018). Patients receiving an ATB treatment (oral ATB prophylaxis or recurrent IV ATB cures) were not excluded while a decrease in FC levels after systemic ATB treatment has been reported (Schnapp et al., 2019). However, no difference in the FC level was found according to antibiotic treatment (oral or intravenous) but our patients were not in pulmonary exacerbation. Indeed, ATB were used for these patients as their basal treatment and not for acute pulmonary exacerbation by contrast with the study of Schnapp *et al.* published 3 years after the end of the present study (Schnapp et al., 2019). By contrast with Rumman *et al.* (Rumman et al., 2014), the FC level was not different in patients receiving or not inhaled antibiotherapy. However, they compared patients using normal or abnormal FC level (Rumman et al., 2014) while we compared our patients using a higher FC level threshold or as continuous variable. In our study, the FC level was not different in patients receiving or not proton pump inhibitors which was in agreement with a previous study (Parisi et al., 2017)

but in contrast with another (Adriaanse et al., 2015). However, we did not include CF adults or pancreatic sufficiency CF patients by contrast with this last study (Adriaanse et al., 2015). No association has been identifying between FC level and other clinical parameters in our study which is in accordance with previous studies (Parisi et al., 2017; Rumman et al., 2014; Van Biervliet et al., 2018; Dhaliwal et al., 2015) and reinforces our results according to the FC level.

In cystic fibrosis, abdominal symptoms are common and need more attention from clinicians because often overshadowed by respiratory symptoms. These abdominal symptoms may be related to various digestive organ disorders but can be the sign of dysbiosis or intestinal inflammation. Our results show that in CF children with PI, an increase in fecal calprotectin level, a biomarker known to be related to dysbiosis and intestinal inflammation, is associated with worse GI symptoms and impaired QoL. Measurement of the FC level could help the clinician to better discriminate the origin (functional or organic) of gastrointestinal manifestation and impaired quality of life in CF and thus allow to optimize or adapt the treatment.

**Author Contributions:** F. Beaufils was involved in data acquisition and analysis, and writing the manuscript. E. Mas, M. Mittaine, S. Bui, M. Fayon, H. Clouzeau, F. Galode and T. Lamireau were involved in patient inclusion, data acquisition and critical revision of the manuscript. M. Addra and L. Delhaes were involved in statistical analysis, data interpretation and in critical revision of the manuscript. R. Enaud was involved in designing the study, data handling, critical revision of the manuscript and study supervision. All authors approved the final manuscript as submitted and agree to be accountable for all aspects of the work.

**Acknowledgments:** We thank Jessica Latour, Sandrine Lefevre, Nelly Tastet and Caroline Bruneaux from CF department of Bordeaux Children Hospital and Carole Lannibois and Pascale Maumus from CF department of Toulouse Children Hospital for their fruitful help and/or discussion.

**Potential conflict of Interest:** Laurence Delhaes received research grant from Vertex Pharmaceuticals to perform Lum-Iva-Biota study (this study is ongoing and unrelated to the current manuscript). Vertex Pharmaceuticals had no involvement in the design of the present study and collection, analysis, and interpretation of data as well as in writing the manuscript. The remaining authors have no conflicts of interest relevant to this article to disclose.

**Funding:** This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. Raphaël Enaud received a PhD grant from the University Hospital of Bordeaux and the Biocodex Microbiota Foundation's award 2017 for his research work.

## 1.5 SUPPLEMENTAL TABLES AND FIGURES

**Table S1. Comparison and correlation of the Gastrointestinal Symptoms Scales 3.0 – PedsQL™ and the Quality of Life Pediatric Inventory 4.0 – PedsQL™.scores obtained from children and their parents**

	Scores Obtained from Children	Scores Obtained from Parents	<i>p</i>	$\rho$	<i>ICC</i>
<b>PedsQL™-Gastrointestinal symptoms scales 3.0</b>					
Total	90.5 [65.0 ; 100.0]	89.8 [75.0 ; 100.0]	0.97	<b>0.81<sup>a</sup></b>	<b>0.89<sup>a</sup></b>
Stomach Pain and Hurt	79.0 [25.0 ; 100.0]	75.0 [25.0 ; 100.0]	0.52	<b>0.68<sup>a</sup></b>	<b>0.89<sup>a</sup></b>
Stomach Discomfort When Eating	100.0 [80.0 ; 100.0]	100.0 [65.0 ; 100.0]	0.70	<b>0.45<sup>b</sup></b>	<b>0.66<sup>b</sup></b>
Food and Drink Limits	100.0 [75.0 ; 100.0]	100.0 [83.0 ; 100.0]	<b>0.03</b>	<b>0.46<sup>b</sup></b>	<b>0.70<sup>a</sup></b>
Trouble Swallowing	100.0 [67.0 ; 100.0]	100.0 [50.0 ; 100.0]	0.62	0.14	<b>0.62<sup>b</sup></b>
Heart Burn and Reflux	94.0 [69.0 ; 100.0]	100.0 [63.0 ; 100.0]	0.18	<b>0.71<sup>a</sup></b>	<b>0.83<sup>a</sup></b>
Nausea and Vomiting	100.0 [62.0 ; 100.0]	100.0 [81.0 ; 100.0]	0.53	<b>0.65<sup>a</sup></b>	<b>0.78<sup>a</sup></b>
Gas and Bloating	75.0 [18.0 ; 100.0]	71.0 [21.0 ; 100.0]	0.97	<b>0.61<sup>a</sup></b>	<b>0.78<sup>a</sup></b>
Constipation	91.0 [55.0 ; 100.0]	91.0 [61.0 ; 100.0]	0.81	<b>0.78<sup>a</sup></b>	<b>0.85<sup>a</sup></b>
Blood in Poop	100.0 [25.0 ; 100.0]	100.0 [38.0 ; 100.0]	0.46	<b>0.82<sup>a</sup></b>	<b>0.86<sup>a</sup></b>
Diarrhea	86.0 [54.0 ; 100.0]	86.0 [50.0 ; 100.0]	0.53	<b>0.69<sup>a</sup></b>	<b>0.84<sup>a</sup></b>
<b>PedsQL™-Quality of Life Pediatric Inventory 4.0</b>					
Total	81.0 [56.8 ; 100.0]	80.3 [49.5 ; 100.0]	0.85	<b>0.57<sup>a</sup></b>	<b>0.78<sup>a</sup></b>
Physical Functioning	91.0 [59.0 ; 100.0]	91.0 [38.0 ; 100.0]	0.93	<b>0.69<sup>a</sup></b>	<b>0.83<sup>a</sup></b>
Emotional Functioning	80.0 [30.0 ; 100.0]	75.0 [30.0 ; 100.0]	0.48	<b>0.54<sup>a</sup></b>	<b>0.74<sup>a</sup></b>
Social Functioning	90.0 [55.0 ; 100.0]	90.0 [35.0 ; 100.0]	0.18	<b>0.57<sup>a</sup></b>	<b>0.52<sup>b</sup></b>
School Functioning	80.0 [45.0 ; 100.0]	75.0 [15.0 ; 100.0]	0.66	<b>0.57<sup>a</sup></b>	<b>0.72<sup>a</sup></b>

<sup>a</sup>  $p < 0.001$ ; <sup>b</sup>  $p < 0.05$ ; PedsQL™-Gastrointestinal symptoms scales 3.0 and PedsQL™-Quality of Life Pediatric Inventory 4.0 scores obtained from children and their parents are presented at the median [min; max]. Wilcoxon test was used to compare scores obtained from children and those obtained from their matched parents. Correlation between scores obtained from children and their parents were performed using univariate correlation Spearman test and the Spearman's coefficient of correlation ( $\rho$ ) was indicated. A  $p$  value  $\leq 0.05$  was considered significant. Mixed absolute single measure intraclass correlations were computed to express test-retest reliability between children and parents and the intraclass coefficient correlation (ICC) was presented. ICC values indicate poor ( $< 0.5$ ), moderate (0.5–0.75), good (0.75–0.9) or excellent ( $> 0.9$ ) reliability.

**Table S2. Scores calculated from children’s and their parents’ answers to the Gastrointestinal symptoms scales 3.0 - PedsQL™**

	Low FC Group N = 32	High FC Group N = 5	<i>p</i>
<b>Gastrointestinal symptoms scales 3.0</b>			
<i>By children</i>			
Total	92.3 [65.0 ; 100.0]	81.9 [72.8 ; 87.9]	<b>0.043</b>
Stomach Pain and Hurt	81.0 [25.0 ; 100.0]	75.0 [62.0 ; 79.0]	0.349
Stomach Discomfort When Eating	100.0 [80.0 ; 100.0]	95.0 [85.0 ; 100.0]	0.308
Food and Drink Limits	100.0 [75.0 ; 100.0]	100.0 [79.0 ; 100.0]	0.834
Trouble Swallowing	100.0 [67.0 ; 100.0]	100.0 [92.0 ; 100.0]	0.100
Heart Burn and Reflux	100.0 [75.0 ; 100.0]	81.0 [69.0 ; 94.0]	<b>0.024</b>
Nausea and Vomiting	100.0 [62.0 ; 100.0]	75.0 [75.0 ; 100.0]	<b>0.011</b>
Gas and Bloating	79.0 [39.0 ; 100.0]	50.0 [18.0 ; 71.0]	<b>0.009</b>
Constipation	91.0 [57.0 ; 100.0]	91.0 [55.0 ; 96.0]	0.772
Blood in Poop	100.0 [25.0 ; 100.0]	100.0 [50.0 ; 100.0]	0.255
Diarrhea	86.0 [54.0 ; 100.0]	79.0 [71.0 ; 82.0]	0.203
<i>By parents</i>			
Total	91.8 [75.0 ; 100.0]	84.2 [81.2 ; 85.0]	<b>0.039</b>
Stomach Pain and Hurt	75.0 [25.0 ; 100.0]	63.0 [50.0 ; 83.0]	0.397
Stomach Discomfort When Eating	100.0 [65.0 ; 100.0]	85.0 [75.0 ; 95.0]	< <b>0.01</b>
Food and Drink Limits	100.0 [83.0 ; 100.0]	100.0 [97.0 ; 100.0]	0.794
Trouble Swallowing	100.0 [50.0 ; 100.0]	100.0 [60.0 ; 100.0]	0.484
Heart Burn and Reflux	100.0 [75.0 ; 100.0]	88.0 [63.0 ; 90.0]	<b>0.004</b>
Nausea and Vomiting	100.0 [81.0 ; 100.0]	88.0 [81.0 ; 100.0]	<b>0.017</b>
Gas and Bloating	73.0 [21.0 ; 100.0]	50.0 [29.0 ; 82.0]	0.134
Constipation	91.0 [61.0 ; 100.0]	75.0 [63.0 ; 100.0]	0.608
Blood in Poop	100.0 [38.0 ; 100.0]	100.0 [88.0 ; 100.0]	0.645
Diarrhea	86.0 [50.0 ; 100.0]	93.0 [68.0 ; 100.0]	0.788

Results are presented at the median [min; max]. Scores were compared with Mann-Whitney test. A *p* value ≤ 0.05 was considered significant. Lower scores indicate worse GI symptomatology and worse QoL.

**Table S3. Scores calculated from children’s and their parents’ answers to the Quality of Life Pediatric Inventory 4.0 - PedsQL™**

	Low FC Group N = 32	High FC Group N = 5	<i>p</i>
<b>Quality of Life Pediatric Inventory 4.0</b>			
<i>By children</i>			
Total	83.0 [58.3 ; 100.0]	74.0 [56.8 ; 83.8]	<b>0.050</b>
Physical Functioning	91.0 [59.0 ; 100.0]	88.0 [72.0 ; 100.0]	0.671
Emotional Functioning	85.0 [30.0 ; 100.0]	65.0 [55.0 ; 75.0]	<b>0.049</b>
Social Functioning	90.0 [60.0 ; 100.0]	75.0 [55.0 ; 100.0]	<b>0.045</b>
School Functioning	80.0 [45.0 ; 100.0]	60.0 [45.0 ; 90.0]	0.129
<i>By parents</i>			
Total	80.9 [49.5 ; 100.0]	76.3 [57.3 ; 88.5]	0.491
Physical Functioning	91.0 [38.0 ; 100.0]	84.0 [69.0 ; 100.0]	0.911
Emotional Functioning	72.5 [30.0 ; 100.0]	75.0 [55.0 ; 100.0]	1.000
Social Functioning	95.0 [35.0 ; 100.0]	85.0 [54.0 ; 100.0]	0.059
School Functioning	75.0 [31.0 ; 100.0]	55.0 [15.0 ; 100.0]	0.639

Results are presented at the median [min; max]. Scores were compared with Mann-Whitney test. A *p* value ≤ 0.05 was considered significant. Lower scores indicate worse GI symptomatology and worse QoL.

**Table S4. Comparison of fecal calprotectin levels between subgroups according clinical and functional outcomes**

	N Yes/No	Yes	No	<i>p</i>
<b>Sex male</b>	22/15	73.5 [49.0 ; 1457.0]	70.0 [43.0 ; 300.0]	0.938
<b>ΔF508 Homozygous mutation</b>	21/16	128.0 [43.0 ; 1457.0]	52.5 [50.0 ; 300.0]	0.074
<b>Chronic colonization</b>				
Pseudomonas Aeruginosa	11/26	70.0 [50.0 ; 300.0]	97.5 [43.0 ; 1457.0]	0.490
Staphylococcus Aureus	27/10	70.0 [50.0 ; 1457.0]	130.5 [50.0 ; 300.0]	0.340
<b>Within a year prior to inclusion</b>				
No. of patients hospitalized	16/21	52.5 [43.0 ; 1457.0]	91.0 [49.0 ; 352.0]	0.565
For Pulmonary exacerbation	6/31	151.5 [50.0 ; 1457.0]	70.0 [43.0 ; 675.0]	0.210
For recurrent IV ATB therapy	15/22	55.0 [43.0 ; 1457.0]	84.0 [49.0 ; 352.0]	0.814
ppFEV <sub>1</sub> < 80%	14/23	91.0 [49.0 ; 1457.0]	70.0 [43.0 ; 352.0]	0.751
FEV <sub>1</sub> /FVC < 80%	15/22	70.0 [43.0 ; 1457.0]	97.5 [49.0 ; 675.0]	0.520
ppFEF <sub>25-75%</sub> < 80%	21/16	70.0 [43.0 ; 1457.0]	87.0 [49.0 ; 675.0]	0.975
<b>Treatment</b>				
Proton pump inhibitor	12/25	161.5 [43.0 ; 1457.0]	70.0 [50.0 ; 675.0]	0.194
ursodeoxycolic acid	24/13	70.0 [43.0 ; 1457.0]	73.5 [50.0 ; 675.0]	0.617
Laxative treatment	6/31	60.0 [50.0 ; 352.0]	77.0 [43.0 ; 1457.0]	0.676
Inhaled antibiotic	16/21	50.0 [49.0 ; 300.0]	91.0 [43.0 ; 1457.0]	0.157
oral ATB prophylaxis	6/31	101.5 [43.0 ; 352.0]	50.0 [49.0 ; 1457.0]	0.835

ΔF508: Deletion of the codon for phenylalanine at position 508; BMI: Body mass index; No.: number; IV ATB: intravenous antibiotherapy; ppFEV<sub>1</sub>: percentage of predicted forced expiratory volume measured in 1 second; FVC: Forced vital capacity; ppFEF<sub>25-75%</sub>: percentage of predicted forced mid-expiratory flow between 25% and 75% of forced vital capacity. Results are presented at the median [min; max]. Variables were compared using a Mann-Whitney test. A *p* value ≤ 0.05 was considered significant.

**Table S5. Correlation between fecal calprotectin levels and clinical characteristics or lung function testing results**

	$\rho$	$p$
Age	0.198	0.240
Z-score Weight	- 0.052	0.764
Z-score Height	- 0.150	0.382
Z-score BMI	0.205	0.230
<b>Lung function testing</b>		
ppFVC	- 0.023	0.893
ppFEV <sub>1</sub>	- 0.013	0.940
FEV <sub>1</sub> /FVC (%)	0.177	0.294
ppFEF <sub>25-75%</sub>	0.141	0.407
ppTLC <sup>a</sup>	- 0.226	0.239
ppRV <sup>a</sup>	- 0.192	0.318
RV/TLC <sup>a</sup>	- 0.119	0.539
ppRFC <sup>a</sup>	- 0.195	0.312
ppRaw <sup>a</sup>	- 0.215	0.263
<b>PERT dosage</b>	0.319	0.054

<sup>a</sup> data were missing for 8 children; BMI: Body mass index; pp: percentage of predicted; FEV<sub>1</sub>: forced expiratory volume measured in 1 second; FVC: Forced vital capacity; FEF<sub>25-75</sub>: Forced mid-expiratory flow between 25% and 75% of forced vital capacity. TLC: Total lung capacity; RV: Residual volume; RFC: Residual functional capacity; Raw: Resistance airways; PERT: Pancreatic enzymes replacement therapy. Correlation were performed using Spearman's correlation test and the coefficient of correlation ( $\rho$ ) was indicated. A  $p$  value  $\leq 0.05$  was considered significant.

**Table S6. Differences between scores calculated from children's and their parents' answers to the Gastrointestinal symptoms scales 3.0 - PedsQL™ according clinical parameters**

	No/Yes	No	Yes	$p$
<b>Scores obtained from children</b>				
<i>Gas and Bloating</i>				
Oral ATB prophylaxis	31/6	79.0 [18.0 ; 100.0]	50.0 [39.0 ; 89.0]	<b>0.018</b>
<i>Constipation</i>				
Sexe male	15/22	96.0 [66.0 ; 100.0]	86.0 [61.0 ; 100.0]	<b>0.018</b>
P. aeruginosa chronic colonization	28/9	94.0 [57.0 ; 100.0]	84.0 [55.0 ; 95.0]	<b>0.033</b>
<i>Diarrhea</i>				
P. aeruginosa chronic colonization	28/9	86.0 [61.0 ; 100.0]	71.0 [54.0 ; 96.0]	<b>0.009</b>
<b>Scores obtained from parents</b>				
<i>Diarrhea</i>				
P. aeruginosa chronic colonization	28/9	93.0 [61.0 ; 100.0]	75.0 [50.0 ; 93.0]	<b>0.022</b>

Results are presented at the median [min; max]. Variables were compared with Mann-Whitney test. A  $p$  value  $\leq 0.05$  was considered significant. Lower scores indicate worse GI symptomatology and worse QoL.

**Table S7. Differences between scores calculated from children's and their parents' answers to the to the Quality of Life Pediatric Inventory 4.0 - PedsQL™ according clinical parameters**

	No/Yes	No	Yes	<i>p</i>
<b>Scores obtained from children</b>				
<i>Total</i>				
Oral ATB prophylaxis	31/6	82.5 [56.8 ; 100.0]	71.3 [59.3 ; 83.8]	<b>0.041</b>
Ursodeoxycholic acid	24/13	84.3 [58.3 ; 100.0]	72.8 [56.8 ; 95.0]	<b>0.002</b>
Recurent IV ATB	22/15	83.9 [58.3 ; 100.0]	76.3 [56.8 ; 96.0]	<b>0.046</b>
<i>P. aeruginosa</i> chronic colonization	28/9	83.9 [58.3 ; 100.0]	72.8 [56.8 ; 84.5]	<b>0.007</b>
<i>Physical Functioning</i>				
Ursodesoxycholic acid	24/13	94.0 [63.0 ; 100.0]	81.0 [59.0 ; 100.0]	<b>0.007</b>
Recurent IV ATB	22/15	94.0 [63.0 ; 100.0]	84.0 [59.0 ; 100.0]	<b>0.025</b>
<i>P. aeruginosa</i> chronic colonization	28/9	94.0 [63.0 ; 100.0]	81.0 [59.0 ; 88.0]	<b>0.022</b>
<i>Emotional Functioning</i>				
Ursodeoxycholic acid	24/13	86.0 [30.0 ; 100.0]	65.0 [40.0 ; 90.0]	<b>0.004</b>
Proton pump inhibitor	25/12	85.0 [30.0 ; 100.0]	72.5 [40.0 ; 90.0]	<b>0.044</b>
<i>Social Functioning</i>				
<i>P. aeruginosa</i> chronic colonization	28/9	90.0 [60.0 ; 100.0]	80.0 [55.0 ; 90.0]	<b>0.005</b>
<b>Scores obtained from parents</b>				
<i>Total</i>				
Ursodeoxycholic acid	24/13	83.8 [66.0 ; 100.0]	71.8 [49.5 ; 100.0]	<b>0.027</b>
<i>School Functioning</i>				
Sex male	15/22	90.0 [45.0 ; 100.0]	65.0 [15.0 ; 100.0]	<b>0.030</b>

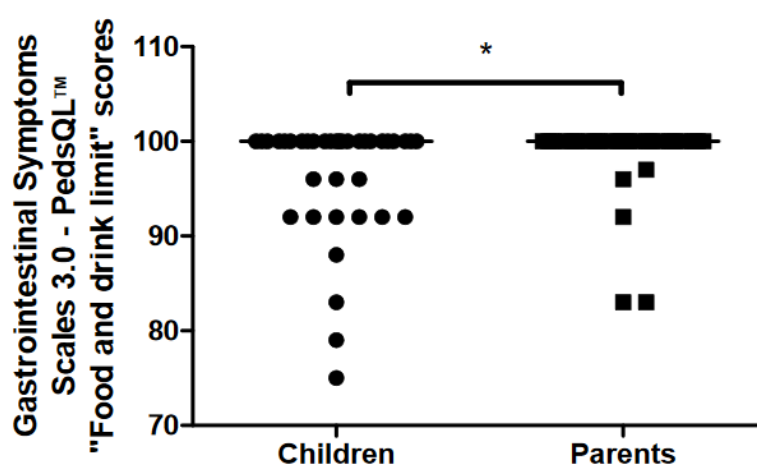
Results are presented at the median [min; max]. Variables were compared with Mann-Whitney test. A *p* value ≤ 0.05 was considered significant. Lower scores indicate worse GI symptomatology and worse QoL.

**Table S8. Significant correlations between clinical parameters or lung function testing results and PedsQL™ – Gastrointestinal symptoms scales 3.0 or PedsQL™ - Quality of Life Pediatric Inventory 4.0 scores obtained from children or their parents**

	Clinical Parameters with a Significant Correlation	$\rho$	$p$
<b>PedsQL™-Gastrointestinal symptoms scales 3.0</b>			
<b>Scores</b>			
<i>Obtained from children</i>			
Food and Drink Limits	Age	- 0.357	0.030
Stomach Pain and Hurt scores	PERT dosage	- 0.367	0.026
<i>Obtained from parents</i>			
Trouble Swallowing	PERT dosage	- 0.342	0.039
Nausea and Vomiting	FEV1/FVC	0.347	0.035
Gas and Bloating	PERT dosage	- 0.392	0.016
Constipation	Age	- 0.419	0.010
<b>PedsQL™-Quality of Life Pediatric Inventory 4.0</b>			
<b>Scores</b>			
<i>Obtained from children</i>			
Physical Functioning	Age	- 0.339	0.040
Emotionnal functioning	Z-Score weight	0.397	0.017
	Z-Score height	0.470	0.039
School Functioning	Age	- 0.385	0.019
	Z-score weight	0.389	0.019
<i>Obtained from parents</i>			
Physical Functioning	Age	- 0.394	0.016
School Functioning	ppFEV1	0.323	0.026

PERT: pancreatic enzyme replacement therapy; pp: percentage of predicted; FEV1: forced expiratory volume measured in 1 second; FVC: Forced vital capacity. Correlations were performed using univariate correlation Spearman's test and the coefficient of correlation( $\rho$ ) was indicated.

**Figure S1. Gastrointestinal Symptoms Scales 3.0 - PedsQL™ "Food and drink limit" scores according answers obtained from children and their parents.**



Lower scores indicate worse symptomatology. Comparison was performed using Wilcoxon's test. \*  $p < 0.05$





## **2 L'AUGMENTATION DE LA CALPROTECTINE FECALE CHEZ LES ENFANTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE EST ASSOCIEE A DES PERTURBATIONS DU MICROBIOTE SIMILAIRES A CELLES OBSERVEES DANS LA MALADIE DE CROHN**

---

Bien que des perturbations du microbiote intestinal ont été décrites dans la mucoviscidose, notamment une diminution des espèces bactériennes anti- inflammatoires (dont *Bifidobacterium* spp. et *Faecalibacterium prauztnisii*) et à l'inverse l'apparition de bactéries opportunistes pro- inflammatoires (*E. coli*), le lien entre inflammation intestinale et dysbiose reste très peu étudié, contrairement à la maladie de Crohn. L'objectif principal de cette étude était donc de rechercher si une association entre la composition du microbiote intestinal et la présence d'une inflammation intestinale existait chez l'enfants atteint de mucoviscidose.

Un échantillon de selles a été recueilli chez 20 enfants (âgés de 5 à 17 ans) atteints de mucoviscidose. L'analyse du microbiote fécal a été réalisée par séquençage de la région v4 de l'ARNr 16S par technologie Illumina (MiSeq). L'inflammation digestive a été évaluée par le dosage ELISA de la calprotectine fécale.

Une inflammation intestinale (définie par un taux de calprotectine fécale > 250 µg/g) était présente chez 7 enfants (35%). Il n'y avait pas de différence significative d'alpha-diversité entre les patients avec ou sans inflammation intestinale. En revanche, le microbiote des patients ayant une inflammation intestinale se distinguait par une augmentation de l'abondance d'*Acidaminococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. et *Veillonella dispar*, et une diminution de *Bacteroides* spp., *Ruminococcus* spp., *Coprococcus* spp., *Dialister* spp., *Parabacteroides* spp., *Bifidobacterium adolescentis* et *F. prausnitzii*. Ces perturbations du microbiote présentaient des similitudes avec la dysbiose observée dans la maladie de Crohn, comme en témoigne l'augmentation du « Microbial Dysbiosis Index » dans notre population. De plus, une surreprésentation significative du genre *Streptococcus* était retrouvée chez les enfants avec inflammation intestinale, ce qui soulève la question de l'implication de l'axe « intestin-poumons » puisque les streptocoques font partie de la flore orale et respiratoire.

Cette étude a permis de mieux caractériser la dysbiose bactérienne associée à l'inflammation intestinale dans la mucoviscidose et de proposer plusieurs marqueurs microbiens, dont le MD-dysbiosis Index, dans le suivi de l'évolution de la maladie et l'étude de l'impact des modulateurs CFTR sur le microbiote digestif. Elle participe également à une meilleure compréhension de la physiopathologie de cette inflammation.

# INTESTINAL INFLAMMATION IN CHILDREN WITH CYSTIC FIBROSIS IS ASSOCIATED WITH CROHN'S-LIKE MICROBIOTA DISTURBANCES

Raphaël Enaud<sup>a,c\*</sup>, Katarzyna B. Hooks<sup>d,e\*</sup>, Aurélien Barre<sup>d,e</sup>, Thomas Barnetche<sup>c,f</sup>, Christophe Hubert<sup>g,h</sup>, Marie Massot<sup>i</sup>, Thomas Bazin<sup>j</sup>, Haude Clouzeau<sup>b</sup>, Stéphanie Bui<sup>b</sup>, Michael Fayon<sup>a,c</sup>, Patrick Berger<sup>a,c</sup>, Philippe Lehours<sup>k</sup>, Cécile Bébéar<sup>c,j</sup>, Macha Nikolski<sup>d,e</sup>, Thierry Lamireau<sup>b,c</sup>, Laurence Delhaes<sup>a,c</sup>, Thierry Schaevebeke<sup>c,f,j</sup>

**Affiliations:** <sup>a</sup>Univ. Bordeaux, INSERM, CRCTB, U1045, CHU Bordeaux, F-33000, Bordeaux, France; <sup>b</sup>CHU Bordeaux, CRCM Pédiatrique, CIC 1401, F-33000, Bordeaux, France; <sup>c</sup>FHU ACRONIM, F-33000, Bordeaux, France; <sup>d</sup>Univ. Bordeaux, Bordeaux Bioinformatics Center, F-33000, Bordeaux, France; <sup>e</sup>Univ. Bordeaux, CNRS, LaBRI, UMR 5800, F-33400, Talence, France; <sup>f</sup>CHU Bordeaux, Service de Rhumatologie, F-33000, Bordeaux, France; <sup>g</sup>Univ. Bordeaux, INSERM, MRGM, U1211, F-33000, Bordeaux, France; <sup>h</sup>Univ. Bordeaux, PGTB, F-33000, Bordeaux, France; <sup>i</sup>BIOGECO, INRA, Univ. Bordeaux, F-33610, Cestas, France; <sup>j</sup>Univ. Bordeaux, INRA, USC EA 3671, Infections humaines à mycoplasmes et à chlamydiae, CHU Bordeaux, F-33000, Bordeaux, France; and <sup>k</sup>Univ. Bordeaux, INSERM, BaRITOn, UMR1053, CHU Bordeaux, F-33000, Bordeaux, France.

\* Drs Enaud and Hooks contributed equally as co-first authors.

**Corresponding author:** Dr Raphaël Enaud ([raphael.enaud@chu-bordeaux.fr](mailto:raphael.enaud@chu-bordeaux.fr))

Available at <https://doi.org/10.3390/jcm8050645>

## Abstract

Cystic fibrosis (CF) is a systemic genetic disease, which leads to pulmonary but also digestive disorders. In a majority of CF patients, intestine is the site of chronic inflammation and microbiota disturbances. The link between gut inflammation and microbiota dysbiosis is still poorly understood. The main objective of this study was to assess gut microbiota composition in CF children depending on their intestinal inflammation. We collected fecal samples from 20 children with CF. Fecal calprotectin levels were measured and fecal microbiota was analyzed by 16S rRNA sequencing. We observed intestinal inflammation was associated with microbiota disturbances characterized mainly by increased abundances of *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Veillonella dispar*, along with decreased abundances of *Bacteroides*, *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. Those changes exhibited similarities with that of Crohn's (CD), as evidenced by the elevated CD Microbial-Dysbiosis index that we applied for the first time in CF. Furthermore, the significant over-representation of *Streptococcus* in children with intestinal inflammation appears to be specific to CF and raises the issue of gut-lung axis involvement. Taking together, our results provide new arguments to link gut microbiota and intestinal inflammation in CF and suggest the key role of the gut-lung axis in the CF evolution.

**Keywords:** Cystic fibrosis; gut microbiota; intestinal inflammation; fecal calprotectin; dysbiosis index.

## 2.1 INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is a genetic disorder caused by mutations in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator gene (CFTR), leading to viscous secretions accumulating on epithelial surfaces in both the lungs and the gastrointestinal tract (De Lisle and Borowitz, 2013). In recent decades, improved patient care in the management of pulmonary disease has led to an older CF population with new complications, including intestinal disorders (Parkins et al., 2011). However, some CF gastrointestinal complications such as chronic inflammation, gut microbiota disruption and increased risk of gastrointestinal malignancies remain poorly understood (Flass et al., 2015; de Freitas et al., 2018; Garg and Ooi, 2017; Yamada et al., 2018).

Gut microbiota has been recently shown to be associated with the human health and diseases including CF (Rogers et al., 2016). Its composition is clearly different in CF patient, with a decrease in specific bacteria such as *Bifidobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Clostridium* spp. and *Faecalibacterium prausnitzii*, and the emergence of opportunistic pro-inflammatory bacteria such as *Escherichia coli* and *Eubacterium bifforme* (de Freitas et al., 2018; Burke et al., 2017; Nielsen et al., 2016; Schippa et al., 2013; Duytschaever et al., 2011). In CF, this disturbed microbiota, usually named “dysbiosis”, stems from multiple factors including hydro electrolytic disruptions of the intestinal secretions, slower gastrointestinal transit time (De Lisle, 2007), drug uses, impaired innate immunity in the gut (Clarke et al., 2004; Ooi et al., 2015) and hypercaloric diet (Debray et al., 2018; Li and Somerset, 2018), and appears to be correlated with the severity of the CFTR mutations (Schippa et al., 2013).

Furthermore, chronic intestinal inflammation is present in the majority of CF patients, even in the absence of digestive symptoms (Munck, 2014). Inflammation is characterized by an infiltrate of the lamina propria by mononuclear cells expressing inflammation markers (such as ICAM-1, CD-25, IL-2, IFN $\gamma$ ) associated with Crohn’s-like endoscopic lesions of the mucosa (edema, erythema or ulcerations) (Raia et al., 2000; Flass et al., 2015; Henker et al., 2019). To better assess intestinal inflammation, Bruzzese *et al.* have adapted in CF the fecal calprotectin measurement, previously used as a non-invasive digestive inflammation biomarker in inflammatory bowel disease (IBD) (Bruzzese et al., 2004). Fecal calprotectin level is significantly higher in CF patients compared to healthy subjects (Bruzzese et al., 2004, 2014; Ellemunter et al., 2017).

The pathophysiology of intestinal inflammation is still unclear in CF. Very few studies have focused on the link between intestinal microbiota composition and inflammation in CF, while this link is well documented in IBD (Sokol et al., 2017). To our knowledge, only one study using next-generation sequencing (NGS) of microbiota was dedicated to this issue and showed a

positive correlation between *E. coli* abundance and intestinal inflammation in CF children (Hoffman et al., 2014). A recent study was focused on the evolution of intestinal microbiota and inflammation in CF patients treated with Ivacaftor, a CFTR-modifying therapy. An absence of intestinal inflammation was significantly associated with an increased *Akkermansia* abundance (Ooi et al., 2018).

As previous studies focused on mucosal inflammation and microbiota in the gastrointestinal tract of CF patients were highly limited (Bruzzese et al., 2014; Hoffman et al., 2014), our aim was to investigate links between gut microbiome and intestinal inflammation using NGS approach plus fecal calprotectin measurements, in a pediatric CF population.

## **2.2 MATERIALS AND METHODS**

### **2.2.1 Study design, sample collection, and ethics statement**

Our observational prospective study took place at the Children's Hospital of Bordeaux from November 2015 to May 2018. The inclusion criteria were patient over 3 years of age with well-documented CF associated with exocrine pancreatic insufficiency. The exclusion criteria were an ongoing enrollment in therapeutic protocols, antibiotics or probiotics courses during the two months prior the inclusion or patients after organ transplantation.

At inclusion visit patients' stool samples were collected and stored at -80°C until use. In parallel, patient clinical status was documented using: demographic data, nutritional status assessed by the Body Mass Index expressed as percent of the standard normalized by age (%BMI), respiratory capacity measured by Forced Expiratory Volume in 1s expressed as percent predicted (%FEV<sub>1</sub>) and microbial pulmonary colonization along with previous intravenous (IV), oral or inhaled antibiotic courses.

In addition, questionnaires focused on standardized assessments of quality of life (PedsQL™ 4.0 Generic Core Scale) and of digestive symptoms (PedsQL™ - Gastrointestinal Symptoms Scales 3.0) were provided at no charge via the ePROVIDE™ online distribution process and filled for each child. These questionnaires, validated for different age groups, include a self-assessment and a parental evaluation. A score negatively correlated with the presence of symptoms was assigned from 0 to 100 to each item based on the collected responses. An average score was calculated for the main questionnaire sections.

Finally, long-term evolution based on clinical monitoring two years after inclusion was recorded for each child, based on %BMI and %FEV<sub>1</sub> values at the follow-up visit, plus the

corresponding variations (estimated by the difference between %BMI or %FEV<sub>1</sub> measures at two years and inclusion), and the number of antibiotic courses during this period (IV, oral, inhaled or any mode of administration combined) (**Table 1; Table S1**).

The present study was approved by the regional ethical committee “CPP Sud-Ouest et Outremer III” (DC 2015/129). Informed consent was sought from study participants, and their parents.

### 2.2.2 Measurements of fecal calprotectin

The fecal calprotectin assay was carried out using the GHSA kit (Eurobio). In absence of a specific threshold in CF, we applied a cut-off of 250 µg/g, recently validated to predict an inflammatory flare associated with endoscopic lesions in IBD (Davidson and Lock, 2017; Lin et al., 2014).

### 2.2.3 Microbiota analysis

DNA extraction was performed using DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen) according to manufacturer's protocol. The DNA samples were the used for V4 region of the 16S rRNA gene sequencing as previously described (Bazin et al., 2018). For specific analysis of *S. oralis* and total bacteria population, droplet digital PCR (ddPCR) on the fecal DNA was performed, as described in the **Supplemental Information**.

### 2.2.4 Sequencing and bioinformatics analysis

Next-generation sequencing was performed using Illumina MiSeq sequencer, and bioinformatic analysis as described previously (Bazin et al., 2018). Alpha and beta diversity indexes were assessed using raw Operational Taxonomic Unit (OTU) occurrence counts and a Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS) ordination method with Bray-Curtis distance metric implemented by R package phyloseq, respectively. Subsequent OTU filtering and analyses were performed with MicrobiomeAnalyst (<http://www.microbiomeanalyst.ca>) (Dhariwal et al., 2017). OTUs were normalized by total sum scaling. Two groups of patients were defined with low (< 250 µg/g) and high (> 250 µg/g) fecal calprotectin level and used for DESeq2 (Love et al., 2014) (**Table S2**) and LEfSe (Segata et al., 2011) (**Table S3**) analyses to find differentially present taxa and microbiota markers, respectively. Raw data have been deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) sequence read archive (ENA accession number PRJEB28609).

### 2.2.5 Microbial Dysbiosis index evaluation

We estimated the Microbial Dysbiosis index (MD-index; **Table S4**), a ratio between relative abundance of increased and decreased bacteria recently proposed in Crohn's disease (CD) (Gevers et al., 2014).

### 2.2.6 Statistical analysis

Differentially present taxonomic nodes between groups of patients were calculated using DESeq2 approach and a False Discovery Rate (FDR) < 0.05. LEfSe method was used to identify metagenomic biomarkers (Segata et al., 2011). Nonparametric Wilcoxon-Mann-Whitney test was used to compare quantitative variables between groups. Correlations were calculated using Spearman method. Statistical analysis was performed with R studio program (version 1.1.453 for Windows<sup>TM</sup>); a p-value < 0.05 was considered indicative of statistical significance.

## 2.3 RESULTS

### 2.3.1 Intestinal inflammation is associated with more previous intravenous antibiotic courses in CF

Twenty children with CF between 6 and 14 years of age were included; their main demographic characteristics, clinical and microbiological data are summarized in Table 1. Among them, we identified seven (35%) children (mean of age at  $8.0 \pm 3.0$  years old, **Table 1**) with significant intestinal inflammation (fecal calprotectin > 250  $\mu\text{g/g}$ , with levels ranged from 300 to 1800  $\mu\text{g/g}$ ). Age of patients, mutation severities, %BMI and %FEV<sub>1</sub> were not significantly different between children without and with intestinal inflammation (**Table 1**). In addition, no complaint recorded in questionnaires could discriminate inflammatory status of children (**Table 1**). However, children with intestinal inflammation have received significantly more intravenous antibiotic courses before inclusion ( $p=0.04$  adjusted with age, **Table 1**).

**Table 1. Characteristics of patients with and without intestinal inflammation**

	No inflammatory group	Inflammatory group
<b>Patient</b>	13 (65%)	7 (35%)
<b>Fecal calprotectin level</b>	122 (91.0-149.0)	459 (324.5-925.0)
<b>Age in years</b>	9 (7.0-11.0)	8 (7.5-11.5)
<b>Female</b>	7 (53.9%)	3 (43%)
<b>Mutations</b>		
- F508del homozygous	10 (77%)	4 (57%)
- F508del heterozygous	2 (15%)	3 (43%)
- Others	1 (8%)	0
<b>%BMI<sup>†</sup></b>	97.6 (94.0-108.0)	98.3 (88.5-97.7)
<b>%FEV<sub>1</sub><sup>††</sup></b>	81(71.0-91.0)	76 (71.5-93.5)
<b>Chronic pulmonary colonization</b>		
- <i>P. aeruginosa</i>	1 (8%)	0
- <i>S. aureus</i>	11 (85%)	7 (100%)
<b>Previous IV antibiotic courses<sup>+</sup></b>	0 (0-2)	5 (0.5-10)
<b>Quality of life<sup>*</sup></b>		
- Parents' report	81.9 (76.5-88.4)	89.0 (86.7-90.4)
- Child's report	83.9 (71.9-89.2)	85.1 (76.8-88.6)
<b>Digestive symptoms<sup>**</sup></b>		
- Parents' report	83.2 (80.6-90.7)	94.5 (93.6-95.0)
- Child's report	84.5 (79.4-95.1)	91.2 (88.7-98.1)
<b>Follow-up at 2 years</b>		
- %BMI <sup>†</sup>	96.6 (90.6-105.9)	97.6 (92.3-102.6)
- %BMI variation	- 0.5 (-3.8-1.5)	-0.3 (-1.0-3.0)
- %FEV <sub>1</sub> <sup>††</sup>	84.0 (71.2-95.2)	83.5 (69.5-85.5)
- %FEV <sub>1</sub> variation	1 (-21.0-8.5)	9 (-4.7-14.5)
- IV antibiotics	2.5 (0.0-5.2)	6.5 (5.2-9.2)
- Oral antibiotics	1.5 (0.0-3.2)	2 (2.0-2.7)
- Inhaled antibiotics <sup>+</sup>	1 (1.0-1.2)	2 (2.0-2.7)
- Total antibiotics <sup>+</sup>	5 (3.7-8.2)	11.5 (10.2-12.7)

Data are presented as n (%) or median (interquartile interval).

Abbreviations: BMI, body mass index; FEV<sub>1</sub>, Forced Expiratory Volume in 1s; IV, intravenous.

+ p < 0.05

<sup>†</sup> expressed as percent of the standard normalized by age

<sup>††</sup> expressed as percent predicted

<sup>\*</sup> Evaluated using PedsQL™ Generic Core Scale 4.0

<sup>\*\*</sup> Evaluated using PedsQL™ Gastrointestinal Symptoms Scales 3.0

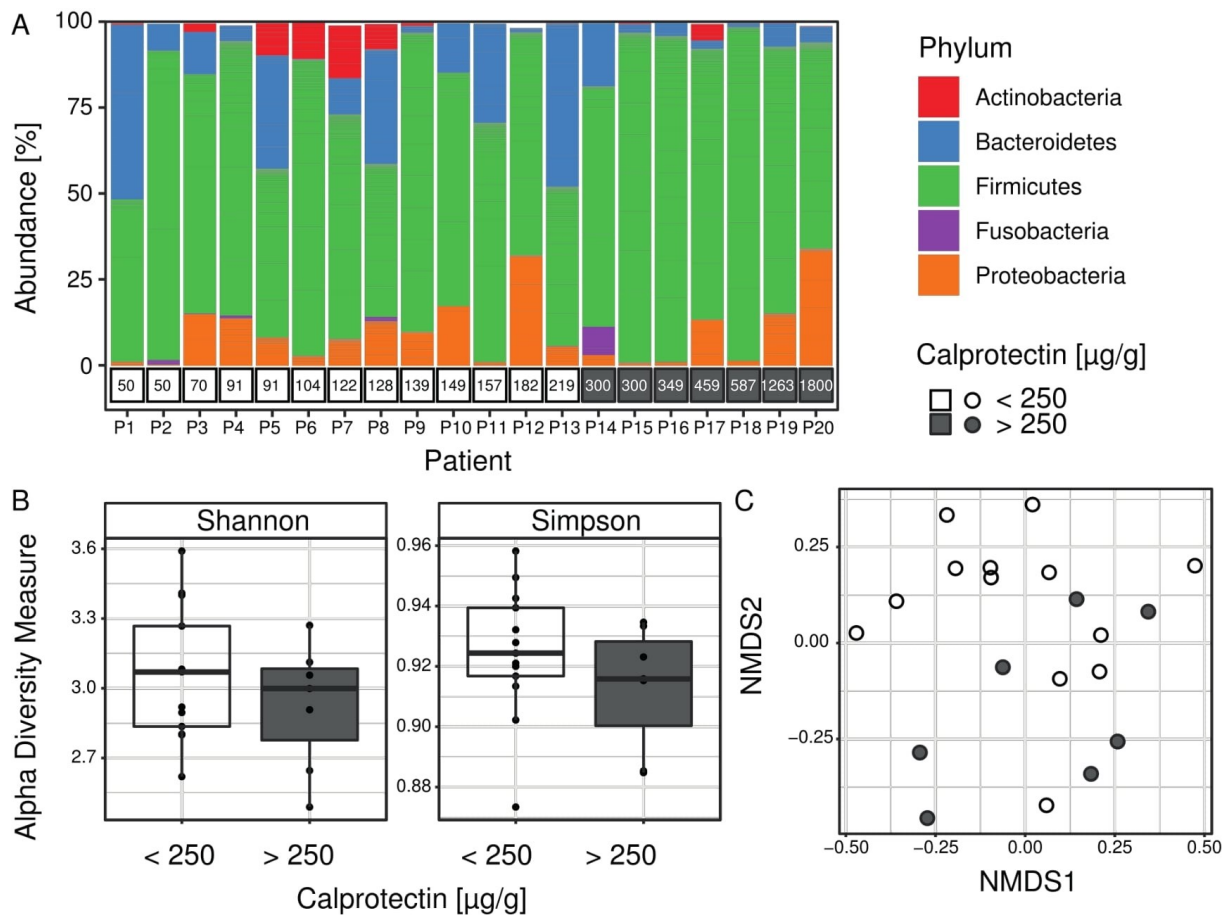


### 2.3.2 CF children with intestinal inflammation are distinguished by their intestinal microbiota composition

The microbiota composition from 20 fecal samples was estimated using targeted 16S rRNA gene sequencing. After bioinformatic analysis, the median number of high-quality reads per patient was 421,720 (from 69,534 to 2,500,796). Taxonomic assignment was used to compare the profiles of patients' microbiota (**Fig. 1**). At the phylum level, the proportion of Firmicutes was significantly higher in microbiota profiles of children with intestinal inflammation (on average 81% vs 65% respectively for children with and without intestinal inflammation, FDR = 0.0078) (**Fig. 1A**). To evaluate species diversity in patient's microbiome we calculated alpha diversity indices. The Shannon and Simpson indices are two complementary approaches to alpha diversity, sensitive to changes in abundance of the rarest or the most abundant OTUs, respectively. Alpha diversity indexes were not significantly different between children with and without intestinal inflammation (**Fig. 1B**). However, the beta diversity analysis (NMDS) reflecting the variation of microbiome between samples, showed partial separation of the patients with intestinal inflammation (**Fig. 1C**).

Differential expression (DESeq2) analysis revealed 80 distinctive OTUs that belonged to 25 unique taxonomic nodes differentially present between patients according to their intestinal inflammation status (**Fig. 2A, Table S2**). Among them, increased abundances of *Acidaminococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. and *Veillonella dispar* along with decreased abundances of *Bacteroides* spp., *Ruminococcus* spp., *Coprococcus* spp., *Dialister* spp., *Parabacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Dorea formicigenerans* and *Faecalibacterium prausnitzii* were observed in children with fecal calprotectin higher than 250 µg/g (**Fig. 2A**).

Using LEfSe analysis (**Table S3**), we identified numerous taxonomic nodes that can predict intestinal inflammation in our young CF population. It confirmed the results of DESeq2 at genus levels regarding *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Dialister* and *Parabacteroides*, and at the species level regarding *Veillonella dispar*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Dorea formicigenerans* and *Faecalibacterium prausnitzii*. In addition, some OTUs belonging to the families Lachnospiraceae and Ruminococcaceae appear to be differentially correlated to the inflammatory patient status (**Fig. 2B**, results with p-value < 0.01).

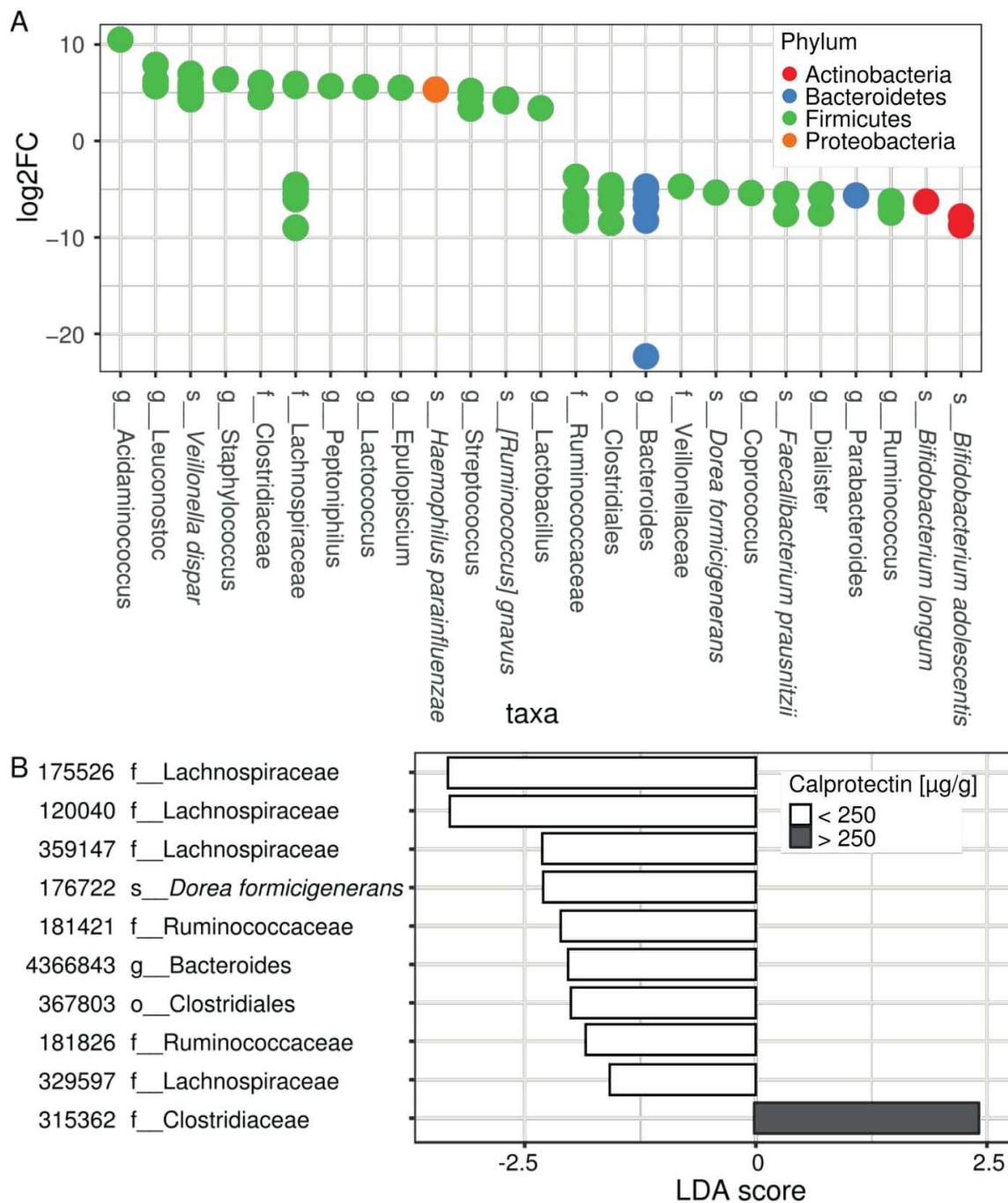


**Fig. 1: Microbiota composition in the CF cohort**

(A) Proportions of bacteria from the five most abundant phyla colored according to the legend. Calprotectin measurements per patient are shown in boxes below the barplot. The proportion of Firmicutes was significantly higher in microbiota profiles of children with intestinal inflammation (gray boxes). (B) Alpha diversity values for all patients ( $n = 20$ ) are shown as points and summarized as boxplots for each group. Both Shannon and Simpson alpha indices measure microbial diversity within sample, and they were not significantly different between children with and without intestinal inflammation (Wilcoxon-Mann-Whitney test). (C) Beta diversity (NMDS), which assesses differences in microbial composition between samples using a NMDS ordination method with Bray-Curtis distance metric, showed a partial separation of samples of patients with intestinal inflammation

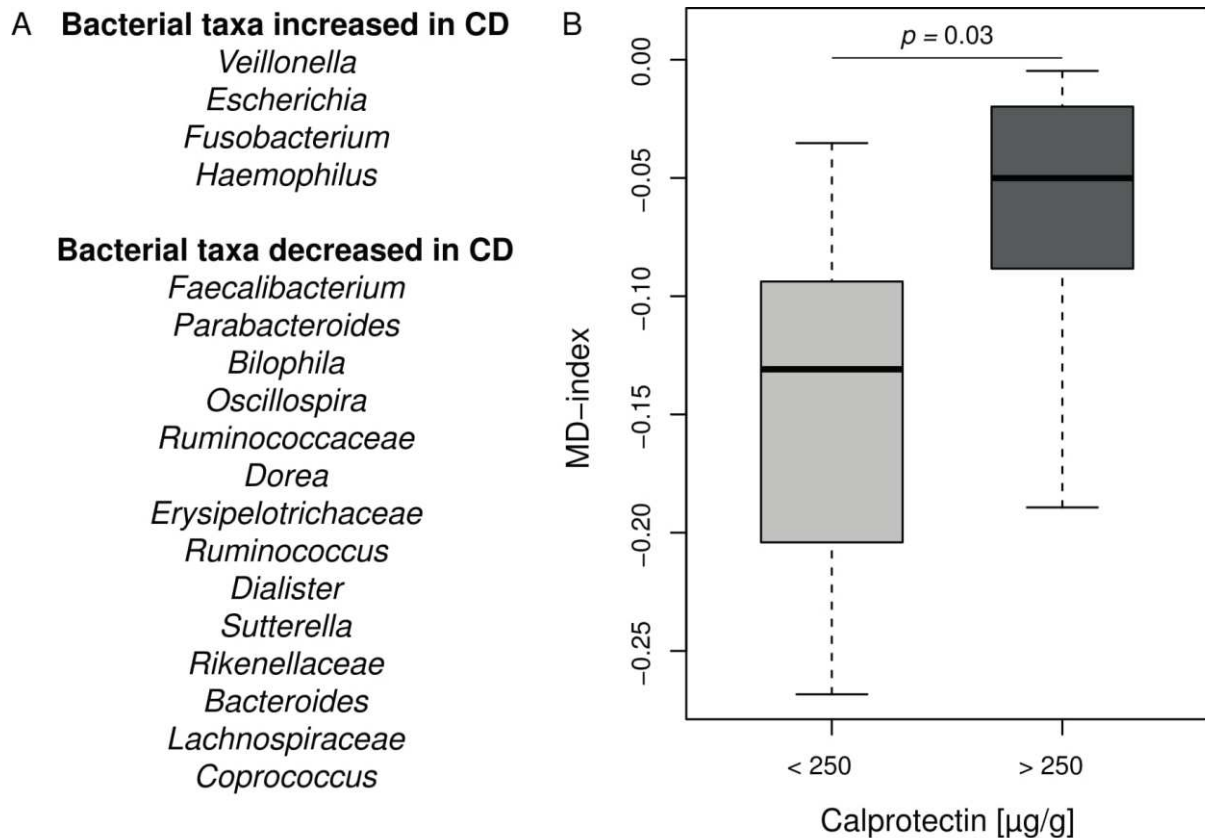
### 2.3.3 CF intestinal inflammation and microbiota exhibit similarities with IBD

In order to analyze deeper the CF intestinal microbiota changes in our cohort, we applied the MD-index, recently designed and validated in CD (Gevers et al., 2014). This index is based on a ratio between given bacterial taxa known to be increased or decreased in CD listed in **Fig 3A**. The MD-index was significantly higher in the CF children with intestinal inflammation compared to the group without inflammation ( $p = 0.03$ ) (**Fig. 3B; Table S4**). It was not correlated to age, %BMI or %FEV<sub>1</sub> in our cohort.



**Fig. 2: The composition of the microbiota differs according to the inflammation status of CF patients.**

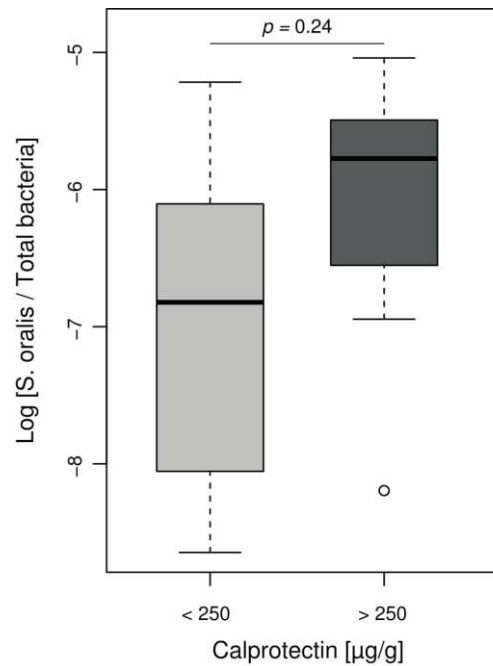
(A) Differential abundance analysis (DESeq) assessing OTU significantly changed in the microbiome of patients with intestinal inflammation, compared with patient without intestinal inflammation. Each circle represents one of 80 significant OTUs colored by a phylum according to the legend. OTUs are collapsed to 25 taxa represented on x axis and ordered by decreasing log of fold change. For full results see **Table S2**. (B) LefSe analysis showing OTUs distinguishing patients without and with intestinal inflammation (p-value < 0.01) and confirming DESeq2 results. For full results see **Table S3**.



**Fig. 3: MD-index distribution in CF cohort according to the intestinal inflammation status.**

(A) Bacterial taxa contributing to the MD-index according to (Gevers et al., 2014). (B) Boxplot of MD-index values for patients separated into groups according to calprotectin level. Patients with CF intestinal inflammation have a significant higher MD-index (Wilcoxon-Mann-Whitney test,  $p = 0.03$ ). For full results see **Table S4**.

However, *Streptococcus* genus, increased in our inflammatory patient group, is not usually associated with IBD and is not included in the MD-index. Given the role of *Streptococcus mitis* group in CF lung disease evolution (Maeda et al., 2011; Kramná et al., 2018) and difficulties in distinguishing this group from other *Streptococci* by NGS, we assessed the presence of mitis group species by using ddPCR that targeted specifically *Streptococcus oralis*. We observed a non-significant increase log ratios of *S. oralis* per total bacteria in children with intestinal inflammation, compared to children with low calprotectin levels (ratio median -5.8 and -6.8, respectively,  $p = 0.24$ ) (**Figure 4**).



**Fig. 4: Relative abundance of *S. oralis* assessed by ddPCR according to the inflammation status of CF patients.**

Boxplot of values representing relative proportion of *S. oralis* in patients microbiomes, separated into groups according to calprotectin level. Among *Streptococcus* found in CF children, there was a notable proportion of *S. oralis* but without significant difference between children with or without intestinal inflammation (Wilcoxon-Mann-Whitney test,  $p = 0.24$ ).

#### 2.3.4 Intestinal inflammation at the inclusion is associated with increased antibiotic use over the next two years

We compared the clinical evolution at 2 years between children without and with intestinal inflammation. While intestinal inflammation was not predictive of evolution of %FEV<sub>1</sub> or %BMI at two years (**Table 1**), children with intestinal inflammation at the inclusion had more antibiotic treatments over the next two years, all routes of administration combined ( $p = 0.02$ ). Surprisingly, this discrepancy appears to be more related to inhaled antibiotic courses ( $p=0.02$ ) than to intravenous ( $p=0.06$ ) or oral ( $p>0.05$ ) antibiotic therapies (**Table 1**).

## 2.4 DISCUSSION

Intestinal microbiota disturbances and intestinal inflammation are now widely accepted as an integral part of CF. With the increased life expectancy of patients, the management of these digestive disorders is becoming a topical subject, even if the corresponding physiological mechanisms are not yet well understood. In fact, links between intestinal microbiota and inflammation in CF have been suggested directly or indirectly by a limited number of studies (Garg and Ooi, 2017). In one of the few CF studies analyzing gut microbiota by NGS according to inflammation, intestinal inflammation was associated with an increase of *E. coli* abundance (Hoffman et al., 2014). In another study, gastrointestinal mucosal lesions recorded by capsule endoscopy was positively correlated with Firmicutes and negatively correlated with Bacteroidetes (Flass et al., 2015). Indirectly, probiotic intake or antibiotic courses in CF patients were able to decrease intestinal inflammation (Bruzzese et al., 2004; Schnapp et al., 2019).

In order to refine the relationships between intestinal microbiota composition and inflammation in the CF, we compared intestinal microbiota profiles from young CF patients, according to their intestinal inflammatory status evaluated by fecal calprotectin. Despite the limited number of children included (n=20) and their young age (mean of age at  $8.0 \pm 3.0$  y.o. in **Table 1**), we identified a notable proportion of children (35%) with significant intestinal inflammation and microbiota disturbances (**Fig. 1, Fig. 2**). In this group, fecal calprotectin levels ranged from 300 to 1800  $\mu\text{g/g}$ , rates comparable to those seen in IBD (Lin et al., 2014). We observed increased abundances of *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. and *Veillonella dispar*, along with decreased abundances of *Bacteroides* spp., *Ruminococcus* spp., *Coprococcus* spp., *Dialister* spp., *Parabacteroides* spp., *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii* in children with fecal calprotectin higher than 250  $\mu\text{g/g}$  (**Fig. 3**). We did not find significant increased *E. coli* abundances, as previously reported in a cohort of younger CF children (median age at 10 months) (Hoffman et al., 2014). Our results were confirmed using LEfSe (**Table S3**). On the whole, these microbiota disturbances exhibited numerous similarities with the well described IBD microbiota (Sokol et al., 2008, 2017; Gevers et al., 2014). Interestingly, the MD-index, which is positively correlated with the clinical disease activity of CD (Gevers et al., 2014), was significantly higher in our group of CF children with high fecal calprotectin levels.

Decrease of *B. adolescentis* and *F. prausnitzii* in group of children with intestinal inflammation confirm the results recently published in CF (Bruzzese et al., 2014) and are congruent with data exploring *in vitro* anti-inflammatory proprieties of bacteria. *Bifidobacterium adolescentis* inhibits inflammatory responses in intestinal epithelial cells, by

limiting the lipopolysaccharide-induced inflammatory response and the TNF- $\alpha$  production (Khokhlova et al., 2012). Furthermore, the intestinal inflammation in our cohort was associated with an under-representation of *F. prausnitzii* (**Fig. 2B**), a strain well investigated in IBD for its anti-inflammatory properties and considered as a viable marker of health (Sokol et al., 2008).

Taken together, these results raise the question of the causal relationship between microbiota composition and inflammation: does a decrease of anti-inflammatory bacteria lead to inflammation or does it result from this inflammation as a basic consequence of anti-inflammatory bacteria decrease? Answer to this question is still a matter of debate in CF as well as IBD (Ni et al., 2017). Keeping in mind that the causal relation is probably bidirectional, few published data suggest the existence of a pro-inflammatory microbiota. Experiments using a murine model of colitis showed that disease can be transmitted from a genetically modified mouse to a wild mouse by a microbiota transfer (Garrett et al., 2007). In CF, oral antibiotic or probiotic exposures were shown to reduce intestinal inflammation (Bruzzese et al., 2004; De Lisle, 2007). A higher MD-index in our inflammatory subpopulation lets us suggest that these patients may have a more pronounced “pro-inflammatory” microbiota (**Fig. 2A, Fig. 3B**). This subpopulation exhibited also significantly more Firmicutes and had previously received more IV antibiotics, which is a known factor leading to an increase of Firmicutes (**Table 1, Fig. 1A**) (Burke et al., 2017). Moreover, the young age of our cohort together with the microbiota disturbances observed in CF from the first weeks of life (Madan et al., 2012; Nielsen et al., 2016) seem to indicate that CF gut microbiota changes is inherent to the disease rather than a basic consequence of inflammation and/or antibiotic use.

More recently, the human microbiome (which includes the gut microbiome but also the other body sites) has emerged as a complex interconnected entity leading to the popularization of the concepts of gut-brain and gut-lung axes (Bienenstock et al., 2015; Enaud et al., 2018). The gut-lung axis is of major interest in CF, as patients colonize their digestive tract with microorganisms from oral or respiratory tracts by sputum swallowing (Al-Momani et al., 2016). Bacteria found in gastric fluid were correlated with CF sputum microbiota composition, especially regarding *Streptococcus* abundance (Al-Momani et al., 2016). *Streptococcus* isolates are naturally present in the digestive tract (Nielsen et al., 2016) but their proportion seems to be higher in CF patients (Nielsen et al., 2016). We identified a significant over-representation of *Streptococcus* spp. in CF children with intestinal inflammation (**Fig. 3A**), with a notable proportion of *S. oralis* (**Fig. 4**). *Streptococcus* strains may contribute to the inflammatory process by synergistic interactions with other commensal microorganisms such as *Candida albicans* or *Veillonella* spp., both being increased in IBD flares (van den Bogert et al., 2013; Xu

et al., 2014b; Sokol et al., 2017). Overall, these data support the relationship between respiratory and digestive microbiomes.

This CF "gut lung axis" is poorly described. It appears to be bidirectional with intestinal microbiota changes predicting pulmonary colonization of *Pseudomonas aeruginosa* (Madan et al., 2012) and oral probiotics decreasing pulmonary exacerbations (Anderson et al., 2016). Interestingly, we found that intestinal inflammation at the inclusion was associated with an increase in short-term antibiotic cures, especially with an increase over the next 2 years in inhaled antibiotic courses (**Table 1**). However, in the absence of repeated fecal calprotectin measurement during these two years, we cannot affirm that non-inflammatory patients at baseline remain without intestinal inflammation during this period.

Short-term intestinal inflammation may affect the nutritional status of CF patients, as demonstrated by significant correlations between fecal calprotectin level and both weight z-scores and height z-scores of CF patients (Dhaliwal et al., 2015). As previously recorded (Ellemunter et al., 2017), we did not find significant correlation between intestinal inflammation and BMI. BMI evolution is recognized as multifactorial and is now part of the nutritional management, fully integrated into CF disease treatment (Ellemunter et al., 2017).

Long-term inflammation could impact morbidity and mortality, especially regarding the increased risk of small intestine and colon cancers in CF patients compared with the general population (Maisonneuve et al., 2013). The pathogenesis of digestive cancers in CF remains unclear. It has been shown that chronic intestinal inflammation is associated with this malignancy risk (Arthur et al., 2012). Furthermore in IBD, risk factor for colorectal cancer is correlated with the intensity and duration of the inflammation (Munkholm, 2003). CF inflammation is present even at an early age, as well demonstrated in our pediatric cohort than in previous studies (Garg et al., 2017a, 2018), which may be a key factor in developing digestive malignancy later on.

Microbiota composition has also been associated with digestive cancer, due to a decrease in bacteria protecting against cancer and changes in the corresponding metabolite production, such as a decrease in butyrate production, also observed in CF patients with intestinal inflammation (Arthur et al., 2012; Wang et al., 2012; Manor et al., 2016). We and others (Bruzzese et al., 2014; Madan et al., 2012; del Campo et al., 2014; Duytschaever et al., 2011; Manor et al., 2016) showed that *Bacteroides* - known as protective bacteria against malignancy (Wang et al., 2012) - are decreased in CF.



## 2.5 CONCLUSIONS

To conclude, with more CF patients surviving into advanced adulthood we need to improve our understanding and management of this systemic disease, including the chronic intestinal inflammation. Few studies including ours reinforce the relation between intestinal inflammation and microbiota disturbance. Further *in vitro* and *in vivo* studies are warranted given the limited understanding of the CF physiopathology. Even well-documented probiotic strains, such as *Bifidobacterium adolescentis* identified in this study to be significantly decreased – that inhibits inflammatory responses in intestinal epithelial cells (Khokhlova et al., 2012) – will require further clinical trials to decipher their potential ability to reduce the short-term intestinal inflammation and the long-term cancer risk.

### Supplementary Materials at:

<https://www.mdpi.com/2077-0383/8/5/645#supplementary>

**Table S1:** Clinical information for 20 CF patients

**Table S2:** Significant differentially present taxa between patients with low and high calprotectin levels.

**Table S3:** Results of LEfSe for patients with low and high calprotectin levels.

**Table S4:** Index of dysbiosis (MD-index) per patient.

**Supplemental information:** Additional informations.

### Acknowledgments

We thank Erwan Guichoux from the Genome Transcriptome Facility of Bordeaux, Jessica Latour, Sandrine Lefevre and Caroline Bruneaux from the team of Center for Resources and Skills in Cystic Fibrosis of Bordeaux and Fatima M’Zali from Aquitaine microbiology for their fruitful help and/or discussion. This study was funded by Association Aquitaine pour la Recherche Clinique en Rhumatologie and Biocodex Microbiota Foundation’s grant. This study was funded by *Association Aquitaine pour la Recherche Clinique en Rhumatologie* and Biocodex Microbiota Foundation’s award 2017. Katarzyna Hooks was supported by the French government via the “Investments for the Future” Programme, IdEx Bordeaux (ANR-10-IDEX-03-02). The funding agency had no role in study design, data collection or interpretation of the results or submission of the work for publication. The authors declare that they have no competing interests.

## **Author Contributions**

Conceptualization, Raphaël Enaud, Katarzyna B. Hooks, Patrick Berger, Thierry Lamireau, Laurence Delhaes and Thierry Schaefferbeke; Data curation, Aurélien Barre, Christophe Hubert, Marie Massot and Macha Nikolski; Formal analysis, Raphaël Enaud, Katarzyna B. Hooks, Aurélien Barre, Thomas Barnetche, Macha Nikolski and Laurence Delhaes; Funding acquisition, Raphaël Enaud and Thierry Schaefferbeke; Investigation, Raphaël Enaud, Thomas Barnetche, Christophe Hubert, Marie Massot, Haude Clouzeau, Stéphanie Bui and Philippe Lehours; Methodology, Raphaël Enaud, Katarzyna B. Hooks, Aurélien Barre, Thomas Barnetche, Marie Massot, Thomas Bazin, Michael Fayon, Patrick Berger, Macha Nikolski, Laurence Delhaes and Thierry Schaefferbeke; Project administration, Michael Fayon, Patrick Berger, Philippe Lehours, Thierry Lamireau, Laurence Delhaes and Thierry Schaefferbeke; Supervision, Michael Fayon, Patrick Berger, Thierry Lamireau, Laurence Delhaes and Thierry Schaefferbeke; Validation, Katarzyna B. Hooks, Christophe Hubert, Marie Massot, Thomas Bazin, Cécile Bébéar and Thierry Schaefferbeke; Visualization, Raphaël Enaud, Katarzyna B. Hooks and Cécile Bébéar; Writing – original draft, Raphaël Enaud, Katarzyna B. Hooks and Laurence Delhaes; Writing – review & editing, Marie Massot, Thomas Bazin, Haude Clouzeau, Stéphanie Bui, Michael Fayon, Patrick Berger, Philippe Lehours, Cécile Bébéar, Macha Nikolski, Thierry Lamireau and Thierry Schaefferbeke. Drs Enaud and Hooks contributed equally to the manuscript. All authors approved the final manuscript as submitted and agree to be accountable for all aspects of the work.

## **Potential conflict of Interest**

The authors have no conflicts of interest relevant to this article to disclose.



### **3 ROLE DU MICROBIOTE DANS LA REPONSE INFLAMMATOIRE EPITHELIALE DIGESTIVE DANS LA MUCOVISCIDOSE**

---

Nous avons montré précédemment que l'inflammation intestinale dans la mucoviscidose était associée à une dysbiose intestinale. Ces résultats renforcent l'hypothèse qu'il existe une relation entre l'inflammation intestinale et la perturbation du microbiote, sans pour autant établir un lien de causalité.

Notre hypothèse de travail ici est qu'il existe un microbiote « pro- inflammatoire » qui participe à la physiopathologie de l'inflammation intestinale associée à la mucoviscidose. Nous avons donc choisi d'étudier *in vitro* la réponse inflammatoire de cellules épithéliales digestives (Cellules CACO<sub>2</sub>) stimulées par différents surnageants de microbiote fécal d'enfants atteints de mucoviscidose présentant ou non une inflammation intestinale. Ces challenges *in vitro* découlaient du travail précédent : les filtrats des microbiotes inflammatoires ou non étant préparés à partir des échantillons issus du travail précédent (Cf. Matériel et méthode page 72). Par ailleurs, ce travail représentait le sujet de Master 2 de Candice Tétard (année 2019-2020).

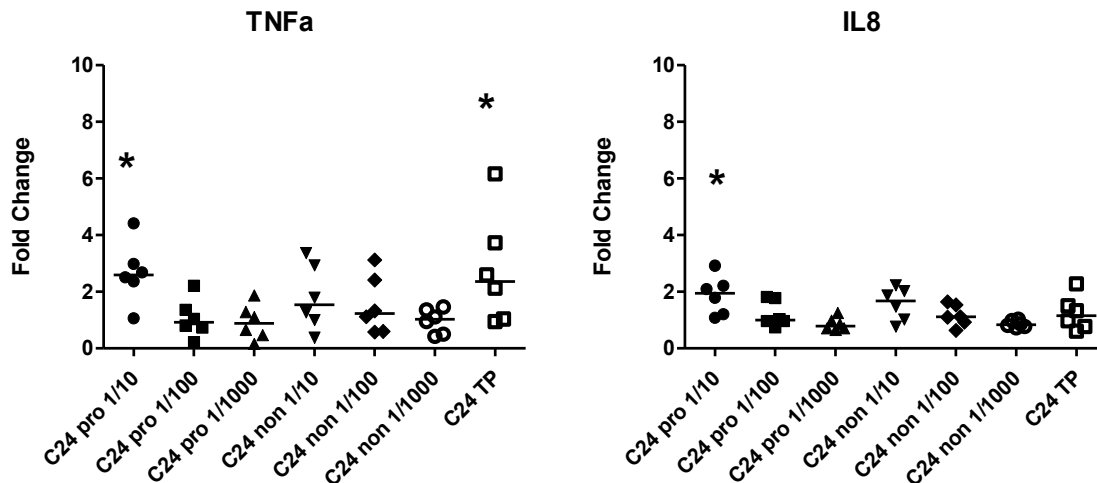
#### **3.1 STIMULATION DES CELLULES CACO<sub>2</sub> AVEC LES SURNAGEANTS DE SELLES**

##### **3.1.1 Stimulation pendant 1h et 6h**

Il n'y a pas eu de modification de l'expression des gènes étudiés après une stimulation pendant 1h et 6h (données non montrées), ce qui est cohérent avec les données de la littérature (Ponce De Leon Rodriguez, 2019).

##### **3.1.2 Stimulation pendant 24h**

L'expression des gènes des cytokines TNF $\alpha$  et IL-8 était significativement augmentée après 24 heures de stimulation par les surnageants de selles « pro » - inflammatoires, comparée aux stimulations par des surnageants de selles « non » - inflammatoires » (Figure 1). Un effet de dilution était observé mais de manière non significative. L'expression des autres gènes n'était pas significativement modifiée.



**Figure 1 : Expression de TNF- $\alpha$  et IL-8 par les cellules CACO2 après 24 heures de stimulation**

Résultats exprimés en fold change pour l'expression des gènes de l'inflammation, analysée par qPCR, après stimulation pendant 24h des CACO2 avec les surnageants de selles de patient avec inflammation (« pro ») et sans inflammation (« non »). Les challenges ont été réalisés avec les pools dilués au 1/10, 1/100 et 1/1000 dans du DMEM. TP : Témoin positif (LPS et IFN- $\gamma$ ). \* : Fold Change significatif > 2 ou < à 0,5.

### 3.2 STIMULATION DE COCULTURES CACO2 - THP-1 AVEC LES SURNAGEANTS DE SELLES PENDANT 24H

#### 3.2.1 Au niveau des cellules CACO2

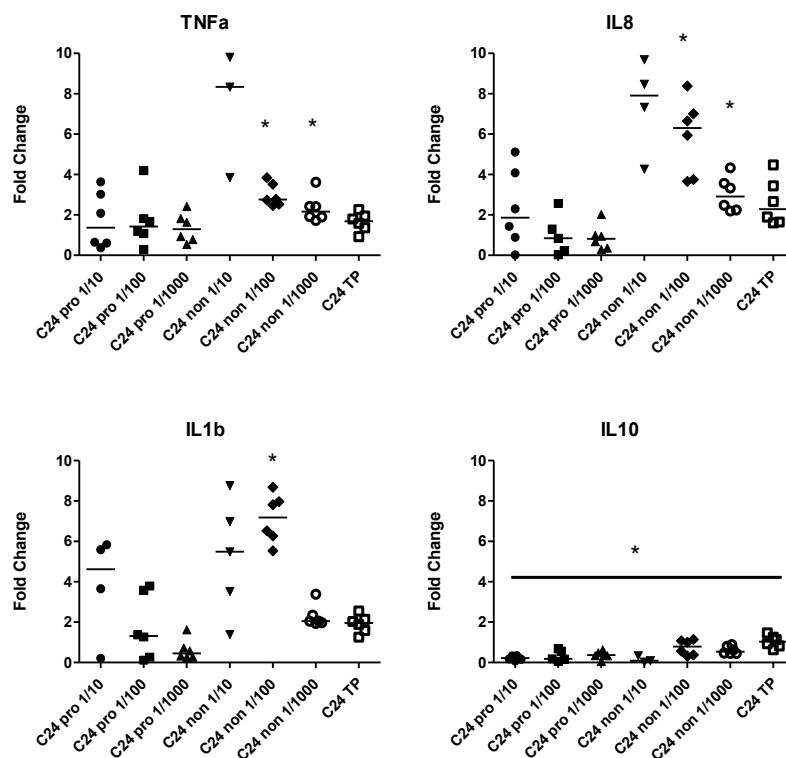
Il n'existait pas de différence significative dans l'expression des gènes hormis une légère diminution significative de l'expression d'INOS et COX-2 après stimulation avec le pool « pro » - inflammatoire dilué au 1/10

#### 3.2.2 Au niveau des cellules THP-1

L'expression des gènes des cytokines pro- inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-8, IL1- $\beta$ ) était significativement augmentée pour les stimulations avec le filtrat poolé « non » - inflammatoire ; ce avec un effet dose. Cet effet se retrouve aussi (mais de manière moins importante) pour l'IL1- $\beta$  en présence du filtrat poolé « pro » - inflammatoire (Figure 2).

L'expression de l'IL-10 cytokine anti-inflammatoire est significativement diminuée pour l'ensemble des conditions de stimulation (Figure 2).

Il n'existait pas de différence significative dans l'expression des autres gènes étudiés.



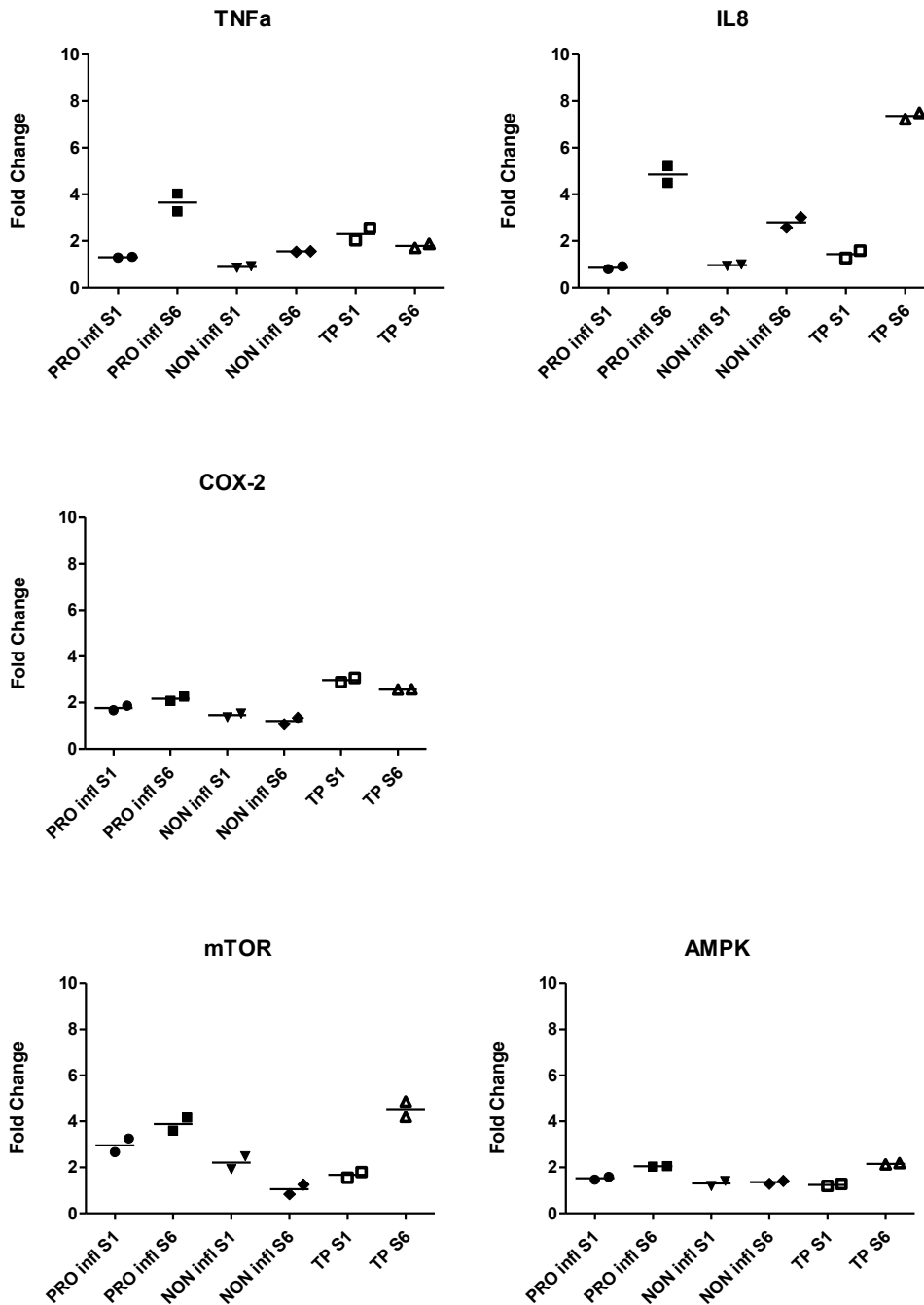
**Figure 2 : Expression de TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-1b et IL-10 par les cellules THP-1 après 24 heures de stimulation, en condition de coculture avec les cellules CACO2.**

Résultats exprimés en fold change pour l'expression des gènes de l'inflammation, analysés par qPCR, après stimulation des THP-1 différenciées (en co-culture avec les cellules CACO2) avec les surnageants de selles de patient avec inflammation (« pro ») et sans inflammation (« non ») pendant 24h. Les challenges ont été réalisés avec les pools dilués au 1/10<sup>e</sup>, 1/100<sup>e</sup> et 1/1000<sup>e</sup>. TP : Témoin positif (LPS et IFN- $\gamma$ ). \* : Fold Change > 2 ou < 0,5.

### 3.3 STIMULATION CHRONIQUE DES CELLULES CACO2

En comparant l'expression des gènes entre la première et la dernière exposition durant une exposition chronique, il semblerait que la stimulation chronique de 6 semaines avec les surnageants des selles de patients avec inflammation (filtrat « pro » - inflammatoire) suffise à entraîner une expression plus importante des gènes de l'inflammation (TNF $\alpha$ , IL-8 et COX2), et une inhibition du gène mTOR impliquée dans l'induction de l'autophagie (Figure 3).

En effet, après 6 semaines de stimulation, nous avons observé une expression de mTOR augmentée (alors que son rôle est d'inhiber l'autophagie) et une expression d'AMPK diminuée (alors que son activation induit l'autophagie). Ces résultats seront à confirmer par d'autres expérimentations.

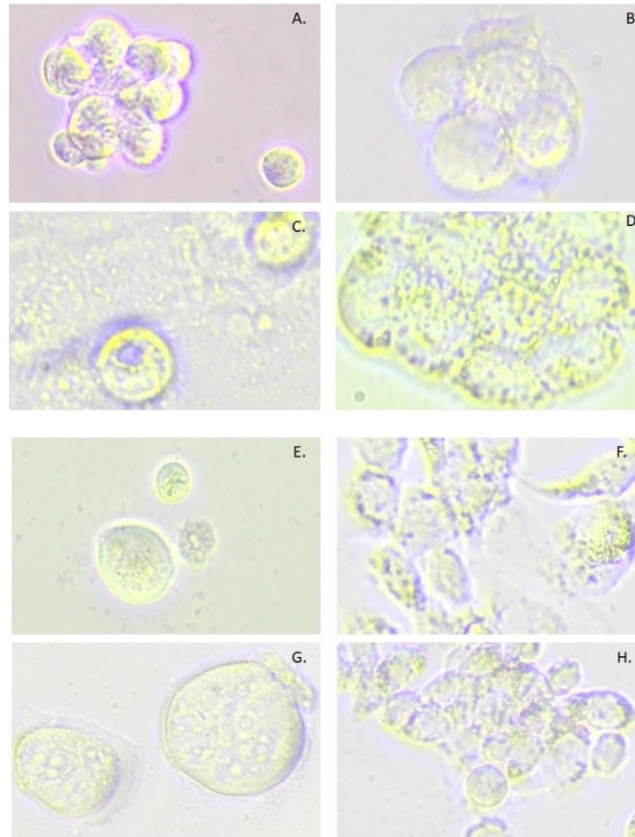


**Figure 3 : Comparaison de l'expression des gènes de TNF- $\alpha$ , IL-8, COX2, mTOR et AMPK par les cellules CACO2 après 1 et 6 semaines de stimulation chronique**

Résultats exprimés en fold change pour l'expression des gènes de l'inflammation et de l'autophagie, analysés par qPCR, après stimulation chronique des CACO2 pendant 6 semaines avec des filtrats poolés de surnageants de selles de patient avec inflammation (« pro ») et sans inflammation (« non »). Les challenges ont été réalisés avec les pools dilués au 1/100<sup>e</sup>. TP : Témoin positif (LPS et IFN- $\gamma$ ).

### 3.4 VIABILITE CELLULAIRE

Des photographies ont été prises au microscope optique avant et après stimulation avec nos différentes conditions. Microscopiquement, il ne semblait pas y avoir de différences décelables, notamment il ne semblait pas y avoir d'induction de mort cellulaire (Figure 4).

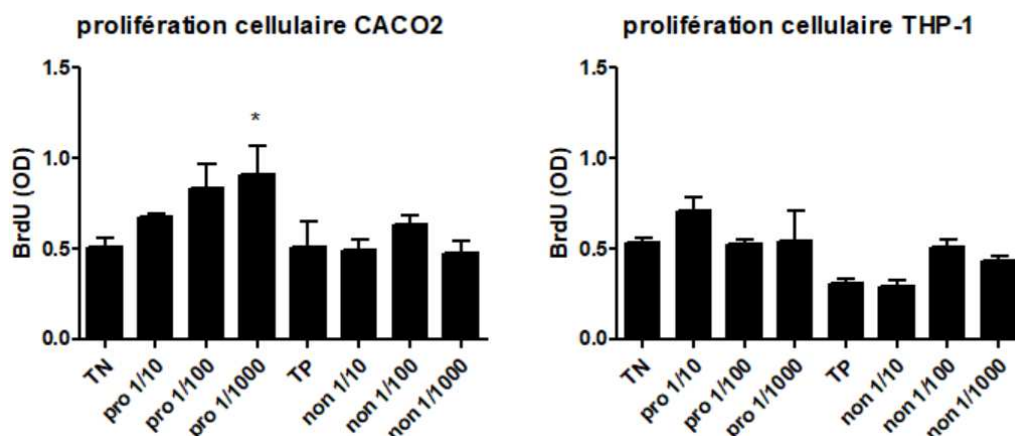


**Figure 4 : Photographies des cellules CACO2 et THP-1 prises au microscope grossissement x40 en contraste de phase, à différentes conditions de stimulation.**

(A) Cellules CACO2 à la mise en puits. (B) Cellules THP-1 à la mise en puits. (C) Cellules CACO2 à 24h. (D) Cellules THP-1 à 24h après adjonction de PMA. (E) Cellules CACO2 après 24h de stimulation avec le pool « pro » inflammatoire. (F) Cellules THP-1 différenciées après 24h de stimulation avec le pool « pro » inflammatoire. (G) Cellules CACO2 après 24h de stimulation avec le pool « non »-inflammatoire. (H) Cellules THP-1 différenciées après 24h de stimulation avec le pool « non »-inflammatoire.

Pour confirmer l'impression observée en microscopie, nous avons quantifié la croissance cellulaire par BrdU. Le protocole au BrdU ne montre pas de diminution significative en termes de synthèse d'ADN, confirmant indirectement une bonne viabilité des cellules. Il y a même une tendance (non significative, hormis pour les cellules CACO-2 qui ont une synthèse significativement augmentée après stimulation avec le filtrat poolé de selles « pro » inflammatoire dilué au 1/1000<sup>e</sup>) à l'augmentation de la prolifération pour les cellules CACO2 en comparaison avec les témoins négatifs (Figure 5).





**Figure 5 : Etude de la prolifération cellulaire**

Par méthode ELISA quantifiant l'incorporation de BrdU lors de la synthèse d'ADN, pour nos différentes lignées cellulaires, après stimulation avec nos conditions préalablement décrites (filtrats poolés de selles « pro »- inflammatoire et « non »- inflammatoire à différentes concentration). TP : Témoin positif (LPS et IFN- $\gamma$ ).

### 3.5 DISCUSSION DES RESULTATS

La dysbiose présente chez les patients atteints de mucoviscidose avec inflammation digestive commence maintenant à être décrite dans la littérature. Nous avons pu nous appuyer sur les précédents travaux du laboratoire (Enaud et al., 2019) pour sélectionner des filtrats de surnageants de selles de patients avec et sans inflammation digestive, et étudier *in vitro* l'effet de leurs métabolites (contact indirect) sur la réponse inflammatoire épithéliale.

Nous avons testé dans un premier temps les effets des filtrats de surnageants de selles sur un modèle cellulaire monocouche de CACO2. Après 24h de stimulation avec le pool « pro » - inflammatoire, l'expression génique de TNF- $\alpha$  et d'IL-8 (cytokines pro- inflammatoires) était augmentée. Mais ce modèle cellulaire présente certaines limites, dont un manque de reproductibilité expérimentale, comme précédemment décrit (Ponce De Leon Rodriguez, 2019), lié notamment à une différenciation de ces cellules dépendante du temps de culture et du nombre de passages. De plus, l'expression génique des différentes cytokines étudiées est connue pour être peu abondante, ce qui peut également expliquer les variabilités intra-conditions constatées (Ponce De Leon Rodriguez, 2019). Enfin, les cellules utilisées n'avaient pas une fonction CFTR altérée, qui peut se faire notamment avec la méthode *CRISPR/Cas9* (Antosca et al., 2019).

Pour se rapprocher de la situation observée *in vivo*, nous avons décidé d'y associer des cellules immunitaires (lignée cellulaire monocyttaire humaine THP-1). La mise en œuvre de

cette coculture n'a pas permis de mieux détecter l'expression géniques des marqueurs de l'inflammation au niveau des cellules CACO2. En revanche, pour les cellules THP-1 en coculture, l'expression génique était bien plus importante. De façon surprenante, des résultats opposés à ceux attendus ont été observés : les stimulations avec le filtrat des selles non-inflammatoires induisaient une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$ , IL-8, IL1- $\beta$  avec un effet des dilutions (effet dose) pour les cellules THP-1 coculture. Par ailleurs, une diminution de l'expression d'INOS et COX-2 (enzymes jouant un rôle dans l'inflammation) était observée pour les cellules CACO2 après stimulation avec le filtrat des selles « pro » - inflammatoire. Etonnamment l'expression du gène de l'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) était significativement diminuée pour l'ensemble des conditions de stimulation pour les THP-1 différenciés et indétectables pour les CACO2.

Du fait de leur manque de reproductibilité et de leur hétérogénéité, ces résultats sont difficilement interprétables, comme cela a déjà été décrit avec ces deux lignées cellulaires (Ponce De Leon Rodriguez, 2019). De plus notre modèle de coculture est incomplet car nous n'avons pas pu y introduire de cellules productrices de mucus. Enfin, il serait intéressant de compléter nos données d'expression génique par des dosages ELISA correspondant des différentes cytokines, enzymes et/ou protéines.

Nos résultats suggèrent cependant qu'un modèle de stimulation chronique des cellules CACO2 peut être une piste plus pertinente qu'une stimulation ponctuelle à 6h ou même 24h. Nos données préliminaires retrouvaient en effet une augmentation de l'expression des gènes pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-8, COX2) et une diminution des gènes impliqués dans l'apoptose après 6 semaines de stimulation avec les selles « pro » - inflammatoires. Si ces résultats préliminaires permettent de suggérer un lien physiopathologique entre dysbiose, inflammation et conséquence à long terme sur le surrisque de cancer intestinal dans la mucoviscidose, ils doivent être confirmés avec un nombre d'échantillons et d'expérimentations plus grand.



## 4 REDUCTION DE L'INFLAMMATION INTESTINALE SOUS LUMACAFITOR/IVACAFITOR CHEZ LES ADOLESCENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE

---

La morbi-mortalité de la mucoviscidose est essentiellement conditionnée par l'atteinte pulmonaire, mais d'autres organes peuvent être atteints, notamment le tube digestif. Une inflammation intestinale chronique est présente chez plus de la moitié des patients atteints de mucoviscidose ; hors aucun traitement n'est actuellement proposé à ces patients (Lisowska et al., 2010; Munck, 2014; Ellemunter et al., 2017; Garg et al., 2017a). En parallèle, aucune donnée n'est disponible sur l'effet du traitement par Lumacaftor/Ivacaftor sur l'inflammation digestive, or on peut supposer que la modulation de la protéine CFTR par Lumacaftor/Ivacaftor n'est pas restreinte au tractus respiratoire.

Nous avons donc étudié l'évolution de l'inflammation intestinale sous Lumacaftor/Ivacaftor chez les enfants atteints de mucoviscidose âgés de moins de 18 ans et suivis aux CRCM de Bordeaux et de Toulouse, ayant débuté le traitement entre Janvier 2016 et Juillet 2018. La mesure de calprotectine fécale a été réalisée au début du traitement par Lumacaftor/Ivacaftor et après au moins 3 mois de traitement.

Quinze patients ont été inclus dans l'étude, (âge médian ; 12 ans, IQR : 12 ; 14,5). A la mise sous traitement, la concentration médiane de calprotectine était de 713 µg/g (IQR : 148 ; 852) et 9 patients (60 %) avaient une concentration supérieure à 250 µg/g. Par rapport aux valeurs initiales, les concentrations de calprotectine fécale ont diminué de façon significative après au moins 3 mois de traitement par Lumacaftor/Ivacaftor (médiane (IQR) : 102 µg/g (69 ; 210),  $p=0,001$ ). Seuls quatre patients (27 %) ont conservé des taux de calprotectine supérieurs à 250 µg/g et deux patients (13 %) ont présenté une augmentation de la calprotectine après la mise sous Lumacaftor/Ivacaftor. Nous n'avons pas observé de différences significatives concernant l'évolution du VEMS ni des Z-scores du poids, de la taille et de l'IMC.

Cette étude pilote (publiée dans *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*) montre pour la première fois que l'inflammation intestinale associée à la mucoviscidose diminue sous Lumacaftor/Ivacaftor, et ouvre la voie à d'autres études avec des effectifs plus importants. En particulier, nous avons initié une étude (« Lum-Iva-Biota 2-11 ans », voir chapitre « Perspectives ») afin d'étudier l'évolution simultanée de l'inflammation intestinale, du microbiote fécal et des symptômes digestifs chez environ 150 enfants âgés de 2 à 11 ans et débutant un traitement par Lumacaftor/Ivacaftor (AMM accordé en 2019 pour cette tranche d'âges). Par ailleurs, les conséquences à long terme sur le risque de cancer intestinal d'un traitement par Lumacaftor/Ivacaftor restent encore à être déterminées.

# REDUCED INTESTINAL INFLAMMATION WITH LUMACAFITOR/IVACAFITOR IN ADOLESCENTS WITH CYSTIC FIBROSIS

Candice **Tétard**<sup>a</sup>, MD, Marie **Mittaine**<sup>b</sup>, MD, Stéphanie **Bui**<sup>a</sup>, MD, Fabien **Beaufils**<sup>a,c,d</sup>, MD, Pascale **Maumus**<sup>b</sup>, RN, Michael **Fayon**<sup>a,c,d</sup>, MD-PhD, Pierre-Regis **Burgel**<sup>e,f</sup>, MD-PhD, Thierry **Lamireau**<sup>a,d</sup>, MD-PhD, Laurence **Delhaes**<sup>a,c,d,g</sup>, MD-PhD, Emmanuel **Mas**<sup>b,h,i</sup>, MD-PhD, Raphaël **Enaud**<sup>a,c,d</sup>, MD\*

**Affiliations:** <sup>a</sup>CHU Bordeaux, CRCM Pédiatrique, CIC 1401, F-33000, Bordeaux, France; <sup>b</sup>CHU Toulouse, CRCM Pédiatrique, F-31300, Toulouse, France; <sup>c</sup>Univ. Bordeaux, INSERM, CRCTB, U1045, CHU Bordeaux, F-33000, Bordeaux, France; <sup>d</sup>FHU ACRONIM, F-33000, Bordeaux, France; <sup>e</sup>Respiratory Medicine and National Reference Cystic Fibrosis Reference Center; Cochin Hospital; Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), F-75014, Paris, France; <sup>f</sup>ERN-Lung CF network; <sup>g</sup>CHU Bordeaux, Service de Parasitologie-Mycologie, F-33000, Bordeaux, France; <sup>h</sup>Université de Toulouse, INSERM, INRA, ENVT, UPS, F-31000, Toulouse, France; <sup>i</sup>Unité de Gastroentérologie, Hépatologie, Nutrition, Diabétologie et Maladies Héritaires du Métabolisme, Hôpital des Enfants, CHU de Toulouse, F-31300, France

\*Correspondence: Dr Raphaël Enaud ([raphael.enaud@chu-bordeaux.fr](mailto:raphael.enaud@chu-bordeaux.fr))

## Abstract

A chronic intestinal inflammation may occur in patients with cystic fibrosis (CF), while no therapeutic management is proposed. While Lumacaftor/Ivacaftor is well-known to modulate the defective cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein in lungs, no data are available on the impact of this treatment on CF intestinal disorders. We therefore investigated the evolution of intestinal inflammation after initiation of Lumacaftor/Ivacaftor in CF adolescents (median of follow-up: 336 days (IQR: 278;435)). Median fecal calprotectin concentrations decreased significantly after Lumacaftor/Ivacaftor initiation (102 µg/g (IQR: 69;210)) compared to the baseline (713 µg/g (IQR:148;852), p=0.001). To our knowledge, this study showed for the first time that CF-related intestinal inflammation is improved by Lumacaftor/Ivacaftor treatment.

Available at <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002864>

## 4.1 INTRODUCTION

During the past decade, improvement in the management of people with cystic fibrosis (CF) has led to an ageing patient population. Although CF morbidity and mortality still mainly depend on respiratory function, impact of the disease on other organs currently represents new challenges.

It is now established that chronic intestinal inflammation may affect patients with CF, even in the absence of digestive symptoms (Werlin et al., 2010; Munck, 2014). Fecal calprotectin, a biomarker reflecting intestinal inflammation, is significantly higher in children with CF compared to healthy controls and has been correlated with the severity of the genetic disease, as well as with intestinal dysbiosis (Enaud et al., 2019; Parisi et al., 2017). Such chronic intestinal inflammation may have a short and long term impact on morbidity and mortality in patients with CF, with consequences on nutritional status, recognized to be a predictor of lung function deterioration and overall survival (Steinkamp and Wiedemann, 2002). Dhaliwal *et al.* showed that fecal calprotectin levels were inversely correlated with weight and height Z-scores in CF children (Dhaliwal et al., 2015). In addition, a CF murine model study showed that reduction of intestinal inflammation improved weight growth (Norkina et al., 2004).

Moreover, it has recently been shown that patients with CF are at major risk of small bowel and colon cancers, which occur more frequently (standardized incidence ratio, 18.9 [95% CI: 9.4-38.3] and 10.9 [95% CI: 8.4-14.11], respectively) and earlier (median age at diagnosis, 32 ± 9 years *versus* 68 ± 11.1 years, respectively) in people with CF compared with the general population (Yamada et al., 2018). The mechanisms responsible for the increased risk of gastrointestinal cancer in patient with CF are unclear. However, the loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene function in the intestinal tract in mice is associated with intestinal tumor formation, suggesting to consider the CFTR as a tumor suppressor gene (Than et al., 2016). CF-associated intestinal dysbiosis could also be linked to the development of gastrointestinal cancer. For example, *Fusobacterium* and *Escherichia coli*, which have been associated to colorectal cancer, are over-represented in intestinal microbiota of children with CF compared to healthy controls (Hoffman et al., 2014; Coffey et al., 2019). Moreover, chronic intestinal inflammation is an established risk factor for colorectal cancer, correlated with the intensity and duration of the inflammation in Inflammatory Bowel Diseases (IBD) (Munkholm, 2003; Arthur et al., 2012). Taken together, it can be assumed that chronic intestinal inflammation, occurring from childhood, may represent a risk factor for intestinal malignancy in CF (Ellemunter et al., 2017; Garg and Ooi, 2017; Enaud et al., 2019).

Consequently, the management of intestinal inflammation must be integrated into CF care. Currently, no specific anti-inflammatory treatments are proposed to patients with CF.

On the one hand, while some studies indicate efficacy regarding probiotics' ability to reduce intestinal inflammation, they are not recommended in CF because of inter-individual variability and a limited level of evidence (Coffey et al., 2020). On the other hand, the modulation of the defective CFTR protein may be another potential therapeutic option. Ivacaftor, a CFTR potentiator for CF patients with class III mutations such as G551D, is effective in reducing intestinal inflammation, but this treatment only involves 4% of CF patients (Ooi et al., 2018). The new Lumacaftor/Ivacaftor combination is indicated for F508del homozygous patients, representing 40% of the whole Caucasian CF population. While Lumacaftor/Ivacaftor is well-known to modulate the defective CFTR protein in lungs, limited data are available on the impact of this treatment on CF intestinal disorders. In the present study, we investigated intestinal inflammation following the initiation of Lumacaftor/Ivacaftor in CF adolescents, by monitoring fecal calprotectin concentrations.

## **4.2 MATERIALS AND METHODS**

**Patient cohort.** To conduct this pilot study, we retrospectively gathered data from the medical records of adolescents with CF between 12 and 18 years of age, followed at the Bordeaux or Toulouse University Hospitals who started Lumacaftor/Ivacaftor between January 2016 and July 2018 and who had fecal calprotectin assay at the time of treatment initiation or in the previous month. Fecal calprotectin assays prior to and more than 3 months after initiation of Lumacaftor/Ivacaftor were collected, along with concomitant clinical and laboratory data, such as weight, height, body mass index (BMI), sweat test, fecal elastase and lung function from each patient's medical records. Pancreatic insufficiency was defined as a fecal elastase <200 µg/g.

At the time of the patient follow-up period, Lumacaftor/Ivacaftor had already received marketing authorization in France and was prescribed to the patient as part of routine care. The retrospective data collected and analyzed were obtained exclusively from patients' medical records and no specific interventions were performed for this study. In this context, according to the law in force, the approval of an ethics committee was not required. Patients were informed about this study and gave their consent for the use of their data.

**Measurements of fecal calprotectin.** The fecal calprotectin assays used were performed at the time of treatment initiation or during the previous month for the baseline levels, and during an annual check-up for post-initiation levels. If more than one fecal calprotectin assay was available after 3 months of treatment, only the first assay was considered. No pulmonary exacerbation was reported in the medical records at the time of the different calprotectin measurements. In both participating study centers, concentrations of fecal calprotectin were

measured by a quantitative enzyme immunoassay (fCAL; Bühlmann, Schönenbuch, Switzerland), as per the manufacturer's instructions. The result was initially interpreted quantitatively. Then, we applied a cut-off of 250 µg/g, recently validated to predict endoscopic lesions in IBD, in order to identify patients with a significantly increased calprotectin concentration (Davidson and Lock, 2017; Enaud et al., 2019).

**Statistical analysis.** A nonparametric Wilcoxon matched-pairs test was used to compare quantitative variables before and after the onset of treatment. Correlations were calculated using the Spearman's method. Statistical analysis was performed using the R studio program (version 1.1.463 for Windows™) and plotted using GraphPad Prism (version 5.01 for Windows™); a p-value <0.05 was considered indicative of statistical significance.

## 4.3 RESULTS

### 4.3.1 Baseline patient characteristics

Of the 32 adolescents who initiated Lumacaftor/Ivacaftor during the study period, 15 of them had had a fecal calprotectin performed in the month prior to initiation of treatment and were included in the present study. Their characteristics at baseline are summarized in Table 1. All patients had exocrine pancreatic insufficiency. Lumacaftor/Ivacaftor treatment was initiated between 12 and 16 years of age (median: 12 years, interquartile range (IQR): 12;14.5). The median concentration of calprotectin was 713 µg/g (IQR: 148;852); 9 patients (60%) showed a concentration above 250 µg/g.

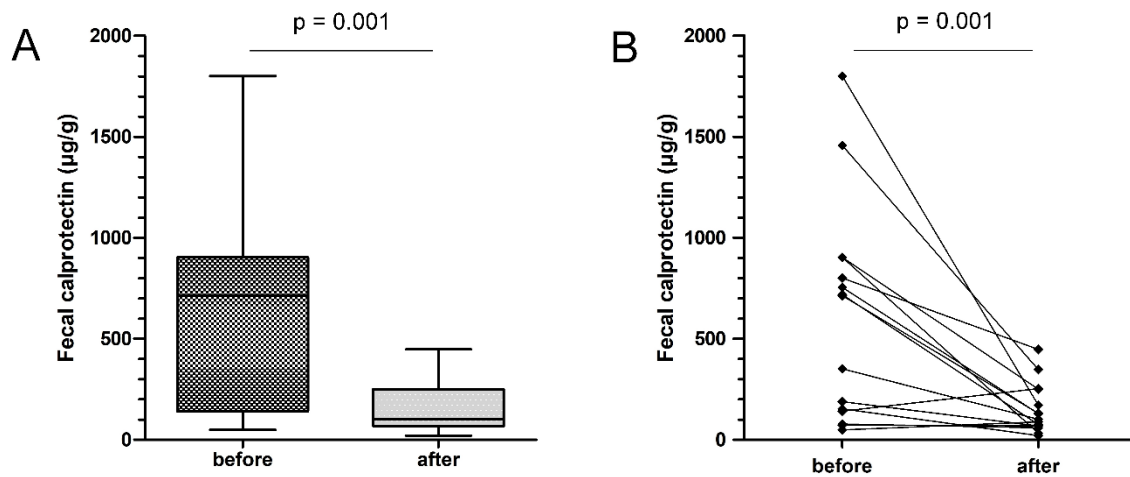
The median Z-score for weight, height and BMI were -1.3 (IQR: -1.5;-0.8), -1 (IQR: -1.4;-0.2) and -1 (IQR: -1.3;-0.2), respectively. The median percent of predicted Forced Expiratory Volume in 1 second (ppFEV<sub>1</sub>) was 89% (IQR: 71;99.5). At inclusion, these parameters were not correlated with calprotectin concentrations (Table 1).

### 4.3.2 Outcome after initiation of Lumacaftor/Ivacaftor

The reassessment visit was conducted at a median time of 336 days (IQR: 278;435) after treatment onset. The evolution of patients is summarized in Table 1. Compared to baseline, fecal calprotectin concentrations decreased significantly (seven-fold) after at least 3 months of treatment with Lumacaftor/Ivacaftor (median (IQR): 713 µg/g (148;852) *versus* 102 µg/g (69;210) respectively, p=0.001) (Figure 1A). However, calprotectin levels remained above 250 µg/g in four patients (27%) and increased in 2 patients (13%) (Figure 1B). We did not observe any significant difference in outcome regarding weight, height and BMI Z-score, or ppFEV<sub>1</sub>.



Changes in sweat test and calprotectin were not correlated. Noteworthy, all patients remained pancreatic insufficient (missing data for 2 patients) (Table 1).



**Figure 1. Overall (A) and per patient (B) evolution in fecal calprotectin concentrations after initiation of Lumacaftor/Ivacaftor.**

*The error bars on the boxplot represent the maximum and minimum values.*

#### 4.4 DISCUSSION

Intestinal inflammation is now widely accepted as an integral part of CF disease and its management is becoming a major topic. However, limited data are available on the impact of CFTR modulators on this digestive tract disorder. In this pilot study, we showed for the first time that modulation of CFTR function by Lumacaftor/Ivacaftor was associated with a significant decrease of intestinal inflammation, using fecal calprotectin concentrations as a surrogate marker. To note, this decrease of intestinal inflammation was not correlated with respiratory function changes, suggesting that CF-related digestive disorders may evolve independently from pulmonary disease, as previously reported (Ellemunter et al., 2017). Interestingly, fecal calprotectin levels increased on Lumacaftor/Ivacaftor in two patients. It is possible that some patients are unresponsive to treatment at the gastrointestinal level,

**Table 1. Summary of patient characteristics at baseline and during reassessment after Lumacaftor/Ivacaftor administration**

Patient	Site	Age	Sex	Baseline					Reassessment post-Lumacaftor/Ivacaftor							
				FC (µg/g)	Weight Z-score	Height Z-score	BMI Z-score	ppFEV <sub>1</sub>	Delay (days)	Δ FC (µg/g)	Δ Weight Z-score	Δ Height Z-score	Δ BMI Z-score	Δ ppFEV <sub>1</sub>	Δ SC (mmol/L)	EPF
1	T	12	M	154	-0.65	-0.18	-0.68	101	210	-133	-0.52	-0.38	-0.58	-15	N/A	PI
2	T	12	M	49	-0.09	0.33	-0.29	104	381	40	0.45	0.15	0.41	3	-5	PI
3	B	12	F	78	-1.18	0.21	-1.98	72	308	-18	0.65	-0.19	1.16	13	-7	PI
4	B	12	M	903	-1	-0.18	-1.28	71	916	-653	0.21	-0.19	0.26	3	N/A	N/A
5	B	12	M	142	-2.41	-2.05	-1.56	63	659	112	-0.71	-0.19	-1.11	-1	N/A	PI
6	T	12	M	352	-1.33	-1.85	-0.26	71	336	-250	0.22	0.14	0.06	12	-11	PI
7	B	12	M	903	0.04	0.29	0.02	89	294	-869	0.25	0.15	0.08	-3	N/A	N/A
8	T	12	M	73	-1.35	-0.86	-1.16	88	366	-3	0.33	0.3	0.17	-5	-27	PI
9	T	12	F	189	-1.57	-1.34	-1.24	107	201	-121	0.62	0.36	0.6	7	N/A	PI
10	B	13	M	1800	-1.47	-1.27	-1.02	70	756	-1629	0.67	0.38	0.46	23	-2	PI
11	T	14	F	754	-0.16	-0.98	0.28	109	490	-624	-0.61	-0.35	-0.35	3	-17	PI
12	T	15	M	713	-0.87	-0.99	-0.53	97	103	-582	0.56	0.25	0.53	-12	-16	PI
13	T	15	M	1457	-1.54	-1.49	-0.98	90	368	-1110	-0.12	0.02	0.31	14	-15	PI
14	B	15	F	719	-1.51	-0.91	1.22	65	267	-644	0.01	0.13	-2.4	7	N/A	PI
15	B	16	M	801	-1.94	-1.68	-1.35	98	290	-352	0.01	0.15	0	-16	-17	PI
<b>Median</b>		<b>12</b>		<b>713</b>	<b>-1,3</b>	<b>-1</b>	<b>-0,1</b>	<b>89</b>	<b>336</b>	<b>-352</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>3</b>	<b>-15</b>	
<b>(IQR)</b>		<b>(12;14,5)</b>		<b>(148;852)</b>	<b>(-1,5;-0,8)</b>	<b>(-1,4;-0,2)</b>	<b>(-1,3;-0,3)</b>	<b>(71;99,5)</b>	<b>(279;436)</b>	<b>(-649;-70)</b>	<b>(-0,1;0,5)</b>	<b>(-0,2;0,2)</b>	<b>(-0,2;0,4)</b>	<b>(-4;9,5)</b>	<b>(-17;-7)</b>	

Abbreviations: B = Bordeaux; BMI = body mass index; EPF = exocrine pancreatic function; F = females; FC = fecal calprotectin; M = males; N/A = not available; PI = pancreatic insufficient; SC = sweat chloride test; T = Toulouse. Δ = evolution following initiation of Lumacaftor/Ivacaftor; ppFEV<sub>1</sub> = percent predicted forced expiratory volume in 1 second.

suggesting an inter-individual variability in the treatment response, as it has been reported for pulmonary function (Burgel et al., 2020). Intercurrent factors, such as post-antibiotic dysbiosis, may also occur and contribute to intestinal inflammation. Studies are needed to better characterize and understand persistent intestinal inflammation on Lumacaftor/Ivacaftor in these patients.

Probably due to a limited number of patients in this study, ppFEV<sub>1</sub> as well as nutritional and anthropometric measurements were not significantly improved by Lumacaftor/Ivacaftor. Moreover, we were unable to identify correlations between intestinal inflammation and nutritional status at baseline and at follow-up, even if it has been described in the literature (Dhaliwal et al., 2015). It should be reminded that nutritional status of patients in CF is multifactorial and an integral part of the CF care, which probably did not enable us to observe a link between the evolution of intestinal inflammation and nutritional status.

This pilot study has several limitations. Intestinal inflammation has been assessed by fecal calprotectin with a cut-off of 250 µg/g. It was reported that calprotectin levels can vary according to the immunoassay used, limiting comparability between studies (Labaere et al., 2014). Thus, the same method was used for all dosages in our study, which allows for better inter- and intra-individual comparability. Furthermore, the findings of this study need to be confirmed using a larger sample size. The evolution of fecal calprotectin over time in CF adolescents has been poorly studied. Ellemunter *et al.* conducted a longitudinal assessment of fecal calprotectin concentrations in CF patients over a period of up to 12 years and found stable concentrations between 10 and 20 years (Ellemunter et al., 2017). A control group could be used to better discern the part of treatment in the evolution of intestinal inflammation. However, Lumacaftor/Ivacaftor has marketing authorization for F508del homozygous patients older than 12 years of age and it is therefore impossible to match the control group on both age and mutations. Future studies should also investigate the evolution of digestive symptoms on Lumacaftor/Ivacaftor treatment.

The association between gut microbiota composition and intestinal inflammation has already been mentioned in the literature (Hoffman et al., 2014; Enaud et al., 2019; Ooi et al., 2018). Published studies suggest the link between inflammation, dysbiosis and cancer risk in CF alimentary tract disorders (Garg and Ooi, 2017). Larger scale longitudinal studies are warranted to follow the simultaneous evolution of microbiota and inflammation when Lumacaftor/Ivacaftor is administered to CF patients. In addition, *in vitro* and *in vivo* studies will be required to decipher the pathophysiological role of Lumacaftor/Ivacaftor on the digestive mucosa. In the long term, registry analysis will be valuable in fully documenting the impact of protein therapies on CF digestive cancer risk.

In conclusion, reduced intestinal inflammation was seen with Lumacaftor/Ivacaftor treatment in a group of adolescents with CF. The short- and long-term consequences of such a decrease in intestinal inflammation have yet to be determined, especially regarding the risk of bowel malignancy in CF.

**Source of funding:** This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. Raphaël Enaud received a PhD grant from the University Hospital of Bordeaux for his research work.

**Conflicts of interest:** SB, FB, MF, RE conduct clinical trials with Vertex pharmacological agents, on behalf of the European Cystic Fibrosis Society – Clinical Trials Network (ECFS-CTN) and within the scope of ECFS-CTN activities. Laurence Delhaes received research grant from Vertex Pharmaceuticals to perform Lum-Iva-Biota study (this study is unrelated to the current manuscript). Vertex Pharmaceuticals had no involvement in the design of the present study and collection, analysis, and interpretation of data as well as in writing the manuscript. The remaining authors have no conflicts of interest relevant to this article to disclose.

**Author contributions:** C. Tétard was involved in designing the study, data acquisition and analysis, and writing the manuscript. M. Mittaine, S. Bui, P. Maumus, M. Fayon and T. Lamireau were involved in patient inclusion, data acquisition and critical revision of the manuscript. F. Beaufils and L. Delhaes were involved in statistical analysis, data interpretation and in critical revision of the manuscript. PR. Burgel was involved in data acquisition, data handling and critical revision of the manuscript. R. Enaud and E. Mas were involved in designing the study, data handling, critical revision of the manuscript and study supervision. All authors approved the final manuscript as submitted and agree to be accountable for all aspects of the work.

**Acknowledgments:** We thank Jessica Latour, Sandrine Lefevre, Nelly Tastet and Caroline Bruneaux from CF department of Bordeaux Children Hospital, Hélène Savel from University Hospital of Bordeaux, and Carole Lannibois from CF department of Toulouse Children Hospital for their fruitful help and/or discussion.



Partie 3 des résultats :  
Vers un Axe Intestin-Poumon,  
élément clé dans la physiopathologie  
de la mucoviscidose

---



# **1 L'AXE INTESTIN-POUMONS DANS LA SANTE ET LES MALADIES RESPIRATOIRES : UNE PLACE POUR LES DIALOGUES INTER-ORGANES ET INTERREGNES**

---

L'intestin et les poumons sont anatomiquement distincts, cependant les communications anatomiques potentielles et les voies complexes impliquant leur microbiote respectif ont renforcé l'existence d'un axe intestin-poumon (« Gut Lung Axis » ou GLA en anglais).

Par rapport au microbiote intestinal largement étudié, le microbiote pulmonaire est pris en compte depuis seulement quelques années. Il représente une partie plus discrète du microbiote associé à l'Homme. De plus, alors que la grande majorité des études se sont focalisées sur la composante bactérienne du microbiote pulmonaire dans des conditions saines et/ou pathologiques, plusieurs travaux récents ont mis en évidence la contribution des micromycètes et des virus (mycobiote et virobiote, respectivement) tant au niveau digestif que respiratoire. Des preuves de plus en plus nombreuses indiquent également le rôle clé des interactions entre ces différents microorganismes (interactions dites interrègnes) dans le maintien de l'homéostasie de l'hôte comme dans l'évolution des maladies.

Le concept d'un axe intestin-poumons récemment proposé implique de nombreuses interactions hôte-microbe mais aussi microbe-microbe ; ces interactions étant basées sur des effets ou stimuli à la fois locaux et généraux ou systémiques. Le GLA peut moduler les réponses immunitaires et interférer avec l'évolution des maladies respiratoires.

Dans cette revue (article ci-dessous, publié dans *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*), nous avons voulu analyser comment les microbiotes pulmonaire et intestinal s'influencent mutuellement et peuvent avoir un impact sur la survenue et l'évolution des maladies respiratoires. En raison des connaissances limitées sur le virobiote humain, nous sommes concentrés sur les bactériobiotés et les mycobiotés de l'intestin et des poumons, en accordant une attention particulière aux interactions microbiennes au sein du GLA capables de moduler les réponses locales ou systémiques de l'hôte. Ainsi, notre revue fait la synthèse des nombreuses connexions et influences du microbiote bactérien et fongique intestinal sur la réponse inflammatoire et immune de l'hôte au niveau pulmonaire en lien direct avec le rôle connu et documenté du microbiote intestinal dans la genèse de la réponse immune générale. Elle met également en avant une certaine réciprocité dans cet axe intestin-poumons (GLA), avec une influence hautement probable du myco-microbiote pulmonaire sur la réponse immune locale mais aussi systémique.



# THE GUT-LUNG AXIS IN HEALTH AND RESPIRATORY DISEASES: A PLACE FOR INTER-ORGAN AND INTER-KINGDOM CROSSTALKS

**Authors:** Raphaël Enaud<sup>1-3\*</sup>, Renaud Prevel<sup>2-4\*</sup>, Eleonora Ciarlo<sup>5</sup>, Fabien Beaufiles<sup>2,3,6</sup>, Gregoire Wieërs<sup>7</sup>, Benoit Guery<sup>5</sup>, Laurence Delhaes<sup>2,3,8</sup>

**Affiliations:** <sup>1</sup> CHU de Bordeaux, CRCM Pédiatrique, CIC 1401, F-33000 Bordeaux, France ; <sup>2</sup> Univ. Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33000 Bordeaux, France; <sup>3</sup> CHU de Bordeaux, Univ. Bordeaux, FHU ACRONIM, F-33000 Bordeaux, France ; <sup>4</sup> CHU de Bordeaux, Médecine Intensive Réanimation, F-33000 Bordeaux, France; <sup>5</sup> Infectious Diseases Service, Department of Medicine, Lausanne University Hospital and University of Lausanne, Lausanne, Switzerland; <sup>6</sup> CHU de Bordeaux, Service d'Explorations fonctionnelles respiratoires, F-33000 Bordeaux, France; <sup>7</sup> Clinique Saint Pierre, department of Internal Medicine, B-1340 Ottignies, Belgium; <sup>8</sup> CHU de Bordeaux: Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Univ. Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

\* These authors have contributed equally to this work

Available at <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00009>

## ABSTRACT

Gut and lungs are anatomically distinct, but potential anatomic communications and complex pathways involving their respective microbiota have reinforced the existence of a gut-lung axis (GLA).

Compared to the better-studied gut microbiota, the lung microbiota, only considered in recent years, represents a more discreet part of the whole microbiota associated to human host. While the vast majority of studies focused on the bacterial component of the microbiota in healthy and pathological conditions, recent works have highlighted the contribution of fungal and viral kingdoms in both digestive and respiratory levels. Moreover, growing evidences indicate the key role of inter-kingdom crosstalks in maintaining host homeostasis and in diseases evolution. In fact, the recently emerged GLA concept involves host-microbe as well as microbe-microbe interactions, based both on localized and long-reaching effects. GLA can shape immune responses and interfere with the course of respiratory diseases.

In this review, we aim to analyse how the lung and gut microbiota influence each other and may impact on respiratory diseases. Due to the limited knowledge on the human virobiota, we focused on gut and lung bacteriobiota and mycobiota, with a specific attention on inter-kingdom microbial crosstalks which are able to shape local or long-reached host responses within the GLA.

**Keywords:** Gut-Lung Axis, Mycobiota, Microbiome, Respiratory disease, Dysbiosis

## 1.1 INTRODUCTION

Recent advances in microbiota explorations have led to an improved knowledge of the communities of commensal microorganisms within the human body. Human skin and mucosal surfaces are associated with rich and complex ecosystems (microbiota) composed of bacteria (bacteriobiota), fungi (mycobiota), viruses (virobiota), phages, archaea, protists and helminths (Cho and Blaser, 2012). The role of the gut bacteriobiota in local health homeostasis and diseases is being increasingly investigated, but its long-distance impacts still need to be clarified (Chiu et al., 2017). Among the relevant inter-organ connexions, the gut-lung axis (GLA) remains less studied than the gut-brain axis. So far, microbiota studies mainly focused on the bacterial component neglecting other microbial kingdoms. However, the understanding of mycobiota involvement in human health and inter-organ connexions should not be overlooked (Nguyen *et al.*, 2015; Enaud *et al.*, 2018). Viruses are also known to be key players in numerous respiratory diseases and to interact with the human immune system, but technical issues still limit the amount of data regarding virobiota (Mitchell and Glanville, 2018). Therefore, we will focus on bacterial and fungal components of the microbiota and their close interactions that are able to shape local or long-reached host responses within the GLA. While GLA mycobiota also influences chronic gut diseases such as IBD, we will not address this key role in the present review: We aimed at analysing how lung and gut bacteriobiota and mycobiota influence each other, how they interact with the human immune system and their role in respiratory diseases.

## 1.2 MICROBIAL INTERACTIONS WITHIN THE GUT-LUNG-AXIS

### 1.2.1 Inter-kingdom crosstalk within the gut microbiota

The gut microbiota has been the most extensively investigated. The majority of genes (99%) amplified in human stools are from bacteria, which are as numerous as human cells and comprise 150 distinct bacterial species, belonging mainly to Firmicutes and Bacteroidetes phyla. Proteobacteria, Actinobacteria, Cyanobacteria or Fusobacteria are also represented in healthy people (Sekirov *et al.*, 2010; Human Microbiome Project Consortium, 2012).

More recently, fungi have been recognized as an integral part of our commensal flora and their role in health and diseases is increasingly considered (Huffnagle and Noverr, 2013; Huseyin *et al.*, 2017). Fungi are about 100 times larger than bacteria, so even if fungal sequences are 100 to 1000 times less frequent than bacterial sequences, fungi must not be neglected in the gastrointestinal ecosystem. In contrast with the bacteriobiota, the diversity of the gut mycobiota in healthy subjects is limited to few genera, with a high prevalence of *Saccharomyces cerevisiae*, *Malassezia restricta*, and *Candida albicans* (Nash *et al.*, 2017).

Although often dichotomized due to technical and analysis sequencing issues, critical interactions exist between bacteriobiota and mycobiota (Peleg *et al.*, 2010). The most appropriate approach to decipher the role of gut microbiota is therefore considering the gut as an ecosystem in which inter-kingdom interactions occur and have major implications as suggested by the significant correlations between the gut bacteriobiota and mycobiota profiles among healthy subjects (Hoffmann *et al.*, 2013). Yeasts, *e.g.* *Saccharomyces boulardii* and *C. albicans*, or fungus wall components, *e.g.*  $\beta$ -glucans, are able to inhibit the growth of some intestinal pathogens (Zhou *et al.*, 2013; Markey *et al.*, 2018). *S. boulardii* also produces proteases or phosphatases that inactivate the toxins produced by intestinal bacteria such as *Clostridium difficile* and *Escherichia coli* (Castagliuolo *et al.*, 1999; Buts *et al.*, 2006). In addition, at physiological state and during gut microbiota disturbances (*e.g.* after a course of antibiotics), fungal species may take over the bacterial functions of immune modulation, preventing mucosal tissue damages (Jiang *et al.*, 2017). *Vice versa*, bacteria can also modulate fungi: fatty acids locally produced by bacteria impact on the phenotype of *C. albicans* (Noverr and Huffnagle, 2004; Tso *et al.*, 2018).

Beside the widely studied gut microbiota, microbiota of other sites, including lungs, are essential for the host homeostasis and disease. Lung microbiota is now recognized as a cornerstone in the physiopathology of numerous respiratory diseases (Vandenborghet *et al.*, 2019; Soret *et al.*, 2020).

### 1.2.2 Inter-kingdom crosstalk within the lung microbiota

The lung microbiota represents a significantly lower biomass than the gut microbiota: about 10 to 100 bacteria per 1000 human cells (Sze *et al.*, 2012). Its composition depends on the microbial colonization from the oropharynx and upper respiratory tract through salivary micro-inhalations, on the host elimination abilities (especially coughing and mucociliary clearance), on interactions with the host immune system, and on local conditions for microbial proliferation, such as pH or oxygen concentration (Gleeson *et al.*, 1997; Wilson and Hamilos, 2014). The predominant bacterial phyla in lungs are the same than in gut, mainly Firmicutes and Bacteroidetes followed by Proteobacteria and Actinobacteria (Charlson *et al.*, 2011). In healthy subjects, the main identified fungi are usually environmental: Ascomycota (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eremothecium* and *Vanderwaltozyma*) and Microsporidia (*Systemostrema*) (Nguyen *et al.*, 2015; Vandenborghet *et al.*, 2019). In contrast to the intestinal or oral microbiota, data highlighting the interactions between bacteria and fungi in the human respiratory tract are more scattered (Delhaes *et al.*, 2012; Soret *et al.*, 2020). However, data from both *in vitro* and *in vivo* studies suggest relevant inter-kingdom crosstalk (Delhaes *et al.*, 2012; Xu and Dongari-Bagtzoglou, 2015; Lof *et al.*, 2017; Soret *et al.*, 2020). This dialogue may involve several pathways as physical interaction, quorum-sensing molecules, production of

antimicrobial agents, immune response modulation and nutrient exchange (Peleg *et al.*, 2010). Synergistic interactions have been documented between *Candida* and *Streptococcus*, such as stimulation of *Streptococcus* growth by *Candida*, increasing biofilm formation, or enhancement of the *Candida* pathogenicity by *Streptococcus* (Diaz *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2014b). In vitro studies exhibited an increased growth of *Aspergillus fumigatus* in presence of *P. aeruginosa*, due to the mold ability in assimilating *P. aeruginosa*-derived volatile sulfur compounds (Briard *et al.*, 2019; Scott *et al.*, 2019). However, the lung microbiota modulation is not limited to local inter-kingdom crosstalk and also depends on inter-compartment crosstalk between gut and lungs.

### 1.2.3 Microbial inter-compartment crosstalk

From birth throughout the entire life, a close correlation between the composition of the gut and lung microbiota exists, suggesting a host-wide network (Grier *et al.*, 2018). For instance, modification of newborns' diet influences the composition of their lung microbiota and fecal transplantation in rats induces changes in the lung microbiota (Madan *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2017).

Host health condition can impact this gut-lung interaction too. In cystic fibrosis (CF) newborns, gut colonizations with *Roseburia*, *Dorea*, *Coprococcus*, *Blautia* or *Escherichia* presaged their respiratory appearance and their gut and lung abundances are highly correlated over time (Madan *et al.*, 2012). Similarly, the lung microbiota is enriched with gut bacteria, such as *Bacteroides spp*, after sepsis (Dickson *et al.*, 2016).

Conversely, lung microbiota may affect the gut microbiota composition. In a pre-clinical model, influenza infection triggers an increased proportion of *Enterobacteriaceae* and decreased abundances of *Lactobacilli* and *Lactococci* in the gut (Looft and Allen, 2012). Consistently, lipopolysaccharide (LPS) instillation in the lungs of mice is associated with gut microbiota disturbances (Sze *et al.*, 2014).

Although gastroesophageal content inhalations and sputum swallowing partially explain this inter-organ connexion, GLA also involves indirect communications such as host immune modulation.

## **1.3 GUT-LUNG AXIS INTERACTIONS WITH THE HUMAN IMMUNE SYSTEM**

### **1.3.1 Gut microbiota and local immunity**

Gut microbiota effects on local immune system have been extensively reviewed (Elson and Alexander, 2015). Briefly, gut microbiota closely interacts with the mucosal immune system using both pro- inflammatory and regulatory signals (*Skelly et al.*, 2019). It also influences neutrophil responses, modulating their ability to extravasate from blood (Karmarkar and Rock, 2013). Toll-Like Receptor (TLR) signaling is essential for microbiota-driven myelopoiesis and exerts a neonatal selection shaping the gut microbiota with long-term consequences (Balmer *et al.*, 2014; Fulde *et al.*, 2018). Moreover, the gut microbiota communicates with and influences immune cells expressing TLR or GPR41/43 by the mean of microbial associated molecular patterns (MAMPs) or short chain fatty acid (SCFAs) (Le Poul *et al.*, 2003). Data focused the gut mycobiota impact on the immune system are sparser. Commensal fungi seem to reinforce bacterial protective benefits on both the local and systemic immunity, with a specific role for mannans, a highly-conserved fungal wall component. Moreover, fungi are able to produce SCFAs (Baltierra-Trejo *et al.*, 2015; Xiros *et al.*, 2019). Therefore, gut mycobiota perturbations could be as deleterious as bacteriobiota ones (Wheeler *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2017).

### **1.3.2 Lung microbiota and local immunity**

A crucial role of lung microbiota in the maturation and homeostasis of lungs immunity has emerged over the last few years (Dickson *et al.*, 2018). Colonization of the respiratory tract provides essential signals for maturing local immune cells with long-term consequences (Gollwitzer *et al.*, 2014). Pre-clinical studies confirm the causality between airways microbial colonization and the regulation and maturation of the airways' immune cells. Germ-free mice exhibit an increased local Th2-associated cytokines and IgE productions, promoting allergic airways inflammation (Herbst *et al.*, 2011). Consistently, lungs exposure to commensal bacteria reduces Th2-associated cytokines production after an allergen challenge and induces regulatory cells early in life (Russell *et al.*, 2012; Gollwitzer *et al.*, 2014). The establishment of resident memory B cells in lungs also requires to encounter lung microbiota local antigens, especially regarding immunity against viruses such as influenza (Allie *et al.*, 2019).

Interactions between lung microbiota and immunity are also a two-way process; a major inflammation in the lungs can morbidly transform the lung microbiota composition (Molyneaux *et al.*, 2013).

### 1.3.3 Long-reaching immune modulation within the gut-lung axis

Beyond the local immune regulation by the site-specific microbiota, long-reaching immune impact of gut microbiota is now being recognized, especially on the pulmonary immune system (Chiu et al., 2017). The mesenteric lymphatic system is an essential pathway between the lungs and the intestine, through which intact bacteria, their fragments or metabolites (e.g., SCFAs) may translocate across the intestinal barrier, reach the systemic circulation and modulate the lung immune response (Trompette et al., 2014; Bingula et al., 2017; McAleer and Kolls, 2018). SCFAs, mainly produced by the bacterial dietary fibers fermentation especially in case of high-fiber diet (HFD), act in the lungs as signaling molecules on resident antigen-presenting cells to attenuate the inflammatory and allergic responses (Anand and Mande, 2018; Cait *et al.*, 2018). SCFAs-receptor deficient mice show increased inflammatory responses in experimental models of asthma (Trompette et al., 2014). Fungi, including *A. fumigatus*, can also produce SCFAs or create a biofilm enhancing the bacterial production of SCFAs, but on the other way around bacterial SCFAs can dampen the fungal growth (Hynes et al., 2008; Baltierra-Trejo et al., 2015; Xiros et al., 2019). The impact of fungal production of SCFAs on the host has not been assessed so far.

Other important players of this long-reaching immune effect are gut segmented filamentous bacteria (SFB), a commensal bacteria colonizing the ileum of most of the animals, including humans and involving in modulation of the immune systems development (Yin et al., 2013). SFB regulate CD4<sup>+</sup> T-cells polarization into the Th17 pathway, which is implicated in the response to pulmonary fungal infections and lung autoimmune manifestations (McAleer *et al.*, 2016; Bradley *et al.*, 2017). Recently, innate lymphoid cells, involved in tissue repair, have been shown to be recruited from the gut to the lungs in response to inflammatory signals upon IL-25 (Huang *et al.*, 2018). Finally, the intestinal TLR activation, required for the NF- $\kappa$ B-dependent pathways of innate immunity and inflammation, is associated with an increased influenza-related lung response in mice (Ichinohe *et al.*, 2011).

Other mechanisms may be involved in modulating the long-reaching immune response related to gut microbiota, exemplified by the increased number of mononuclear leucocytes and an increased phagocytic and lytic activity after a treatment with *Bifidobacterium lactis* HNO19 probiotics (Gill *et al.*, 2001). Diet, especially fiber intakes, which increases the systemic level of SCFAs, or probiotics influence the pulmonary immune response and thus impact the progression of respiratory disorders (King et al., 2007; Varraso et al., 2015; Anand and Mande, 2018).

The GLA immune dialogue remains a two-way process. For instance, *Salmonella* nasal inoculation promotes a *Salmonella*-specific gut immunization which depends on lung dendritic cells (Ruane *et al.*, 2013). Respiratory influenza infection also modulates the composition of the gut microbiota as stated above. These intestinal microbial disruptions seem

to be unrelated to an intestinal tropism of influenza virus but mediated by Th17-cells (Wang *et al.*, 2014).

*In fine*, GLA results from complex interactions between both the different microbial components of the gut and lung microbiotas combined with local and long-reaching immune effects. All these interactions strongly suggest a major role for the GLA in respiratory diseases, as recently documented in a mice model (Skalski *et al.*, 2018).

## **1.4 GUT-LUNG AXIS IN RESPIRATORY DISEASES**

### **1.4.1 Acute infectious diseases**

Regarding influenza infection and the impact of gut and lung microbiota, our knowledge is still fragmentary; human data are not yet available. However, antibiotic treatment causes significantly reduced immune responses against influenza virus in mice (Ichinohe *et al.*, 2011). Conversely, influenza-infected HFD-fed mice exhibit increased survival rates compared to infected controls thanks to an enhanced generation of Ly6c-patrolling monocytes. These monocytes increase the numbers of macrophages that have a limited capacity to produce CXCL1 locally, reducing neutrophils recruitment to the airways and so tissue damages. In parallel, diet-derived SCFAs boost CD8+ T-cell effector function in HFD-fed mice (Trompette *et al.*, 2018).

Both lung and gut microbiota are essential against bacterial pneumonia. Lung microbiota is able to protect against respiratory infections with *Streptococcus pneumoniae* and *Klebsiella pneumoniae* by priming the pulmonary production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) *via* IL-17 and Nod2 stimulation (Brown *et al.*, 2017). The gut microbiota also plays a crucial role response to lung bacterial infections. Studies on germ-free mice showed an increased morbidity and mortality during *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae* or *P. aeruginosa* acute lung infection (Fagundes *et al.*, 2012; Fox *et al.*, 2012; Brown *et al.*, 2017). The use of broad spectrum antibiotic treatments, to disrupt mice gut microbiota, results in worse outcome in lung infection mouse models (Schuijt *et al.*, 2016; Robak *et al.*, 2018). Mechanistically, alveolar macrophages from mice deprived of gut microbiota through antibiotic treatment are less responsive to stimulation and show reduced phagocytic capacity (Schuijt *et al.*, 2016). Interestingly, priming of antibiotic-treated animals with TLR agonists restores resistance to pulmonary infections (Fagundes *et al.*, 2012). SFB appear to be an important gut microbiota component for lung defence against bacterial infection thanks to their capacity to induce the production of the Th17 cytokine, IL-22, and to increase neutrophil counts in the lungs during *Staphylococcus aureus* pneumonia. (Gauguet *et al.*, 2015).

Modulating chronic infectious diseases will similarly depend on gut and lung microbiotas. For instance, *Mycobacterium tuberculosis* infection severity is correlated with gut microbiota (Namasivayam *et al.*, 2018).

#### 1.4.2 Chronic respiratory diseases

Multiple studies have addressed the impact of gut and lung microbiota on chronic respiratory diseases such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asthma and cystic fibrosis (CF) (Table 1).

Decreased lung microbiota diversity and *Proteobacteria* expansion are associated with both COPD severity and exacerbations (Garcia-Nuñez *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016, 2018; Mayhew *et al.*, 2018). The fact that patients with genetic mannose binding lectin deficiency exhibit a more diverse pulmonary microbiota and a lower risk of exacerbation suggests not only association but also causality (Dicker *et al.*, 2018). Besides the lung flora, the gut microbiota is involved in exacerbations as suggested by the increased gastro-intestinal permeability in patients admitted for COPD exacerbations (Sprooten *et al.*, 2018). Whatever the permeability's origin (hypoxemia or pro-inflammatory status), level of circulating gut microbiota-dependent trimethylamine-N-oxide has been associated with mortality in COPD patients (Ottiger *et al.*, 2018). This association being explained by comorbidities and age, its impact *per se* is not guaranteed. Further studies are warranted to investigate the role of GLA in COPD and to assess causality.

Early-life perturbations in fungal and bacterial gut colonization, such as low gut microbial diversity *e.g.* after neonatal antibiotic use, are critical to induce childhood asthma development (Abrahamsson *et al.*, 2014; Metsälä *et al.*, 2015; Arrieta *et al.*, 2018). This microbial disruption is associated with modifications of faecal SCFAs levels (Arrieta *et al.*, 2018). Causality has been assessed in murine models. Inoculation of the bacteria absent in the microbiota of asthmatic patients decreases airways inflammation (Arrieta *et al.*, 2015). Furthermore, *Bacteroides fragilis* seems to play a major role in immune homeostasis balancing the host systemic Th1/Th2 ratio and therefore conferring protection against allergen-induced airway disorders (Mazmanian *et al.*, 2005; Panzer and Lynch, 2015; Arrieta *et al.*, 2018). Nevertheless it is still not fully deciphered as some studies conversely found that an early colonization with *Bacteroides*, including *B. fragilis*, could be an early indicator of asthma later in life (Vael *et al.*, 2008). Regarding fungi, gut fungal overgrowth (after antibiotic administration or a gut colonization protocol with *Candida* or *Wallemia mellicola*) increases the occurrence of asthma *via* IL-13 without any fungal expansion in the lungs (Noverr *et al.*, 2005; Wheeler *et al.*, 2016; Skalski *et al.*, 2018). The prostaglandin E2 produced in the gut by *Candida* can reach the lungs and promotes lung M2 macrophage polarization and allergic airway inflammation (Kim *et al.*, 2014). In mice, a gut over-representation of *W. mellicola* associated with several intestinal



microbiome disturbances appears to have long-reaching effects on the pulmonary immune response and severity of asthma, by involving the Th2 pathways especially IL-13 and in a lesser degree IL-17, a goblet cell differentiation, a fibroblasts' activation, and an IgE production by B cell (Skalski et al., 2018). Taken together, these results indicate that the GLA, mainly through the gut microbiota, is likely to play a major role in asthma.

In CF patients, gut and lung microbiota are distinct from those of healthy subjects and disease progression is associated with microbiotas alterations (Madan *et al.*, 2012; Stokell *et al.*, 2015; Nielsen *et al.*, 2016). Moreover, the bacterial abundances at both sites are highly correlated and have similar trends over time (Madan *et al.*, 2012), especially regarding *Streptococcus* that are found in higher proportion in CF stools, gastric contents, and sputa (Al-Momani *et al.*, 2016; Nielsen *et al.*, 2016). Moreover, CF patients with a documented intestinal inflammation exhibit a higher *Streptococcus* abundance in the gut (Enaud et al., 2019), suggesting the GLA involvement in the intestinal inflammation. Of note, gut but not lung microbiota alteration is associated with early-life exacerbations: some gut microbiota perturbations, such as a decrease of *Parabacteroides*, are predictive of an airway colonization with *Pseudomonas aeruginosa* (Hoen *et al.*, 2015). Furthermore, oral administration of probiotics to CF patients leads to a decreased number of exacerbations (Anderson *et al.*, 2016). While the mycobiota has been recently studied in CF (Nguyen et al., 2015; Soret et al., 2020), no data on the role of the fungal component of the GLA are currently available in CF, which deserves to be more widely studied.

The role of inter-compartment and inter-kingdom interactions within the GLA in those pulmonary diseases has now to be further confirmed and causality to be assessed. Diet, probiotics or more specific modulations could be in a near future novel essential tools in therapeutic management of these respiratory diseases.

## 1.5 CONCLUSION

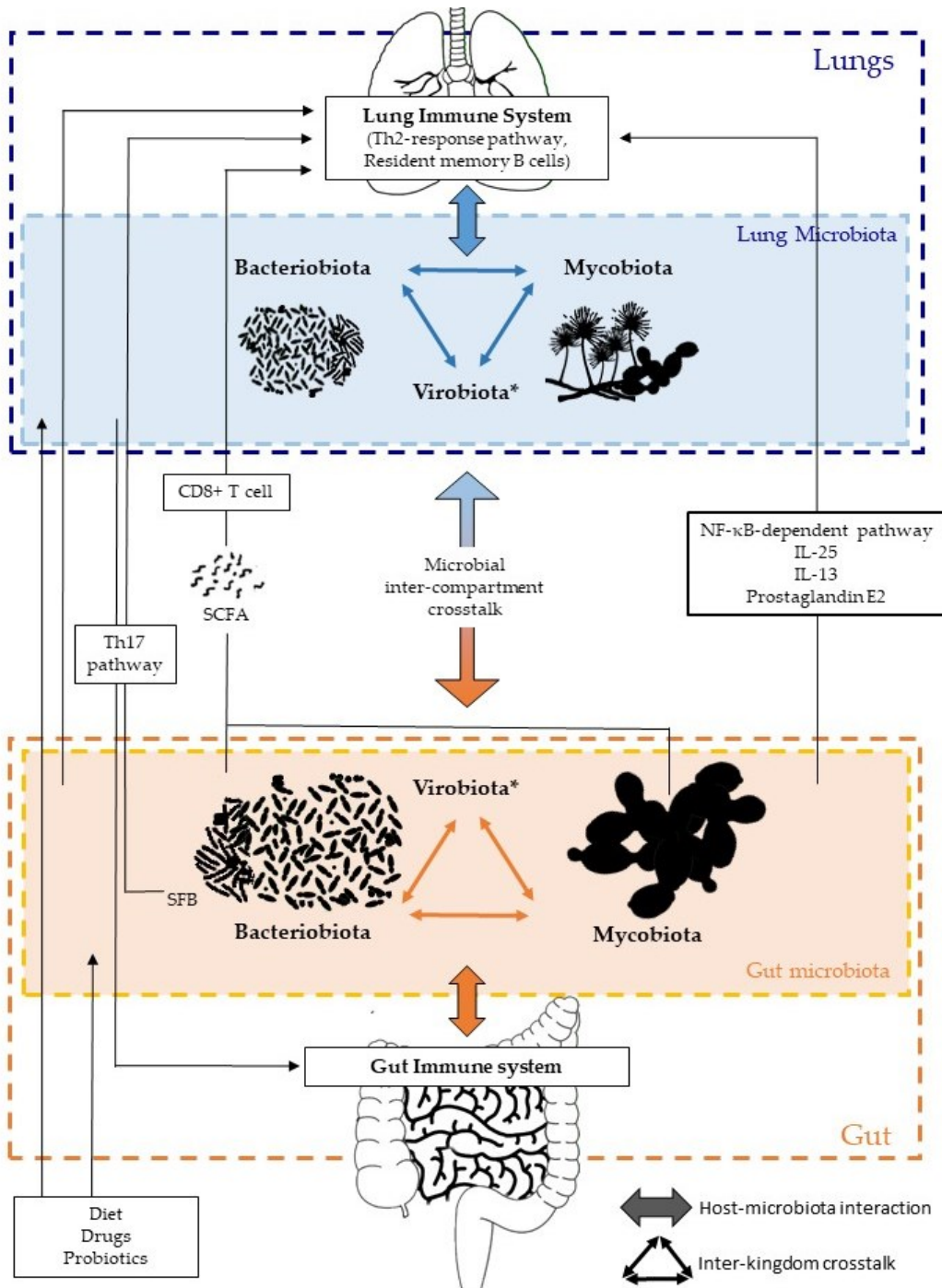
The Gut-Lung Axis or GLA has emerged as a specific axis with intensive dialogues between gut and lungs, involving each compartment in a two-way manner, with both microbial and immune interactions (Figure1). Each kingdom and compartment plays a crucial role in this dialogue, and consequently in host health and diseases. The roles of fungal and viral kingdoms within GLA still remain to be more investigated. Their manipulation, as for the bacterial component, could pave the way for new approaches in the management of several respiratory diseases such as acute infections, COPD, asthma and/or CF.

## **AKNOWLEDGEMENT**

Laurence Delhaes has received research grants from “Vaincre La Mucoviscidose” (RF20160501626) and from the "Fondation de l'Université de Bordeaux" ("Bronch-Asp" project); she is member of ESGHAMI and NGS-MycA working groups of ESCMID and ECCM respectively. Renaud Prevel and Raphaël Enaud has received PhD research grants from University Hospital of Bordeaux. All the funders had no role in article design, decision to publish, or preparation of the manuscript. We would like to thank Laure De Rosamel for her precious proofreading of the manuscript.

**Table 1. Gut-Lung Axis in human chronic respiratory diseases**

Lung disease	Microbiota disorders in		Comments	References
	Lungs	Gut		
Chronic obstructive pulmonary disease (COPD)	Decreased lung microbiota diversity, <i>Proteobacteria</i> expansion		Associated with both COPD severity and exacerbations	García-Núñez et al., 2014; Wang et al., 2016; Mayhew et al., 2018
		Increased gastro-intestinal permeability and level of circulating gut microbiota-dependent trimethylamine-N-oxide	Associated with long-term all-cause mortality in COPD patients	Ottiger et al., 2018
Asthma	Proteobacteria ( <i>Haemophilus</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rickettsia</i> and <i>Moraxella</i> species) and Firmicutes ( <i>Lactobacillus</i> )		Overrepresented in asthmatic patients and/or associated with an uncontrolled asthma	Hilty et al., 2010; Marri et al., 2013; Huang et al., 2015; Denner et al., 2016; Zhang et al., 2016; Durack et al., 2017; Sverrild et al., 2017; Zhang et al., 2016
	Bacteroidetes and Fusobacteria		Reduced in asthmatic patients	Green et al., 2014; Sverrild et al., 2017
	<i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Haemophilus</i> and <i>Streptococcus</i>		Associated with worse FEV <sub>1</sub> and higher sputum neutrophil counts	van Woerden et al., 2013
	<i>Malassezia</i>		Overrepresented in asthmatic patients	Fraczek et al., 2018
	<i>Aspergillus fumigatus</i>		Associated with corticosteroid treatment	
		Early-life perturbations - Low gut microbial diversity - Increased bacterial abundance of <i>Clostridium</i> , <i>Streptococcus</i> and <i>Bacteroides fragilis</i> - Decreased bacterial abundances of <i>Lachnospira</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Rothia</i> <i>Bacteroides</i> and <i>Bifidobacterium</i> - Increased fungal abundances of <i>Saccharomyces</i> and <i>Pichia kudriavzevii</i> - Decreased fungal abundances of <i>Candida tropicalis</i> and <i>Debaryomyces hansenii</i>	Increased risk of childhood asthma development	Björkstén et al., 2001; Penders et al., 2007; Vael et al., 2008; van Nimwegen et al., 2011; Abrahamsson et al., 2012; Arrieta et al., 2015, 2018; Stiemsma et al., 2016
Cystic fibrosis (CF)	Decreased lung microbiota diversity		Correlated with the disease evolution and associated with exacerbation	Zhao et al., 2012; Stokell et al., 2015; Frayman et al., 2017
	<i>Streptococcus</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Rothia</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Acintomyces</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Gemella</i>		Major bacterial taxa in CF pediatric patients	Worlitzsch et al., 2009; Maclan et al., 2012; Renwick et al., 2014; Coburn et al., 2015; Frayman et al., 2017
	<i>Streptococcus</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Rothia</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Acintomyces</i> , <i>Pseudomonas</i>		Major bacterial taxa in CF adult patients	Cox et al., 2010; Hampton et al., 2014; Coburn et al., 2015; Frayman et al., 2017
	<i>Candida albicans</i> and <i>Aspergillus fumigatus</i>		Major fungi isolated in CF patient; <i>C. albicans</i> was more likely co-associated with <i>P. aeruginosa</i>	Delhaes et al., 2012; Willger et al., 2014; Kim et al., 2015; Nguyen et al., 2016
		Decrease of <i>Parabacteroides</i>	Predictive of an airway colonization with <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Association	Hoehn et al., 2015
		Increased abundances of <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Escherichia coli</i> and <i>Veillonella dispar</i> Decreased abundances of <i>Bacteroides</i> , <i>Bifidobacterium adolescentis</i> and <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Association with CF intestinal inflammation	Hoffman et al., 2014; Enaud et al., 2019
			Association with with CF intestinal inflammation	Enaud et al., 2019



**Figure 1: Inter-kingdom and inter-compartment crosstalks within the gut-lung axis.**

Bacteriobiota, mycobiota and virobiota are closely interacting within each organ either by direct or indirect mechanisms shaping each other. Gut microbiota influences both gut immune system and lung immune system via local or long-reaching interactions, which involve either CD8+ T cell, Th17, IL-25, IL-13, prostaglandin E2 and/or NF-κB-dependent pathways. Lung microbiota impacts the mucosal immunity and contributes to immune tolerance, through neutrophil recruitment, production of pro-inflammatory cytokines mediated by receptor 2 (TLR2), and the release of antimicrobial peptides, such as β-defensin 2 stimulated by T helper 17 (Th17) cells. On the other side, lung microbiota also influences gut immune system but precise mechanisms remains to decipher, even if an intestinal microbial disruption has been associated with Th17 cells mediation after influenza virus lung infection. Several factors are well known to influence the composition of the intestinal and/or lung microbiota, such as diet, drugs, probiotics. (\* Of note, the virobiota is not covered in this review.)



# Discussion Générale et Perspectives

---



# **1 POINTS FORTS ET LIMITES DES APPROCHES UTILISEES DANS LA THESE**

---

Après avoir établi l'état des connaissances actuelles sur la mucoviscidose, maladie systémique affectant notamment le système respiratoire et intestinal, et sa prise en charge novatrice par les thérapies modulatrices du CFTR, notre travail s'est concentré sur l'analyse des microbiotes/mycobiotes et de l'inflammation respiratoires et intestinales.

En premier lieu, notre revue de la littérature ainsi que nos travaux ont permis de mettre l'accent sur la pertinence de l'analyse concomitante des mycobiotes/microbiotes et de l'inflammation, que ce soit au niveau du tractus respiratoire ou intestinal.

## **1.1 MICROBIOTE ET INFLAMMATION PULMONAIRES DANS LA MUCOVISCIDOSE**

Il est maintenant bien reconnu que l'écosystème système pulmonaire, dont les communautés microbiennes et la réponse inflammatoire locale, est étroitement lié à la physiopathologie de la mucoviscidose. Cet écosystème est en perpétuelle évolution, et sa dynamique conditionne la morbi-mortalité de cette maladie. Ainsi, nous avons pu, dans notre premier travail, préciser l'implication des différentes communautés microbiennes, et notamment fongiques, dans l'évolution de la fonction pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose. Nous avons également mis en évidence des interactions entre micromycètes et bactéries au sein du myco-microbiote respiratoire lors de phénomènes d'exacerbation chez des patients atteints de mucoviscidose et a permis d'incrémenter le modèle écologique « Climax-Attack » (Soret et al., 2020).

A l'ère des thérapies modulatrices du CFTR, l'exigence des objectifs thérapeutiques doit donc prendre en compte ces données, et viser non seulement une amélioration clinique (amélioration de la qualité de vie, amélioration du VEMS, diminution des exacerbations...) mais également une restauration de l'écosystème pulmonaire (diminution des colonisations avec des pathogènes (*Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Aspergillus*, ...), augmentation de la diversité microbienne, diminution de l'inflammation locale ...).

Dans la continuité de ces premiers travaux, et pour répondre à ces objectifs thérapeutiques, l'évolution du myco-microbiote respiratoire et de l'inflammation locale a donc été analysée longitudinalement durant les 6 premiers mois de la mise en place d'un modulateur CFTR (Lumacaftor/Ivacaftor) chez les patients de 12 ans et plus. Si l'amélioration clinique sous Lumacaftor/Ivacaftor n'est plus à démontrer, l'impact du traitement sur le myco-microbiote respiratoire semble être conditionné par l'écosystème pulmonaire présent à l'initiation du



traitement. L'évolution du mycobiote/microbiote pulmonaire sous Lumacaftor/Ivacaftor chez les patients colonisés par *P. aeruginosa* (associé à des taux de calprotectine plus élevés) est moins marquée que chez les patients non colonisés, chez qui nous avons pu mettre en évidence une augmentation de l'alpha-diversité bactérienne après 6 mois de traitement. La capacité de résilience de l'écosystème pulmonaire sous modulateur CFTR semble donc diminuer avec l'évolution de la maladie, et notamment avec une colonisation à *Pseudomonas*. Ces résultats confortent l'idée que les modulateurs doivent être commencés le plus tôt possible, même si la fonction pulmonaire est encore conservée, afin de restaurer ou maintenir un écosystème pulmonaire le plus proche de celui d'un individu sain. Une étude est donc actuellement en cours (« Lum-Iva-Biota 2-11 ans », voir chapitre 2.1 des « Perspectives ») afin d'étudier l'évolution du myco/microbiote et de l'inflammation pulmonaires chez environ 150 enfants âgés de 2 à 11 ans et débutant un traitement par Lumacaftor/Ivacaftor.

Par ailleurs, nous prévoyons d'étudier également la nouvelle combinaison associant Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor sur le myco/microbiote et l'inflammation pulmonaires, étant donné que ce traitement cible de nouvelles mutations et que l'efficacité semble plus importante qu'avec Lumacaftor/Ivacaftor (étude Kaf-Biota, voir chapitre 2.2 des « Perspectives »).

## **1.2 MICROBIOTE ET INFLAMMATION INTESTINALE DANS LA MUCOVISCIDOSE**

Les données sur l'atteinte digestive dans la mucoviscidose, et notamment l'inflammation intestinale, sont plus récentes et moins nombreuses (Garg and Ooi, 2017). Il était donc important dans un premier temps d'évaluer l'association entre l'atteinte digestive et les symptômes des patients. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence une association entre des taux élevés de calprotectine fécale (supérieurs à 250µg/g) et, d'une part une majoration des symptômes gastro-intestinaux (reflux, nausées et vomissements, sensation de gaz et de ballonnements), et d'autre part une altération de la qualité de vie. Ces résultats soulignent la pertinence clinique de comprendre et prendre en charge l'inflammation intestinale des patients.

Ainsi, la deuxième partie de notre travail, axée sur la physiopathologie de l'inflammation intestinale, s'est concentrée sur l'association entre le taux de calprotectine fécale et la composition du microbiote fécal. Nous avons pu montrer que le microbiote des patients ayant une calprotectine fécale  $\geq 250 \mu\text{g/g}$  (suggérant une inflammation intestinale) se distinguait par sa composition (notamment une augmentation de l'abondance de *Staphylococcus* spp. et *Streptococcus* spp., et une diminution de *Bacteroides* spp., *Ruminococcus* spp., *Coprococcus* spp., *Dialister* spp., *Bifidobacterium adolescentis* et *F. prausnitzii*) comparé aux patients avec

une calprotectine < 250µg/g. Ces perturbations du microbiote présentait des similitudes avec la dysbiose observée dans la maladie de Crohn, comme en témoigne l'augmentation du « Microbial Dysbiosis Index » dans notre population, et peuvent suggérer un lien de causalité entre microbiote et inflammation.

Afin d'étudier ce lien de causalité, nous avons étudié *in vitro* la réponse inflammatoire de cellules épithéliales digestives (cellules CACO2) stimulées par différents surnageants de microbiote fécal d'enfants atteints de mucoviscidose présentant ou non une inflammation intestinale. Nos données préliminaires retrouvaient une augmentation de l'expression des gènes pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-8, COX2) et une diminution des gènes impliqués dans l'apoptose après stimulation des cellules CACO2 pendant 6 semaines avec des surnageants de selles de patients ayant une calprotectine fécale  $\geq$  250 µg/g. Si ces résultats se confirment avec un nombre d'échantillons et d'expérimentations plus important, ils pourraient renforcer l'hypothèse d'un lien de causalité entre microbiote et inflammation intestinale dans la mucoviscidose.

Nous travaillons également sur différentes pistes thérapeutiques concernant cette inflammation intestinale. La première visait à étudier l'évolution de la calprotectine fécale chez les patients traités par Lumacaftor/Ivacaftor. Nous avons montré que les taux de calprotectine fécale diminuent sous Lumacaftor/Ivacaftor. Ces données suggèrent que la modulation de la protéine CFTR par Lumacaftor/Ivacaftor n'est pas restreinte au tractus respiratoire et que les modulateurs CFTR peuvent aussi améliorer l'atteinte intestinale des patients. Une étude multicentrique est en cours chez environ 150 enfants âgés de 2 à 11 ans et débutant un traitement par Lumacaftor/Ivacaftor (« Lum-Iva-Biota 2-11 ans », voir chapitre 2.1 des « Perspectives »), afin de confirmer ces résultats sur un plus grand nombre de patients et d'étudier la coévolution entre le myco/microbiote et l'inflammation intestinale.

### **1.3 LIMITES DES APPROCHES UTILISEES DANS CETTE THESE**

Les recherches portant sur les communautés microbiennes dans le cadre la mucoviscidose se sont enrichies, tant au niveau pulmonaire qu'au niveau intestinal, de l'utilisation des technologies de séquençage haut-débit. Ces recherches s'avèrent aujourd'hui incontournables pour une meilleure compréhension de la physiopathologie et de l'évolution de la maladie. Cependant, des efforts de standardisation des différentes étapes de métagénomique, depuis l'extraction d'ADN à l'analyse bio-informatique, restent encore à accomplir par la communauté scientifique afin de permettre des comparaisons robustes inter-centres ou inter-études (Coron et al., 2018a; Amos et al., 2020; Ducarmon et al., 2020).

Nos analyses du microbiote pulmonaire sont basées sur des expectorations. Même si elles sont sujettes à des contaminations salivaires et que les segments pulmonaires

fonctionnellement exclus de la ventilation peuvent être sous-représentés, ce mode de recueil est non invasif et peut donc être répété dans le temps. Les limites de l'analyse microbienne des lavages broncho alvéolaires, au-delà de leur caractère invasif, résident dans la grande variabilité des compositions microbiennes en fonction du segment pulmonaire prélevé (Garg et al., 2017b). Les expectorations représentent par nature un mélange de microbiotes des voies respiratoires supérieures et inférieures. Il y a donc une similitude des profils microbiens entre les expectorations et les lavage broncho alvéolaires (Hogan et al., 2016; Durack et al., 2017; Sulaiman et al., 2018). Par ailleurs, les maladies à forte charge microbienne dans les voies respiratoires inférieures, comme la mucoviscidose, sont plus susceptibles de produire des échantillons d'expectorations reflétant le microbiote des voies respiratoires inférieures (Carney et al., 2020). Enfin, plusieurs résultats pertinents proviennent d'études basées sur l'analyse métagénomique d'expectorations (Lim et al., 2014; Acosta et al., 2018).

Sur le plan digestif, la méthode de référence pour détecter une inflammation de la muqueuse intestinale restent l'endoscopie et l'étude histologique des biopsies, qui est invasive et coûteuse. Sur la base d'études antérieures, principalement dans les MICI, montrant des corrélations entre les niveaux de calprotectine fécale et le degré d'inflammation de la muqueuse intestinale, nous avons décidé d'utiliser ce biomarqueur, non invasif et donc répétable dans le temps, pour étudier l'inflammation intestinale chez les patients atteints de mucoviscidose (Lin et al., 2014). Une des problématiques spécifiques à la mucoviscidose est que la calprotectine présente dans les expectorations pourrait, après déglutition des crachats, augmenter les taux de calprotectine fécale. Cependant, l'absence de corrélation entre le taux de calprotectine et le VEMS, dans nos travaux comme dans la littérature (Ellemunter et al., 2017), remet assez fortement en cause cette hypothèse. Aussi, nous avons prévu de comparer dans « Lum-Iva-Biota 2-11 ans » (voir Perspectives) l'évolution des taux de calprotectine dans les selles et dans les expectorations, afin de pouvoir répondre de manière directe à cette question.

Enfin, la mise en évidence d'une association entre une dysbiose et une inflammation, comme montré dans nos travaux (voir chapitre 2 de la deuxième partie des résultats), soulève la question du lien de causalité entre microbiote et inflammation. Cette question reste largement débattue, notamment dans les MICI (Ni et al., 2017). C'est dans ce contexte que nous avons initié le développement de modèles de cultures cellulaires et l'exploration *in vitro* de la réponse inflammatoire épithéliale face à une dysbiose. De plus, l'étude de la coévolution dans le temps du myco/microbiote et de l'inflammation, comme prévu dans « Lum-Iva-Biota 2-11 ans » (voir chapitre suivant), contribuera également à apporter des éléments de réponse.

## 2 PERSPECTIVES

---

### 2.1 ETUDE OBSERVATIONNELLE « LUM-IVA-BIOTA CHEZ LES 2 – 11 ANS »

Afin de pouvoir documenter les effets de Lumacaftor/Ivacaftor sur le microbiote et l'inflammation pulmonaires et digestifs, notre équipe coordonne depuis 2016 la cohorte nationale « Lum-Iva-Biota », avec 15 CRCM français participants. Cette cohorte a été menée en deux parties :

- La première partie ciblait l'évolution à 1 an du microbiote et de l'inflammation pulmonaire chez 100 patients âgés de 12 ans et plus débutant un traitement par Lumacaftor/Ivacaftor. Les résultats ont permis notamment de montrer que l'effet du traitement sur le microbiote pulmonaire était plus marqué chez les patients non colonisés préalablement à *P. aeruginosa*, avec notamment une augmentation significative de l'alpha diversité (cf. partie 1, Chapitre 3). Ces données suggèrent l'intérêt de commencer le traitement le plus tôt possible et nécessitent d'être confirmées dans une cohorte plus jeune.
- La deuxième partie vise donc chez les patients âgés de 2 à 11 ans et débutant un traitement par Lumacaftor/Ivacaftor à étudier la coévolution sur 1 an du microbiote et de l'inflammation pulmonaires et digestifs. A ce jour, nous avons inclus 150 patients et avons atteint en septembre 2020 les 6 mois de suivi pour la moitié d'entre eux (Travail en cours). Cette seconde partie a notamment reçu le financement de l'Association Vaincre La Mucoviscidose (VLM) pour la partie digestive du projet (inflammation et microbiote), dans le cadre de l'Appel d'Offre 2020 (Coordinateur : R. Enaud, Etude EMILI, ancillaire à l'étude Lum-Iva-Biota financée par un Grant Vertex pour la partie pulmonaire et coordonnée par Pr. Laurence Delhaes).

L'objectif principal de l'étude EMILI est d'étudier l'effet à 12 mois d'un traitement par Lumacaftor/Ivacaftor sur l'évolution de l'inflammation intestinale évaluée par dosage de la calprotectine fécale chez l'enfant âgé de 2 à 11 ans, homozygote DeltaF508 atteint de mucoviscidose. Ces données permettront notamment de vérifier les résultats de notre étude pilote (Tétard et al., 2020). Les objectifs secondaires sont d'étudier l'effet à 3, 6 et 12 mois d'un traitement par Lumacaftor/Ivacaftor sur l'état nutritionnel et le microbiote intestinal (bactérien et fongique), et d'estimer l'association entre l'évolution de l'inflammation intestinale et de la composition du microbiote intestinal (bactérien et fongique).

Le suivi de cette cohorte permettra également d'étudier l'effet à 12 mois d'un traitement par Lumacaftor/Ivacaftor sur l'évolution du microbiote (fongique et bactérien) et de l'inflammation pulmonaire (évaluée par la calprotectine), chez l'enfant âgé de 2 à 11 ans, homozygote DeltaF508 atteint de mucoviscidose (étude princeps « Lum-Iva-Biota »). Enfin la

combinaison des résultats au niveau respiratoire et intestinal, tant sur le plan des microbiotes que de l'inflammation, devrait nous permettre de dégager les premiers éléments d'une coévolution des deux flores et de l'inflammation dans la mucoviscidose et de l'impact des modulateurs sur cette coévolution.

## **2.2 SUIVI DE L'AXE INTESTIN-POUMON DES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE ET TRAITES PAR LA COMBINAISON IVACAFTOR/TEZACAFTOR/ELEXACAFTOR**

La prise en charge de la mucoviscidose a été marquée ces toutes dernières années par l'apparition de plusieurs modulateurs de la protéine CFTR, qui sont le plus souvent évalués sur des critères d'efficacité ciblant la fonction respiratoire (évolution de VEMS, nombre d'exacerbations). Cependant, il nous semble essentiel de pouvoir continuer à documenter l'effet de ces traitements sur le microbiote et l'inflammation pulmonaires et digestifs de façon à mieux connaître l'impact physiopathologique de ces thérapies.

Ainsi, une nouvelle combinaison associant Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor a prouvé son efficacité pour le traitement des patients de 12 ans et plus porteurs de deux mutations F508del ou d'une mutation dite « à fonction minimale » associée à une mutation F508del (Middleton et al., 2019). L'autorisation européenne de mise sur le marché a été obtenue en août 2020 et l'accès en France devrait donc arriver prochainement en 2021. Etant donné que ce traitement cible de nouvelles mutations et que l'efficacité semble plus importante qu'avec Lumacaftor/Ivacaftor, nous proposons d'analyser son impact sur le microbiote et l'inflammation pulmonaires et digestifs des patients, avec une attention particulière pour les patients colonisés à *P. aeruginosa*.

Nous avons donc soumis à l'appel d'offre 2021 de VLM le projet « Kaf-biota », afin de mettre en place une collection biologique multicentrique pour le recueil et le stockage des expectorations et des selles des 152 patients recueillis régulièrement (tous les 3 mois) durant la première année de traitement par Ivacaftor/Tezacaftor/Elexacaftor, et d'étudier notamment l'évolution du microbiote et de l'inflammation pulmonaires et digestifs.

### **2.3 EFFET D'UN TRAITEMENT PAR POLYETHYLENE GLYCOL SUR L'INFLAMMATION INTESTINALE DANS LA MUCOVISCIDOSE CHEZ L'ENFANT**

Si les progrès de prise en charge de la mucoviscidose accroissent l'espérance de vie des patients, d'autres problématiques émergent, notamment l'impact de l'inflammation intestinale associée à la mucoviscidose sur l'état nutritionnel, la croissance staturo-pondérale, et le surrisque élevé de cancers digestifs (Maisonneuve, 2013 ; Garg and Ooi, 2017 ; Yamada, 2018). Cependant, aucune prise en charge n'est actuellement proposée pour traiter cette inflammation intestinale.

Bien que les modulateurs de la protéine CFTR (Ivacaftor ; Lumacaftor/Ivacaftor) puissent être associés à une diminution des marqueurs de l'inflammation intestinale (Ooi et al., 2018; Tétard et al., 2020), ces traitements ne concernent que certaines mutations (et donc certains patients). D'autres traitements de l'inflammation intestinale ont été proposés : L'utilisation de probiotiques a fait l'objet de quelques études pilotes mais les résultats divergent. Les probiotiques ne sont donc pas recommandés à l'heure actuelle (Nikniaz, 2017). Enfin, la prescription d'immunosuppresseurs, proposés dans la maladie de Crohn, est difficilement envisageable chez ces patients pour lesquels les infections pulmonaires participent à la dégradation de la fonction respiratoire et altèreraient la balance bénéfice/risque d'un traitement par immunosuppresseur.

Dans ce contexte, l'utilisation de laxatifs pour fluidifier les sécrétions digestives et restaurer un écosystème digestif proche de celui du sujet sain pourrait constituer une nouvelle piste thérapeutique de cette inflammation intestinale, comme cela a précédemment été montré dans le modèle murin de mucoviscidose (De Lisle, 2007). Cependant à ce jour, à notre connaissance, aucune étude n'a évalué chez l'Homme l'effet d'un traitement laxatif sur l'inflammation intestinale de la mucoviscidose.

L'étude de phase 2 MUCOLAX (*Effet d'un traitement par polyéthylène glycol sur l'inflammation intestinale associée à la mucoviscidose chez l'enfant*) a donc été mis en place en septembre 2020 sur deux centres (CHU de Toulouse et Bordeaux, financement de l'Appel d'Offre Interne 2019 du CHU de Bordeaux - coordinateur : R. Enaud).

Son objectif principal est d'évaluer chez l'enfant de 4 à 18 ans l'efficacité d'un traitement de 3 mois par polyéthylène glycol (0,7 g/kg/j, avec une dose maximale de 20 g/j) sur l'inflammation intestinale associée à la mucoviscidose, via le dosage de la calprotectine fécale. Les objectifs secondaires sont notamment d'étudier l'efficacité de ce traitement sur les symptômes digestifs, la qualité de vie et le microbiote intestinal (bactérien et fongique). La coévolution de l'inflammation entre l'intestin et les poumons (« l'axe intestin-poumon ») sera également caractérisée.

Le nombre de sujets attendus est de 23 patients, selon les critères d'inclusion et d'exclusion détaillés en Annexe 6.

Le critère de jugement principal est la proportion de patients avec une calprotectine fécale < 250 µg/g mesurée par un test ELISA à 3 mois de l'initiation du traitement par polyéthylène glycol, témoignant de l'absence d'inflammation intestinale ou d'une inflammation légère.

Si les résultats de cette étude de phase 2 sont positifs, ils permettront de préparer un essai clinique randomisé multicentrique de phase 3. Si ce traitement s'avère efficace pour traiter l'inflammation intestinale de la mucoviscidose, cela pourrait constituer une proposition thérapeutique simple à mettre en place, peu coûteuse et avec très peu d'effets indésirables, dans cette indication où pour l'instant aucun traitement n'est proposé.

A terme, il sera aussi important d'évaluer au long court l'impact de la prise en charge de l'inflammation intestinale sur la prévalence des cancers digestifs dans la mucoviscidose.

### **3 CONCLUSION**

---

L'étude du myco-microbiote et de l'inflammation est un élément clé de la compréhension physiopathologique des atteintes respiratoires et intestinales de la mucoviscidose, mais également de l'évaluation de l'impact des traitements, notamment par modulateurs de la protéine CFTR chez les patients.

Nous avons ainsi pu préciser l'implication des différentes communautés microbiennes, et notamment fongiques, dans l'évolution de la fonction pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose. Nous avons également pu montrer que la diversité microbienne pulmonaire était améliorée chez les patients traités par Lumacaftor/Ivacaftor, mais que cet effet était conditionné par la non-colonisation à *Pseudomonas* à l'initiation du traitement.

En parallèle, nous avons montré que la calprotectine fécale, biomarqueur de l'inflammation intestinale, était dans la mucoviscidose associée à des perturbations du microbiote intestinal, et qu'elle diminuait sous Lumacaftor/Ivacaftor.

Des études longitudinales comprenant la coévolution du myco/microbiote et de l'inflammation, au niveau pulmonaire et intestinal, sont actuellement en cours et pourront permettre d'affiner les liens entre myco/microbiote et inflammation au sein de chaque tractus, mais également dans l'axe intestin-poumon.

# Références Bibliographiques

---



- Aalbers, B. L., de Winter-de Groot, K. M., Arets, H. G. M., Hofland, R. W., de Kiviet, A. C., van Oirschot-van de Ven, M. M. M., et al. (2020a). Clinical effect of lumacaftor/ivacaftor in F508del homozygous CF patients with FEV1  $\geq$  90% predicted at baseline. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 19, 654–658. doi:10.1016/j.jcf.2019.12.015.
- Aalbers, B. L., Hofland, R. W., Bronsveld, I., de Winter-de Groot, K. M., Arets, H. G. M., de Kiviet, A. C., et al. (2020b). Females with cystic fibrosis have a larger decrease in sweat chloride in response to lumacaftor/ivacaftor compared to males. *J. Cyst. Fibros.* doi:10.1016/j.jcf.2020.05.004.
- Aaron, S. D., Stephenson, A. L., Cameron, D. W., and Whitmore, G. A. (2015). A statistical model to predict one-year risk of death in patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Epidemiol.* 68, 1336–1345. doi:10.1016/j.jclinepi.2014.12.010.
- Abbott, J. (2009). Health-related quality of life measurement in cystic fibrosis: advances and limitations. *Chron. Respir. Dis.* 6, 31–41. doi:10.1177/1479972308098159.
- Abbott, J., Hart, A., Havermans, T., Matossian, A., Goldbeck, L., Barreto, C., et al. (2011). Measuring health-related quality of life in clinical trials in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 10 Suppl 2, S82-85. doi:10.1016/S1569-1993(11)60013-1.
- Abrahamsson, T. R., Jakobsson, H. E., Andersson, A. F., Björkstén, B., Engstrand, L., and Jenmalm, M. C. (2014). Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 44, 842–850. doi:10.1111/cea.12253.
- Acinas, S. G., Sarma-Rupavtarm, R., Klepac-Ceraj, V., and Polz, M. F. (2005). PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8966–8969. doi:10.1128/AEM.71.12.8966-8969.2005.
- Acosta, N., Heirali, A., Somayaji, R., Surette, M. G., Workentine, M. L., Sibley, C. D., et al. (2018). Sputum microbiota is predictive of long-term clinical outcomes in young adults with cystic fibrosis. *Thorax* 73, 1016–1025. doi:10.1136/thoraxjnl-2018-211510.
- Adriaanse, M. P. M., van der Sande, L. J. T. M., van den Neucker, A. M., Menheere, P. P. C. A., Dompeling, E., Buurman, W. A., et al. (2015). Evidence for a Cystic Fibrosis Enteropathy. *PLOS ONE* 10, e0138062. doi:10.1371/journal.pone.0138062.
- Äijö, T., Müller, C. L., and Bonneau, R. (2018). Temporal probabilistic modeling of bacterial compositions derived from 16S rRNA sequencing. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 34, 372–380. doi:10.1093/bioinformatics/btx549.
- Albert, P. S., and Shih, J. H. (2010). AN APPROACH FOR JOINTLY MODELING MULTIVARIATE LONGITUDINAL MEASUREMENTS AND DISCRETE TIME-TO-EVENT DATA. *Ann. Appl. Stat.* 4, 1517–1532. doi:10.1214/10-AOAS339.
- Allie, S. R., Bradley, J. E., Mudunuru, U., Schultz, M. D., Graf, B. A., Lund, F. E., et al. (2019). The establishment of resident memory B cells in the lung requires local antigen encounter. *Nat. Immunol.* 20, 97–108. doi:10.1038/s41590-018-0260-6.
- Al-Momani, H., Perry, A., Stewart, C. J., Jones, R., Krishnan, A., Robertson, A. G., et al. (2016). Microbiological profiles of sputum and gastric juice aspirates in Cystic Fibrosis patients. *Sci. Rep.* 6, 26985. doi:10.1038/srep26985.

- Alonso-Aleman, D., Barré, A., Beretta, S., Bonizzoni, P., Nikolski, M., and Valiente, G. (2014). Further steps in TANGO: improved taxonomic assignment in metagenomics. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 30, 17–23. doi:10.1093/bioinformatics/btt256.
- Amin, R., Dupuis, A., Aaron, S. D., and Ratjen, F. (2010a). The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest* 137, 171–176. doi:10.1378/chest.09-1103.
- Amin, R., Dupuis, A., Aaron, S. D., and Ratjen, F. (2010b). The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest* 137, 171–176. doi:10.1378/chest.09-1103.
- Amos, G. C. A., Logan, A., Anwar, S., Fritzsche, M., Mate, R., Bleazard, T., et al. (2020). Developing standards for the microbiome field. *Microbiome* 8, 98. doi:10.1186/s40168-020-00856-3.
- Anand, S., and Mande, S. S. (2018). Diet, Microbiota and Gut-Lung Connection. *Front. Microbiol.* 9, 2147. doi:10.3389/fmicb.2018.02147.
- Anderson, J. L., Miles, C., and Tierney, A. C. (2016). Effect of probiotics on respiratory, gastrointestinal and nutritional outcomes in patients with cystic fibrosis: A systematic review. *J. Cyst. Fibros.* 16, 186–197. doi:10.1016/j.jcf.2016.09.004.
- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 26, 32–46. doi:https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x.
- Andrinopoulou, E. R., Clancy, J. P., and Szczesniak, R. D. (2020). Multivariate joint modeling to identify markers of growth and lung function decline that predict cystic fibrosis pulmonary exacerbation onset. *BMC Pulm. Med.* 20. doi:10.1186/s12890-020-1177-z.
- Angebault, C., Payen, M., Woerther, P.-L., Rodriguez, C., and Botterel, F. (2020). Combined bacterial and fungal targeted amplicon sequencing of respiratory samples: Does the DNA extraction method matter? *PLoS ONE* 15. doi:10.1371/journal.pone.0232215.
- Antosca, K. M., Chernikova, D. A., Price, C. E., Ruoff, K. L., Li, K., Guill, M. F., et al. (2019). Altered Stool Microbiota of Infants with Cystic Fibrosis Shows a Reduction in Genera Associated with Immune Programming from Birth. *J. Bacteriol.* 201. doi:10.1128/JB.00274-19.
- Arrieta, M.-C., Arévalo, A., Stiemsma, L., Dimitriu, P., Chico, M. E., Loor, S., et al. (2018). Associations between infant fungal and bacterial dysbiosis and childhood atopic wheeze in a nonindustrialized setting. *J. Allergy Clin. Immunol.* 142, 424-434.e10. doi:10.1016/j.jaci.2017.08.041.
- Arrieta, M.-C., Stiemsma, L. T., Dimitriu, P. A., Thorson, L., Russell, S., Yurist-Doutsch, S., et al. (2015). Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci. Transl. Med.* 7, 307ra152. doi:10.1126/scitranslmed.aab2271.
- Arthur, J. C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J. M., Fan, T.-J., et al. (2012). Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 338, 120–123. doi:10.1126/science.1224820.
- Balmer, M. L., Schürch, C. M., Saito, Y., Geuking, M. B., Li, H., Cuenca, M., et al. (2014). Microbiota-derived compounds drive steady-state granulopoiesis via MyD88/TICAM signaling. *J. Immunol. Baltim. Md* 193, 5273–5283. doi:10.4049/jimmunol.1400762.

- Baltierra-Trejo, E., Sánchez-Yáñez, J. M., Buenrostro-Delgado, O., and Márquez-Benavides, L. (2015). Production of short-chain fatty acids from the biodegradation of wheat straw lignin by *Aspergillus fumigatus*. *Bioresour. Technol.* 196, 418–425. doi:10.1016/j.biortech.2015.07.105.
- Barratt, S. M., Leeds, J. S., Robinson, K., Shah, P. J., Lobo, A. J., McAlindon, M. E., et al. (2011). Reflux and irritable bowel syndrome are negative predictors of quality of life in coeliac disease and inflammatory bowel disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 23, 159–165. doi:10.1097/MEG.0b013e328342a547.
- Barry, P. J., Jones, A. M., Webb, A. K., and Horsley, A. R. (2014). Sweat chloride is not a useful marker of clinical response to Ivacaftor. *Thorax* 69, 586–587. doi:10.1136/thoraxjnl-2013-204532.
- Baxter, C. G., Dunn, G., Jones, A. M., Webb, K., Gore, R., Richardson, M. D., et al. (2013). Novel immunologic classification of aspergillosis in adult cystic fibrosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132, 560-566.e10. doi:10.1016/j.jaci.2013.04.007.
- Baxter, E. W., Graham, A. E., Re, N. A., Carr, I. M., Robinson, J. I., Mackie, S. L., et al. (2020). Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN $\gamma$ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *J. Immunol. Methods* 478, 112721. doi:10.1016/j.jim.2019.112721.
- Bazin, T., Hooks, K. B., Barnetche, T., Truchetet, M.-E., Enaud, R., Richez, C., et al. (2018). Microbiota Composition May Predict Anti-Tnf Alpha Response in Spondyloarthritis Patients: an Exploratory Study. *Sci. Rep.* 8, 5446. doi:10.1038/s41598-018-23571-4.
- Bell, S. C., Mall, M. A., Gutierrez, H., Macek, M., Madge, S., Davies, J. C., et al. (2020). The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *Lancet Respir. Med.* 8, 65–124. doi:10.1016/S2213-2600(19)30337-6.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 57, 289–300. doi:https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.
- Bernarde, C., Keravec, M., Mounier, J., Gouriou, S., Rault, G., Férec, C., et al. (2015). Impact of the CFTR-potentiator ivacaftor on airway microbiota in cystic fibrosis patients carrying a G551D mutation. *PloS One* 10, e0124124. doi:10.1371/journal.pone.0124124.
- Bhalla, M., Turcios, N., Aponte, V., Jenkins, M., Leitman, B. S., McCauley, D. I., et al. (1991). Cystic fibrosis: scoring system with thin-section CT. *Radiology* 179, 783–788. doi:10.1148/radiology.179.3.2027992.
- Bienenstock, J., Kunze, W., and Forsythe, P. (2015). Microbiota and the gut-brain axis. *Nutr. Rev.* 73 Suppl 1, 28–31. doi:10.1093/nutrit/nuv019.
- Bingula, R., Filaire, M., Radosevic-Robin, N., Bey, M., Berthon, J.-Y., Bernalier-Donadille, A., et al. (2017). Desired Turbulence? Gut-Lung Axis, Immunity, and Lung Cancer. *J. Oncol.* doi:10.1155/2017/5035371.
- Boutin, S., Gräber, S. Y., Wielpütz, M. O., Joachim, C., Wege, S., Sommerburg, O., et al. (2019). Effects of short-term lumacaftor/ivacaftor therapy on lung microbiome in F508del homozygous patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 18, S97–S98. doi:10.1016/S1569-1993(19)30436-9.

- Boyko, Y., Ivanova, V., Vakaruk, M., Kozina, T., Shevchenko, N., Vaizer, N., et al. (2020). Blood calprotectin in children with juvenile idiopathic arthritis: relationship to flare development after discontinuation of treatment. *Reumatologia* 58, 202–207. doi:10.5114/reum.2020.98431.
- Bradley, C. P., Teng, F., Felix, K. M., Sano, T., Naskar, D., Block, K. E., et al. (2017). Segmented Filamentous Bacteria Provoke Lung Autoimmunity by Inducing Gut-Lung Axis Th17 Cells Expressing Dual TCRs. *Cell Host Microbe* 22, 697-704.e4. doi:10.1016/j.chom.2017.10.007.
- Brecelj, J., Zidar, N., Jeruc, J., and Orel, R. (2016). Morphological and Functional Assessment of Oesophageal Mucosa Integrity in Children With Cystic Fibrosis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 62, 757–764. doi:10.1097/MPG.0000000000001131.
- Briard, B., Mislin, G. L. A., Latgé, J.-P., and Beauvais, A. (2019). Interactions between *Aspergillus fumigatus* and Pulmonary Bacteria: Current State of the Field, New Data, and Future Perspective. *J. Fungi Basel Switz.* 5. doi:10.3390/jof5020048.
- Brooks, J. P., Edwards, D. J., Harwich, M. D., Rivera, M. C., Fettweis, J. M., Serrano, M. G., et al. (2015). The truth about metagenomics: quantifying and counteracting bias in 16S rRNA studies. *BMC Microbiol.* 15. doi:10.1186/s12866-015-0351-6.
- Brown, R. L., Sequeira, R. P., and Clarke, T. B. (2017). The microbiota protects against respiratory infection via GM-CSF signaling. *Nat. Commun.* 8, 1512. doi:10.1038/s41467-017-01803-x.
- Bruzzese, E., Callegari, M. L., Raia, V., Viscovo, S., Scotto, R., Ferrari, S., et al. (2014). Disrupted intestinal microbiota and intestinal inflammation in children with cystic fibrosis and its restoration with *Lactobacillus* GG: a randomised clinical trial. *PLoS One* 9, e87796. doi:10.1371/journal.pone.0087796.
- Bruzzese, E., Raia, V., Gaudiello, G., Polito, G., Buccigrossi, V., Formicola, V., et al. (2004). Intestinal inflammation is a frequent feature of cystic fibrosis and is reduced by probiotic administration. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20, 813–819. doi:10.1111/j.1365-2036.2004.02174.x.
- Bui, S., Macey, J., Fayon, M., « nouvelles thérapeutiques de la Société Française pour la Mucoviscidose », Bihouée, T., Burgel, P.-R., et al. (2016). [New therapeutic developments in cystic fibrosis]. *Arch. Pediatr. Organe Off. Soc. Française Pédiatr.* 23, 12S47-12S53. doi:10.1016/S0929-693X(17)30062-3.
- Burgel, P.-R., Bellis, G., Olesen, H. V., Viviani, L., Zolin, A., Blasi, F., et al. (2015). Future trends in cystic fibrosis demography in 34 European countries. *Eur. Respir. J.* 46, 133–141. doi:10.1183/09031936.00196314.
- Burgel, P.-R., Munck, A., Durieu, I., Chiron, R., Mely, L., Prevotat, A., et al. (2020). Real-Life Safety and Effectiveness of Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 201, 188–197. doi:10.1164/rccm.201906-1227OC.
- Burke, D. G., Fouhy, F., Harrison, M. J., Rea, M. C., Cotter, P. D., O’Sullivan, O., et al. (2017). The altered gut microbiota in adults with cystic fibrosis. *BMC Microbiol.* 17, 58. doi:10.1186/s12866-017-0968-8.
- Buts, J.-P., Dekeyser, N., Stilmant, C., Delem, E., Smets, F., and Sokal, E. (2006). *Saccharomyces boulardii* produces in rat small intestine a novel protein phosphatase

- that inhibits *Escherichia coli* endotoxin by dephosphorylation. *Pediatr. Res.* 60, 24–29. doi:10.1203/01.pdr.0000220322.31940.29.
- Buzzetti, R., Alicandro, G., Minicucci, L., Notarnicola, S., Furnari, M. L., Giordano, G., et al. (2012). Validation of a predictive survival model in Italian patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 11, 24–29. doi:10.1016/j.jcf.2011.08.007.
- Cait, A., Hughes, M. R., Antignano, F., Cait, J., Dimitriu, P. A., Maas, K. R., et al. (2018). Microbiome-driven allergic lung inflammation is ameliorated by short-chain fatty acids. *Mucosal Immunol.* 11, 785–795. doi:10.1038/mi.2017.75.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., and Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J.* 11, 2639–2643. doi:10.1038/ismej.2017.119.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., and Holmes, S. P. (2016a). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. doi:10.1038/nmeth.3869.
- Callahan, B. J., Sankaran, K., Fukuyama, J. A., McMurdie, P. J., and Holmes, S. P. (2016b). Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Research* 5, 1492. doi:10.12688/f1000research.8986.2.
- Cantón, R., Cobos, N., de Gracia, J., Baquero, F., Honorato, J., Gartner, S., et al. (2005a). Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 690–703. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01217.x.
- Cantón, R., Cobos, N., de Gracia, J., Baquero, F., Honorato, J., Gartner, S., et al. (2005b). Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11, 690–703. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01217.x.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Costello, E. K., Berg-Lyons, D., Gonzalez, A., Stombaugh, J., et al. (2011). Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biol.* 12, R50. doi:10.1186/gb-2011-12-5-r50.
- Carlsen, K., Jakobsen, C., Kallemsø, T., Paerregaard, A., Riis, L. B., Munkholm, P., et al. (2017). F-calprotectin and Blood Markers Correlate to Quality of Life in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 65, 539–545. doi:10.1097/MPG.0000000000001540.
- Carmody, L. A., Caverly, L. J., Foster, B. K., Rogers, M. A. M., Kalikin, L. M., Simon, R. H., et al. (2018). Fluctuations in airway bacterial communities associated with clinical states and disease stages in cystic fibrosis. *PLoS One* 13, e0194060. doi:10.1371/journal.pone.0194060.
- Carmody, L. A., Zhao, J., Kalikin, L. M., LeBar, W., Simon, R. H., Venkataraman, A., et al. (2015). The daily dynamics of cystic fibrosis airway microbiota during clinical stability and at exacerbation. *Microbiome* 3, 12. doi:10.1186/s40168-015-0074-9.
- Carney, S. M., Clemente, J. C., Cox, M. J., Dickson, R. P., Huang, Y. J., Kitsios, G. D., et al. (2020). Methods in Lung Microbiome Research. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 62, 283–299. doi:10.1165/rcmb.2019-0273TR.

- Castagliuolo, I., Riegler, M. F., Valenick, L., LaMont, J. T., and Pothoulakis, C. (1999). *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect. Immun.* 67, 302–307.
- Caverly, L. J., and LiPuma, J. J. (2018). Cystic fibrosis respiratory microbiota: unraveling complexity to inform clinical practice. *Expert Rev. Respir. Med.* 12, 857–865. doi:10.1080/17476348.2018.1513331.
- Chang, S. (2015). Disease monitoring in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 21, 11246. doi:10.3748/wjg.v21.i40.11246.
- Charlson, E. S., Bittinger, K., Haas, A. R., Fitzgerald, A. S., Frank, I., Yadav, A., et al. (2011). Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184, 957–963. doi:10.1164/rccm.201104-0655OC.
- Chassagnon, G., Martin, C., Burgel, P.-R., Hubert, D., Fajac, I., Paragios, N., et al. (2018). An automated computed tomography score for the cystic fibrosis lung. *Eur. Radiol.* 28, 5111–5120. doi:10.1007/s00330-018-5516-x.
- Chiu, L., Bazin, T., Truchetet, M.-E., Schaefferbeke, T., Delhaes, L., and Pradeu, T. (2017). Protective Microbiota: From Localized to Long-Reaching Co-Immunity. *Front. Immunol.* 8, 1678. doi:10.3389/fimmu.2017.01678.
- Cho, I., and Blaser, M. J. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.* 13, 260–270. doi:10.1038/nrg3182.
- Chotirmall, S. H., O'Donoghue, E., Bennett, K., Gunaratnam, C., O'Neill, S. J., and McElvaney, N. G. (2010). Sputum *Candida albicans* presages FEV<sub>1</sub> decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis. *Chest* 138, 1186–1195. doi:10.1378/chest.09-2996.
- Chouliaras, G., Margoni, D., Dimakou, K., Fessatou, S., Panayiotou, I., and Roma-Giannikou, E. (2017). Disease impact on the quality of life of children with inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 23, 1067–1075. doi:10.3748/wjg.v23.i6.1067.
- Clancy, J. P., Cotton, C. U., Donaldson, S. H., Solomon, G. M., VanDevanter, D. R., Boyle, M. P., et al. (2019). CFTR modulator theratyping: Current status, gaps and future directions. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 18, 22–34. doi:10.1016/j.jcf.2018.05.004.
- Clarke, L. L., Gawenis, L. R., Bradford, E. M., Judd, L. M., Boyle, K. T., Simpson, J. E., et al. (2004). Abnormal Paneth cell granule dissolution and compromised resistance to bacterial colonization in the intestine of CF mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286, G1050-1058. doi:10.1152/ajpgi.00393.2003.
- Coburn, B., Wang, P. W., Diaz Caballero, J., Clark, S. T., Brahma, V., Donaldson, S., et al. (2015a). Lung microbiota across age and disease stage in cystic fibrosis. *Sci. Rep.* 5, 10241. doi:10.1038/srep10241.
- Coburn, B., Wang, P. W., Diaz Caballero, J., Clark, S. T., Brahma, V., Donaldson, S., et al. (2015b). Lung microbiota across age and disease stage in cystic fibrosis. *Sci. Rep.* 5, 10241. doi:10.1038/srep10241.
- Coffey, M. J., Garg, M., Homaira, N., Jaffe, A., and Ooi, C. Y. (2020). Probiotics for people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 1, CD012949. doi:10.1002/14651858.CD012949.pub2.

- Coffey, M. J., Nielsen, S., Wemheuer, B., Kaakoush, N. O., Garg, M., Needham, B., et al. (2019). Gut Microbiota in Children With Cystic Fibrosis: A Taxonomic and Functional Dysbiosis. *Sci. Rep.* 9. doi:10.1038/s41598-019-55028-7.
- Cogen, J., Emerson, J., Sanders, D. B., Ren, C., Schechter, M. S., Gibson, R. L., et al. (2015). Risk factors for lung function decline in a large cohort of young cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol.* 50, 763–770. doi:10.1002/ppul.23217.
- Conrad, D., Haynes, M., Salamon, P., Rainey, P. B., Youle, M., and Rohwer, F. (2013). Cystic fibrosis therapy: a community ecology perspective. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 48, 150–156. doi:10.1165/rcmb.2012-0059PS.
- Conrad, D. J., Bailey, B. A., Hardie, J. A., Bakke, P. S., Eagan, T. M. L., and Aarli, B. B. (2017). Median regression spline modeling of longitudinal FEV1 measurements in cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients. *PLoS ONE* 12. doi:10.1371/journal.pone.0190061.
- Coron, N., Pihet, M., Fréalle, E., Lemeille, Y., Pinel, C., Pelloux, H., et al. (2018a). Toward the Standardization of Mycological Examination of Sputum Samples in Cystic Fibrosis: Results from a French Multicenter Prospective Study. *Mycopathologia* 183, 101–117. doi:10.1007/s11046-017-0173-1.
- Coron, N., Pihet, M., Fréalle, E., Lemeille, Y., Pinel, C., Pelloux, H., et al. (2018b). Toward the Standardization of Mycological Examination of Sputum Samples in Cystic Fibrosis: Results from a French Multicenter Prospective Study. *Mycopathologia* 183, 101–117. doi:10.1007/s11046-017-0173-1.
- Corvol, H., Taytard, J., Tabary, O., Le Rouzic, P., Guillot, L., and Clement, A. (2015). Les enjeux de la médecine personnalisée appliquée à la mucoviscidose. *Arch. Pédiatrie* 22, 778–786. doi:10.1016/j.arcped.2015.04.015.
- Costea, P. I., Zeller, G., Sunagawa, S., Pelletier, E., Alberti, A., Levenez, F., et al. (2017). Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. *Nat. Biotechnol.* 35, 1069–1076. doi:10.1038/nbt.3960.
- Courtney, J. M., Bradley, J., Mccaughan, J., O'Connor, T. M., Shortt, C., Bredin, C. P., et al. (2007). Predictors of mortality in adults with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 42, 525–532. doi:10.1002/ppul.20619.
- Couto, M. R., Gonçalves, P., Catarino, T. A., and Martel, F. (2017). The Effect of Inflammatory Status on Butyrate and Folate Uptake by Tumoral (Caco-2) and Non-Tumoral (IEC-6) Intestinal Epithelial Cells. *Cell J.* 19, 96–105. doi:10.22074/cellj.2017.4859.
- Cox, M. J., Allgaier, M., Taylor, B., Baek, M. S., Huang, Y. J., Daly, R. A., et al. (2010). Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients. *PLoS One* 5, e11044. doi:10.1371/journal.pone.0011044.
- Cui, L., Morris, A., and Ghedin, E. (2013). The human mycobiome in health and disease. *Genome Med.* 5, 63. doi:10.1186/gm467.
- Cuthbertson, L., Rogers, G. B., Walker, A. W., Oliver, A., Green, L. E., Daniels, T. W. V., et al. (2016). Respiratory microbiota resistance and resilience to pulmonary exacerbation and subsequent antimicrobial intervention. *ISME J.* 10, 1081–1091. doi:10.1038/ismej.2015.198.

- Cuthbertson, L., Walker, A. W., Oliver, A. E., Rogers, G. B., Rivett, D. W., Hampton, T. H., et al. (2020). Lung function and microbiota diversity in cystic fibrosis. *Microbiome* 8, 45. doi:10.1186/s40168-020-00810-3.
- Dasenbrook, E. C., Checkley, W., Merlo, C. A., Konstan, M. W., Lechtzin, N., and Boyle, M. P. (2010). Association between respiratory tract methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and survival in cystic fibrosis. *JAMA* 303, 2386–2392. doi:10.1001/jama.2010.791.
- Dasenbrook, E. C., Merlo, C. A., Diener-West, M., Lechtzin, N., and Boyle, M. P. (2008). Persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and rate of FEV1 decline in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 814–821. doi:10.1164/rccm.200802-327OC.
- David, L. A., Materna, A. C., Friedman, J., Campos-Baptista, M. I., Blackburn, M. C., Perrotta, A., et al. (2014a). Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biol.* 15, R89. doi:10.1186/gb-2014-15-7-r89.
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., et al. (2014b). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505, 559–563. doi:10.1038/nature12820.
- Davidson, F., and Lock, R. J. (2017). Paediatric reference ranges for faecal calprotectin: a UK study. *Ann. Clin. Biochem.* 54, 214–218. doi:10.1177/0004563216639335.
- Davies, J. C., Cunningham, S., Harris, W. T., Lapey, A., Regelman, W. E., Sawicki, G. S., et al. (2016). Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of ivacaftor in patients aged 2–5 years with cystic fibrosis and a CFTR gating mutation (KIWI): an open-label, single-arm study. *Lancet Respir. Med.* 4, 107–115. doi:10.1016/S2213-2600(15)00545-7.
- Davies, J. C., Wainwright, C. E., Canny, G. J., Chilvers, M. A., Howenstine, M. S., Munck, A., et al. (2013). Efficacy and safety of ivacaftor in patients aged 6 to 11 years with cystic fibrosis with a G551D mutation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187, 1219–1225. doi:10.1164/rccm.201301-0153OC.
- Davis, N. M., Proctor, D. M., Holmes, S. P., Relman, D. A., and Callahan, B. J. (2018). Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome* 6, 226. doi:10.1186/s40168-018-0605-2.
- De Boeck, K., Munck, A., Walker, S., Faro, A., Hiatt, P., Gilmartin, G., et al. (2014). Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation. *J. Cyst. Fibros.* 13, 674–680. doi:10.1016/j.jcf.2014.09.005.
- de Freitas, M. B., Moreira, E. A. M., Tomio, C., Moreno, Y. M. F., Daltoe, F. P., Barbosa, E., et al. (2018). Altered intestinal microbiota composition, antibiotic therapy and intestinal inflammation in children and adolescents with cystic fibrosis. *PLoS One* 13, e0198457. doi:10.1371/journal.pone.0198457.
- De La Cochetière, M. F., Durand, T., Lepage, P., Bourreille, A., Galmiche, J. P., and Doré, J. (2005). Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5588–5592. doi:10.1128/JCM.43.11.5588-5592.2005.



- De Lisle, R. C. (2007). Altered transit and bacterial overgrowth in the cystic fibrosis mouse small intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293, G104-111. doi:10.1152/ajpgi.00548.2006.
- De Lisle, R. C., and Borowitz, D. (2013). The cystic fibrosis intestine. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3, a009753. doi:10.1101/cshperspect.a009753.
- De Lisle, R. C., Mueller, R., and Boyd, M. (2011). Impaired Mucosal Barrier Function in the Small Intestine of the Cystic Fibrosis Mouse: *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 53, 371–379. doi:10.1097/MPG.0b013e318219c397.
- Debray, D., El Mourabit, H., Merabtene, F., Brot, L., Ulveling, D., Chrétien, Y., et al. (2018). Diet-Induced Dysbiosis and Genetic Background Synergize With Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Deficiency to Promote Cholangiopathy in Mice. *Hepatology* 67, 1533–1549. doi:10.1002/hep4.1266.
- Decaestecker, T., Seys, S., Hox, V., Dilissen, E., Marijsse, G., Manhaeghe, L., et al. (2017). Serum and sputum calprotectin, a reflection of neutrophilic airway inflammation in asthmatics after high-altitude exposure. *Clin. Exp. Allergy* 47, 1675–1677. doi:10.1111/cea.13043.
- del Campo, R., Garriga, M., Pérez-Aragón, A., Guallarte, P., Lamas, A., Máiz, L., et al. (2014). Improvement of digestive health and reduction in proteobacterial populations in the gut microbiota of cystic fibrosis patients using a *Lactobacillus reuteri* probiotic preparation: A double blind prospective study. *J. Cyst. Fibros.* 13, 716–722. doi:10.1016/j.jcf.2014.02.007.
- Delhaes, L., Monchy, S., Fréalle, E., Hubans, C., Salleron, J., Leroy, S., et al. (2012). The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community--implications for therapeutic management. *PloS One* 7, e36313. doi:10.1371/journal.pone.0036313.
- Delhaes, L., Touati, K., Faure-Cognet, O., Cornet, M., Botterel, F., Dannaoui, E., et al. (2018). Prevalence, geographic risk factor, and development of a standardized protocol for fungal isolation in cystic fibrosis: Results from the international prospective study “MFIP.” *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* doi:10.1016/j.jcf.2018.10.001.
- Dhaliwal, J., Leach, S., Katz, T., Nahidi, L., Pang, T., Lee, J. M., et al. (2015). Intestinal Inflammation and Impact on Growth in Children With Cystic Fibrosis: *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 60, 521–526. doi:10.1097/MPG.0000000000000683.
- Dhariwal, A., Chong, J., Habib, S., King, I. L., Agellon, L. B., and Xia, J. (2017). MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res.* 45, W180–W188. doi:10.1093/nar/gkx295.
- Diaz, P. I., Xie, Z., Sobue, T., Thompson, A., Biyikoglu, B., Ricker, A., et al. (2012). Synergistic Interaction between *Candida albicans* and Commensal Oral Streptococci in a Novel In Vitro Mucosal Model. *Infect. Immun.* 80, 620–632. doi:10.1128/IAI.05896-11.
- Dicker, A. J., Crichton, M. L., Cassidy, A. J., Brady, G., Hapca, A., Tavendale, R., et al. (2018). Genetic mannose binding lectin deficiency is associated with airway microbiota diversity and reduced exacerbation frequency in COPD. *Thorax* 73, 510–518. doi:10.1136/thoraxjnl-2016-209931.

- Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R., Falkowski, N. R., Hunter, E. M., Ashley, S. L., and Huffnagle, G. B. (2018). The Lung Microbiota of Healthy Mice Are Highly Variable, Cluster by Environment, and Reflect Variation in Baseline Lung Innate Immunity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 198, 497–508. doi:10.1164/rccm.201711-2180OC.
- Dickson, R. P., Singer, B. H., Newstead, M. W., Falkowski, N. R., Erb-Downward, J. R., Standiford, T. J., et al. (2016). Enrichment of the lung microbiome with gut bacteria in sepsis and the acute respiratory distress syndrome. *Nat. Microbiol.* 1, 16113. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.113.
- DiGiulio, D. B., Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Costello, E. K., Lyell, D. J., Robaczewska, A., et al. (2015). Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 11060–11065. doi:10.1073/pnas.1502875112.
- Döring, G., Bareth, H., Gairing, A., Wolz, C., and Botzenhart, K. (1989). Genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* sputum and stool isolates from cystic fibrosis patients: evidence for intestinal colonization and spreading into toilets. *Epidemiol. Infect.* 103, 555–564.
- Dorsey, J., and Gonska, T. (2017). Bacterial overgrowth, dysbiosis, inflammation, and dysmotility in the Cystic Fibrosis intestine. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 16 Suppl 2, S14–S23. doi:10.1016/j.jcf.2017.07.014.
- Ducarmon, Q. R., Hornung, B. V. H., Geelen, A. R., Kuijper, E. J., and Zwitterink, R. D. (2020). Toward Standards in Clinical Microbiota Studies: Comparison of Three DNA Extraction Methods and Two Bioinformatic Pipelines. *mSystems* 5. doi:10.1128/mSystems.00547-19.
- Durack, J., Lynch, S. V., Nariya, S., Bhakta, N. R., Beigelman, A., Castro, M., et al. (2017). Features of the bronchial bacterial microbiome associated with atopy, asthma, and responsiveness to inhaled corticosteroid treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.* 140, 63–75. doi:10.1016/j.jaci.2016.08.055.
- Durmowicz, A. G., Witzmann, K. A., Rosebraugh, C. J., and Chowdhury, B. A. (2013). Change in sweat chloride as a clinical end point in cystic fibrosis clinical trials: the ivacaftor experience. *Chest* 143, 14–18. doi:10.1378/chest.12-1430.
- Duytschaever, G., Huys, G., Bekaert, M., Boulanger, L., De Boeck, K., and Vandamme, P. (2011). Cross-sectional and longitudinal comparisons of the predominant fecal microbiota compositions of a group of pediatric patients with cystic fibrosis and their healthy siblings. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8015–8024. doi:10.1128/AEM.05933-11.
- Duytschaever, G., Huys, G., Bekaert, M., Boulanger, L., De Boeck, K., and Vandamme, P. (2013). Dysbiosis of bifidobacteria and *Clostridium* cluster XIVa in the cystic fibrosis fecal microbiota. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 12, 206–215. doi:10.1016/j.jcf.2012.10.003.
- Elborn, J. S., Ramsey, B. W., Boyle, M. P., Konstan, M. W., Huang, X., Marigowda, G., et al. (2016). Efficacy and safety of lumacaftor/ivacaftor combination therapy in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR by pulmonary function subgroup: a pooled analysis. *Lancet Respir. Med.* 4, 617–626. doi:10.1016/S2213-2600(16)30121-7.
- Ellemunter, H., Engelhardt, A., Schüller, K., and Steinkamp, G. (2017). Fecal Calprotectin in Cystic Fibrosis and Its Relation to Disease Parameters: A Longitudinal Analysis for 12

Years. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 65, 438–442. doi:10.1097/MPG.0000000000001544.

- Elson, C. O., and Alexander, K. L. (2015). Host-microbiota interactions in the intestine. *Dig. Dis. Basel Switz.* 33, 131–136. doi:10.1159/000369534.
- Emerson J, Rosenfeld, M, McNamara S, Ramsey B, and Gibson RL (2002). *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 91–100.
- Enaud, R., Hooks, K. B., Barre, A., Barnetche, T., Hubert, C., Massot, M., et al. (2019). Intestinal Inflammation in Children with Cystic Fibrosis Is Associated with Crohn's-Like Microbiota Disturbances. *J. Clin. Med.* 8. doi:10.3390/jcm8050645.
- Enaud, R., Prevel, R., Ciarlo, E., Beaufils, F., Wieërs, G., Guery, B., et al. (2020). The Gut-Lung Axis in Health and Respiratory Diseases: A Place for Inter-Organ and Inter-Kingdom Crosstalks. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10. doi:10.3389/fcimb.2020.00009.
- Enaud, R., Vandenberght, L.-E., Coron, N., Bazin, T., Prevel, R., Schaeveerbeke, T., et al. (2018). The Mycobioome: A Neglected Component in the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Microorganisms* 6. doi:10.3390/microorganisms6010022.
- Esposito, S., Colombo, C., Tosco, A., Montemiro, E., Volpi, S., Ruggiero, L., et al. (2016). *Streptococcus pneumoniae* oropharyngeal colonization in children and adolescents with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 15, 366–371. doi:10.1016/j.jcf.2015.05.008.
- Esther, C. R., Lin, F.-C., Kerr, A., Miller, M. B., and Gilligan, P. H. (2014). Respiratory viruses are associated with common respiratory pathogens in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 49, 926–931. doi:10.1002/ppul.22917.
- Fagundes, C. T., Amaral, F. A., Vieira, A. T., Soares, A. C., Pinho, V., Nicoli, J. R., et al. (2012). Transient TLR activation restores inflammatory response and ability to control pulmonary bacterial infection in germfree mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 1411–1420. doi:10.4049/jimmunol.1101682.
- Farrell, P. M., White, T. B., Ren, C. L., Hempstead, S. E., Accurso, F., Derichs, N., et al. (2017). Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J. Pediatr.* 181S, S4-S15.e1. doi:10.1016/j.jpeds.2016.09.064.
- Faust, K., Lahti, L., Gonze, D., de Vos, W. M., and Raes, J. (2015). Metagenomics meets time series analysis: unraveling microbial community dynamics. *Curr. Opin. Microbiol.* 25, 56–66. doi:10.1016/j.mib.2015.04.004.
- Fidler, K. J., Hilliard, T. N., Bush, A., Johnson, M., Geddes, D. M., Turner, M. W., et al. (2009). Mannose-binding lectin is present in the infected airway: a possible pulmonary defence mechanism. *Thorax* 64, 150–155. doi:10.1136/thx.2008.100073.
- Fidler, M. C., Beusmans, J., Panorchan, P., and Van Goor, F. (2017). Correlation of sweat chloride and percent predicted FEV1 in cystic fibrosis patients treated with ivacaftor. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 16, 41–44. doi:10.1016/j.jcf.2016.10.002.
- Flass, T., Tong, S., Frank, D. N., Wagner, B. D., Robertson, C. E., Kotter, C. V., et al. (2015). Intestinal lesions are associated with altered intestinal microbiome and are more frequent in children and young adults with cystic fibrosis and cirrhosis. *PloS One* 10, e0116967. doi:10.1371/journal.pone.0116967.

- Flight, W. G., Bright-Thomas, R. J., Tilston, P., Mutton, K. J., Guiver, M., Morris, J., et al. (2014). Incidence and clinical impact of respiratory viruses in adults with cystic fibrosis. *Thorax* 69, 247–253. doi:10.1136/thoraxjnl-2013-204000.
- Flume, P. A., Strange, C., Ye, X., Ebeling, M., Hulse, T., and Clark, L. L. (2005). Pneumothorax in Cystic Fibrosis. *Chest* 128, 720–728. doi:10.1378/chest.128.2.720.
- Flume P, Sawicki G, Pressler T, Schwarz C, Fajac I, Layish D, et al. (2018). WS01.2 Phase 2 initial results evaluating PTI-428, a novel CFTR amplifier, in patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 17, S1–S2. doi:10.1016/S1569-1993(18)30120-6.
- Flynn, J. M., Niccum, D., Dunitz, J. M., and Hunter, R. C. (2016). Evidence and Role for Bacterial Mucin Degradation in Cystic Fibrosis Airway Disease. *PLoS Pathog.* 12, e1005846. doi:10.1371/journal.ppat.1005846.
- Fodor, A. A., Klem, E. R., Gilpin, D. F., Elborn, J. S., Boucher, R. C., Tunney, M. M., et al. (2012). The adult cystic fibrosis airway microbiota is stable over time and infection type, and highly resilient to antibiotic treatment of exacerbations. *PloS One* 7, e45001. doi:10.1371/journal.pone.0045001.
- Fox, A. C., McConnell, K. W., Yoseph, B. P., Breed, E., Liang, Z., Clark, A. T., et al. (2012). The endogenous bacteria alter gut epithelial apoptosis and decrease mortality following *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Shock Augusta Ga* 38, 508–514. doi:10.1097/SHK.0b013e31826e47e8.
- Frayman, K. B., Armstrong, D. S., Carzino, R., Ferkol, T. W., Grimwood, K., Storch, G. A., et al. (2017). The lower airway microbiota in early cystic fibrosis lung disease: a longitudinal analysis. *Thorax* 72, 1104–1112. doi:10.1136/thoraxjnl-2016-209279.
- Frayman, K. B., Wylie, K. M., Armstrong, D. S., Carzino, R., Davis, S. D., Ferkol, T. W., et al. (2019). Differences in the lower airway microbiota of infants with and without cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 18, 646–652. doi:10.1016/j.jcf.2018.12.003.
- Fréalte, E., Decrucq, K., Botterel, F., Bouchindhomme, B., Camus, D., Dei-Cas, E., et al. (2009). Diagnosis of invasive aspergillosis using bronchoalveolar lavage in haematology patients: influence of bronchoalveolar lavage human DNA content on real-time PCR performance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 28, 223–232. doi:10.1007/s10096-008-0616-1.
- Frey, D. L., Boutin, S., Dittrich, S. A., Graeber, S. Y., Stahl, M., Wege, S., et al. (2021). Relationship between airway dysbiosis, inflammation and lung function in adults with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* doi:10.1016/j.jcf.2020.12.022.
- Frost, F. J., Nazareth, D. S., Charman, S. C., Winstanley, C., and Walshaw, M. J. (2019). Ivacaftor Is Associated with Reduced Lung Infection by Key Cystic Fibrosis Pathogens. A Cohort Study Using National Registry Data. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 16, 1375–1382. doi:10.1513/AnnalsATS.201902-122OC.
- Fulde, M., Sommer, F., Chassaing, B., van Vorst, K., Dupont, A., Hensel, M., et al. (2018). Neonatal selection by Toll-like receptor 5 influences long-term gut microbiota composition. *Nature* 560, 489–493. doi:10.1038/s41586-018-0395-5.
- Gao, B., Gallagher, T., Zhang, Y., Elbadawi-Sidhu, M., Lai, Z., Fiehn, O., et al. (2018). Tracking Polymicrobial Metabolism in Cystic Fibrosis Airways: *Pseudomonas aeruginosa*

Metabolism and Physiology Are Influenced by *Rothia mucilaginosa*-Derived Metabolites. *mSphere* 3. doi:10.1128/mSphere.00151-18.

- García-Nuñez, M., Millares, L., Pomares, X., Ferrari, R., Pérez-Brocal, V., Gallego, M., et al. (2014). Severity-related changes of bronchial microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Microbiol.* 52, 4217–4223. doi:10.1128/JCM.01967-14.
- Garg, M., Leach, S. T., Coffey, M. J., Katz, T., Strachan, R., Pang, T., et al. (2017a). Age-dependent variation of fecal calprotectin in cystic fibrosis and healthy children. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 16, 631–636. doi:10.1016/j.jcf.2017.03.010.
- Garg, M., Leach, S. T., Pang, T., Needham, B., Coffey, M. J., Katz, T., et al. (2018). Age-related levels of fecal M2-pyruvate kinase in children with cystic fibrosis and healthy children 0 to 10 years old. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 17, 109–113. doi:10.1016/j.jcf.2017.07.011.
- Garg, M., and Ooi, C. Y. (2017). The Enigmatic Gut in Cystic Fibrosis: Linking Inflammation, Dysbiosis, and the Increased Risk of Malignancy. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 19, 6. doi:10.1007/s11894-017-0546-0.
- Garg, N., Wang, M., Hyde, E., da Silva, R. R., Melnik, A. V., Protsyuk, I., et al. (2017b). Three-Dimensional Microbiome and Metabolome Cartography of a Diseased Human Lung. *Cell Host Microbe* 22, 705–716.e4. doi:10.1016/j.chom.2017.10.001.
- Garrett, W. S., Lord, G. M., Punit, S., Lugo-Villarino, G., Mazmanian, S., Ito, S., et al. (2007). Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell* 131, 33–45. doi:10.1016/j.cell.2007.08.017.
- Gauguet, S., D'Ortona, S., Ahnger-Pier, K., Duan, B., Surana, N. K., Lu, R., et al. (2015). Intestinal Microbiota of Mice Influences Resistance to *Staphylococcus aureus* Pneumonia. *Infect. Immun.* 83, 4003–4014. doi:10.1128/IAI.00037-15.
- Gee, L., Abbott, J., Conway, S. P., Etherington, C., and Webb, A. K. (2003). Quality of life in cystic fibrosis: the impact of gender, general health perceptions and disease severity. *J. Cyst. Fibros.* 2, 206–213. doi:10.1016/S1569-1993(03)00093-6.
- Gee, L., Abbott, J., Hart, A., Conway, S. P., Etherington, C., and Webb, A. K. (2005). Associations between clinical variables and quality of life in adults with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 4, 59–66. doi:10.1016/j.jcf.2004.12.005.
- Gelfond, D., and Borowitz, D. (2013). Gastrointestinal Complications of Cystic Fibrosis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 333–342. doi:10.1016/j.cgh.2012.11.006.
- Gerber, G. K. (2014). The dynamic microbiome. *FEBS Lett.* 588, 4131–4139. doi:10.1016/j.febslet.2014.02.037.
- Gerber, G. K., Onderdonk, A. B., and Bry, L. (2012). Inferring Dynamic Signatures of Microbes in Complex Host Ecosystems. *PLOS Comput. Biol.* 8, e1002624. doi:10.1371/journal.pcbi.1002624.
- Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L. A., Vázquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Ren, B., et al. (2014). The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe* 15, 382–392. doi:10.1016/j.chom.2014.02.005.

- Giatsis, C., Sipkema, D., Smidt, H., Verreth, J., and Verdegem, M. (2014). The Colonization Dynamics of the Gut Microbiota in Tilapia Larvae. *PLOS ONE* 9, e103641. doi:10.1371/journal.pone.0103641.
- Gibson, T. E., and Gerber, G. K. (2018). Robust and Scalable Models of Microbiome Dynamics. *ArXiv180504591 Cs Stat*. Available at: <http://arxiv.org/abs/1805.04591> [Accessed January 9, 2021].
- Gill, H. S., Rutherford, K. J., Cross, M. L., and Gopal, P. K. (2001). Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 833–839. doi:10.1093/ajcn/74.6.833.
- Gilligan, P. H. (2014). Infections in patients with cystic fibrosis: diagnostic microbiology update. *Clin. Lab. Med.* 34, 197–217. doi:10.1016/j.cll.2014.02.001.
- Glassman, S. I., and Martiny, J. B. H. (2018). Broadscale Ecological Patterns Are Robust to Use of Exact Sequence Variants versus Operational Taxonomic Units. *mSphere* 3. doi:10.1128/mSphere.00148-18.
- Gleeson, K., Eggli, D. F., and Maxwell, S. L. (1997). Quantitative aspiration during sleep in normal subjects. *Chest* 111, 1266–1272.
- Gloor, G. B., Macklaim, J. M., Vu, M., and Fernandes, A. D. (2016). Compositional uncertainty should not be ignored in high-throughput sequencing data analysis. *Austrian J. Stat.* 45, 73–87. doi:10.17713/ajs.v45i4.122.
- Goffard, A., Lambert, V., Salleron, J., Herwegh, S., Engelmann, I., Pinel, C., et al. (2014). Virus and cystic fibrosis: rhinoviruses are associated with exacerbations in adult patients. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 60, 147–153. doi:10.1016/j.jcv.2014.02.005.
- Goldbeck, L., Zerrer, S., and Schmitz, T. G. (2007). Monitoring quality of life in outpatients with cystic fibrosis: Feasibility and longitudinal results. *J. Cyst. Fibros.* 6, 171–178. doi:10.1016/j.jcf.2006.06.005.
- Goldstein, W., and Döring, G. (1986). Lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes and proteinase inhibitors in patients with cystic fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134, 49–56. doi:10.1164/arrd.1986.134.1.49.
- Gollwitzer, E. S., Saglani, S., Trompette, A., Yadava, K., Sherburn, R., McCoy, K. D., et al. (2014). Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nat. Med.* 20, 642–647. doi:10.1038/nm.3568.
- Gray, R. D., Imrie, M., Boyd, A. C., Porteous, D., Innes, J. A., and Greening, A. P. (2010). Sputum and serum calprotectin are useful biomarkers during CF exacerbation. *J. Cyst. Fibros.* 9, 193–198. doi:10.1016/j.jcf.2010.01.005.
- Gray, R. D., MacGregor, G., Noble, D., Imrie, M., Dewar, M., Boyd, A. C., et al. (2008). Sputum Proteomics in Inflammatory and Suppurative Respiratory Diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 444–452. doi:10.1164/rccm.200703-409OC.
- Grier, A., McDavid, A., Wang, B., Qiu, X., Java, J., Bandyopadhyay, S., et al. (2018). Neonatal gut and respiratory microbiota: coordinated development through time and space. *Microbiome* 6, 193. doi:10.1186/s40168-018-0566-5.

- Guilloud-Bataille, M., De Crozes, D., Rault, G., Degioanni, A., and Feingold, J. (2000). Cystic Fibrosis Mutations: Report from the French Registry. *Hum. Hered.* 50, 142–145.
- Guimbellot, J. S., Baines, A., Paynter, A., Heltshe, S. L., VanDalfsen, J., Jain, M., et al. (2020). Long term clinical effectiveness of ivacaftor in people with the G551D CFTR mutation. *J. Cyst. Fibros.* doi:10.1016/j.jcf.2020.11.008.
- Guo, J., Yu, L., Turro, N. J., and Ju, J. (2010). An Integrated System for DNA Sequencing by Synthesis Using Novel Nucleotide Analogues. *Acc. Chem. Res.* 43, 551–563. doi:10.1021/ar900255c.
- Harris, J. K., Wagner, B. D., Zemanick, E. T., Robertson, C. E., Stevens, M. J., Heltshe, S. L., et al. (2020). Changes in Airway Microbiome and Inflammation with Ivacaftor Treatment in Patients with Cystic Fibrosis and the G551D Mutation. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 17, 212–220. doi:10.1513/AnnalsATS.201907-493OC.
- Heijerman, H. G. M., McKone, E. F., Downey, D. G., Van Braeckel, E., Rowe, S. M., Tullis, E., et al. (2019). Efficacy and safety of the elexacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* 394, 1940–1948. doi:10.1016/S0140-6736(19)32597-8.
- Heltshe, S. L., Mayer-Hamblett, N., Burns, J. L., Khan, U., Baines, A., Ramsey, B. W., et al. (2015). Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients with G551D-CFTR treated with ivacaftor. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 60, 703–712. doi:10.1093/cid/ciu944.
- Henker, R., Oltmanns, A., Wald, A., Tuennemann, J., Opitz, S., Hoffmeister, A., et al. (2019). Severe ileocecal inflammatory syndrome in adult patients with cystic fibrosis. *Z. Gastroenterol.* 57, 312–316. doi:10.1055/a-0829-7050.
- Herbst, T., Sichelstiel, A., Schär, C., Yadava, K., Bürki, K., Cahenzli, J., et al. (2011). Dysregulation of allergic airway inflammation in the absence of microbial colonization. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184, 198–205. doi:10.1164/rccm.201010-1574OC.
- Hill, E. M. (2017). The Emergence of Streptococcus anginosus Group as a Cystic Fibrosis Pathogen. *Clin. Microbiol. Newsl.* 39, 143–147. doi:10.1016/j.clinmicnews.2017.09.002.
- Ho, N. T., Li, F., Wang, S., and Kuhn, L. (2019). metamicrobiomeR: an R package for analysis of microbiome relative abundance data using zero-inflated beta GAMLSS and meta-analysis across studies using random effects models. *BMC Bioinformatics* 20, 188. doi:10.1186/s12859-019-2744-2.
- Hoehn, A. G., Li, J., Moulton, L. A., O'Toole, G. A., Housman, M. L., Koestler, D. C., et al. (2015). Associations between Gut Microbial Colonization in Early Life and Respiratory Outcomes in Cystic Fibrosis. *J. Pediatr.* 167, 138–147.e3. doi:10.1016/j.jpeds.2015.02.049.
- Hoffman, L. R., Pope, C. E., Hayden, H. S., Heltshe, S., Levy, R., McNamara, S., et al. (2014). Escherichia coli dysbiosis correlates with gastrointestinal dysfunction in children with cystic fibrosis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 58, 396–399. doi:10.1093/cid/cit715.

- Hoffmann, C., Dollive, S., Grunberg, S., Chen, J., Li, H., Wu, G. D., et al. (2013). Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PLoS One* 8, e66019. doi:10.1371/journal.pone.0066019.
- Hogan, D. A., Willger, S. D., Dolben, E. L., Hampton, T. H., Stanton, B. A., Morrison, H. G., et al. (2016). Analysis of Lung Microbiota in Bronchoalveolar Lavage, Protected Brush and Sputum Samples from Subjects with Mild-To-Moderate Cystic Fibrosis Lung Disease. *PLoS One* 11, e0149998. doi:10.1371/journal.pone.0149998.
- Huang, Y., Mao, K., Chen, X., Sun, M.-A., Kawabe, T., Li, W., et al. (2018). S1P-dependent interorgan trafficking of group 2 innate lymphoid cells supports host defense. *Science* 359, 114–119. doi:10.1126/science.aam5809.
- Hubeau, C., Naour, R. L., Abély, M., Hinnrasky, J., Guenounou, M., Gaillard, D., et al. (2004). Dysregulation of IL-2 and IL-8 production in circulating T lymphocytes from young cystic fibrosis patients. *Clin. Exp. Immunol.* 135, 528–534. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2003.02385.x.
- Hubert, D., Réglie-Poupet, H., Sermet-Gaudelus, I., Ferroni, A., Le Bourgeois, M., Burgel, P.-R., et al. (2013). Association between *Staphylococcus aureus* alone or combined with *Pseudomonas aeruginosa* and the clinical condition of patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 12, 497–503. doi:10.1016/j.jcf.2012.12.003.
- Huffnagle, G. B., and Noverr, M. C. (2013). The emerging world of the fungal microbiome. *Trends Microbiol.* 21, 334–341. doi:10.1016/j.tim.2013.04.002.
- Human Microbiome Project Consortium (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486, 207–214. doi:10.1038/nature11234.
- Huseyin, C. E., O'Toole, P. W., Cotter, P. D., and Scanlan, P. D. (2017). Forgotten fungi-the gut mycobiome in human health and disease. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 479–511. doi:10.1093/femsre/fuw047.
- Hynes, M. J., Murray, S. L., Khew, G. S., and Davis, M. A. (2008). Genetic analysis of the role of peroxisomes in the utilization of acetate and fatty acids in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 178, 1355–1369. doi:10.1534/genetics.107.085795.
- Ichinohe, T., Pang, I. K., Kumamoto, Y., Peaper, D. R., Ho, J. H., Murray, T. S., et al. (2011). Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5354–5359. doi:10.1073/pnas.1019378108.
- Ihrmark, K., Bödeker, I. T. M., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., et al. (2012). New primers to amplify the fungal ITS2 region--evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82, 666–677. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x.
- Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium (2014). The Integrative Human Microbiome Project: dynamic analysis of microbiome-host omics profiles during periods of human health and disease. *Cell Host Microbe* 16, 276–289. doi:10.1016/j.chom.2014.08.014.
- Jafari, S.-A., Mehdizadeh-Hakkak, A., Kianifar, H.-R., Hebrani, P., Ahanchian, H., and Abbasnejad, E. (2013). Effects of Probiotics on Quality of Life in Children with Cystic Fibrosis; *Iran J Pediatr* 23, 6.



- Jennings, M. T., Riekert, K. A., and Boyle, M. P. (2014). Update on Key Emerging Challenges in Cystic Fibrosis. *Med. Princ. Pract.* 23, 393–402. doi:10.1159/000357646.
- Jerkic, S. P., Michel, F., Donath, H., Herrmann, E., Schubert, R., Rosewich, M., et al. (2020). Calprotectin as a New Sensitive Marker of Neutrophilic Inflammation in Patients with Bronchiolitis Obliterans. *Mediators Inflamm.* 2020, e4641585. doi:10.1155/2020/4641585.
- Ji, B. W., Sheth, R. U., Dixit, P. D., Wang, H. H., and Vitkup, D. (2019). Quantifying spatiotemporal dynamics and noise in absolute microbiota abundances using replicate sampling. *bioRxiv*, 310649. doi:10.1101/310649.
- Jiang, T. T., Shao, T.-Y., Ang, W. X. G., Kinder, J. M., Turner, L. H., Pham, G., et al. (2017). Commensal Fungi Recapitulate the Protective Benefits of Intestinal Bacteria. *Cell Host Microbe* 22, 809-816.e4. doi:10.1016/j.chom.2017.10.013.
- Jones, A. M. (2011). Anaerobic bacteria in cystic fibrosis: pathogens or harmless commensals? *Thorax* 66, 558–559. doi:10.1136/thx.2010.157875.
- Joshi, D., Ehrhardt, A., Hong, J. S., and Sorscher, E. J. (2019). Cystic fibrosis precision therapeutics: Emerging considerations. *Pediatr. Pulmonol.* 54 Suppl 3, S13–S17. doi:10.1002/ppul.24547.
- Karmarkar, D., and Rock, K. L. (2013). Microbiota signalling through MyD88 is necessary for a systemic neutrophilic inflammatory response. *Immunology* 140, 483–492. doi:10.1111/imm.12159.
- Kasper, J. Y., Hermanns, M. I., Cavalius, C., Kraegeloh, A., Jung, T., Danzebrink, R., et al. (2016). The role of the intestinal microvasculature in inflammatory bowel disease: studies with a modified Caco-2 model including endothelial cells resembling the intestinal barrier in vitro. *Int. J. Nanomedicine* 11, 6353–6364. doi:10.2147/IJN.S92608.
- Keating, D., Marigowda, G., Burr, L., Daines, C., Mall, M. A., McKone, E. F., et al. (2018). VX-445-Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. *N. Engl. J. Med.* 379, 1612–1620. doi:10.1056/NEJMoa1807120.
- Keller, J. (2005). Human pancreatic exocrine response to nutrients in health and disease. *Gut* 54, 1–28. doi:10.1136/gut.2005.065946.
- Kennedy, K., Hall, M. W., Lynch, M. D. J., Moreno-Hagelsieb, G., and Neufeld, J. D. (2014). Evaluating Bias of Illumina-Based Bacterial 16S rRNA Gene Profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 5717–5722. doi:10.1128/AEM.01451-14.
- Keogh, R. H., Szczesniak, R., Taylor-Robinson, D., and Bilton, D. (2018). Up-to-date and projected estimates of survival for people with cystic fibrosis using baseline characteristics: A longitudinal study using UK patient registry data. *J. Cyst. Fibros.* 17, 218–227. doi:10.1016/j.jcf.2017.11.019.
- Kerem, E., Viviani, L., Zolin, A., MacNeill, S., Hatziaorou, E., Ellemunter, H., et al. (2014). Factors associated with FEV1 decline in cystic fibrosis: analysis of the ECFS patient registry. *Eur. Respir. J.* 43, 125–133. doi:10.1183/09031936.00166412.
- Khokhlova, E. V., Smeianov, V. V., Efimov, B. A., Kafarskaia, L. I., Pavlova, S. I., and Shkoporov, A. N. (2012). Anti-inflammatory properties of intestinal Bifidobacterium strains isolated from healthy infants. *Microbiol. Immunol.* 56, 27–39. doi:10.1111/j.1348-0421.2011.00398.x.

- Kim, Y.-G., Udayanga, K. G. S., Totsuka, N., Weinberg, J. B., Núñez, G., and Shibuya, A. (2014). Gut dysbiosis promotes M2 macrophage polarization and allergic airway inflammation via fungi-induced PGE<sub>2</sub>. *Cell Host Microbe* 15, 95–102. doi:10.1016/j.chom.2013.12.010.
- King, D. E., Egan, B. M., Woolson, R. F., Mainous, A. G., Al-Solaiman, Y., and Jesri, A. (2007). Effect of a high-fiber diet vs a fiber-supplemented diet on C-reactive protein level. *Arch. Intern. Med.* 167, 502–506. doi:10.1001/archinte.167.5.502.
- Klepac-Ceraj, V., Lemon, K. P., Martin, T. R., Allgaier, M., Kembel, S. W., Knapp, A. A., et al. (2010). Relationship between cystic fibrosis respiratory tract bacterial communities and age, genotype, antibiotics and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 12, 1293–1303. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02173.x.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., et al. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41, e1. doi:10.1093/nar/gks808.
- Koller, D. Y., Nething, I., Otto, J., Urbanek, R., and Eichler, I. (1997). Cytokine concentrations in sputum from patients with cystic fibrosis and their relation to eosinophil activity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155, 1050–1054. doi:10.1164/ajrccm.155.3.9116985.
- Konstan, M. W., Butler, S. M., Wohl, M. E. B., Stoddard, M., Matousek, R., Wagener, J. S., et al. (2003). Growth and nutritional indexes in early life predict pulmonary function in cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 142, 624–630. doi:10.1067/mpd.2003.152.
- Konstan, M. W., McKone, E. F., Moss, R. B., Marigowda, G., Tian, S., Waltz, D., et al. (2016). Assessment of safety and efficacy of long-term treatment with combination lumacaftor and ivacaftor therapy in patients with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation (PROGRESS): a phase 3, extension study. *Lancet Respir. Med.* doi:10.1016/S2213-2600(16)30427-1.
- Konstan, M. W., McKone, E. F., Moss, R. B., Marigowda, G., Tian, S., Waltz, D., et al. (2017). Assessment of safety and efficacy of long-term treatment with combination lumacaftor and ivacaftor therapy in patients with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation (PROGRESS): a phase 3, extension study. *Lancet Respir. Med.* 5, 107–118. doi:10.1016/S2213-2600(16)30427-1.
- Koo, T. K., and Li, M. Y. (2016). A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *J. Chiropr. Med.* 15, 155–163. doi:10.1016/j.jcm.2016.02.012.
- Kramer, R., Sauer-Heilborn, A., Welte, T., Guzman, C. A., Abraham, W.-R., and Höfle, M. G. (2015). Cohort Study of Airway Mycobiome in Adult Cystic Fibrosis Patients: Differences in Community Structure between Fungi and Bacteria Reveal Predominance of Transient Fungal Elements. *J. Clin. Microbiol.* 53, 2900–2907. doi:10.1128/JCM.01094-15.
- Kramná, L., Dřevínek, P., Lin, J., Kulich, M., and Cinek, O. (2018). Changes in the lung bacteriome in relation to antipseudomonal therapy in children with cystic fibrosis. *Folia Microbiol. (Praha)* 63, 237–248. doi:10.1007/s12223-017-0562-3.
- Labaere, D., Smismans, A., Van Olmen, A., Christiaens, P., D'Haens, G., Moons, V., et al. (2014). Comparison of six different calprotectin assays for the assessment of

- inflammatory bowel disease. *United Eur. Gastroenterol. J.* 2, 30–37. doi:10.1177/2050640613518201.
- Layeghifard, M., Li, H., Wang, P. W., Donaldson, S. L., Coburn, B., Clark, S. T., et al. (2019). Microbiome networks and change-point analysis reveal key community changes associated with cystic fibrosis pulmonary exacerbations. *Npj Biofilms Microbiomes* 5, 1–12. doi:10.1038/s41522-018-0077-y.
- Le Poul, E., Loison, C., Struyf, S., Springael, J.-Y., Lannoy, V., Decobecq, M.-E., et al. (2003). Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J. Biol. Chem.* 278, 25481–25489. doi:10.1074/jbc.M301403200.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., and Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022–1023. doi:10.1038/4441022a.
- Li, D., Keogh, R., Clancy, J. P., and Szczesniak, R. D. (2017). Flexible semiparametric joint modeling: an application to estimate individual lung function decline and risk of pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Emerg. Themes Epidemiol.* 14. doi:10.1186/s12982-017-0067-1.
- Li, L., and Somerset, S. (2018). Associations between Flavonoid Intakes and Gut Microbiota in a Group of Adults with Cystic Fibrosis. *Nutrients* 10. doi:10.3390/nu10091264.
- Lim, M. Y., Park, Y.-S., Kim, J.-H., and Nam, Y.-D. (2020). Evaluation of fecal DNA extraction protocols for human gut microbiome studies. *BMC Microbiol.* 20, 212. doi:10.1186/s12866-020-01894-5.
- Lim, M. Y., Song, E.-J., Kim, S. H., Lee, J., and Nam, Y.-D. (2018). Comparison of DNA extraction methods for human gut microbial community profiling. *Syst. Appl. Microbiol.* 41, 151–157. doi:10.1016/j.syapm.2017.11.008.
- Lim, Y. W., Evangelista, J. S., Schmieder, R., Bailey, B., Haynes, M., Furlan, M., et al. (2014). Clinical Insights from Metagenomic Analysis of Sputum Samples from Patients with Cystic Fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 52, 425–437. doi:10.1128/JCM.02204-13.
- Lin, H., and Peddada, S. D. (2020). Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nat. Commun.* 11, 3514. doi:10.1038/s41467-020-17041-7.
- Lin, J.-F., Chen, J.-M., Zuo, J.-H., Yu, A., Xiao, Z.-J., Deng, F.-H., et al. (2014). Meta-analysis: Fecal Calprotectin for Assessment of Inflammatory Bowel Disease Activity. *Inflamm. Bowel Dis.* 20, 1407–1415. doi:10.1097/MIB.0000000000000057.
- Liou, T. G., Adler, F. R., Argel, N., Asfour, F., Brown, P. S., Chatfield, B. A., et al. (2019). Prospective multicenter randomized patient recruitment and sample collection to enable future measurements of sputum biomarkers of inflammation in an observational study of cystic fibrosis. *BMC Med. Res. Methodol.* 19, 88. doi:10.1186/s12874-019-0705-0.
- Liou, T. G., Adler, F. R., FitzSimmons, S. C., Cahill, B. C., Hibbs, J. R., and Marshall, B. C. (2001). Predictive 5-Year Survivorship Model of Cystic Fibrosis. *Am. J. Epidemiol.* 153, 345–352.
- Liou, T. G., Adler, F. R., Keogh, R. H., Li, Y., Jensen, J. L., Walsh, W., et al. (2012). Sputum Biomarkers and the Prediction of Clinical Outcomes in Patients with Cystic Fibrosis. *PLOS ONE* 7, e42748. doi:10.1371/journal.pone.0042748.

- Liou, T. G., Kartsonaki, C., Keogh, R. H., and Adler, F. R. (2020). Evaluation of a five-year predicted survival model for cystic fibrosis in later time periods. *Sci. Rep.* 10. doi:10.1038/s41598-020-63590-8.
- Lisowska, A., Madry, E., Pogorzelski, A., Szydłowski, J., Radzikowski, A., and Walkowiak, J. (2010). Small intestine bacterial overgrowth does not correspond to intestinal inflammation in cystic fibrosis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 70, 322–326. doi:10.3109/00365513.2010.486869.
- Liu, T., Yang, Z., Zhang, X., Han, N., Yuan, J., and Cheng, Y. (2017). 16S rDNA analysis of the effect of fecal microbiota transplantation on pulmonary and intestinal flora. *3 Biotech* 7, 370. doi:10.1007/s13205-017-0997-x.
- Lof, M., Janus, M. M., and Krom, B. P. (2017). Metabolic Interactions between Bacteria and Fungi in Commensal Oral Biofilms. *J. Fungi Basel Switz.* 3. doi:10.3390/jof3030040.
- Looft, T., and Allen, H. K. (2012). Collateral effects of antibiotics on mammalian gut microbiomes. *Gut Microbes* 3, 463–467. doi:10.4161/gmic.21288.
- Loukou, I., Moustaki, M., Plyta, M., and Douros, K. (2020). Longitudinal changes in lung function following initiation of lumacaftor/ivacaftor combination. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 19, 534–539. doi:10.1016/j.jcf.2019.09.009.
- Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
- Lubamba, B., Dhooghe, B., Noel, S., and Leal, T. (2012). Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin. Biochem.* 45, 1132–1144. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.05.034.
- Lundberg, D. S., Yourstone, S., Mieczkowski, P., Jones, C. D., and Dangl, J. L. (2013). Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. *Nat. Methods* 10, 999–1002. doi:10.1038/nmeth.2634.
- Lynch, S. V., Goldfarb, K. C., Wild, Y. K., Kong, W., De Lisle, R. C., and Brodie, E. L. (2013). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator knockout mice exhibit aberrant gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes* 4, 41–47. doi:10.4161/gmic.22430.
- Maccaferri, S., Klinder, A., Brigidi, P., Cavina, P., and Costabile, A. (2012). Potential Probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 Modulates the Immune Response in Caco-2 Cells and Peripheral Blood Mononuclear Cells and Impacts the Human Gut Microbiota in an In Vitro Colonic Model System. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 956–964. doi:10.1128/AEM.06385-11.
- MacKenzie, T., Gifford, A. H., Sabadosa, K. A., Quinton, H. B., Knapp, E. A., Goss, C. H., et al. (2014). Longevity of Patients With Cystic Fibrosis in 2000 to 2010 and Beyond: Survival Analysis of the Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. *Ann. Intern. Med.* 161, 233–241. doi:10.7326/M13-0636.
- Madan, J. C., Koestler, D. C., Stanton, B. A., Davidson, L., Moulton, L. A., Housman, M. L., et al. (2012). Serial analysis of the gut and respiratory microbiome in cystic fibrosis in infancy: interaction between intestinal and respiratory tracts and impact of nutritional exposures. *mBio* 3. doi:10.1128/mBio.00251-12.

- Maeda, Y., Elborn, J. S., Parkins, M. D., Reihill, J., Goldsmith, C. E., Coulter, W. A., et al. (2011). Population structure and characterization of viridans group streptococci (VGS) including *Streptococcus pneumoniae* isolated from adult patients with cystic fibrosis (CF). *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 10, 133–139. doi:10.1016/j.jcf.2010.11.003.
- Maisonneuve, P., Marshall, B. C., Knapp, E. A., and Lowenfels, A. B. (2013). Cancer risk in cystic fibrosis: a 20-year nationwide study from the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* 105, 122–129. doi:10.1093/jnci/djs481.
- Mandal, S., Van Treuren, W., White, R. A., Eggesbø, M., Knight, R., and Peddada, S. D. (2015). Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microb. Ecol. Health Dis.* 26, 27663. doi:10.3402/mehd.v26.27663.
- Manor, O., Levy, R., Pope, C. E., Hayden, H. S., Brittnacher, M. J., Carr, R., et al. (2016). Metagenomic evidence for taxonomic dysbiosis and functional imbalance in the gastrointestinal tracts of children with cystic fibrosis. *Sci. Rep.* 6, 22493. doi:10.1038/srep22493.
- Marchesi, J. R., Dutilh, B. E., Hall, N., Peters, W. H. M., Roelofs, R., Boleij, A., et al. (2011). Towards the human colorectal cancer microbiome. *PLoS One* 6, e20447. doi:10.1371/journal.pone.0020447.
- Maria del Carmen PONCE DE LEON RODRIGUEZ (2019). Développement d'un modèle in vitro d'inflammation intestinale par l'utilisation de lignées cellulaires humaines en co-culture pour l'étude des interactions avec les micro-constituants alimentaires.
- Markey, L., Shaban, L., Green, E. R., Lemon, K. P., Meccas, J., and Kumamoto, C. A. (2018). Pre-colonization with the commensal fungus *Candida albicans* reduces murine susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes* 9, 497–509. doi:10.1080/19490976.2018.1465158.
- Marsteller, N. L., Nussbaum, E., Morphey, T., and Randhawa, I. S. (2019). Cystic fibrosis patients at risk for disease progression marked by decline in FEV1% predicted: development of the cystic fibrosis risk of disease progression score. *J. Thorac. Dis.* 11, 5557–5565. doi:10.21037/jtd.2019.11.22.
- Martiniano, S. L., and Nick, J. A. (2015). Nontuberculous mycobacterial infections in cystic fibrosis. *Clin. Chest Med.* 36, 101–115. doi:10.1016/j.ccm.2014.11.003.
- Masson, A., Schneider-Futschik, E. K., Baatallah, N., Nguyen-Khoa, T., Girodon, E., Hatton, A., et al. (2019). Predictive factors for lumacaftor/ivacaftor clinical response. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 18, 368–374. doi:10.1016/j.jcf.2018.12.011.
- Mayer-Hamblett, N., Aitken, M. L., Accurso, F. J., Kronmal, R. A., Konstan, M. W., Burns, J. L., et al. (2007). Association between Pulmonary Function and Sputum Biomarkers in Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175, 822–828. doi:10.1164/rccm.200609-1354OC.
- Mayhew, D., Devos, N., Lambert, C., Brown, J. R., Clarke, S. C., Kim, V. L., et al. (2018). Longitudinal profiling of the lung microbiome in the AERIS study demonstrates repeatability of bacterial and eosinophilic COPD exacerbations. *Thorax* 73, 422–430. doi:10.1136/thoraxjnl-2017-210408.

- Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O., and Kasper, D. L. (2005). An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 122, 107–118. doi:10.1016/j.cell.2005.05.007.
- McAleer, J. P., and Kolls, J. K. (2018). Contributions of the intestinal microbiome in lung immunity. *Eur. J. Immunol.* 48, 39–49. doi:10.1002/eji.201646721.
- McAleer, J. P., Nguyen, N. L. H., Chen, K., Kumar, P., Ricks, D. M., Binnie, M., et al. (2016). Pulmonary Th17 Antifungal Immunity Is Regulated by the Gut Microbiome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 197, 97–107. doi:10.4049/jimmunol.1502566.
- McArdle, B. H., and Anderson, M. J. (2001). Fitting Multivariate Models to Community Data: A Comment on Distance-Based Redundancy Analysis. *Ecology* 82, 290–297. doi:https://doi.org/10.1890/0012-9658(2001)082[0290:FMMTCD]2.0.CO;2.
- McCarthy, C., Dimitrov, B. D., Meurling, I. J., Gunaratnam, C., and McElvaney, N. G. (2013). The CF-ABLE score: a novel clinical prediction rule for prognosis in patients with cystic fibrosis. *Chest* 143, 1358–1364. doi:10.1378/chest.12-2022.
- McCarthy, D. J., Chen, Y., and Smyth, G. K. (2012). Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res.* 40, 4288–4297. doi:10.1093/nar/gks042.
- McColley, S. A., Konstan, M. W., Ramsey, B. W., Stuart Elborn, J., Boyle, M. P., Wainwright, C. E., et al. (2019). Lumacaftor/ivacaftor reduces pulmonary exacerbations in patients irrespective of initial changes in FEV1. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 18, 94–101. doi:10.1016/j.jcf.2018.07.011.
- McCord, A. I., Chapman, C. A., Weny, G., Tumukunde, A., Hyeroba, D., Klotz, K., et al. (2014). Fecal microbiomes of non-human primates in Western Uganda reveal species-specific communities largely resistant to habitat perturbation. *Am. J. Primatol.* 76, 347–354. doi:https://doi.org/10.1002/ajp.22238.
- McKinzie, C. J., Goralski, J. L., Noah, T. L., Retsch-Bogart, G. Z., and Prieur, M. B. (2017). Worsening anxiety and depression after initiation of lumacaftor/ivacaftor combination therapy in adolescent females with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 16, 525–527. doi:10.1016/j.jcf.2017.05.008.
- McKnight, D. T., Huerlimann, R., Bower, D. S., Schwarzkopf, L., Alford, R. A., and Zenger, K. R. (2019). microDecon: A highly accurate read-subtraction tool for the post-sequencing removal of contamination in metabarcoding studies. *Environ. DNA* 1, 14–25. doi:https://doi.org/10.1002/edn3.11.
- McKone, E. F., Borowitz, D., Drevinek, P., Griese, M., Konstan, M. W., Wainwright, C., et al. (2014). Long-term safety and efficacy of ivacaftor in patients with cystic fibrosis who have the Gly551Asp-CFTR mutation: a phase 3, open-label extension study (PERSIST). *Lancet Respir. Med.* 2, 902–910. doi:10.1016/S2213-2600(14)70218-8.
- McKone, E. F., Goss, C. H., and Aitken, M. L. (2006). CFTR genotype as a predictor of prognosis in cystic fibrosis. *Chest* 130, 1441–1447. doi:10.1378/chest.130.5.1441.
- McMurdie, P. J., and Holmes, S. (2014). Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLOS Comput. Biol.* 10, e1003531. doi:10.1371/journal.pcbi.1003531.

- McNamara, J. J., McColley, S. A., Marigowda, G., Liu, F., Tian, S., Owen, C. A., et al. (2019). Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of lumacaftor and ivacaftor combination therapy in children aged 2-5 years with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR: an open-label phase 3 study. *Lancet Respir. Med.* 7, 325–335. doi:10.1016/S2213-2600(18)30460-0.
- Metsälä, J., Lundqvist, A., Virta, L. J., Kaila, M., Gissler, M., and Virtanen, S. M. (2015). Prenatal and post-natal exposure to antibiotics and risk of asthma in childhood. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 45, 137–145. doi:10.1111/cea.12356.
- Middleton, P. G., Mall, M. A., Dřevínek, P., Lands, L. C., McKone, E. F., Polineni, D., et al. (2019). Elexacaftor–Tezacaftor–Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *N. Engl. J. Med.* 381, 1809–1819. doi:10.1056/NEJMoa1908639.
- Milla, C. E., Ratjen, F., Marigowda, G., Liu, F., Waltz, D., and Rosenfeld, M. (2017). Lumacaftor/Ivacaftor in patients aged 6-11 years with cystic fibrosis and homozygous for F508del-CFTR. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 195, 912–920. doi:10.1164/rccm.201608-1754OC.
- Millar, B. C., McCaughan, J., Rendall, J. C., Downey, D. G., and Moore, J. E. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients with c.1652G>A (G551D)-CFTR treated with ivacaftor-Changes in microbiological parameters. *J. Clin. Pharm. Ther.* 43, 92–100. doi:10.1111/jcpt.12616.
- Mirković, B., Murray, M. A., Lavelle, G. M., Molloy, K., Azim, A. A., Gunaratnam, C., et al. (2015). The Role of Short-Chain Fatty Acids, Produced by Anaerobic Bacteria, in the Cystic Fibrosis Airway. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 192, 1314–1324. doi:10.1164/rccm.201505-0943OC.
- Mitchell, A. B., and Glanville, A. R. (2018). Introduction to Techniques and Methodologies for Characterizing the Human Respiratory Virome. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1838, 111–123. doi:10.1007/978-1-4939-8682-8\_9.
- Molyneaux, P. L., Mallia, P., Cox, M. J., Footitt, J., Willis-Owen, S. A. G., Homola, D., et al. (2013). Outgrowth of the bacterial airway microbiome after rhinovirus exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 188, 1224–1231. doi:10.1164/rccm.201302-0341OC.
- Moss, R. B., Flume, P. A., Elborn, J. S., Cooke, J., Rowe, S. M., McColley, S. A., et al. (2015). Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis who have an Arg117His-CFTR mutation: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Respir. Med.* 3, 524–533. doi:10.1016/S2213-2600(15)00201-5.
- Muhlebach, M. S., Hatch, J. E., Einarsson, G. G., McGrath, S. J., Gilipin, D. F., Lavelle, G., et al. (2018). Anaerobic bacteria cultured from cystic fibrosis airways correlate to milder disease: a multisite study. *Eur. Respir. J.* 52. doi:10.1183/13993003.00242-2018.
- Munck, A. (2014). Cystic fibrosis: evidence for gut inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 52, 180–183. doi:10.1016/j.biocel.2014.02.005.
- Munkholm, P. (2003). Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 18 Suppl 2, 1–5. doi:10.1046/j.1365-2036.18.s2.2.x.

- Nakamura, H., Yoshimura, K., McElvaney, N. G., and Crystal, R. G. (1992). Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J. Clin. Invest.* 89, 1478–1484. doi:10.1172/JCI115738.
- Namasivayam, S., Sher, A., Glickman, M. S., and Wipperfurth, M. F. (2018). The Microbiome and Tuberculosis: Early Evidence for Cross Talk. *mBio* 9, e01420-18. doi:10.1128/mBio.01420-18.
- Nash, A. K., Auchtung, T. A., Wong, M. C., Smith, D. P., Gesell, J. R., Ross, M. C., et al. (2017). The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome* 5, 153. doi:10.1186/s40168-017-0373-4.
- Natoli, M., Leoni, B. D., D'Agnano, I., Zucco, F., and Felsani, A. (2012). Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 26, 1243–1246. doi:10.1016/j.tiv.2012.03.009.
- Navarro, J., Rainisio, M., Harms, H. K., Hodson, M. E., Koch, C., Mastella, G., et al. (2001). Factors associated with poor pulmonary function: cross-sectional analysis of data from the ERCF. European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis. *Eur. Respir. J.* 18, 298–305. doi:10.1183/09031936.01.00068901.
- Neerincx, A. H., Whiteson, K., Phan, J. L., Brinkman, P., Abdel-Aziz, M. I., Weersink, E. J. M., et al. (2020). Ivacaftor/lumacaftor changes the lung microbiome and metabolome in cystic fibrosis patients. *Eur. Respir. J.* 56. doi:10.1183/13993003.congress-2020.4337.
- Neurath, M. F. (2014). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 329–342. doi:10.1038/nri3661.
- Nguyen, L. D. N., Viscogliosi, E., and Delhaes, L. (2015). The lung mycobiome: an emerging field of the human respiratory microbiome. *Front. Microbiol.* 6, 89. doi:10.3389/fmicb.2015.00089.
- Ni, J., Wu, G. D., Albenberg, L., and Tomov, V. T. (2017). Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 573–584. doi:10.1038/nrgastro.2017.88.
- Niccum, D. E., Billings, J. L., Dunitz, J. M., and Khoruts, A. (2016). Colonoscopic screening shows increased early incidence and progression of adenomas in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 15, 548–553. doi:10.1016/j.jcf.2016.01.002.
- Nielsen, S., Needham, B., Leach, S. T., Day, A. S., Jaffe, A., Thomas, T., et al. (2016). Disrupted progression of the intestinal microbiota with age in children with cystic fibrosis. *Sci. Rep.* 6, 24857. doi:10.1038/srep24857.
- Nkam, L., Lambert, J., Latouche, A., Bellis, G., Burgel, P. R., and Hocine, M. N. (2017). A 3-year prognostic score for adults with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 16, 702–708. doi:10.1016/j.jcf.2017.03.004.
- Noni, M., Katelari, A., Dimopoulos, G., Doudounakis, S.-E., Tzoumaka-Bakoula, C., and Spoulou, V. (2015). *Aspergillus fumigatus* chronic colonization and lung function decline in cystic fibrosis may have a two-way relationship. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2235–2241.



- Norkina, O., Burnett, T. G., and De Lisle, R. C. (2004). Bacterial overgrowth in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator null mouse small intestine. *Infect. Immun.* 72, 6040–6049. doi:10.1128/IAI.72.10.6040-6049.2004.
- Noverr, M. C., Falkowski, N. R., McDonald, R. A., McKenzie, A. N., and Huffnagle, G. B. (2005). Development of allergic airway disease in mice following antibiotic therapy and fungal microbiota increase: role of host genetics, antigen, and interleukin-13. *Infect. Immun.* 73, 30–38. doi:10.1128/IAI.73.1.30-38.2005.
- Noverr, M. C., and Huffnagle, G. B. (2004). Regulation of *Candida albicans* morphogenesis by fatty acid metabolites. *Infect. Immun.* 72, 6206–6210. doi:10.1128/IAI.72.11.6206-6210.2004.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., et al. (2020). *vegan: Community Ecology Package*. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> [Accessed January 9, 2021].
- O'Neill, K., Bradley, J. M., Johnston, E., McGrath, S., McIlreavey, L., Rowan, S., et al. (2015). Reduced bacterial colony count of anaerobic bacteria is associated with a worsening in lung clearance index and inflammation in cystic fibrosis. *PLoS One* 10, e0126980. doi:10.1371/journal.pone.0126980.
- Ooi, C. Y., Pang, T., Leach, S. T., Katz, T., Day, A. S., and Jaffe, A. (2015). Fecal Human  $\beta$ -Defensin 2 in Children with Cystic Fibrosis: Is There a Diminished Intestinal Innate Immune Response? *Dig. Dis. Sci.* 60, 2946–2952. doi:10.1007/s10620-015-3842-2.
- Ooi, C. Y., Syed, S. A., Rossi, L., Garg, M., Needham, B., Avolio, J., et al. (2018). Impact of CFTR modulation with Ivacaftor on Gut Microbiota and Intestinal Inflammation. *Sci. Rep.* 8. doi:10.1038/s41598-018-36364-6.
- O'Sullivan, B. P., and Freedman, S. D. (2009). Cystic fibrosis. *Lancet Lond. Engl.* 373, 1891–1904. doi:10.1016/S0140-6736(09)60327-5.
- Ottiger, M., Nickler, M., Steuer, C., Bernasconi, L., Huber, A., Christ-Crain, M., et al. (2018). Gut, microbiota-dependent trimethylamine-N-oxide is associated with long-term all-cause mortality in patients with exacerbated chronic obstructive pulmonary disease. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 45, 135-141.e1. doi:10.1016/j.nut.2017.07.001.
- Paganin, P., Fiscarelli, E. V., Tuccio, V., Chiancianesi, M., Bacci, G., Morelli, P., et al. (2015). Changes in Cystic Fibrosis Airway Microbial Community Associated with a Severe Decline in Lung Function. *PLoS ONE* 10. doi:10.1371/journal.pone.0124348.
- Palermo, T. M., Harrison, D., and Koh, J. L. (2006). Effect of disease-related pain on the health-related quality of life of children and adolescents with cystic fibrosis. *Clin. J. Pain* 22, 532–537. doi:10.1097/01.ajp.0000210996.45459.76.
- Pang, T., Leach, S. T., Katz, T., Jaffe, A., Day, A. S., and Ooi, C. Y. (2015). Elevated fecal M2-pyruvate kinase in children with cystic fibrosis: A clue to the increased risk of intestinal malignancy in adulthood? *J. Gastroenterol. Hepatol.* 30, 866–871. doi:10.1111/jgh.12842.
- Panzer, A. R., and Lynch, S. V. (2015). Influence and effect of the human microbiome in allergy and asthma. *Curr. Opin. Rheumatol.* 27, 373–380. doi:10.1097/BOR.0000000000000191.

- Parisi, G. F., Papale, M., Rotolo, N., Aloisio, D., Tardino, L., Scuderi, M. G., et al. (2017). Severe disease in Cystic Fibrosis and fecal calprotectin levels. *Immunobiology* 222, 582–586. doi:10.1016/j.imbio.2016.11.005.
- Parkins, M. D., Parkins, V. M., Rendall, J. C., and Elborn, S. (2011). Changing epidemiology and clinical issues arising in an ageing cystic fibrosis population. *Thorax* 66, 105–119. doi:10.1177/1753465810386051.
- Pauvert, C., Buée, M., Laval, V., Edel-Hermann, V., Fauchery, L., Gautier, A., et al. (2019). Bioinformatics matters: The accuracy of plant and soil fungal community data is highly dependent on the metabarcoding pipeline. *Fungal Ecol.* 41, 23–33. doi:10.1016/j.funeco.2019.03.005.
- Peleg, A. Y., Choo, J. M., Langan, K. M., Edgeworth, D., Keating, D., Wilson, J., et al. (2018). Antibiotic exposure and interpersonal variance mask the effect of ivacaftor on respiratory microbiota composition. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 17, 50–56. doi:10.1016/j.jcf.2017.08.002.
- Peleg, A. Y., Hogan, D. A., and Mylonakis, E. (2010). Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 340–349. doi:10.1038/nrmicro2313.
- Pellegrino, R., Viegi, G., Brusasco, V., Crapo, R. O., Burgos, F., Casaburi, R., et al. (2010). Interpretative strategies for lung function tests. *Eur. Respir. J.* 26, 21.
- Pittman, J. E., Wylie, K. M., Akers, K., Storch, G. A., Hatch, J., Quante, J., et al. (2017). Association of Antibiotics, Airway Microbiome, and Inflammation in Infants with Cystic Fibrosis. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 14, 1548–1555. doi:10.1513/AnnalsATS.201702-121OC.
- Quinn, R. A., Adem, S., Mills, R. H., Comstock, W., DeRight Goldasich, L., Humphrey, G., et al. (2019). Neutrophilic proteolysis in the cystic fibrosis lung correlates with a pathogenic microbiome. *Microbiome* 7. doi:10.1186/s40168-019-0636-3.
- Quinn, R. A., Lim, Y. W., Maughan, H., Conrad, D., Rohwer, F., and Whiteson, K. L. (2014). Biogeochemical Forces Shape the Composition and Physiology of Polymicrobial Communities in the Cystic Fibrosis Lung. *mBio* 5. doi:10.1128/mBio.00956-13.
- Quinn, R. A., Whiteson, K., Lim, Y. W., Zhao, J., Conrad, D., LiPuma, J. J., et al. (2016). Ecological networking of cystic fibrosis lung infections. *Npj Biofilms Microbiomes* 2, 1–11. doi:10.1038/s41522-016-0002-1.
- Quinn, R. A., Whiteson, K., Lim, Y.-W., Salamon, P., Bailey, B., Mienardi, S., et al. (2015). A Winogradsky-based culture system shows an association between microbial fermentation and cystic fibrosis exacerbation. *ISME J.* 9, 1024–1038. doi:10.1038/ismej.2014.234.
- Quittner, A., Suthoff, E., Rendas-Baum, R., Bayliss, M. S., Sermet-Gaudelus, I., Castiglione, B., et al. (2015). Effect of ivacaftor treatment in patients with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation: Patient-reported outcomes in the STRIVE randomized, controlled trial. *Health Qual. Life Outcomes* 13. doi:10.1186/s12955-015-0293-6.
- Raats, D., Decaestecker, T., Fogelström, M., Dupont, L., and Lorent, N. (2019). Cross-sectional evaluation of serum and sputum calprotectin in bronchiectasis disease monitoring. *Eur. Respir. J.* 54. doi:10.1183/13993003.congress-2019.PA2678.

- Raia, V., Maiuri, L., de Ritis, G., de Vizia, B., Vacca, L., Conte, R., et al. (2000). Evidence of chronic inflammation in morphologically normal small intestine of cystic fibrosis patients. *Pediatr. Res.* 47, 344–350.
- Raquil, M.-A., Anceriz, N., Rouleau, P., and Tessier, P. A. (2008). Blockade of antimicrobial proteins S100A8 and S100A9 inhibits phagocyte migration to the alveoli in streptococcal pneumonia. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 3366–3374. doi:10.4049/jimmunol.180.5.3366.
- Ratjen, F., Bell, S. C., Rowe, S. M., Goss, C. H., Quittner, A. L., and Bush, A. (2015). Cystic fibrosis. *Nat. Rev. Dis. Primer* 1. doi:10.1038/nrdp.2015.10.
- Ratjen, F., Hug, C., Marigowda, G., Tian, S., Huang, X., Stanojevic, S., et al. (2017). Efficacy and safety of lumacaftor and ivacaftor in patients aged 6-11 years with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR: a randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Respir. Med.* 5, 557–567. doi:10.1016/S2213-2600(17)30215-1.
- Reece, E., Segurado, R., Jackson, A., McClean, S., Renwick, J., and Greally, P. (2017). Co-colonisation with *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa* is associated with poorer health in cystic fibrosis patients: an Irish registry analysis. *BMC Pulm. Med.* 17. doi:10.1186/s12890-017-0416-4.
- Robak, O. H., Heimesaat, M. M., Kruglov, A. A., Prepens, S., Ninnemann, J., Gutbier, B., et al. (2018). Antibiotic treatment-induced secondary IgA deficiency enhances susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J. Clin. Invest.* 128, 3535–3545. doi:10.1172/JCI97065.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140. doi:10.1093/bioinformatics/btp616.
- Robinson, M. D., and Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* 11, R25. doi:10.1186/gb-2010-11-3-r25.
- Rogers, G. B., Narkewicz, M. R., and Hoffman, L. R. (2016). The CF gastrointestinal microbiome: Structure and clinical impact. *Pediatr. Pulmonol.* 51, S35–S44. doi:10.1002/ppul.23544.
- Rosenthal, M., Aiello, A. E., Chenoweth, C., Goldberg, D., Larson, E., Gloor, G., et al. (2014). Impact of Technical Sources of Variation on the Hand Microbiome Dynamics of Healthcare Workers. *PLOS ONE* 9, e88999. doi:10.1371/journal.pone.0088999.
- Rowe, S. M., Daines, C., Ringshausen, F. C., Kerem, E., Wilson, J., Tullis, E., et al. (2017). Tezacaftor–Ivacaftor in Residual-Function Heterozygotes with Cystic Fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 377, 2024–2035. doi:10.1056/NEJMoa1709847.
- Rowe, S. M., Jackson, P. L., Liu, G., Hardison, M., Livraghi, A., Solomon, G. M., et al. (2008). Potential Role of High-Mobility Group Box 1 in Cystic Fibrosis Airway Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 822–831. doi:10.1164/rccm.200712-1894OC.
- Rowe, S. M., Miller, S., and Sorscher, E. J. (2005). Cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 352, 1992–2001. doi:10.1056/NEJMra043184.
- Royce, F. H., and Carl, J. C. (2011). Health-related quality of life in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pediatr.* 23, 535–540. doi:10.1097/MOP.0b013e32834a7829.

- Ruane, D., Brane, L., Reis, B. S., Cheong, C., Poles, J., Do, Y., et al. (2013). Lung dendritic cells induce migration of protective T cells to the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 210, 1871–1888. doi:10.1084/jem.20122762.
- Rubin, J. L., O’Callaghan, L., Pelligra, C., Konstan, M. W., Ward, A., Ishak, J. K., et al. (2019). Modeling long-term health outcomes of patients with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR treated with lumacaftor/ivacaftor. *Ther. Adv. Respir. Dis.* 13, 1753466618820186. doi:10.1177/1753466618820186.
- Rumman, N., Sultan, M., El-Chammas, K., Goh, V., Salzman, N., Quintero, D., et al. (2014). Calprotectin in Cystic Fibrosis. *BMC Pediatr.* 14. doi:10.1186/1471-2431-14-133.
- Russell, S. L., Gold, M. J., Hartmann, M., Willing, B. P., Thorson, L., Wlodarska, M., et al. (2012). Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *EMBO Rep.* 13, 440–447. doi:10.1038/embor.2012.32.
- Sagel, S. D., Chmiel, J. F., and Konstan, M. W. (2007). Sputum Biomarkers of Inflammation in Cystic Fibrosis Lung Disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 4, 406–417. doi:10.1513/pats.200703-044BR.
- Sankaran, K., and Holmes, S. P. (2017). Inference of Dynamic Regimes in the Microbiome. *ArXiv171200067 Stat.* Available at: <http://arxiv.org/abs/1712.00067> [Accessed January 9, 2021].
- Santiago, A., Panda, S., Mengels, G., Martinez, X., Azpiroz, F., Dore, J., et al. (2014). Processing faecal samples: a step forward for standards in microbial community analysis. *BMC Microbiol.* 14, 112. doi:10.1186/1471-2180-14-112.
- Sawicki, G. S., Rasouliyan, L., McMullen, A. H., Wagener, J. S., McColley, S. A., Pasta, D. J., et al. (2011). Longitudinal assessment of health-related quality of life in an observational cohort of patients with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 46, 36–44. doi:10.1002/ppul.21325.
- Scanlan, P. D., Buckling, A., Kong, W., Wild, Y., Lynch, S. V., and Harrison, F. (2012). Gut dysbiosis in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 11, 454–455. doi:10.1016/j.jcf.2012.03.007.
- Schippa, S., Iebba, V., Santangelo, F., Gagliardi, A., De Biase, R. V., Stamato, A., et al. (2013). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) allelic variants relate to shifts in faecal microbiota of cystic fibrosis patients. *PloS One* 8, e61176. doi:10.1371/journal.pone.0061176.
- Schnapp, Z., Hartman, C., Livnat, G., Shteinberg, M., and Elenberg, Y. (2019). Decreased Fecal Calprotectin Levels in Cystic Fibrosis Patients After Antibiotic Treatment for Respiratory Exacerbation. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 68, 282–284. doi:10.1097/MPG.0000000000002197.
- Schuijt, T. J., Lankelma, J. M., Scicluna, B. P., de Sousa e Melo, F., Roelofs, J. J. T. H., de Boer, J. D., et al. (2016). The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia. *Gut* 65, 575–583. doi:10.1136/gutjnl-2015-309728.
- Scott, J. E., and O’Toole, G. A. (2019). The Yin and Yang of Streptococcus Lung Infections in Cystic Fibrosis: a Model for Studying Polymicrobial Interactions. *J. Bacteriol.* 201. doi:10.1128/JB.00115-19.

- Scott, J., Sueiro-Olivares, M., Ahmed, W., Heddergott, C., Zhao, C., Thomas, R., et al. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*-Derived Volatile Sulfur Compounds Promote Distal *Aspergillus fumigatus* Growth and a Synergistic Pathogen-Pathogen Interaction That Increases Pathogenicity in Co-infection. *Front. Microbiol.* 10, 2311. doi:10.3389/fmicb.2019.02311.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., et al. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 12, R60. doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., and Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* 90, 859–904. doi:10.1152/physrev.00045.2009.
- Sermet-Gaudelus, I., Mayell, S. J., Southern, K. W., and European Cystic Fibrosis Society (ECFS), Neonatal Screening Working Group (2010a). Guidelines on the early management of infants diagnosed with cystic fibrosis following newborn screening. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 9, 323–329. doi:10.1016/j.jcf.2010.04.008.
- Sermet-Gaudelus, I., Munck, A., Rota, M., Roussey, M., Feldmann, D., Nguyen-Khoa, T., et al. (2010b). [French guidelines for sweat test practice and interpretation for cystic fibrosis neonatal screening]. *Arch. Pediatr. Organe Off. Soc. Francaise Pediatr.* 17, 1349–1358. doi:10.1016/j.arcped.2010.06.021.
- Shenhav, L., Furman, O., Briscoe, L., Thompson, M., Silverman, J. D., Mizrahi, I., et al. (2019). Modeling the temporal dynamics of the gut microbial community in adults and infants. *PLOS Comput. Biol.* 15, e1006960. doi:10.1371/journal.pcbi.1006960.
- Sherrard, L. J., Bell, S. C., and Tunney, M. M. (2016). The role of anaerobic bacteria in the cystic fibrosis airway. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 22, 637–643. doi:10.1097/MCP.0000000000000299.
- Shwachman, H., and Kulczycki, L. L. (1958). Long-term study of one hundred five patients with cystic fibrosis; studies made over a five- to fourteen-year period. *AMA J. Dis. Child.* 96, 6–15. doi:10.1001/archpedi.1958.02060060008002.
- Silverman, J. D., Durand, H., Bloom, R. J., Mukherjee, S., and David, L. A. (2018a). Dynamic linear models guide design and analysis of microbiota studies within artificial human guts. *bioRxiv*, 306597. doi:10.1101/306597.
- Silverman, J. D., Roche, K., Holmes, Z. C., David, L. A., and Mukherjee, S. (2019). Bayesian Multinomial Logistic Normal Models through Marginally Latent Matrix-T Processes. *ArXiv190311695 Stat.* Available at: <http://arxiv.org/abs/1903.11695> [Accessed January 14, 2021].
- Silverman, J. D., Shenhav, L., Halperin, E., Mukherjee, S., and David, L. A. (2018b). Statistical Considerations in the Design and Analysis of Longitudinal Microbiome Studies. *bioRxiv*, 448332. doi:10.1101/448332.
- Singh, S. B., McLearn-Montz, A. J., Milavetz, F., Gates, L. K., Fox, C., Murry, L. T., et al. (2019). Pathogen acquisition in patients with cystic fibrosis receiving ivacaftor or lumacaftor/ivacaftor. *Pediatr. Pulmonol.* 54, 1200–1208. doi:10.1002/ppul.24341.
- Sinha, R., Abu-Ali, G., Vogtmann, E., Fodor, A. A., Ren, B., Amir, A., et al. (2017). Assessment of variation in microbial community amplicon sequencing by the Microbiome Quality

- Control (MBQC) project consortium. *Nat. Biotechnol.* 35, 1077–1086. doi:10.1038/nbt.3981.
- Skalski, J. H., Limon, J. J., Sharma, P., Gargus, M. D., Nguyen, C., Tang, J., et al. (2018). Expansion of commensal fungus *Wallemia mellicola* in the gastrointestinal mycobiota enhances the severity of allergic airway disease in mice. *PLoS Pathog.* 14, e1007260. doi:10.1371/journal.ppat.1007260.
- Skelly, A. N., Sato, Y., Kearney, S., and Honda, K. (2019). Mining the microbiota for microbial and metabolite-based immunotherapies. *Nat. Rev. Immunol.* 19, 305–323. doi:10.1038/s41577-019-0144-5.
- Smyth, R. L., Croft, N. M., O’Hea, U., Marshall, T. G., and Ferguson, A. (2000). Intestinal inflammation in cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child.* 82, 394–399.
- Sokol, H., Leducq, V., Aschard, H., Pham, H.-P., Jegou, S., Landman, C., et al. (2017). Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* 66, 1039–1048. doi:10.1136/gutjnl-2015-310746.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J.-J., et al. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16731–16736. doi:10.1073/pnas.0804812105.
- Soret, P., Vandenberght, L.-E., Francis, F., Coron, N., Enaud, R., Avalos, M., et al. (2020). Respiratory mycobiome and suggestion of inter-kingdom network during acute pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. *Sci. Rep.* 10, 3589. doi:10.1038/s41598-020-60015-4.
- Sprooten, R. T. M., Lenaerts, K., Braeken, D. C. W., Grimbergen, I., Rutten, E. P., Wouters, E. F. M., et al. (2018). Increased Small Intestinal Permeability during Severe Acute Exacerbations of COPD. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* 95, 334–342. doi:10.1159/000485935.
- Stahl, M., Joachim, C., Wielpütz, M. O., and Mall, M. A. (2019). Comparison of lung clearance index determined by washout of N<sub>2</sub> and SF<sub>6</sub> in infants and preschool children with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 18, 399–406. doi:10.1016/j.jcf.2018.11.001.
- Stallings, V. A., Sainath, N., Oberle, M., Bertolaso, C., and Schall, J. I. (2018). Energy Balance and Mechanisms of Weight Gain with Ivacaftor Treatment of Cystic Fibrosis Gating Mutations. *J. Pediatr.* 201, 229-237.e4. doi:10.1016/j.jpeds.2018.05.018.
- Steinkamp, G., and Wiedemann, B. (2002). Relationship between nutritional status and lung function in cystic fibrosis: cross sectional and longitudinal analyses from the German CF quality assurance (CFQA) project. *Thorax* 57, 596–601. doi:10.1136/thorax.57.7.596.
- Stokell, J. R., Gharaibeh, R. Z., Hamp, T. J., Zapata, M. J., Fodor, A. A., and Steck, T. R. (2015). Analysis of changes in diversity and abundance of the microbial community in a cystic fibrosis patient over a multiyear period. *J. Clin. Microbiol.* 53, 237–247. doi:10.1128/JCM.02555-14.
- Stoltz, D. A., Meyerholz, D. K., Pezzulo, A. A., Ramachandran, S., Rogan, M. P., Davis, G. J., et al. (2010). Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth. *Sci. Transl. Med.* 2, 29ra31. doi:10.1126/scitranslmed.3000928.

- Sulaiman, I., Wu, B. G., Li, Y., Scott, A. S., Malecha, P., Scaglione, B., et al. (2018). Evaluation of the airway microbiome in nontuberculous mycobacteria disease. *Eur. Respir. J.* 52. doi:10.1183/13993003.00810-2018.
- Szczesniak, R., Heltshe, S. L., Stanojevic, S., and Mayer-Hamblett, N. (2017). Use of FEV1 in Cystic Fibrosis Epidemiologic Studies and Clinical Trials: A Statistical Perspective for the Clinical Researcher. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 16, 318–326. doi:10.1016/j.jcf.2017.01.002.
- Sze, M. A., Dimitriu, P. A., Hayashi, S., Elliott, W. M., McDonough, J. E., Gosselink, J. V., et al. (2012). The Lung Tissue Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185, 1073–1080. doi:10.1164/rccm.201111-2075OC.
- Sze, M. A., Tsuruta, M., Yang, S.-W. J., Oh, Y., Man, S. F. P., Hogg, J. C., et al. (2014). Changes in the bacterial microbiota in gut, blood, and lungs following acute LPS instillation into mice lungs. *PLoS One* 9, e111228. doi:10.1371/journal.pone.0111228.
- Tabori, H., Arnold, C., Jaudszus, A., Mentzel, H.-J., Renz, D. M., Reinsch, S., et al. (2017). Abdominal symptoms in cystic fibrosis and their relation to genotype, history, clinical and laboratory findings. *PLOS ONE* 12, e0174463. doi:10.1371/journal.pone.0174463.
- Talamo Guevara, M., and McColley, S. A. (2017). The safety of lumacaftor and ivacaftor for the treatment of cystic fibrosis. *Expert Opin. Drug Saf.* 16, 1305–1311. doi:10.1080/14740338.2017.1372419.
- Taylor-Cousar, J. L., Jain, M., Barto, T. L., Haddad, T., Atkinson, J., Tian, S., et al. (2018). Lumacaftor/ivacaftor in patients with cystic fibrosis and advanced lung disease homozygous for F508del-CFTR. *J. Cyst. Fibros.* 17, 228–235. doi:10.1016/j.jcf.2017.09.012.
- Taylor-Cousar, J. L., Munck, A., McKone, E. F., van der Ent, C. K., Moeller, A., Simard, C., et al. (2017). Tezacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1709846>. doi:10.1056/NEJMoa1709846.
- Tesell, M. A., Alper, C. J., Bacon, R., Greenwood, B. C., Lenz, K., Jeffrey, P. L., et al. (2019). Effect of Lumacaftor/Ivacaftor on Pulmonary Exacerbation Rates in Members with Cystic Fibrosis in a Medicaid Population. *J. Manag. Care Spec. Pharm.* 25, 1021–1025. doi:10.18553/jmcp.2019.25.9.1021.
- Tétard, C., Mittaine, M., Bui, S., Beauvils, F., Maumus, P., Fayon, M., et al. (2020). Reduced Intestinal Inflammation with Lumacaftor/Ivacaftor in Adolescents with Cystic Fibrosis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* doi:10.1097/MPG.0000000000002864.
- Than, B. L. N., Linnekamp, J. F., Starr, T. K., Largaespada, D. A., Rod, A., Zhang, Y., et al. (2016). CFTR is a tumor suppressor gene in murine and human intestinal cancer. *Oncogene* 35, 4179–4187. doi:10.1038/onc.2015.483.
- Tong, K., Barker, D., France, M., Burr, L., Greville, H., Visser, S., et al. (2020). Lumacaftor/ivacaftor reduces exacerbations in adults homozygous for Phe508del mutation with severe lung disease. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 19, 415–420. doi:10.1016/j.jcf.2019.12.006.
- Trompette, A., Gollwitzer, E. S., Pattaroni, C., Lopez-Mejia, I. C., Riva, E., Pernot, J., et al. (2018). Dietary Fiber Confers Protection against Flu by Shaping Ly6c- Patrolling

- Monocyte Hematopoiesis and CD8<sup>+</sup> T Cell Metabolism. *Immunity* 48, 992-1005.e8. doi:10.1016/j.immuni.2018.04.022.
- Trompette, A., Gollwitzer, E. S., Yadava, K., Sichelstiel, A. K., Sprenger, N., Ngom-Bru, C., et al. (2014). Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat. Med.* 20, 159–166. doi:10.1038/nm.3444.
- Tso, G. H. W., Reales-Calderon, J. A., Tan, A. S. M., Sem, X., Le, G. T. T., Tan, T. G., et al. (2018). Experimental evolution of a fungal pathogen into a gut symbiont. *Science* 362, 589–595. doi:10.1126/science.aat0537.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., and Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* 26, 171–176. doi:10.1002/ijc.2910260208.
- Tunney, M. M., Field, T. R., Moriarty, T. F., Patrick, S., Doering, G., Muhlebach, M. S., et al. (2008). Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177, 995–1001. doi:10.1164/rccm.200708-1151OC.
- Tunney, M. M., Klem, E. R., Fodor, A. A., Gilpin, D. F., Moriarty, T. F., McGrath, S. J., et al. (2011). Use of culture and molecular analysis to determine the effect of antibiotic treatment on microbial community diversity and abundance during exacerbation in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 66, 579–584. doi:10.1136/thx.2010.137281.
- Uchmanowicz, I., Jankowska-Polańska, B., Wleklík, M., Rosinczuk-Tonderys, J., and Dębska, G. (2014). Health-related quality of life of patients with cystic fibrosis assessed by the SF-36 questionnaire. *Adv. Respir. Med.* 82, 10–17. doi:10.5603/PiAP.2014.0003.
- Vael, C., Nelen, V., Verhulst, S. L., Goossens, H., and Desager, K. N. (2008). Early intestinal *Bacteroides fragilis* colonisation and development of asthma. *BMC Pulm. Med.* 8, 19. doi:10.1186/1471-2466-8-19.
- Vaincre la mucoviscidose (2017). Registre français de la mucoviscidose.
- Van Biervliet, S., Eggermont, E., Mariën, P., Hoffman, I., and Veereman, G. (2003). Combined impact of mucosal damage and of cystic fibrosis on the small intestinal brush border enzyme activities. *Acta Clin. Belg.* 58, 220–224. doi:10.1179/acb.2003.58.4.002.
- Van Biervliet, S., Hauser, B., Verhulst, S., Stepman, H., Delanghe, J., Warzee, J.-P., et al. (2018). Probiotics in cystic fibrosis patients: A double blind crossover placebo controlled study. *Clin. Nutr. ESPEN* 27, 59–65. doi:10.1016/j.clnesp.2018.06.008.
- van den Bogert, B., Erkus, O., Boekhorst, J., de Goffau, M., Smid, E. J., Zoetendal, E. G., et al. (2013). Diversity of human small intestinal *Streptococcus* and *Veillonella* populations. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85, 376–388. doi:10.1111/1574-6941.12127.
- Van Goor, F., Hadida, S., Grootenhuys, P. D. J., Burton, B., Stack, J. H., Straley, K. S., et al. (2011). Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 18843–18848. doi:10.1073/pnas.1105787108.
- Vandenborgh, L.-E., Enaud, R., Coron, N., Denning, D. W., and Delhaes, L. (2019). “From culturomics to metagenomics: the mycobiome in chronic respiratory diseases,” in *The Lung Microbiome* (European Respiratory Society), 88–118. doi:10.1183/2312508X.erm8319.



- Vandenborgh, L.-E., Enaud, R., Urien, C., Coron, N., Girodet, P.-O., Ferreira, S., et al. (2020a). Type 2-high asthma is associated with a specific indoor mycobiome and microbiome. *J. Allergy Clin. Immunol.* doi:10.1016/j.jaci.2020.08.035.
- Vandenborgh, L.-E., Enaud, R., Urien, C., Coron, N., Girodet, P.-O., Ferreira, S., et al. (2020b). Type 2-high asthma is associated with a specific indoor mycobiome and microbiome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 0. doi:10.1016/j.jaci.2020.08.035.
- VandenBranden, S. L., McMullen, A., Schechter, M. S., Pasta, D. J., Michaelis, R. L., Konstan, M. W., et al. (2012). Lung Function Decline From Adolescence to Young Adulthood in Cystic Fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 47, 135–143. doi:10.1002/ppul.21526.
- Varni, J. W., Bendo, C. B., Denham, J., Shulman, R. J., Self, M. M., Neigut, D. A., et al. (2015). PedsQL™ Gastrointestinal Symptoms Scales and Gastrointestinal Worry Scales in pediatric patients with functional and organic gastrointestinal diseases in comparison to healthy controls. *Qual. Life Res.* 24, 363–378. doi:10.1007/s11136-014-0781-x.
- Varni, J. W., Seid, M., and Kurtin, P. S. (2001). PedsQL 4.0: reliability and validity of the Pediatric Quality of Life Inventory version 4.0 generic core scales in healthy and patient populations. *Med. Care* 39, 800–812. doi:10.1097/00005650-200108000-00006.
- Varraso, R., Chiuve, S. E., Fung, T. T., Barr, R. G., Hu, F. B., Willett, W. C., et al. (2015). Alternate Healthy Eating Index 2010 and risk of chronic obstructive pulmonary disease among US women and men: prospective study. *BMJ* 350, h286. doi:10.1136/bmj.h286.
- Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., et al. (2015). *The impact of food bioactives on health: in vitro and ex vivo models*. Springer Nature.
- Vertex Pharmaceuticals Incorporated (2018). A Phase 3, 2-Part, Open-label Study to Evaluate the Safety and Pharmacokinetics of Lumacaftor/Ivacaftor Combination Therapy in Subjects Aged 2 Through 5 Years With Cystic Fibrosis, Homozygous for the F508del-CFTR Mutation. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02797132>.
- Vertex Pharmaceuticals Incorporated (2020). A Phase 3, 2-Arm, Open-label Study to Evaluate the Safety and Pharmacodynamics of Long-term Ivacaftor Treatment in Subjects With Cystic Fibrosis Who Are Less Than 24 Months of Age at Treatment Initiation and Have an Approved Ivacaftor-Responsive Mutation. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03277196> [Accessed December 28, 2020].
- Voganatsi, A., Panyutich, A., Miyasaki, K. T., and Murthy, R. K. (2001). Mechanism of extracellular release of human neutrophil calprotectin complex. *J. Leukoc. Biol.* 70, 130–134.
- Vogl, T., Tenbrock, K., Ludwig, S., Leukert, N., Ehrhardt, C., van Zoelen, M. A. D., et al. (2007). Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat. Med.* 13, 1042–1049. doi:10.1038/nm1638.
- Voorend-van Bergen, S., Brackel, H., Caudri, D., de Jongste, J., and Pijnenburg, M. (2013). Assessment of asthma control by children and parents. *Eur. Respir. J.* 41, 233. doi:10.1183/09031936.00106812.
- Wagner Mackenzie, B., Waite, D. W., and Taylor, M. W. (2015). Evaluating variation in human gut microbiota profiles due to DNA extraction method and inter-subject differences. *Front. Microbiol.* 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00130.

- Wainwright, C. E., Elborn, J. S., Ramsey, B. W., Marigowda, G., Huang, X., Cipolli, M., et al. (2015). Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N. Engl. J. Med.* 373, 220–231. doi:10.1056/NEJMoa1409547.
- Wang, J., Li, F., Wei, H., Lian, Z.-X., Sun, R., and Tian, Z. (2014). Respiratory influenza virus infection induces intestinal immune injury via microbiota-mediated Th17 cell-dependent inflammation. *J. Exp. Med.* 211, 2397–2410. doi:10.1084/jem.20140625.
- Wang, T., Cai, G., Qiu, Y., Fei, N., Zhang, M., Pang, X., et al. (2012). Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J.* 6, 320–329. doi:10.1038/ismej.2011.109.
- Wang, Z., Bafadhel, M., Haldar, K., Spivak, A., Mayhew, D., Miller, B. E., et al. (2016). Lung microbiome dynamics in COPD exacerbations. *Eur. Respir. J.* 47, 1082–1092. doi:10.1183/13993003.01406-2015.
- Wang, Z., Singh, R., Miller, B. E., Tal-Singer, R., Van Horn, S., Tomsho, L., et al. (2018). Sputum microbiome temporal variability and dysbiosis in chronic obstructive pulmonary disease exacerbations: an analysis of the COPDMAP study. *Thorax* 73, 331–338. doi:10.1136/thoraxjnl-2017-210741.
- Weiss, S., Xu, Z. Z., Peddada, S., Amir, A., Bittinger, K., Gonzalez, A., et al. (2017). Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome* 5, 27. doi:10.1186/s40168-017-0237-y.
- Werlin, S. L., Benuri-Silbiger, I., Kerem, E., Adler, S. N., Goldin, E., Zimmerman, J., et al. (2010). Evidence of intestinal inflammation in patients with cystic fibrosis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 51, 304–308. doi:10.1097/MPG.0b013e3181d1b013.
- Wheeler, M. L., Limon, J. J., Bar, A. S., Leal, C. A., Gargus, M., Tang, J., et al. (2016). Immunological Consequences of Intestinal Fungal Dysbiosis. *Cell Host Microbe* 19, 865–873. doi:10.1016/j.chom.2016.05.003.
- Wilson, M. T., and Hamilos, D. L. (2014). The nasal and sinus microbiome in health and disease. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 14, 485. doi:10.1007/s11882-014-0485-x.
- Xia, Y., and Sun, J. (2017). Hypothesis testing and statistical analysis of microbiome. *Genes Dis.* 4, 138–148. doi:10.1016/j.gendis.2017.06.001.
- Xia, Y., Sun, J., and Chen, D.-G. (2018). “Modeling Over-Dispersed Microbiome Data,” in *Statistical Analysis of Microbiome Data with R* ICOSA Book Series in Statistics., eds. Y. Xia, J. Sun, and D.-G. Chen (Singapore: Springer), 395–451. doi:10.1007/978-981-13-1534-3\_11.
- Xiros, C., Shahab, R. L., and Studer, M. H.-P. (2019). A cellulolytic fungal biofilm enhances the consolidated bioconversion of cellulose to short chain fatty acids by the rumen microbiome. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 3355–3365. doi:10.1007/s00253-019-09706-1.
- Xu, H., and Dongari-Bagtzoglou, A. (2015). Shaping the oral mycobiota: interactions of opportunistic fungi with oral bacteria and the host. *Curr. Opin. Microbiol.* 26, 65–70. doi:10.1016/j.mib.2015.06.002.
- Xu, H., Jenkinson, H., and Dongari-Bagtzoglou, A. (2014a). Innocent until proven guilty: mechanisms and roles of Streptococcus–Candida interactions in oral health and disease. *Mol. Oral Microbiol.* 29, 99–116. doi:10.1111/omi.12049.

- Xu, H., Sobue, T., Thompson, A., Xie, Z., Poon, K., Ricker, A., et al. (2014b). Streptococcal co-infection augments *Candida* pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response. *Cell. Microbiol.* 16, 214–231. doi:10.1111/cmi.12216.
- Yamada, A., Komaki, Y., Komaki, F., Micic, D., Zullo, S., and Sakuraba, A. (2018). Risk of gastrointestinal cancers in patients with cystic fibrosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 19, 758–767. doi:10.1016/S1470-2045(18)30188-8.
- Yan, Q., Li, J., Yu, Y., Wang, J., He, Z., Nostrand, J. D. V., et al. (2016). Environmental filtering decreases with fish development for the assembly of gut microbiota. *Environ. Microbiol.* 18, 4739–4754. doi:https://doi.org/10.1111/1462-2920.13365.
- Yassour, M., Vatanen, T., Siljander, H., Hämäläinen, A.-M., Härkönen, T., Ryhänen, S. J., et al. (2016). Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatment on bacterial strain diversity and stability. *Sci. Transl. Med.* 8, 343ra81. doi:10.1126/scitranslmed.aad0917.
- Yen, E. H., Quinton, H., and Borowitz, D. (2013). Better nutritional status in early childhood is associated with improved clinical outcomes and survival in patients with cystic fibrosis. *J. Pediatr.* 162, 530-535.e1. doi:10.1016/j.jpeds.2012.08.040.
- Yin, Y., Wang, Y., Zhu, L., Liu, W., Liao, N., Jiang, M., et al. (2013). Comparative analysis of the distribution of segmented filamentous bacteria in humans, mice and chickens. *ISME J.* 7, 615–621. doi:10.1038/ismej.2012.128.
- Z, X., Me, K., and Mi, M. (2018). Impact of DNA Sequencing and Analysis Methods on 16S rRNA Gene Bacterial Community Analysis of Dairy Products. *Mosphere* 3. doi:10.1128/msphere.00410-18.
- Zemanick, E. T., Harris, J. K., Wagner, B. D., Robertson, C. E., Sagel, S. D., Stevens, M. J., et al. (2013). Inflammation and airway microbiota during cystic fibrosis pulmonary exacerbations. *PLoS One* 8, e62917. doi:10.1371/journal.pone.0062917.
- Zemanick, E. T., Wagner, B. D., Robertson, C. E., Ahrens, R. C., Chmiel, J. F., Clancy, J. P., et al. (2017). Airway microbiota across age and disease spectrum in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 50. doi:10.1183/13993003.00832-2017.
- Zemanick, E. T., Wagner, B. D., Robertson, C. E., Stevens, M. J., Szeffler, S. J., Accurso, F. J., et al. (2015). Assessment of airway microbiota and inflammation in cystic fibrosis using multiple sampling methods. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 12, 221–229. doi:10.1513/AnnalsATS.201407-310OC.
- Zhao, J., Schloss, P. D., Kalikin, L. M., Carmody, L. A., Foster, B. K., Petrosino, J. F., et al. (2012). Decade-long bacterial community dynamics in cystic fibrosis airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5809–5814. doi:10.1073/pnas.1120577109.
- Zhou, J., Wu, L., Deng, Y., Zhi, X., Jiang, Y.-H., Tu, Q., et al. (2011). Reproducibility and quantitation of amplicon sequencing-based detection. *ISME J.* 5, 1303–1313. doi:10.1038/ismej.2011.11.
- Zhou, T. X., Jung, J. H., Zhang, Z. F., and Kim, I. H. (2013). Effect of dietary  $\beta$ -glucan on growth performance, fecal microbial shedding and immunological responses after lipopolysaccharide challenge in weaned pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 179, 85–92. doi:10.1016/j.anifeedsci.2012.10.008.

Zhou-Suckow, Z., Duerr, J., Hagner, M., Agrawal, R., and Mall, M. A. (2017). Airway mucus, inflammation and remodeling: emerging links in the pathogenesis of chronic lung diseases. *Cell Tissue Res.* 367, 537–550. doi:10.1007/s00441-016-2562-z.



# Annexes

---

# 1 SCRIPT DADA2 POUR L'ASSIGNATION 16S (FORMAT R MARKDOWN)

---

```
---
title: "Assignment 16S"
author: "Raphael Enaud"
date: `r format(Sys.time(), "%d %m %Y")`
```

```
header-includes:
  - \usepackage{color, fancyvrb}
```

```
output:
  rmdformats::readthedown:
    highlight: kate
    numbersections : yes
  html_document:
    fig_height: 7
    fig_width: 10
```

```
---
```

```
```${r knitrinit, include=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=TRUE}
```

```
# AVANT DE COMMENCER
```

```
# 1 / Mettre tous les fichiers démultiplexés (fastq.gz ou .gz) dans un même dossier. Attention : IL NE FAUT PAS QU'IL Y AIT D'ESPACE DANS LE CHEMIN D'ACCES. NB : Extensions gz acceptees
```

```
# 2 / charger le répertoire des fichiers
```

```
## ATTENTION, IL NE FAUT PAS UTILISER UN CHEMIN CONTENANT DES ESPACES
```

```
## Par défaut:
```

```
setwd("C:/Users/EnaudR/OneDrive/Boulot/Fastq/Scripts_DADA2/16S/")
```

```
path <- "C:/Users/EnaudR/OneDrive/Boulot/Fastq/Scripts_DADA2/16S/"
```

```
library(knitr)
library(rmdformats)
library("kableExtra")
library(DESeq2)
library("ggplot2")
library("readxl")
library("dplyr")
library(knitr)
library(rmdformats)
library("kableExtra")
library(DESeq2)
library(psy)
library(Rcpp)
library(nnet)
library(dplyr)
library(ggplot2)
library(psy)
library(prettyR)
library(corrplot)
library(readr)
library(questionr)
library(finalfit)
library(labelled)
```

```

library("dada2")
packageVersion("dada2")
library(ShortRead)
packageVersion("ShortRead")
library(Biostrings)
packageVersion("Biostrings")
library(DECIPHER); packageVersion("DECIPHER")
library(rJava)
library(xlsxjars)
library("phyloseq")
library(xlsx)
library("plyr")
theme_set(theme_bw())

# Identifiers les forwards et reverses
fnFs <- sort(list.files(path, pattern="_R1_001.fastq", full.names = TRUE))
fnRs <- sort(list.files(path, pattern="_R2_001.fastq", full.names = TRUE))
##Si besoin changer les extensions des fastq Reverse et Forward:
## Par défaut, fastq reverse se finit par _R1_001.fastq.gz
## Par défaut, fastq forward se finit par _R2_001.fastq.gz

# Extract sample names, assuming filenames have format:
SAMPLENAME_XXX.fastq
sample.names <- sapply(strsplit(basename(fnFs), "_"), `[`, 1)
````

```

L'assignation 16S a été réalisée avec a version des packages suivants:

```

````{r, echo=TRUE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
packageVersion("dada2")
packageVersion("ShortRead")
packageVersion("Biostrings")
packageVersion("DECIPHER")
````

```

### # Primers utilisés

```

Les primers; par default = Primers 16S (Illumina) V3-V4 341F, 805R:
FWD <- CCTACGGGNGGCWGCAG
REV <- GACTACHVGGGTATCTAATCC

```

### # Liste des échantillons

```

````{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
sample.names
````

```

### # Contrôler les profils de qualité de lecture

```

````{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
plotQualityProfile(fnFs[1:6])
````

```

En échelle de gris se trouve le heatmap de la fréquence de chaque score de qualité a chaque position de base. Le score qualité médian à chaque position est indiqué par la ligne verte et les quartiles par les lignes orange.



La ligne rouge indique la proportion de lectures qui s'étendent au moins jusqu'à cette position.

Pour le 16S : Il est conseillé généralement de rogner les derniers nucléotides pour éviter les erreurs moins bien contrôlées qui peuvent s'y produire. En V3-V4, nous tronquerons les lectures avant à la position 240 (suppression des 10 derniers nucléotides), afin de permettre le chevauchement des reads. En V4, DADA2 suggèrent de tronquer à 240 et 160, respectivement pour le forward et le reverse.

Nous visualisons maintenant le profil de qualité des lectures inversées :

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
plotQualityProfile(fnRs[1:6])
```
```

Les lectures Reverse peuvent être de moins bonne qualité, surtout à la fin, ce qui est courant dans le séquençage d'Illumina. Ce n'est pas trop inquiétant, car DADA2 intègre les informations de qualité dans son modèle d'erreur.

#### # Filtrer les reads

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}

# Place filtered files in filtered/ subdirectory

filtFs <- file.path(path, "filtered", paste0(sample.names,
"_F_filt.fastq.gz"))
filtRs <- file.path(path, "filtered", paste0(sample.names,
"_R_filt.fastq.gz"))

names(filtFs) <- sample.names
names(filtRs) <- sample.names

out <- filterAndTrim(fnFs, filtFs, fnRs, filtRs, trimLeft=c(17,21),
truncLen=c(240,240),
maxN=0, maxEE=c(2,2), truncQ=2, rm.phix=TRUE,
compress=TRUE, multithread=FALSE, matchIDs=TRUE)
# Sur MAC, mettre multithread=TRUE

out

#ATTENTION : Le "truncLen" doit être assez grand pour avoir longueur de la
zone d'intérêt + 20 pb minimum, afin de pouvoir ensuite merger
#V3-V4 fait 460pb dont les amorces. Si on fait du 2x250pb, on est peut
difficilement ronger les extrémités (donc on se limitera à
truncLen=c(240,240). #Si on fait du V4 seul, on peut ronger plus facilement
les extrémités si de mauvaise qualité. Pour infos, Dans le tuto DADA2, ils
proposent : truncLen=c(240,160) pour #du V4 (260pb)

#MaxEE : Le paramètre maxEE définit le nombre maximum d'"erreurs attendues"
autorisées dans une lecture, ce qui constitue un meilleur filtre que la
simple moyenne des notes de qualité.

#NB : Les paramètres de filtrage standard sont des points de départ et non
des points fixes. Si vous voulez accélérer le calcul en aval, vous pouvez
```

resserrer maxEE. Si trop peu de lectures passent le filtre, pensez à relaxer maxEE max, surtout au verso (ex. maxEE=c(2,5)), et à réduire le truncLen pour supprimer les queues de mauvaise qualité. Rappelez-vous cependant que lorsque vous choisissez truncLen pour les lectures à deux extrémités, vous devez conserver le chevauchement après la troncature afin de pouvoir les fusionner ultérieurement.

```
# trimLeft=c(17,21) : permet de rogner les amorces des reads forward et  
reverses (ici, respectivement de 17 et 21 pb).
```

## # Apprendre les taux d'erreur

L'algorithme DADA2 utilise un modèle d'erreur paramétrique ("err") et chaque ensemble de données d'amplicon à un taux d'erreur spécifique. La méthode "learnErrors" apprend ce modèle d'erreur à partir des données, en alternant l'estimation des taux d'erreur et l'inférence de la composition de l'échantillon jusqu'à ce qu'ils convergent vers une solution commune cohérente. L'algorithme doit commencer par une supposition initiale, pour laquelle on utilise les taux d'erreur maximaux possibles dans ces données (= les taux d'erreur si seule la séquence la plus abondante était correcte et que toutes les autres étaient des erreurs).

```
```{r, include=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}  
errF <- learnErrors(filtFs, multithread=FALSE)  
errR <- learnErrors(filtRs, multithread=FALSE)  
```
```

Il est toujours intéressant de visualiser les taux d'erreur estimés :

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}  
plotErrors(errF, nominalQ=TRUE)  
```
```

Les taux d'erreur pour chaque transition possible (A→C, A→G, ...) sont affichés. Les points sont les taux d'erreur observés pour chaque score de qualité. La ligne noire indique les taux d'erreur estimés après convergence de l'algorithme d'apprentissage machine. La ligne rouge indique les taux d'erreur attendus selon la définition nominale du Q-score. Les taux d'erreur estimés (ligne noire) doivent correspondre aux taux observés (points), et les taux d'erreur doivent diminuer lorsque le score de qualité augmente.

## # Application sur les échantillons

Nous sommes maintenant prêts à appliquer l'algorithme d'inférence aux données.

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}  
derepFs <- derepFastq(filtFs, verbose = TRUE)  
derepRs <- derepFastq(filtRs, verbose = TRUE)  
# Name the derep-class objects by the sample names  
names(derepFs) <- sample.names  
names(derepRs) <- sample.names  
  
dadaFs <- dada(derepFs, err = errF, multithread = TRUE)  
dadaRs <- dada(derepRs, err = errR, multithread = TRUE)  
```
```

```
```\n\n
```

### #Fusionner les reads appariés

Nous fusionnons maintenant les reads Forward et Reverse pour obtenir les séquences entières. Par défaut, les séquences fusionnées ne sont éditées que si les lectures avant et arrière se chevauchent d'au moins 12 bases et sont identiques dans la zone de chevauchement (mais ces conditions peuvent être modifiées par des arguments de fonction).

```
```\n{r, include=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}\nmergers <- mergePairs(dadaFs, derepFs, dadaRs, derepRs, verbose=TRUE)\n```\n
```

### #Construction d'un tableau de séquences

Nous pouvons maintenant construire une table de variant de séquence d'amplicons (ASV).

```
```\n{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}\nseqtab <- makeSequenceTable(mergers)\n```\n
```

Donne le nombre d'échantillons et le nombre de séquences ASV différentes dans l'ensemble des échantillons

### # Contrôler la répartition des longueurs de séquences

Il est maintenant intéressant de contrôler la répartition des longueurs de séquences.

```
```\n{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}\noptions(max.print="500")\ntable(nchar(getSequences(seqtab)))\n```\n
```

Vérifier que les longueurs de nos séquences fusionnées se situent toutes dans la plage prévue pour l'amplicon séquencé.

Ici, nous proposons de sélectionner les reads dont la longueur est comprise entre 380 et 450 pb.

Des séquences beaucoup plus longues ou plus courtes que prévu peuvent être le résultat d'un amorçage non spécifique. Vous pouvez supprimer des séquences de longueur non cible de votre table de séquences (par exemple pour V4 : `seqtab <- seqtab[,nchar(colnames(seqtab)) %in% 250:256]`). C'est un peu comme "couper une bande" in-silico pour obtenir des amplicons de la longueur ciblée.

```
```\n{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}\nseqtab2 <- seqtab[,nchar(colnames(seqtab)) %in% 380:450]\noptions(max.print="500")\ntable(nchar(getSequences(seqtab2)))\n```\n
```

### #Enlever les chimères

La méthode DADA2 corrige les erreurs de substitution, mais les chimères demeurent. Les séquences chimériques sont identifiées si elles peuvent être reconstituées avec précision en combinant un segment forward et reverse à partir de deux séquences "mères" plus abondantes.

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
seqtab.nochim <- removeBimeraDenovo(seqtab2, method="consensus",
multithread=FALSE, verbose=TRUE)
dim(seqtab.nochim)
sum(seqtab.nochim)/sum(seqtab2)
```
```

La fréquence des séquences chimériques varie considérablement d'un ensemble de données à l'autre et dépend de facteurs comme les procédures expérimentales et la complexité des échantillons. Dans l'exemple du tutorial DADA2, les chimères représentent environ 21 % des séquences fusionnées, mais lorsque qu'ils tenaient compte de l'abondance de ces chimères, ils constataient qu'elles ne représentent qu'environ 4 % des reads.

La plupart des lectures devraient rester après l'élimination de la chimère. Si la plupart de des lectures ont été supprimées en tant que chimères, le traitement en amont devra peut-être être revu. Dans presque tous les cas, cela est dû à des séquences d'amorces avec des nucléotides ambigus qui n'ont pas été éliminées avant le début du pipeline DADA2.

## # Résumé des différentes étapes du pipeline

En guise de vérification finale, nous examinerons le nombre de lectures qui ont franchi chaque étape du processus :

```
```{r, include=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
getN <- function(x) sum(getUniques(x))
track <- cbind(out, sapply(dadaFs, getN), sapply(dadaRs, getN),
sapply(mergers, getN), rowSums(seqtab.nochim))

## If processing a single sample, remove the sapply calls: e.g. replace
sapply(dadaFs, getN) with getN(dadaFs)
colnames(track) <- c("input", "filtered", "denoisedF", "denoisedR",
"merged", "nonchim")
rownames(track) <- sample.names
```
```

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
options(max.print="800")
kableExtra::kable(track)
```
```

En dehors du filtrage, il ne devrait pas y avoir d'étape dans laquelle une majorité de lectures sont perdues. Si la majorité des lectures n'ont pas réussi à fusionner, revoir le paramètre `truncLen` utilisé dans l'étape de filtrage et vous assurer que les lectures tronquées couvrent votre amplicon. Si la majorité des lectures ont été retirées comme étant chimériques, revoir l'élimination des amorces, car les nucléotides ambigus des amorces non retirées interfèrent avec l'identification des chimères.

## # Assignation

Il est courant à ce stade, en particulier dans le séquençage des amplicons 16S/18S/ITS, d'attribuer une taxonomie aux ASV. Le package DADA2 fournit

une implémentation native de la méthode naïve du classificateur bayésien. La fonction assignTaxonomy prend en entrée un ensemble de séquences à classer et un ensemble d'apprentissage de séquences de référence avec une taxonomie connue, et sort des assignations taxonomiques.

Base de données utilisées : SILVA (SILVA\_SSU\_r138\_August2020). Bases de données disponibles sur : <https://benjjneb.github.io/dada2/training.html>

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
taxa <- assignTaxonomy(seqtab.nochim, "C:/Users/Enaud
Raphael/OneDrive/Boulot/Statistiques/Bio info/Dada2/Scripts sources - Ne
pas modifier/silva_nr_v138_train_set.fa.gz", multithread=FALSE)
```
```

Le package dada2 implémente également une méthode d'assignation au niveau des espèces, basée sur une correspondance exacte entre les ASV et les souches de référence séquencées. Des analyses récentes suggèrent que l'appariement exact (ou identité à 100 %) est le seul moyen approprié d'attribuer une espèce à des fragments de gènes 16S. Actuellement, des fastas de formation à l'assignation d'espèces sont disponibles pour les bases de données Silva et RDP 16S.

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
taxa <- addSpecies(taxa, "C:/Users/Enaud
Raphael/OneDrive/Boulot/Statistiques/Bio info/Dada2/Scripts sources - Ne
pas modifier/silva_species_assignment_v138.fa.gz")
```
```

#### # Visualisation des assignations trouvées:

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
taxa.print <- taxa # Removing sequence rownames for display only
rownames(taxa.print) <- NULL
head(taxa.print)

##If your reads do not seem to be appropriately assigned, for example lots
of your bacterial 16S sequences are being assigned as Eukaryota NA NA NA NA
NA, your reads may be in the opposite orientation as the reference
database. Tell dada2 to try the reverse-complement orientation with
assignTaxonomy(..., tryRC=TRUE) and see if this fixes the assignments. If
using DECIPHER for taxonomy, try IdTaxa (... , strand="both").
```
```

#### # Exportation des données dans un fichier excel

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
seqtab.nochim2 = data.frame(t(seqtab.nochim))

write.csv2(seqtab.nochim2, file="ASV tous reads.csv")
write.csv2(taxa, file="Assignation tous reads.csv")

# Enregistrement global environment
save( out, fnFs, fnRs, seqtab, seqtab.nochim, track, sample.names, taxa ,
file =
"C:/Users/EnaudR/OneDrive/Boulot/Fastq/Scripts_DADA2/16S/assignation.rda")
```
```

## 2 SCRIPT DADA2 POUR L'ASSIGNATION ITS2 (FORMAT R MARKDOWN)

---

Pour ITS2, seuls les reads R1 (forward) ont été utilisés. En effet, il a été montré que cette méthode était plus performante (Pauvert et al., 2019) que l'analyse en paired-end. La région ITS étant très variable, le read n'est pas tronqué, car cela enlèverait de l'information biologique (Pauvert et al., 2019). Les reads sont filtrés selon les « erreurs attendues » comme précédemment, mais il n'y a donc pas d'étape de jointure des reads.

Pour les données fongiques, les amorces ont été enlevées en 5' avec l'outil cutadapt (version 2.3). La taille de la région ITS2 est très variable et la longueur de l'amplicon peut être supérieure à celle de la région ITS2 à séquencer. Dans ce cas, l'amplification va continuer jusqu'à l'amorce opposée (cas b de la Figure 1) et il faudra également enlever l'amorce du read complémentaire en « reverse complément » en 3'.



**Figure 1 : Variabilité de la longueur de la région ITS**

```
---
title: "Assignment ITS"
author: "Raphael Enaud"
date: `r format(Sys.time(), "%d %m %Y")`

header-includes:
- \usepackage{color, fancyvrb}
output:
rmdformats::readthedown:
highlight: kate
numbersections : yes
html_document:
fig_height: 7
fig_width: 10
---
```

```

```{r knitrinit, include=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=TRUE}
library(knitr)
library(rmdformats)
library("kableExtra")
library(DESeq2)
library("ggplot2")
library("readxl")
library("dplyr")
library(knitr)
library(rmdformats)
library("kableExtra")
library(DESeq2)
library(psy)
library(Rcpp)
library(nnet)
library(dplyr)
library(ggplot2)
library(psy)
library(prettyR)
library(corrplot)
library(readr)
library(questionr)
library(finalfit)
library(labelled)
library("dada2")
packageVersion("dada2")
library(ShortRead)
packageVersion("ShortRead")
library(Biostrings)
packageVersion("Biostrings")
library(DECIPHER); packageVersion("DECIPHER")
library(rJava)
library(xlsxjars)
library(xlsx)
library("plyr")
library("phyloseq")
library("ranacapa")
theme_set(theme_bw())

# AVANT DE COMMENCER

# 1 / Dans le "path", créer un dossier "Fastq" avec les séquences R1 et R2.
ATTENTION: IL NE FAUT PAS QU'IL Y AIT D'ESPACE DANS LE CHEMIN D'ACCES
# 2 / Supprimer le dossier "quality" dans le "path" s'il existe déjà
# 3 / Par défaut, le read R1 se finit par "_001.fastq.gz". A modifier dans
le script si besoin.
# 4 / Installer Cutadapt :
https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/index.html
# 4 / Chemin d'accès cutadapt, par défaut : C:/python/cutadapt.exe

# charger le repertoire des fichiers
## Changer le nom du dossier si besoin
## ATTENTION, IL NE FAUT PAS UTILISER UN CHEMIN CONTENANT DES ESPACES, cela
gene le fonctionnement de cutadapt

setwd("C:/Users/EnaudR/OneDrive/Boulot/Fastq/Scripts_DADA2/ITS2/")
path <-
file.path("C:/Users/EnaudR/OneDrive/Boulot/Fastq/Scripts_DADA2/ITS2/")
input <-list.dirs(path, full.names = F, recursive = F)

```

```

qual <-"C:/Users/EnaudR/OneDrive/Boulot/Fastq/Scripts_DADA2/ITS2/quality/"
outp <-"C:/Users/EnaudR/OneDrive/Boulot/Fastq/Scripts_DADA2/ITS2/output/"
fastq <- "C:/Users/EnaudR/OneDrive/Boulot/Fastq/Scripts_DADA2/ITS2/Fastq"
R1 <- "C:/Users/EnaudR/OneDrive/Boulot/Fastq/Scripts_DADA2/ITS2/R1"

# Identifiers les forwards
## changer les extensions si besoin
fnFs <- sort(list.files(fastq, pattern = "_R1_001.fastq.gz", full.names =
TRUE))
fnRs <- sort(list.files(fastq, pattern = "_R2_001.fastq.gz", full.names =
TRUE))

# Identifier les primers
##Primers ITS2 (ITS7F / 3271R):
##FWD <- "GTGARTCATCGAATCTTT"
##REV <- "GATATGCTTAAGTTCAGCGGGT"

FWD <- "GTGARTCATCGAATCTTT"
REV <- "GATATGCTTAAGTTCAGCGGGT"

...

L'assignation ITS a été réalisée avec la version des packages suivants:

```{r, echo=TRUE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
packageVersion("dada2")
packageVersion("ShortRead")
packageVersion("Biostrings")
packageVersion("DECIPHER")
```

Les primers utilisés était les suivants :

```{r, echo=TRUE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
FWD
REV
```

```{r, include=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}

#Verification de la présence et de l'orientation des primers

allOrients <- function(primer) {
  # Create all orientations of the input sequence
  require(Biostrings)
  dna <- DNASTring(primer) # The Biostrings works w/ DNASTring objects
rather than character vectors
  oriens <- c(Forward = dna, Complement = complement(dna), Reverse =
reverse(dna),
             RevComp = reverseComplement(dna))
  return(sapply(oriens, toString)) # Convert back to character vector
}
FWD.oriens <- allOrients(FWD)
REV.oriens <- allOrients(REV)
FWD.oriens
REV.oriens

# Pre filtration

```



```

fnFs.filtN <- file.path(fastq, "filtN", basename(fnFs)) # Put N-filtered
files in filtN/ subdirectory
fnRs.filtN <- file.path(fastq, "filtN", basename(fnRs))
filterAndTrim(fnFs, fnFs.filtN, fnRs, fnRs.filtN, maxN = 0, multithread =
TRUE)

primerHits <- function(primer, fn) {
  # Counts number of reads in which the primer is found
  nhits <- vcountPattern(primer, sread(readFastq(fn)), fixed = FALSE)
  return(sum(nhits > 0))
}

...

Nombres de primers trouvés :

```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}

rbind(FWD.ForwardReads = sapply(FWD.oriens, primerHits, fn =
fnFs.filtN[[1]]),
      FWD.ReverseReads = sapply(FWD.oriens, primerHits, fn =
fnRs.filtN[[1]]),
      REV.ForwardReads = sapply(REV.oriens, primerHits, fn =
fnFs.filtN[[1]]),
      REV.ReverseReads = sapply(REV.oriens, primerHits, fn =
fnRs.filtN[[1]]))
```

```

## # Enlever les primers

```

```{r, include=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}

cutadapt <-
"C:/Users/EnaudR/AppData/Local/Packages/PythonSoftwareFoundation.Python.3.9
_qbz5n2kfra8p0/LocalCache/local-packages/Python39/Scripts/cutadapt.exe"
## changer repertoire de direction si besoin et attention au /
system2(cutadapt, args = "--version") # Run shell commands from R

R1 <- file.path(path, "R1")
if(!dir.exists(R1)) dir.create(R1)
R2 <- file.path(path, "R2")
if(!dir.exists(R2)) dir.create(R2)

fnFs.cut <- file.path(R1, basename(fnFs))
fnRs.cut <- file.path(R2, basename(fnRs))

FWD.RC <- dada2:::rc(FWD)
REV.RC <- dada2:::rc(REV)
# Trim FWD and the reverse-complement of REV off of R1 (forward reads)
R1.flags <- paste("-g", FWD, "-a", REV.RC)
# Trim REV and the reverse-complement of FWD off of R2 (reverse reads)
R2.flags <- paste("-G", REV, "-A", FWD.RC)

# Run Cutadapt
for(i in seq_along(fnFs)) {
  system2(cutadapt, args = c(R1.flags, R2.flags, "-n", 2, # -n 2 required to
remove FWD and REV from reads
                        "-m", 20, "-o", fnFs.cut[i], "-p", fnRs.cut[i], # output
files, filtrage des reads au minimum 20 pb

```

```

        fnFs.filtN[i], fnRs.filtN[i])) # input files
    }
    ...

```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}

rbind(FWD.ForwardReads = sapply(FWD.oriens, primerHits, fn =
fnFs.cut[[1]]),
      FWD.ReverseReads = sapply(FWD.oriens, primerHits, fn = fnRs.cut[[1]]),
      REV.ForwardReads = sapply(REV.oriens, primerHits, fn = fnFs.cut[[1]]),
      REV.ReverseReads = sapply(REV.oriens, primerHits, fn = fnRs.cut[[1]]))
...

```{r, include=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}

write.fasta.dada<-function(dada2, file){
  seqs<-dada2::getSequences(dada2)
  hash<-paste0(">",sapply(seqs, openssl::sha1, USE.NAMES = F))
  write(c(rbind(hash, seqs)),file)
}

for (R1 in R1){
  # List FASTQ files
  fq <-list.files(file.path(path,"R1"), pattern="_001.fastq.gz")
  # Extract sample names, assuming filenames have format:
SAMPLENAME_XXX.fastq
  sample.names <- sapply(strsplit(fq, "_"), `[`, 1)

  # Add the full path
  fq <- file.path(R1, fq)

  filt_path <- file.path(qual,"R1") # Place filtered files in subdirectory
  dir.create(filt_path, recursive = T)
  # Prepare future filenames
  filt <- file.path(filt_path, paste0(sample.names, ".filt.fastq.gz"))

  # Filtrer les reads
  out.ee <- ldply(1:length(sample.names),function(i) {
    fastqFilter(fn = fq[i],
               fout = filt[i],
               trimLeft = 0,minLen = 100,
               maxN=0, maxEE = 1, rm.phix=TRUE,
               compress=TRUE)
  })

  # Dereplication
  derep <- llply(1:length(sample.names), function(i){
    derepFastq(filt[i], verbose=TRUE)
  })
  names(derep)<-sample.names

  # Learn errors
  err <- learnErrors(derep, multithread=3)
  # And save the fit to an image
  png(file.path(qual,paste("errors_dada2",R1,"png",sep=".")),width = 8,
      height = 8, units = "in", res=300)
  plotErrors(err, nominalQ=TRUE)
  dev.off()
}

```

```

# Get variants
dada_obj<-dada(derep, err=err, multithread = 3)
# Create output directory
#outp_rds<-file.path(outp,R1, "RDS")
#dir.create(outp_rds, recursive = T)
#saveRDS(dada_obj, file = paste0(outp_rds,"/",R1,".RDS"), compress =
"gzip")

# Produce Variant Table
seqtab<-makeSequenceTable(dada_obj)

# Remove Chimeras
seqtab.nochim <- removeBimeraDenovo(seqtab, verbose=TRUE)

}

#NB : Les paramètres de filtrage standard sont des points de départ et non
des points fixes. Si vous voulez accélérer le calcul en aval, vous pouvez
resserrer maxEE. Si trop peu de lectures passent le filtre, pensez à
relaxer maxEE max, surtout au verso (ex. maxEE=c(2,5)), et à réduire le
truncLen pour supprimer les queues de mauvaise qualité.
```

```

#### # Liste des échantillons

```

```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
sample.names
```

```

#### # Contrôler les profils de qualité de lecture

```

```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
plotQualityProfile(fq[1:2])
```

```

En échelle de gris se trouve le heatmap de la fréquence de chaque score de qualité à chaque position de base. Le score qualité médian à chaque position est indiqué par la ligne verte et les quartiles par les lignes orange.

La ligne rouge indique la proportion de lectures qui s'étendent au moins jusqu'à cette position.

Pour l'ITS2 : Notez que, contrairement à ce qui se passe avec le 16S, nous ne tronquons pas les lectures à une longueur fixe, car la région ITS présente une variation biologique importante de longueur qui est perdue par une telle évaluation.

#### # Apprendre les taux d'erreur

L'algorithme DADA2 utilise un modèle d'erreur paramétrique ("err") et chaque ensemble de données d'amplicon à un taux d'erreur spécifique. La méthode "learnErrors" apprend ce modèle d'erreur à partir des données, en alternant l'estimation des taux d'erreur et l'inférence de la composition de l'échantillon jusqu'à ce qu'ils convergent vers une solution commune

cohérente. L'algorithme doit commencer par une supposition initiale, pour laquelle on utilise les taux d'erreur maximaux possibles dans ces données (= les taux d'erreur si seule la séquence la plus abondante était correcte et que toutes les autres étaient des erreurs).

Il est toujours intéressant de visualiser les taux d'erreur estimés :

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
plotErrors(err, nominalQ=TRUE)
```
```

Les taux d'erreur pour chaque transition possible (A→C, A→G, ...) sont affichés. Les points sont les taux d'erreur observés pour chaque score de qualité. La ligne noire indique les taux d'erreur estimés après convergence de l'algorithme d'apprentissage machine. La ligne rouge indique les taux d'erreur attendus selon la définition nominale du Q-score. Les taux d'erreur estimés (ligne noire) doivent correspondre aux taux observés (points), et les taux d'erreur doivent diminuer lorsque le score de qualité augmente.

### # Construction d'un tableau de séquences

Nous pouvons maintenant construire une table de variant de séquence d'amplicons (ASV).

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
seqtab <- makeSequenceTable(dada_obj)
dim(seqtab)
```
```

Donne le nombre d'échantillons et le nombre de séquences ASV différentes dans l'ensemble des échantillons.

### # Contrôler la répartition des longueurs de séquences

Il est maintenant intéressant de contrôler la répartition des longueurs de séquences.

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
options(max.print="500")
table(nchar(getSequences(seqtab)))
```
```

Vérifier que les longueurs de nos séquences fusionnées se situent toutes dans la plage prévue pour l'amplicon séquencé.

Contrairement au 16S, il est conseillé de ne pas filtrer les reads sur leur longueur pour ITS2, étant donné la variabilité de la longueur d'ITS2.

## # Enlever les chimères

La méthode DADA2 corrige les erreurs de substitution, mais les chimères demeurent. Les séquences chimériques sont identifiées si elles peuvent être reconstituées avec précision en combinant un segment forward et reverse à partir de deux séquences "mères" plus abondantes.

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
seqtab.nochim <- removeBimeraDenovo(seqtab, verbose=TRUE)
dim(seqtab.nochim)
sum(seqtab.nochim)/sum(seqtab)
table(nchar(getSequences(seqtab.nochim)))
```
```

La fréquence des séquences chimériques varie considérablement d'un ensemble de données à l'autre et dépend de facteurs comme les procédures expérimentales et la complexité des échantillons. Dans l'exemple du tutorial DADA2, les chimères représentent environ 21 % des séquences fusionnées, mais lorsque qu'ils tenaient compte de l'abondance de ces chimères, ils constataient qu'elles ne représentent qu'environ 4 % des reads.

La plupart des lectures devraient rester après l'élimination de la chimère. Si la plupart de des lectures ont été supprimées en tant que chimères, le traitement en amont devra peut-être être revu. Dans presque tous les cas, cela est dû à des séquences d'amorces avec des nucléotides ambigus qui n'ont pas été éliminées avant le début du pipeline DADA2.

## # Résumé des différentes étapes du pipeline

En guise de vérification finale, nous examinerons le nombre de lectures qui ont franchi chaque étape du processus :

```
```{r, include=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
getN <- function(x) sum(getUniques(x))
track <- cbind(out.ee, sapply(dada_obj, getN), rowSums(seqtab.nochim))

## If processing a single sample, remove the sapply calls: e.g. replace
sapply(dadaFs, getN) with getN(dadaFs)
colnames(track) <- c("input", "filtered", "denoised", "nonchim")
rownames(track) <- sample.names
```
```

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
options(max.print="600")
track
```
```

## # Attribution taxonomique avec Unite

Nous Assignons avec Unite. Bases de données disponibles sur : <https://benjjneb.github.io/dada2/training.html>

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
```

```

unite.ref <- "C:/Users/Enaud Raphael/OneDrive/Boulot/Statistiques/Bio
info/Dada2/Scripts sources - Ne pas modifier/UNITE_v2014_March2018.RData" #
CHANGE ME to location on your machine
taxa <- assignTaxonomy(seqtab.nochim, unite.ref, multithread = TRUE, tryRC
= TRUE)

str_replace_all(taxa, pattern = "p_", replacement = "")
str_replace_all(taxa, pattern = "c_", replacement = "")
str_replace_all(taxa, pattern = "o_", replacement = "")
str_replace_all(taxa, pattern = "f_", replacement = "")
str_replace_all(taxa, pattern = "g_", replacement = "")
str_replace_all(taxa, pattern = "s_", replacement = "")

...

```

Visualisation des assignations trouvées :

```

```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
taxa.print <- taxa # Removing sequence rownames for display only
rownames(taxa.print) <- NULL
head(taxa.print)
```

```

### # Exportation des données dans un fichier excel

Les résultats ont été exportés dans un fichier excel dans votre repertoire de travail.

```

```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
seqtab.nochim2 = data.frame(t(seqtab.nochim))

write.csv2(seqtab.nochim2, file="ASV tous reads UNITE.csv")
write.csv2(taxa, file="Assignment tous reads UNITE.csv")

# enregistrement global environment
save( out, fnFs, fnRs, seqtab, seqtab.nochim, track, sample.names, taxa ,
file =
"C:/Users/EnaudR/OneDrive/Boulot/Fastq/Scripts_DADA2/ITS2/assignment
Unite.rda")
```

```

### # Assignation taxonomique avec Isham (optionnel)

Nous assignons avec Isham

```

```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}

unite.ref <- "C:/Users/Enaud Raphael/OneDrive/Boulot/Statistiques/Bio
info/Dada2/Scripts sources - Ne pas modifier/UNITE_v2014_March2018.RData" #
CHANGE ME to location on your machine
taxa <- assignTaxonomy(seqtab.nochim, unite.ref, multithread = TRUE, tryRC
= TRUE)

unite=load("C:/Users/Enaud Raphael/OneDrive/Boulot/Statistiques/Bio
info/Dada2/Scripts sources - Ne pas modifier/UNITE_v2014_March2018.RData")
```

```

Visualisation des assignations trouvées:

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
taxa.print <- taxa # Removing sequence rownames for display only
rownames(taxa.print) <- NULL
head(taxa.print)
```
```

### # Exportation des données dans un fichier excel

Les résultats ont été exportés dans un fichier excel dans votre répertoire de travail.

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
seqtab.nochim2 = data.frame(t(seqtab.nochim))

write.csv2(seqtab.nochim2, file="ASV tous reads ISHAM.csv")
write.csv2(taxa, file="Assignment tous reads ISHAM.csv")

# enregistrement global environment
save(out, fnFs, fnRs, seqtab, seqtab.nochim, track, sample.names, taxa,
file =
"C:/Users/EnaudR/OneDrive/Boulot/Fastq/Scripts_DADA2/ITS2/assignment
Isham.rda")
```
```

### 3 PREPROCESSING 16S (FORMAT R MARKDOWN)

---

Avant de lancer des analyses sur le jeu de données, il est important de nettoyer les reads. Ce scripte pour 16S peut être facilement adapté pour ITS2.

```
---
title: "Pre Processing 16S"
author: "Raphael Enaud"
date: '`r format(Sys.time(), "%d %m %Y")`'
```

```
header-includes:
  - \usepackage{color, fancyvrb}
output:
  rmdformats::readthedown:
    highlight: kate
    numbersections : yes
  html_document:
    fig_height: 7
    fig_width: 10
---
```

```
```${r knitrnit, include=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}

# AVANT DE COMMENCER

# Mettre dans le dossier de travail :
#"Medadonnees.csv" : avec les métadonnées, dont au moins les variables
s'intitulant:
## -- "Groupe" : les groupes à comparer
## -- "Sample_or_Control" : Mettre "Sample"/"TN"/"Mock"

setwd("C:/Users/EnaudR/OneDrive/Boulot/Fastq/Scripts_DADA2/16S/")
load("C:/Users/EnaudR/OneDrive/Boulot/Fastq/Scripts_DADA2/16S/assignation.r
da")

library(knitr)
library(rmdformats)
library("kableExtra")
library(DESeq2)
library("ggplot2")
library("readxl")
library("dplyr")
library(knitr)
library(rmdformats)
library(psy)
library(Rcpp)
library(nnet)
library(dplyr)
library(ggplot2)
library(psy)
library(prettyR)
library(corrplot)
library(readr)
library(questionr)
```



```

library(finalfit)
library(labelled)
library("dada2")
packageVersion("dada2")
library(ShortRead)
packageVersion("ShortRead")
library(Biostrings)
packageVersion("Biostrings")
library(DECIPHER); packageVersion("DECIPHER")
library(rJava)
library(xlsxjars)
library(xlsx)
library("plyr")
theme_set(theme_bw())
library(phyloseq)
library(BiocStyle)
library(ape)
library(tidyr)
library(broom)
library(dplyr)
library(Hmisc)
library(microbiome)
library(picante)
library(plyr)
library(reshape2)
library(doBy)
library(RVAideMemoire)
library(vegan)
library(heatmap.plus)
library(RColorBrewer)
library(gplots)
library(kableExtra)
library(gridExtra)
library(knitr)
library(microbiomeSeq)
library(adespatial)
library(ggpubr)
library(devtools)
library(yingtools2)
library("decontam")
library("microDecon")
` ``

```

```

` `` {r, include=FALSE}

# Création de l'objet phyloseq

samdf<-
read.xlsx("C:/Users/EnaudR/OneDrive/Boulot/Fastq/Scripts_DADA2/16S/Medadonnees.xlsx",1, header=TRUE, colClasses=NA)
samples_df <- sample_data(samdf)

rownames(samples_df) <- samples_df$sample
samples_df$Groupe <- factor(samples_df$Groupe)
samples_df$Sample_or_Control <- factor(samples_df$Sample_or_Control)

phylo <- phyloseq(otu_table(seqtab.nochim, taxa_are_rows=FALSE),
  sample_data(samples_df),
  tax_table(taxa))

```

```

sample_data(phylo)

# Nommer les ASV en ASV 1, ASV2 ... au lieu de la sequence de nuceotides
dna <- Biostrings::DNASTringSet(taxa_names(phylo))
names(dna) <- taxa_names(phylo)
phylo <- merge_phyloseq(phylo, dna)
taxa_names(phylo) <- paste0("ASV", seq(ntaxa(phylo)))
```

```

```

```{r, echo=FALSE}
phylo
```

```

### # Inspecter le nombre de reads

```

```{r, echo=FALSE}
df <- as.data.frame(sample_data(phylo)) # Put sample_data into a ggplot-
friendly data.frame
df$LibrarySize <- sample_sums(phylo)
df <- df[order(df$LibrarySize),]
df$Index <- seq(nrow(df))
ggplot(data=df, aes(x=Index, y=LibrarySize, color=Sample_or_Control, label
= sample)) + geom_point()

kableExtra::kable(sort(sample_sums(phylo))) %>%
  kable_styling() %>%
  scroll_box(width = "100%", height = "600px")
```

```

### # Enlever les bruits de fonds

Suppression des ASV qui sont inferieurs 60 sur l'ensemble des echantillons  
Proportion de reads concernée pour chaque échantillon :

```

```{r, echo=FALSE}
phylof = prune_taxa(names(which(taxa_sums(phylo) < 60)), phylo) # ref :
Gloor, B.G., and Reid, G. (2016). Compositional analysis: a valid approach
to analyze microbiome high-throughput sequencing data. Can. J. Microbiol.
62, 692-703.

phylofdf <- data.frame(sample_names(phylo))
phylofdf$nbre_reads_original = sample_sums(phylo)
phylofdf$nbre_reads_filtres <- sample_sums(phylof)
phylofdf$"proportion reads" =
phylofdf$nbre_reads_filtres/phylofdf$nbre_reads_original*100

print("Proportion d'ASV filtrés :")
ntaxa(phylof)/ntaxa(phylo)*100

kableExtra::kable(phylofdf) %>%
  kable_styling() %>%
  scroll_box(width = "100%", height = "600px")

phylo = prune_taxa(names(which(taxa_sums(phylo) >= 60)), phylo)
```

```

Base de données après filtrage :

```
```{r, echo=FALSE}
phylo
```
```

#### # Sélection des ASV bactériens seulement

```
```{r, echo=FALSE}
phylo_avantfiltre = phylo
phylo = subset_taxa(phylo, Kingdom=="Bacteria")

phylofdf <- data.frame(sample_names(phylo))
phylofdf$nbre_reads_original = sample_sums(phylo_avantfiltre)
phylofdf$nbre_reads_filtres <- sample_sums(phylo_avantfiltre) -
sample_sums(phylo)
phylofdf$nbre_reads_apres_filtre
phylofdf$proportion =
phylofdf$nbre_reads_filtres/phylofdf$nbre_reads_original*100
phylofdf$nbre_reads_apres_filtre = sample_sums(phylo)

print("Proportion d'ASV filtrés :")

(ntaxa(phylo_avantfiltre)-ntaxa(phylo))/ntaxa(phylo_avantfiltre)*100
```
```

#### Proportion de reads concernée pour chaque échantillon :

```
```{r, echo=FALSE}
kableExtra::kable(phylofdf) %>%
  kable_styling() %>%
  scroll_box(width = "100%", height = "600px")
```
```

```
```{r, echo=FALSE}

phylo = subset_taxa(phylo, Kingdom=="Bacteria")
phylo
```
```

Et suppression des phyla avec un seul taxa, car c'est probablement une erreur de séquençage :

```
```{r, echo=FALSE}
table(tax_table(phylo)[, "Phylum"], exclude = NULL)

#Mettre le noms des phylas avec un seul taxa. Exemple :
phylo <- subset_taxa(phylo, !is.na(Phylum) & !Phylum %in%
c("", "Armatimonadota", "Nitrospinota"))

phylo
```
```

#### # Proportion des ASV minoritaires dans notre échantillon

Avec la proportion de reads qui concernent les ASV minoritaires (1%) et très minoritaires (0,1%) et très très minoritaires (0,01%) (cf publications Galland et Roger)

```
```{r, echo=FALSE}

phylor = prune_samples(names(which(sample_sums(phylo) >= 1)), phylo)
phylor = transform_sample_counts(phylor, function(x) x / sum(x) )
phylor1 = filter_taxa(phylor, function(x) sum(x) > .01, TRUE)
phylor0_1 = filter_taxa(phylor, function(x) sum(x) > .001, TRUE)
phylor0_01 = filter_taxa(phylor, function(x) sum(x) > .0001, TRUE)
minoritaire = data.frame(sample_names(phylor))

minoritaire$"Prop inf à 1%" = (sample_sums(phylor) -
sample_sums(phylor1))/sample_sums(phylor)*100
minoritaire$"Prop inf à 0,1%" = (sample_sums(phylor) -
sample_sums(phylor0_1))/sample_sums(phylor)*100
minoritaire$"Prop inf à 0,01%" = (sample_sums(phylor) -
sample_sums(phylor0_01))/sample_sums(phylor)*100

kableExtra::kable(minoritaire) %>%
  kable_styling() %>%
  scroll_box(width = "100%", height = "600px")
```
```

#### # Filtrage des ASV minoritaires (optionnel)

Plusieurs options envisageables:

- ASV présent dans moins de 3 échantillons
- ASV dont l'abondance globales est < 0,01%
- ASV dont la somme totale est inferieure à la somme totale des échantillons

```
```{r, echo=FALSE}

# ASV présent dans moins de 3 échantillons
##condition <- function(x) { sum(x > 0) >= 3 }
##taxaToKeep <- filter_taxa(phylo, condition)
##phylo <- prune_taxa(taxaToKeep, phylo)

# ASV dont l'abondance globales est < 0.005%
#phylor = prune_samples(names(which(sample_sums(phylo) >= 1)), phylo)
#phylor = transform_sample_counts(phylor, function(x) x / sum(x) )
#phylor = filter_taxa(phylor, function(x) sum(x) >= .0001, TRUE)
#phylor_taxa = taxa_names(phylor)
#phylo = prune_taxa(phylor_taxa, phylo)

# ASV dont l'abondance globales est < 0,0005% (doi : 10.1038/s41467-019-12633-4)
# There are no standardized, published cutoffs for this - we use a very conservative cutoff of 0.005% average relative abundance across all samples in order to prevent over-filtering of the data
#phylor = prune_samples(names(which(sample_sums(phylo) >= 1)), phylo)
#phylor = transform_sample_counts(phylor, function(x) x / sum(x) )
#phylor = filter_taxa(phylor, function(x) sum(x) >= 00005, TRUE)
#phylor_taxa = taxa_names(phylor)
#phylo = prune_taxa(phylor_taxa, phylo)
```
```

```

# ASV dont la somme totale est inferieure à la somme totale des
échantillons
##condition <- function(x) { sum(x >= nsamples(phylo))}
##taxaToKeep <- filter_taxa(phylo, condition)
##phylo <- prune_taxa(taxaToKeep, phylo)

##alternatives:
#Remove OTUs that do not show appear more than 5 times in more than half
the samples (trés selectif : 37/1000 ASV pour 14 échantillons)
##wh0 = genefilter_sample(phylo, filterfun_sample(function(x) x > 5),
A=0.5*nsamples(phylo))
##phylo = prune_taxa(wh0, phylo)

#Remove taxa not seen more than 3 times in at least 5% of the samples. This
protects against an OTU with small mean & trivially large C.V. (145/1000
ASV pour 14 échantillons)
## phylo = filter_taxa(phylo, function(x) sum(x > 3) > (0.05*length(x)),
TRUE)

#taxa seen at least 10 times in at least 10% of samples (210/1000 ASV pour
14 échantillons)
##phylo = filter_taxa(phylo, function(x) sum(x > 10) > (0.1*length(x)),
TRUE)

# Sample wise condition (example I): filter taxa present in at least 5
samples (77/1000 ASV pour 14 échantillons)
##condition <- function(x) { x > 0 }
##taxaToKeep <- genefilter_sample(phylo, condition, 5)
##phylo <- prune_taxa(taxaToKeep, phylo)

# Sample wise condition (example II): filter taxa in the top 250 taxa
present in at least 3 samples
##condition <- function(x) { order(x, decreasing = TRUE) <= 250 }
##taxaToKeep <- genefilter_sample(phylo, condition, 3)
##phylo <- prune_taxa(taxaToKeep, phylo)

# sample wide condition (example II): filter taxa present with global
abundance at least 100
##condition <- function(x) {sum(x) >= 100 }
##taxaToKeep <- filter_taxa(phylo, condition)
##phylo <- prune_taxa(taxaToKeep, phylo)

...

```

## # Courbes de raréfaction

```

````{r, include=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE, fig.width
= 14, fig.height= 14}

library(vegan)
library(ggplot2)
library("ranacapa")
phylo = prune_samples(names(which(sample_sums(phylo) >= 1)), phylo) #enleve
tous les échantillons avec 0 reads

```

```
courbe = ggrare(phylo, step = 100, label = "sample", color =
"Sample_or_Control", se = FALSE)
````
```

```
````{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE, fig.width =
14, fig.height= 14}
courbe
````
```

### # Beta diversité des échantillons (Mock et TN)

Mesure de la Beta Diversité par mesure de Bray Curits

Représentation MDS (multi-dimensional scaling)

```
````{r, include=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE, fig.width
= 14, fig.height= 14}
```

```
# Transform data to proportions as appropriate for Bray-Curtis distances
ps.prop <- transform_sample_counts(phylo, function(otu) otu/sum(otu))
ord.nmnds.bray <- ordinate(ps.prop, method="MDS", distance="bray")
````
```

```
````{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE, fig.width =
14, fig.height= 14}
plot_ordination(ps.prop, ord.nmnds.bray, type="samples", label = "sample",
color = "Sample_or_Control", title="MDS")
````
```

Représentation NMDS (Non-metric multi-dimensional scaling)

```
````{r, include=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE, fig.width
= 14, fig.height= 14}
ord.nmnds.bray <- ordinate(ps.prop, method="NMDS", distance="bray")
````
```

```
````{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE, fig.width =
14, fig.height= 14}
plot_ordination(ps.prop, ord.nmnds.bray, type="samples", label = "sample",
color = "Sample_or_Control", title="NMDS")
````
```

### # Arbre de bêta diversité (avec indice de dissimilarité Bray Curtis)

```
````{r, include=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
```

#Création maintenant un arbre phylogénétique aléatoire et ajoutez-le à votre ensemble de données

```
library("ape")
random_tree = rtree(ntaxa(phylo), rooted=TRUE, tip.label=taxa_names(phylo))

phylo1 = merge_phyloseq(phylo, random_tree)
phylo1
```

```
# Mesure de dissimilarité avec Bray Cutris
```

```
GPUF <- round(distance(phylo1,"bray"),3)
````
```

```
````{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE, fig.width =
7, fig.height= 26}
```

```
#Création d'un arbre
```

```
# Manually define color-shading vector based on sample type.
```

```
colorScale <- rainbow(length(levels(getVariable(phylo1,
"Sample_or_Control"))))
```

```
cols <- colorScale[getVariable(phylo1, "Sample_or_Control")]
```

```
GP.tip.labels <- as(getVariable(phylo1, "sample"), "character")
```

```
GP.hclust <- hclust(GPUF, method = "average")
```

```
plot(as.phylo(GP.hclust), show.tip.label = TRUE, tip.color = "white")
```

```
tiplabels(GP.tip.labels, col = cols, frame = "none",adj = -0.05,cex = 0.7)
````
```

## # Decontamination

Decontamination avec le package microDecon

```
````{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE, fig.width =
14, fig.height= 22}
```

```
# decontamination avec microDecon
```

```
##Selection des TN
```

```
phyloTN = subset_samples(phylo, Sample_or_Control == "TN")
```

```
##suppression des TN "aberrant" si besoin
```

```
##phyloTN = prune_samples(sample_names(phyloTN) != "TN9", phyloTN)
```

```
##Selection des échantillons
```

```
phyloSample = subset_samples(phylo, Sample_or_Control == "Sample")
```

```
phylo_microDecon = merge_phyloseq(phyloTN, phyloSample)
```

```
##Création d'une table otu avec une premiere ligne "OTU_ID", puis les TN,
puis les échantillons
```

```
data = data.frame(t(otu_table(phylo_microDecon)))
```

```
data1 = data.frame(row.names(data))
```

```
colnames(data1) <- "OTU_ID"
```

```
data2 = cbind(data1,data)
```

```
##decontamination
```

```
result1 <- decon(data = data2, numb.blanks =
```

```
phyloseq::nsamples(subset_samples(phylo_microDecon, Sample_or_Control
=="TN")), numb.ind = phyloseq::nsamples(phyloSample), taxa = F)
```

```
data_microDecon = data.frame(result1$decon.table)
```

```
row.names(data_microDecon)= data_microDecon$OTU_ID
```

```
data_microDecon2 = data_microDecon[,-c(1,2)]
```

```
##creation du nouveau phyloseq
```

```

rownames(samples_df) <- samples_df$sample
samples_df$Groupe <- factor(samples_df$Groupe)
samples_df$Sample_or_Control <- factor(samples_df$Sample_or_Control)

phylo <- phyloseq(otu_table(data_microDecon2, taxa_are_rows=TRUE),
  sample_data(phylo_microDecon),
  tax_table(phylo_microDecon))

phylo

# Bétadiversité après décontamination
samples_df <- sample_data(samdf)
rownames(samples_df) <- samples_df$sample
samples_df$Groupe <- factor(samples_df$Groupe)
samples_df$Sample_or_Control <- factor(samples_df$Sample_or_Control)
phylo1 <- phyloseq(otu_table(seqtab.nochim, taxa_are_rows=FALSE),
  sample_data(samples_df),
  tax_table(taxa))
sample_names(phylo1) = paste0("initial",sample_names(phylo1))
dna <- Biostrings::DNASTringSet(taxa_names(phylo1))
names(dna) <- taxa_names(phylo1)
phylo1 <- merge_phyloseq(phylo1, dna)
taxa_names(phylo1) <- paste0("ASV", seq(ntaxa(phylo1)))
sample_data(phylo1)$run = "Initial"
sample_data(phylo)$run = "Après MicroDecon"
phylo3 = merge_phyloseq(phylo,phylo1)
ps.prop <- transform_sample_counts(phylo3, fonction(otu) otu/sum(otu))
ord.nmds.bray <- ordinate(ps.prop, method="MDS", distance="bray")

print("Betadiversité avant et après décontamination")
plot_ordination(ps.prop, ord.nmds.bray, type="samples", label = "sample",
color = "run", title="MDS")

print("Arbre de Betadiversité après décontamination")
GPUF <- round(distance(phylo,"bray"),3)
colorScale <- rainbow(length(levels(getVariable(phylo,
"Sample_or_Control"))))
cols <- colorScale[getVariable(phylo, "Sample_or_Control")]
GP.tip.labels <- as(getVariable(phylo, "sample"), "character")
GP.hclust <- hclust(GPUF, method = "average")
plot(as.phylo(GP.hclust), show.tip.label = TRUE, tip.color = "white")
tiplabels(GP.tip.labels, col = cols, frame = "none",adj = -0.05,cex = 0.7)

# Alternative : Decontam : Decontamination des reads avec la méthode de
"prévalence"
##La methode d'identification des contaminants que nous utiliserons est la
methode de "prevalence". Dans cette methode, la prevalence
(presence/absence dans les échantillons) de chaque sequence dans les
echantillons reellement positifs est comparee a la prevalence dans les
controles negatifs pour identifier les contaminants.
##Nombre d'ASV consideres comme contaminant en se référant au "TN" et "TN
PCR":
##sample_data(phylo)$is.neg <- sample_data(phylo)$Sample_or_Control == "TN
PCR" | sample_data(phylo)$Sample_or_Control == "TN"
##contamdf.prev <- isContaminant(phylo, method="prevalence", neg="is.neg")
##table(contamdf.prev$contaminant)
##phylo <- prune_taxa(!contamdf.prev$contaminant, phylo)
##phylo

```



```
# Alternative : Decontam : Decontamination des reads avec la méthode de
"fréquence"
##contamdf.freq <- isContaminant(phylo, method="frequency",
conc="Dosage_final_ADN")
##table(contamdf.freq$contaminant)
##summary(sample_data(phylo)$Dosage_final_ADN)
##phylo <- prune_taxa(!contamdf.freq$contaminant, phylo)
##phylo
```
```

### # Beta diversité des échantillons (échantillons seuls)

Mesure de la Beta Diversité par mesure de Bray Curits

Representation MDS (multi-dimensional scaling)

```
```{r, include=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE, fig.width =
= 14, fig.height= 14}
```

```
# Transform data to proportions as appropriate for Bray-Curtis distances
ps.prop <- transform_sample_counts(phylo, function(otu) otu/sum(otu))
ord.nmnds.bray <- ordinate(ps.prop, method="MDS", distance="bray")
```
```

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE, fig.width =
= 14, fig.height= 14}
plot_ordination(ps.prop, ord.nmnds.bray, type="samples", label = "sample",
color = "Sample_or_Control", title="MDS")
```
```

Representation NMDS (Non-metric multi-dimensional scaling)

```
```{r, include=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE, fig.width =
= 14, fig.height= 14}
```

```
ord.nmnds.bray <- ordinate(ps.prop, method="NMDS", distance="bray")
```
```

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE, fig.width =
= 14, fig.height= 14}
plot_ordination(ps.prop, ord.nmnds.bray, type="samples", label = "sample",
color = "Sample_or_Control", title="NMDS")
```
```

### # Suppression d'échantillon(s) avec peu de reads (optionnel)

Nombre de reads par échantillons après filtrage

```
```{r, echo=FALSE}
kableExtra::kable(sort(sample_sums(phylo))) %>%
  kable_styling() %>%
  scroll_box(width = "100%", height = "600px")
sample_sum_df <- data.frame(sum = sample_sums(phylo))
```

```
# Reads per samples histogram
ggplot(sample_sum_df, aes(x = sum)) +
```

```
geom_histogram(color="Black", binwidth = 500) +
ggtitle("Distribution of sample sequencing depth") +
xlab("Read counts") + ylab("Frequency")
```
```

Ici, nous pouvons supprimer les échantillons avec peu de reads si besoin

```
```{r, echo=FALSE}

phylo = prune_samples(names(which(sample_sums(phylo) >= 1)), phylo) #enleve
tous les échantillons avec 0 reads
phylo = prune_taxa(names(which(taxa_sums(phylo) >= 1)), phylo) #eneleve tous
les taxa avec 0 reads

# To remove samples with fewer than 300 reads
#phylo = prune_samples(names(which(sample_sums(phylo) >= 1000)), phylo)
#phylo
```
```

### # Suppression des TN, Mock et d'éventuels échantillons

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
phylo <- subset_samples(phylo, Sample_or_Control == "Sample")
#phylo = prune_samples(sample_names(phylo) != "M366", phylo)
phylo = prune_taxa(names(which(taxa_sums(phylo) >= 1)), phylo) #eneleve tous
les taxa avec 0 reads

phylo
```
```

### # Résumé du jeu de données final

```
```{r, include=FALSE, warning=FALSE}
summary = summarize_phyloseq(phylo)
```
```

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
summary
```
```

### # Sauvegarde de l'environnement de travail dans un fichier spécifique

Sauvegarde de l'environnement de travail dans un fichier spécifique Phylo  
pre processed.rda"

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
save(phylo, list, file="Phylo pre processed.rda")

otuf1=data.frame(otu_table(phylo))
otuf1=data.frame(t(otuf1))
write.csv2(otuf1, file="OTU final.csv")
write.csv2(tax_table(phylo), file="taxonomy final.csv")
```
```



## 4 COMPARAISON DES COMMUNAUTES

---

```
---
title: "PhyloSeq"
author: "Raphael Enaud"
date: `r format(Sys.time(), "%d %m %Y")`

header-includes:
  - \usepackage{color, fancyvrb}
output:
  rmdformats::readthedown:
    highlight: kate
    numbersections : yes
  html_document:
    fig_height: 9
    fig_width: 12
---
```

```
````{r knitrinit, include=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}
library(knitr)
library(rmdformats)
library("kableExtra")
library(DESeq2)
library("ggplot2")
library("readxl")
library("dplyr")
library(knitr)
library(rmdformats)
library("kableExtra")
library(DESeq2)
library(psy)
library(Rcpp)
library(nnet)
library(dplyr)
library(ggplot2)
library(psy)
library(prettyR)
library(corrplot)
library(readr)
library(questionr)
library(finalfit)
library(labelled)
library("dada2")
packageVersion("dada2")
library(ShortRead)
packageVersion("ShortRead")
library(Biostrings)
packageVersion("Biostrings")
library(DECIPHER); packageVersion("DECIPHER")
library(rJava)
library(xlsxjars)
library(xlsx)
library("plyr")
theme_set(theme_bw())
library(phyloseq)
library(BiocStyle)
```

```

library(ggplot2)
library(ape)
library(tidyr)
library(broom)
library(dplyr)
library(Hmisc)
library (microbiome)
library (picante)
library(plyr)
library(reshape2)
library(doBy)
library(RVAideMemoire)
library (vegan)
library(heatmap.plus)
library(RColorBrewer)
library(gplots)
library(kableExtra)
library(gridExtra)
library(knitr)
library(microbiomeSeq)
library(adespatial)
library(ggpubr)
library (devtools)
library(yingtools2)
```

```

```

```{r, include=FALSE}
# changer le repertoire des fichiers
setwd("C:/Users/EnaudR/OneDrive/Boulot/Fastq/Scripts_DADA2/16S/")
load("C:/Users/EnaudR/OneDrive/Boulot/Fastq/Scripts_DADA2/16S/Phylo pre
processed.rda")
phylo
```

```

### # Resume du jeu de données

```

```{r, include=FALSE, warning=FALSE}
summary = summarize_phyloseq(phylo)
```

```

```

```{r, echo=FALSE, warning=FALSE}
phylo
print(summary[c(1),1])
print(summary[c(2),2])
print(summary[c(3),3])
print(summary[c(4),4])
print(summary[c(5),5])
print(summary[c(7),7])
print(summary[c(8),8])
```

```

### # Nom des échantillons

```

```{r, echo=FALSE, warning=FALSE}
sample_names(phylo)
```

```

### # Inspecter le nombre de reads

Par défaut, la rarefaction se fera sur le nombre de reads minimal de l'ensemble des échantillons

```
```{r, echo=FALSE}
df <- as.data.frame(sample_data(phylo)) # Put sample_data into a ggplot-
friendly data.frame
df$LibrarySize <- sample_sums(phylo)
df <- df[order(df$LibrarySize),]
df$Index <- seq(nrow(df))

kableExtra::kable(sort(sample_sums(phylo))) %>%
  kable_styling() %>%
  scroll_box(width = "100%", height = "600px")
```
```

### # Analyses de l'alpha Diversité

Les indices Observed ASV, Simpson, Shannon, Chaol, Fisher, Evenness ont été calculés.

Les données sont rarefiées par défaut.

```
```{r, include=FALSE}
library(forcats)
sample_data(phylo)$Groupe =
fct_relevel(sample_data(phylo)$Groupe, "Before", "After")

ps_rare <- phyloseq::rarefy_even_depth(phylo,
sample.size=min(sample_sums(phylo)), replace = FALSE, rngseed=TRUE)

adiv <- data.frame(
  "Observed" = phyloseq::estimate_richness(ps_rare, measures = "Observed"),
  "Shannon" = phyloseq::estimate_richness(ps_rare, measures = "Shannon"),
  "Simpson" = phyloseq::estimate_richness(ps_rare, measures = "Simpson"),
  "Groupe" = phyloseq::sample_data(ps_rare)$Groupe)

diversity = adiv
```
```

```
```{r, echo=FALSE}
adiv %>%
  gather(key = metric, value = value, c("Observed", "Shannon", "Simpson"))
%>%
  mutate(metric = factor(metric, levels = c("Observed", "Shannon",
"Simpson"))) %>%
  ggplot(aes(x = Groupe, y = value)) +
  geom_boxplot(outlier.color = NA) +
  geom_jitter(aes(color = Groupe), height = 0, width = .2) +
  labs(x = "", y = "") +
  facet_wrap(~ metric, scales = "free") +
  theme(legend.position="none")
```
```

```

```{r, echo=FALSE}
adiv %>%
  group_by(Groupe) %>%
  dplyr::summarise(median_observed = median(Observed),
                  median_shannon = median(Shannon),
                  median_simpson = median(Simpson))
```

```

### ## Richness (Observed ASVs)

```

```{r, echo=FALSE}

#Wilcoxon test of location
wilcox.test(Observed ~ Groupe, data = adiv, exact = FALSE, conf.int = TRUE)

```

```

### ## Shannon Index

```

```{r, echo=FALSE}

wilcox.test(Shannon ~ Groupe, data = adiv, exact = FALSE, conf.int = TRUE)

```

```

### ## Simpson Index

```

```{r, echo=FALSE}

wilcox.test(Simpson ~ Groupe, data = adiv, exact = FALSE, conf.int = TRUE)

```

```

## # Analyses Beta Diversite

### ## Multidimensional Scaling (MDS) avec mesure de dissimilarité de Bray-Curtis

Les données sont normalisées

```

```{r, include=FALSE}
# Transform data to proportions as appropriate for Bray-Curtis distances

rare_phylo = rarefy_even_depth(phylo,
sample.size=min(sample_sums(phylo)),replace = FALSE, rngseed=TRUE)

ord.nm.ds.bray <- ordinate(rare_phylo, method="MDS", distance="bray")
```

```

```

```{r, echo=FALSE}
plot_ordination(rare_phylo, ord.nm.ds.bray, color="Groupe", label= "sample",
title="Bray MDS") + geom_point(size=2)
```

```

### ## Non-metric multidimensional scaling (NMDS) avec mesure de dissimilarité de Bray-Curtis

Les données sont normalisées

```
```{r, include=FALSE}
# Transform data to proportions as appropriate for Bray-Curtis distances
ord.nmds.bray <- ordinate(rare_phylo, method="NMDS", distance="bray")
```
```

```
```{r, echo=FALSE}
plot_ordination(rare_phylo, ord.nmds.bray, color="Groupe", label= "sample",
title="Bray NMDS") + geom_point(size=2)
```
```

### **## Analyse de variance: les communautés sont-elles statistiquement différentes? (PERMANOVA)**

Pour tester l'effet d'un facteur expérimental sur la similarité des échantillons, nous ferons une analyse multivariée permutacionnelle de la variation (PERMANOVA)

```
```{r, include=FALSE}
# Pick relative abundances (compositional) and sample metadata

library(microbiome)
library(ggplot2)
library(dplyr)
pseq.rel <- microbiome::transform(phylo, "compositional")

otu <- abundances(pseq.rel)
meta <- meta(pseq.rel)
```
```

Evaluons si le groupe a un effet significatif sur la composition globale du microbiote. P-Value du test PERMANOVA :

```
```{r, echo=FALSE}

# samples x species as input
library(vegan)
permanova <- adonis(t(otu) ~ Groupe,
                    data = meta, permutations=99, method = "bray")

# P-value
print(as.data.frame(permanova$aov.tab) ["Groupe", "Pr(>F)"])
```
```



Vérifier que les hypothèses d'homogénéité de la variance tiennent (pour assurer la fiabilité des résultats). La p-Value (Pr) doit être > 0.05 :

```
```{r, echo=FALSE}
dist <- vegdist(t(otu))
anova(betadisper(dist, meta$Groupe))
```
```

Montrer les coefficients des taxons supérieurs séparant les groupes

```
```{r, include=FALSE}

#formatage des noms taxonomiques
library(microbiomeMarker)
library("fantaxtic")
library("sjmisc")

phylo_rename = phylo

taxa2= data.frame(tax_table(name_taxa(phylo_rename, species = T, label="",
)))

for (i in 1:length(taxa2$Kingdom)){
if (!str_contains(taxa2$Kingdom[i], "("))
  {taxa2$Kingdom[i] = paste(taxa2$Kingdom[i], "(Kingdom)")}
}

for (i in 1:length(taxa2$Phylum)){
if (!str_contains(taxa2$Phylum[i], "("))
  {taxa2$Phylum[i] = paste(taxa2$Phylum[i], "(Phylum)")}
}

for (i in 1:length(taxa2$Class)){
if (!str_contains(taxa2$Class[i], "("))
  {taxa2$Class[i] = paste(taxa2$Class[i], "(Class)")}
}

for (i in 1:length(taxa2$Order)){
if (!str_contains(taxa2$Order[i], "("))
  {taxa2$Order[i] = paste(taxa2$Order[i], "(Order)")}
}

for (i in 1:length(taxa2$Family)){
if (!str_contains(taxa2$Family[i], "("))
  {taxa2$Family[i] = paste(taxa2$Family[i], "(Family)")}
}

for (i in 1:length(taxa2$Genus)){
if (!str_contains(taxa2$Genus[i], "("))
  {taxa2$Genus[i] = paste(taxa2$Genus[i], "(Genus)")}
}

for (i in 1:length(taxa2$Species)){
```

```

if (!str_contains(taxa2$Species[i], "("))
  {taxa2$Species[i] = paste(taxa2$Species[i], "(Species)")}
}
}

tax_table(phylo_rename) = as.matrix(taxa2)

taxa_names(phylo_rename) = paste (taxa_names(phylo_rename),
tax_table(phylo_rename)[,7])
x = row.names(taxa_names(phylo_rename))

pseq.rel2 <- microbiome::transform(phylo_rename, "compositional")
otu2 <- abundances(pseq.rel2)
meta2 <- meta(pseq.rel2)
permanova2 <- adonis(t(otu2) ~ Groupe,
                    data = meta2, permutations=99, method = "bray")
dist2 <- vegdist(t(otu2))
coef2 <- coefficients(permanova2)["Groupe1",]
top.coef2 <- coef2[rev(order(abs(coef2)))[1:20]]
par(mar = c(3, 14, 2, 1))

...

```

```

```{r, include=FALSE}
barplot(sort(top.coef2), horiz = T, las = 1, main = "Top taxa")
...

```

```

```{r, include=FALSE}
# Selection des ASV qui séparent les deux groupes

coef <- coefficients(permanova)["Groupe1",]
top.coef <- coef[rev(order(abs(coef)))[1:20]]
par(mar = c(3, 14, 2, 1))
top.coef <- (data.frame(top.coef))
top.coef = row.names(top.coef)
allTaxa = taxa_names(phylo)
selecttopcoed <- allTaxa[(allTaxa %in% top.coef)]
topasv = prune_taxa(selecttopcoed, phylo)
...

```

```

```{r, echo=FALSE}
kable(tax_table(topasv))
...

```

## # Analyse au niveau des phyla

```

```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE, fig.width =
18, fig.height= 8}

phylo_phylum <- tax_glom(phylo, "Phylum", NArm = TRUE)

phylo.prop <- transform_sample_counts(phylo_phylum, function(otu)
otu/sum(otu)* 100)
...

```

## ## Phyla les plus fréquents

```
```{r, echo=FALSE}
#Converting to Relative Abundance
phylo_rel= transform_sample_counts(phylo, function(x) x / sum(x) )

#Agglomerating taxa of the same type at the Phylum level (phyloseq object:
phylo_rel)
glom <- tax_glom(phylo_rel, taxrank = 'Phylum')

#Creating a dataframe in long format from new phyloseq object (glom)
dat <- psmelt(glom)

#Converting factor "Phylum" to a character vector
dat$Phylum <- as.character(dat$Phylum)

#Grouping by Phylum ==> calculating mean Relative Abundance
mean <- ddply(dat, ~Phylum, function(x) c(mean=mean(x$Abundance)))

#Identifying Phyla whose mean Relative Abundance is <=2%
Others <- mean[mean$mean <= 0.02,]$Phylum

#Relabing less abundant Phyla as "Others"
dat[dat$Phylum %in% Others,]$Phylum <- 'Others'

#Checking the most frequent Phyla - for ordering
options(scipen=999)
library(plyr)
phylum_graph <- as.data.frame(ddply(dat, c("Phylum"), summarise,mean = mean
(Abundance)))

phylum_graph = arrange(phylum_graph, desc(mean))
kable(phylum_graph)

dat$Phylum = fct_reorder(dat$Phylum,dat$Abundance,mean.default)

#Visualizing boxplot (most abundant Phyla + Others)
ggplot = ggplot(dat,
  aes(x=Phylum,
      y=Abundance, fill=Phylum))

ggplot + geom_boxplot() + coord_flip() +
scale_color_brewer(palette="Blues") + theme_classic() + labs(x = "Samples",
y = "Normalized abundance") + guides(fill = guide_legend(reverse=TRUE))
```
```

## ## Comparaison des groupes au niveau des phylas

```
```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE, fig.width =
18, fig.height= 8}

phylo.prop = prune_taxa(taxa_sums(phylo.prop) > 0.05, phylo.prop)

phyla_plot = plot_bar(phylo.prop, fill="Phylum")
phyla_plot + facet_wrap(~Groupe, nrow=1, scales="free_x")+ labs(x =
"Samples", y = "Reads abundance (normalized)")
```
```

```

```{r, echo=FALSE, warning=FALSE, message=FALSE, cache=FALSE}

taxa_abundance_table_phylum <- psmelt(phylo.prop)

BoxPlot_phylum <- taxa_abundance_table_phylum %>%
  ggplot(aes(x =Phylum, y = Abundance, fill = Phylum)) +
  geom_boxplot() +
  labs(x = "",
       y = "Relative Abundance",
       title = "Phylum Relative Abundance") +
  facet_grid(~ Groupe, scales = "free") +
  theme(
    axis.text.x = element_text(size = 10, angle = 90, vjust = 0.5, hjust =
1),
    axis.text.y = element_text(size = 12),
    legend.text = element_text(size = 10),
    strip.text = element_text(size = 12)
  )

BoxPlot_phylum

#Creating a dataframe in long format from new phyloseq object (glom)
dat <- psmelt(glom)

#Converting factor "Phylum" to a character vector
dat$Phylum <- as.character(dat$Phylum)

RANK <- 'Phylum'
dat %>%
  filter(Phylum!= "Others") %>%
  group_by_(RANK) %>%
  do(tidy(wilcox.test (Abundance ~ Groupe, data=., exact=F))) %>%
  ungroup() %>%
  mutate(p.adjust=p.adjust(p.value, method = "fdr")) ->
Groupe_phylum.results

arrange(Groupe_phylum.results,p.adjust) %>%
  knitr::kable()
```

```

## # Analyses au niveau du genre

### ## Genres les plus fréquents

Others = abondance inferieure a 0,01%

```

```{r, echo=FALSE}
#Agglomerating taxa of the same type at the genus level (phyloseq object:
phylo_rel)
glom_g <- tax_glom(phylo_rel, taxrank = 'Genus')

#Creating a dataframe in long format from new phyloseq object (glom_g)
dat_g <- psmelt(glom_g)

#Converting factor "Genus" to a character vector
dat_g$Genus <- as.character(dat_g$Genus)

#Grouping by genus ==> calculating mean Relative Abundance

```

```

mean_g <- ddply(dat_g, ~Genus, function(x) c(mean=mean(x$Abundance)))

#Identifying Genera whose mean Relative Abundance is <=1%
Others <- mean_g[mean_g$mean <= 0.01,]$Genus

#Relabing less abundant genus as "Others"
dat_g[dat_g$Genus %in% Others,]$Genus <- 'Others'

#Checking the most frequent genus - for ordering
options(scipen=999)
library(plyr)
genus_graph <- as.data.frame(ddply(dat_g, c("Genus"), summarise, mean = mean
(Abundance)))

genus_graph = arrange(genus_graph, desc(mean))
kable(genus_graph)

dat_g$Genus = fct_reorder(dat_g$Genus, dat_g$Abundance, mean.default)

#Visualizing boxplot (most abundant Genus + Others)
ggplot = ggplot(dat_g,
  aes(x=Genus,
      y=Abundance, fill=Genus))

ggplot + geom_boxplot() + coord_flip() +
scale_color_brewer(palette="Blues") + theme_classic() + labs(x = "Samples",
y = "Normalized abundance") + guides(fill = guide_legend(reverse=TRUE))
` ``

```

## ## Comparaison des groupes au niveau du genre

### ### Test de Wilcoxon

Comparaison avec un test de Wilcoxon avec correction de continuité pour échantillon indépendant

```

` ``{r, echo=FALSE}
#Creating factors for graphs
seq_g <- factor(dat_g$Genus)

#Groupe - Merged plot (genus Level)
xlabs <- paste(levels(dat$Groupe), "\n(N=", table(dat$Groupe), ") ", sep="")

#Agglomerating taxa of the same type at the genus level (phyloseq object:
phylo_rel)
glom_g <- tax_glom(phylo_rel, taxrank = 'Genus')

#Creating a dataframe in long format from new phyloseq object (glom_g)
dat_g <- psmelt(glom_g)

#Converting factor "Genus" to a character vector
dat_g$Genus <- as.character(dat_g$Genus)
#Comparing Groupe genus Distribution
RANK <- 'Genus'

```

```

dat_g %>%
  filter(Genus!= "Others") %>%
  group_by_(RANK) %>%
  do(tidy(wilcox.test (Abundance ~ Groupe, data=., exact=F))) %>%
  ungroup() %>%
  mutate(p.adjust=p.adjust(p.value, method = "fdr")) ->
Groupe_genus.results

arrange(Groupe_genus.results,p.adjust) %>%
  knitr::kable() %>%
  kable_styling() %>%
  scroll_box(width = "100%", height = "600px")
````

```

### ### Test de Welch

STAMP (Parks et al. 2014) est un logiciel graphique largement utilisé qui fournit les "meilleures pratiques" pour choisir les méthodes statistiques appropriées pour l'analyse taxonomique et fonctionnelle des microbes. Les utilisateurs peuvent effectuer des tests pour deux groupes ou pour plusieurs groupes, et les tailles d'effet et les intervalles de confiance sont pris en charge, ce qui permet une évaluation critique de la pertinence biologique des résultats des tests. Ici, microbiomeMarker intègre également les méthodes statistiques utilisées dans STAMP pour l'analyse de comparaison microbienne entre deux groupes et plusieurs groupes.

Le test t de Welch est une adaptation du test t de Student permettant de comparer deux groupes d'échantillons indépendants, qui suivent une loi normale, lorsque les variances sont différentes.

```

````{r, echo=FALSE}

two_group_welch <- test_two_groups(
  phylo,
  group = "Groupe",
  rank_name = "Genus",
  method = "welch.test"
)

d = data.frame(marker_table(two_group_welch))
d <- d[, c("feature", "pvalue_corrected", "Before_mean_rel_freq",
"After_mean_rel_freq", "diff_mean", "ratio_proportion", "ci_lower",
"ci_upper")]
d = arrange(d,pvalue_corrected)
  knitr::kable(d) %>%
  kable_styling() %>%
  scroll_box(width = "100%", height = "600px")
````

```

### ### DeSeq2 du genre

```

````{r, include=FALSE, message=FALSE, warning=FALSE}

```

```

sample_data(phylo)$Groupe <- relevel((sample_data(phylo)$Groupe), ref =
"Before") ## a changer pour mettre le groupe de référence
head(sample_data(phylo)$Groupe)

diagdds = phyloseq_to_deseq2(phylo, ~ Groupe)
# calculate geometric means prior to estimate size factors
gm_mean = function(x, na.rm=TRUE){
exp(sum(log(x[x > 0])), na.rm=na.rm) / length(x))
}
geoMeans = apply(counts(diagdds), 1, gm_mean)
diagdds = estimateSizeFactors(diagdds, geoMeans = geoMeans)
diagdds = DESeq(diagdds, test="Wald", fitType="parametric")

res = results(diagdds, cooksCutoff = FALSE)
alpha = 0.05 ## à changer (0.01 ou 0.05)
sigtab = res[which(res$padj < alpha), ]
sigtab = cbind(as(sigtab, "data.frame"),
as(tax_table(phylo)[rownames(sigtab), ], "matrix"))
```

```

```

```{r, echo=FALSE, message=FALSE, warning=FALSE}
arrange(sigtab, padj) %>%
knitr::kable() %>%
  kable_styling() %>%
  scroll_box(width = "100%", height = "600px")
```

```

```

```{r, echo=FALSE}
library("ggplot2")
theme_set(theme_bw())
sigtabgen = subset(sigtab, !is.na(Genus))
# Phylum order
x = tapply(sigtabgen$log2FoldChange, sigtabgen$Phylum, function(x) max(x))
x = sort(x, TRUE)
sigtabgen$Phylum = factor(as.character(sigtabgen$Phylum), levels=names(x))
# Genus order
x = tapply(sigtabgen$log2FoldChange, sigtabgen$Genus, function(x) max(x))
x = sort(x, TRUE)
sigtabgen$Genus = factor(as.character(sigtabgen$Genus), levels=names(x))
ggplot(sigtabgen, aes(y=Genus, x=log2FoldChange, color=Phylum))+
geom_vline(xintercept = 0.0, color = "gray", size = 0.5) +
geom_point(size=6) +
  theme(axis.text.x = element_text(angle = -90, hjust = 0, vjust=0.5))
```

```

### ### LEFSe

```

```{r, echo=FALSE}
library(microbiomeMarker)
library("fantaxtic")
library("sjmisc")

#formatage des noms taxonomiques

phylo_rename = phylo

```

```

taxa2= data.frame(tax_table(name_taxa(phylo_rename,species = T, label="",
)))

for (i in 1:length(taxa2$Kingdom)){
if (!str_contains(taxa2$Kingdom[i],"("))
  {taxa2$Kingdom[i] = paste(taxa2$Kingdom[i], "(Kingdom)")}
}

for (i in 1:length(taxa2$Phylum)){
if (!str_contains(taxa2$Phylum[i],"("))
  {taxa2$Phylum[i] = paste(taxa2$Phylum[i], "(Phylum)")}
}

for (i in 1:length(taxa2$Class)){
if (!str_contains(taxa2$Class[i],"("))
  {taxa2$Class[i] = paste(taxa2$Class[i], "(Class)")}
}

for (i in 1:length(taxa2$Order)){
if (!str_contains(taxa2$Order[i],"("))
  {taxa2$Order[i] = paste(taxa2$Order[i], "(Order)")}
}

for (i in 1:length(taxa2$Family)){
if (!str_contains(taxa2$Family[i],"("))
  {taxa2$Family[i] = paste(taxa2$Family[i], "(Family)")}
}

for (i in 1:length(taxa2$Genus)){
if (!str_contains(taxa2$Genus[i],"("))
  {taxa2$Genus[i] = paste(taxa2$Genus[i], "(Genus)")}
}

for (i in 1:length(taxa2$Species)){
if (!str_contains(taxa2$Species[i],"("))
  {taxa2$Species[i] = paste(taxa2$Species[i], "(Species)")}
}
}
tax_table(phylo_rename) = as.matrix(taxa2)

#LEFSe
lefse_out <- lefse(phylo_rename,normalization = 1e6,class =
"Groupe",multicls_strat = TRUE)
lefse_out
```



```

```{r, echo=FALSE}
lefse_barplot(lefse_out, label_level = 1)
```

```


```



## 5 AMORCES DES GENES UTILISES EN QPCR

| Cible      | Séquence 5' → 3'                                     |
|------------|--|
| INOS/NOS2  | F - CCGAGGCAAACAGCACATTC<br>R - CTGAGGGCTTTGCTGAGGTC |
| PTGS2/COX2 | F - GCTGTTCCACCCATGTCAA<br>R - TTCCGGTGTGAGCAGTTTTCT |
| TNFa       | F - GCCAGAGGGCTGATTAGAG<br>R - CAGCCTCTCTTCCTTCCTGA  |
| IFNg       | F - CTGGGATGCTCTTCGACCTC<br>R - GTCGCCAGCAGCTAAACAG  |
| TGFb       | F - CAAGGGCTACCATGCCAACT<br>R - TGCTGTACTGCGTGTCCAGG |
| IL-1b      | F - CAGAAGTACCTGAGCTCGCC<br>R - AGATTCGTAGCTGGATGCCG |
| IL-8       | F - AAGAAACCACCGGAAGGAAC<br>R - GCAAACTGCACCTTCACAC  |
| IL-6       | F - ATCTTCTCCTGGGGTACTG<br>R - GCCCAGCTATGAACTCCTTC  |
| IL-2       | F - GACCCAGGGACTTAATCAG<br>R - CAATGGTTGCTGTCTCATC   |
| IL-17      | F - TAATGGCCCTGAGGAATGGC<br>R - AGGAAGCCTGAGTCTAGGGG |
| IL-10      | F - GCAACCCAGGTAACCCTGAC<br>R - TGCCTTCAGCAGAGTGAAGA |
| AMPK       | F - CACCAGGATCCTTTGGCAGT<br>R - AGAATCAGGTGGGCTTGTCG |
| mTOR       | F - TCGCTGAAGTCACACAGACC<br>R - CTTTGGCATATGCTCGGCAC |
| RPLP0      | F - CTGTCTTCCCTGGGCATCA<br>R - TCGTGGAAGTGACATCGTC   |
| RPLP13     | F - GGGAGCAAGGAAAGGGTCT<br>R - CACCTGCACAATTCTCCGA   |
| PPIA       | F - CGGGTCCTGGCATCTTGT<br>R - CAGTCTTGGCAGTGCAGAT    |
| ACTB       | F - GATCATTGCTCCTCCTGAGC<br>R - CCGGACTCGTCATACTCCTG |

## 6 CRITERES D'ELIGIBILITES DE L'ETUDE MUCOLAX

---

Critères d'inclusion :

- Âge  $\geq$  4 ans et  $<$ 18 ans ;
- Patient atteint de mucoviscidose (test de la sueur  $>$  60 mmol/l et/ou biologie moléculaire identifiant des mutations du gène CFTR) avec insuffisance pancréatique associée (élastase fécale  $<$ 100  $\mu$ g/g) ;
- Présentant un résultat de dosage rapide de calprotectine *via* le test IBDoc (Bühlmann®)  $\geq$  250  $\mu$ g/g ;
- Personne affiliée ou bénéficiaire d'un régime de sécurité sociale ;
- Consentement libre, éclairé et écrit signé par les titulaires de l'autorité parentale et l'investigateur avant tout examen nécessité par la recherche et assentiment oral et/ou écrit par le participant (en fonction de son âge).

Critères d'exclusion :

- Traitement en cours qui peut moduler la fonctionnalité du CFTR (thérapie protéique de type Lumacaftor-Ivacaftor) ;
- Patient déjà traité par polyéthylène glycol ou autre laxatif dans le mois précédent la visite d'inclusion ;
- Patient présentant une diarrhée lors de l'inclusion (la diarrhée sera définie par la présence de 3 selles ou plus / jour dans les 7 jours précédents la visite d'inclusion) ;
- Diarrhée aigüe virale ou bactérienne dans le mois précédent la visite d'inclusion (associée à de la fièvre) ;
- Cure d'antibiotiques ou d'antifongiques oraux ou intraveineux dans le mois précédent le recueil des échantillons ;
- Modification du traitement de fond dans le mois précédent la visite d'inclusion (corticothérapie orale ou inhalée, azithromycine, antibiothérapie inhalée, antifongique inhalé, inhibiteurs de pompe à proton) ;
- Introduction d'un traitement par probiotiques dans le mois précédent la visite d'inclusion ;
- Patient greffé (sous immunosuppresseurs) ;
- Patient atteint d'une Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) ou d'une maladie cœliaque ;
- Patient ayant une perforation digestive ou risque de perforation digestive ;
- Patient ayant un iléus ou suspicion d'occlusion intestinale, une sténose symptomatique ;
- Antécédent d'hypersensibilité au macrogol ou à l'un des excipients
- Titulaires de l'autorité parentale bénéficiant d'une mesure de protection judiciaire

## **Microbiome et inflammation pulmonaires et digestifs dans la mucoviscidose : Approches physiopathologiques et thérapeutiques**

**Résumé :** L'étude du myco-microbiote et de l'inflammation est un élément clé de la compréhension physiopathologiques des atteintes respiratoires et intestinales de la mucoviscidose, mais également de l'évaluation de l'impact des traitements des patients, notamment par modulateurs de la protéine CFTR. Les objectifs de cette thèse étaient donc d'étudier les phénomènes de dysbiose et d'inflammation, pulmonaires et digestifs, dans la mucoviscidose et de mieux appréhender l'impact des modulateurs CFTR sur ces phénomènes.

Nous avons ainsi pu préciser l'implication des différentes communautés microbiennes pulmonaires, et notamment fongiques, dans l'évolution de la fonction respiratoire des patients atteints de mucoviscidose. *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Candida albicans* ont été associés à une diminution significative de la fonction respiratoire des patients après deux ans d'évolution. Nous avons pu également montrer que la diversité microbienne pulmonaire, marqueur prédictif de l'évolution de la maladie, était améliorée chez les patients traités par Lumacaftor/Ivacaftor, mais que ces résultats étaient conditionnés par la non-colonisation à *Pseudomonas* à l'initiation du traitement.

Au niveau intestinal, nous avons montré dans la mucoviscidose que la calprotectine fécale, biomarqueur de l'inflammation intestinale, était associée à des perturbations du microbiote intestinal. Afin d'étudier le lien de causalité, nous avons analysé *in vitro* la réponse inflammatoire de cellules épithéliales digestives (cellules CACO2) stimulées par différents surnageants de microbiote fécal d'enfants atteints de mucoviscidose avec inflammation intestinale. Cette réponse se traduisait par une augmentation de l'expression des gènes pro inflammatoire (TNF $\alpha$ , IL-8, COX2) et une diminution des gènes impliqués dans l'apoptose. Enfin, nous avons montré que les taux de calprotectine fécale diminuaient sous Lumacaftor/Ivacaftor, suggérant que la modulation de la protéine CFTR par Lumacaftor/Ivacaftor peut aussi améliorer l'atteinte intestinale des patients.

Des études longitudinales comprenant la coévolution du myco/microbiote et de l'inflammation, au niveau pulmonaire et intestinal, sont actuellement en cours et pourront permettre de préciser les liens entre myco/microbiote et inflammation, au sein de chaque tractus, mais également au sein de l'axe intestin-poumon.

**Mots-Clés :** Microbiote, Mycobiote, Métagénomique Ciblée, Inflammation, Calprotectine, Poumon, Intestin, Mucoviscidose, Modulateurs CFTR, Lumacaftor, Ivacaftor, Culture Cellulaire, CACO2.

---

### **Pulmonary and digestive microbiota and inflammation in cystic fibrosis: Pathophysiological and therapeutic approaches**

**Abstract:** Myco-microbiota and inflammation are key elements in the pathophysiological understanding of the respiratory and intestinal damage of cystic fibrosis (CF), but also in the evaluation of the impact of patient treatments, such as CFTR protein modulators. The main objectives of this thesis were therefore to study dysbiosis and inflammation, in pulmonary and digestive tractus of CF patients and to better understand the impact of CFTR modulators on these phenomena.

We were thus able to decipher the involvement of the different pulmonary microbial communities, in particular fungi, in the evolution of the respiratory function of CF patients. *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Candida albicans* were associated with a significant decrease in the respiratory function of patients after two years of evolution. We were also able to show that pulmonary microbial diversity, a predictive marker of disease progression, was improved in patients treated with Lumacaftor/Ivacaftor, on condition that the patient was not colonized with *Pseudomonas* at Lumacaftor/Ivacaftor initiation.

At the intestinal side, we showed that fecal calprotectin, a biomarker of intestinal inflammation, was associated with disturbances of the intestinal microbiota in CF. In order to investigate the causal link, we documented *in vitro* the inflammatory response of digestive epithelial cells (CACO2 cells) stimulated by different supernatants isolated from fecal microbiota of CF children with intestinal inflammation. This *in vitro* response resulted in an increase of pro-inflammatory gene expression (TNF $\alpha$ , IL-8, COX2) and a decrease in the expression of apoptosis genes. Finally, we showed that fecal calprotectin levels decreased under Lumacaftor/Ivacaftor, suggesting that CFTR protein modulation by Lumacaftor/Ivacaftor may also improve patients' intestinal outcomes.

Longitudinal studies involving the co-evolution of myco/microbiota and inflammation, at the pulmonary and intestinal levels, are currently in progress and may clarify the links between myco/microbiota and inflammation, within each organ but also in the gut-lung axis.

**Keywords:** Microbiota, Mycobiota, Targeted Metagenomics, Inflammation, Calprotectin, Lung, Intestine, Cystic fibrosis, CFTR Modulators, Lumacaftor, Ivacaftor, Cell Culture, CACO2.

#### **Unité de recherche**

U1045 Centre de Recherche Cardiothoracique de Bordeaux (CRCTB), Equipe 2 – Axe Myco-microbiote,  
INSERM, 33600 Pessac, France