



HAL
open science

**AVANCEES DANS LA COMPREHENSION DE
L'ASTHME: DE LA CLINIQUE A LA
PHYSIOPATHOLOGIE ET LA BIOLOGIE
MOLECULAIRE**

Angelica Tiotiu

► **To cite this version:**

Angelica Tiotiu. AVANCEES DANS LA COMPREHENSION DE L'ASTHME: DE LA CLINIQUE A LA PHYSIOPATHOLOGIE ET LA BIOLOGIE MOLECULAIRE. Allergology. Université de Lorraine, 2021. tel-03367683

HAL Id: tel-03367683

<https://hal.science/tel-03367683v1>

Submitted on 6 Oct 2021

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

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

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Mémoire

Présenté pour la candidature au diplôme

D'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

par

Angelica TIOTIU

**AVANCEES DANS LA COMPREHENSION DE L'ASTHME :
DE LA CLINIQUE A LA PHYSIOPATHOLOGIE ET LA BIOLOGIE MOLECULAIRE**

30 09 2021

Rapporteurs :

M^{me}. Anne CHARLOUX Professeur, Université de Strasbourg

M. Gilles GARCIA Professeur, Université Paris-Sud

M^{me} Camille TAILLE Professeur, Université Paris-VII

Membres du Jury :

Mme Cindy BARNIG Professeur, Université de Franche-Comté

M. Roger JANKOWSKI Professeur, Université de Lorraine

M. Philippe PERRIN Professeur, Université de Lorraine

CONTENU DU DOSSIER D'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

AUTORISATION D'INSCRIPTION A L'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES – AVIS DU CONSEIL SCIENTIFIQUE DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE	3
COPIE DU DIPLOME DE DOCTORAT	4
CURRICULUM VITAE	5
PRESENTATION DE L'ACTIVITE D'ENSEIGNEMENT	14
PRESENTATION SYNTHETIQUE DES ACTIVITES DE RECHERCHE	17
1. PRESENTATION THEMATIQUE ET BILAN DES ACTIVITES DE RECHERCHE	17
1.1. RECHERCHE CLINIQUE.....	17
1.1.1. ASTHME	21
1.1.2. AUTRES PATHOLOGIES RESPIRATORIES	24
1.2. RECHERCHE FONDAMENTALE.....	28
1.2.1. PATHOGENESE DE LA TOUX DANS L'ASTHME (EQUIPE EA3450 DEVAH DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE)	28
1.2.2. MECANISMES IMPLIQUES DANS LA PATHOGENESE DE L'ASTHME SEVERE (EQUIPE « AIRWAY DISEASE » IMPERIAL COLLEGE LONDON)	32
2. PRESENTATION DU PROJET SCIENTIFIQUE	42
2.1. RECHERCHE CLINIQUE.....	42
2.1.1. ASTHME	42
2.1.2. AUTRES PATHOLOGIES RESPIRATOIRES	46
2.2. RECHERCHE FONDAMENTALE.....	48
2.2.1. PATHOGENESE DE LA TOUX DANS L'ASTHME	48
2.2.2. MECANISMES IMPLIQUES DANS LA PATHOGENESE DE L'ASTHME SEVERE	49
3. TRAVAUX D'ENCADREMENT	53
3.1. THESE D'UNIVERSITE ET MASTER.....	53
3.2. THESES D'EXERCICE	56
3.3. MEMOIRES DE DES/DESC/DIU DE MEDECINE	58
LISTE COMPLETE ET CLASSEE DES PUBLICATIONS, OUVRAGES INTERNATIONAUX, COMMUNICATIONS	60
COPIE DES 5 PUBLICATIONS LES PLUS SIGNIFICATIVES	71
REFERENCES	127
ANNEXE	133

AUTORISATION D'INSCRIPTION À L'HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES – AVIS DU CONSEIL SCIENTIFIQUE DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE



30/06/2021

Direction de la Recherche et de
la Valorisation

Sous-Direction de l'Administration
de la Recherche

91 avenue de la Libération
BP 50454
54 001 NANCY Cedex

Personne chargée du dossier :
Isabelle VAILLANT -MARECHAL
Ligne directe :
03.72.74.04.55
drv-hdr@univ-lorraine.fr

Madame TIOTIU Iuliana-Angelica
C.H.R.U. Nancy – Hôpitaux de Brabois
Service Pneumologie
9 rue du Morvan
54511 Vandoeuvre-lès-Nancy

Madame,

J'ai l'honneur de vous faire connaître que sur avis favorable du Conseil Scientifique réuni le 29 juin 2021, je vous accorde l'autorisation de vous inscrire à l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR) en ~~Sciences de Gestion~~ Sciences de la Vie et de la Santé.

A compter de la date de réception de ce courrier, vous disposez d'un an pour soutenir votre HDR.

Sept semaines au minimum avant la date prévue pour votre soutenance, je vous remercie de bien vouloir :

- Procéder au paiement de votre inscription auprès du service d'inscription administrative voulu (cf. annexe 2 de la procédure HDR jointe à ce courrier envoyé par email).
- Transmettre à l'adresse suivante : drv-hdr@univ-lorraine.fr :
 - Le formulaire de demande de soutenance de l'HDR (joint à ce courrier envoyé par email) dûment complété.
 - Votre manuscrit final.

Je vous prie d'agréer, Madame, l'expression de mes salutations distinguées.

Le Président de l'Université de Lorraine,
Pour le Président et par déléation,
Le Vice-Président du Conseil Scientifique


Frédéric VILLIÈRAS

COPIE DU DIPLOME DE DOCTORAT

R É P U B L I Q U E F R A N Ç A I S E

Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

DOCTORAT

Vu le code de l'éducation, notamment ses articles L.612-7, L.613-1, D.613-3, D.613-6 et le code de la recherche, notamment son article L.412-1 ;

Vu le décret n° 2011-1169 du 22 septembre 2011 portant création de l'université de Lorraine ;

Vu les pièces justificatives produites par Mme IULIANA CEPUC, née le 28 août 1977 à CIMPIULUNG MOLDOVENESC (ROUMANIE) en vue de son inscription en doctorat ;

Vu le procès-verbal du jury attestant que l'intéressée a soutenu le 14 décembre 2016 une thèse portant sur le sujet suivant : La modulation du réflexe de toux par l'exercice chez le lapin sensibilisé à l'ovalbumine préparée au sein de l'école doctorale Biologie, santé, environnement, devant un jury présidé par YVES MARTINET, PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP, et composé de ANNE CHARLOUX, PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP, BRUNO CHENUËL, PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP, MATHIAS POUSSSEL, MAITRE DE CONF UNIV, - PRATICIEN HOSP, CHRISTIAN STRAUS, PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP, CAMILLE TAILLE, MAITRE DE CONF UNIV, - PRATICIEN HOSP ;

Vu la délibération du jury ;

Le diplôme de **DOCTORAT** en Sciences de la Vie et de la Santé est délivré à Mme **IULIANA CEPUC**

au titre de l'année universitaire 2015-2016

et confère le **grade de docteur**, pour en jouir avec les droits et prérogatives qui y sont attachés.

Fait le 23 février 2017

Le titulaire

Le Président

Le Recteur d'Académie,

Marie REYNIER

Pierre MUTZENHARDT

N° UNIVLOR 12243017

/2017201517355



CURRICULUM VITAE

Nom : TIO TIU (jeune fille CEPUC)
Prénom : Angelica
Nationalité : Française/Roumaine
Date et lieu de Naissance : 28 août 1977 en Roumanie (Câmpulung Moldovenesc)
Situation familiale : Divorcée, deux enfants
Adresse : 53 Rue Gabriel Mouilleron – 54000 Nancy

N° RPPS : 10100038503

N° Inscription Tableau Ordre des Médecins : 54/7659

ADRESSES PROFESSIONNELLES

Département de Pneumologie

Hôpital de Brabois, Bâtiment des Spécialités Médicales, CHRU de Nancy. Rue du Morvan, 54511 Vandoeuivre-lès-Nancy, Cedex, France

Tel : + 33 (0)3 83 15 72 37

Fax : +33 (0)3 83 15 35 41

e-mail : a.tiotiu@chru-nancy.fr



EA 3450 DevAH – Development, Adaptation and Disadvantage. Cardio-respiratory regulations and motor control.

Université de Lorraine. Faculté de Médecine de Nancy. 9, Avenue de la Forêt de Haye – BP 184. Vandoeuivre-lès-Nancy, Cedex, France.

Tel : + 33 (0)3 83 68 37 33

Fax : +33 (0)3 83 68 37 39



SITUATION ACTUELLE

Praticien Hospitalier depuis mai 2013.

ETUDES SECONDAIRES

Lycée Dragos-Voda (Câmpulung Moldovenesc) : Baccalauréat général scientifique (mathématiques) (1996), mention Très Bien.

ETUDES UNIVERSITAIRES

Etudes médicales : Faculté de Médecine, Université de Médecine et Pharmacie « Iuliu Hatieganu », Cluj-Napoca, Roumanie (1997 – 2003), Licence score 10/10

TITRES HOSPITALIERS ET UNIVERSITAIRES

Interne des Hôpitaux (2004-2008) :

2004-2006 Université de Cluj-Napoca, Roumanie

2006-2007 Université Libre de Bruxelles, Belgique

2007-2008 Université Henri Poincaré de Nancy, France

Assistante-Chef de Clinique : Faculté de Médecine de Nancy et CHRU de Nancy (2009–2013).

Chargée d'enseignement : Faculté de Médecine de Nancy (2013)

PRINCIPAUX DIPLOMES UNIVERSITAIRES

1999 - Technicien en Imagerie Médicale, Université de Médecine, Cluj Napoca

2003 - Docteur en Médecine, Université de Médecine, Cluj Napoca

2004 - Master en Pharmacologie Clinique, Université de Médecine, Cluj Napoca

2007 - Certificat de Formation Médicale spécialisée en Pneumologie, ULB Bruxelles

2008 - Certificat médecin spécialiste Pneumologue, Université de Médecine, Cluj Napoca

2012 - Capacité d'Allergologie et d'Immunologie Clinique, Université de Strasbourg

2013 - DESC de Cancérologie, Université de Lorraine, Nancy

2016 - Docteur en Sciences de la Vie, Santé, Environnement, Université de Lorraine, Nancy

2019 - Post-doctorat Imperial College London

2019 - Diplôme Inter-Universitaire de Pédagogie Médicale, Université de Lorraine, Nancy

RESPONSABILITES CLINIQUES

- 2009- Responsable de la prise en charge de la maladie asthmatique au CHRU Nancy
- 2015- Responsable de l'Oncologie thoracique
- 2015- Responsable de la RCP d'Oncologie thoracique (hebdomadaire) au CHRU Nancy
- 2016- Responsable de la RCP de Biologie Moléculaire en Oncologie thoracique (mensuelle)
- 2009 - 2010 Gestion du secteur d'hospitalisation de jour d'oncologie thoracique (13 lits) (ACC)
- 2010 - 2013 Gestion d'un secteur d'hospitalisation conventionnelle (13 lits) (ACC)
Gestion de l'hospitalisation de jour de pneumologie 1 jour/semaine
- 2013- Responsable d'un secteur d'hospitalisation conventionnelle (13 lits) (PH)
Gestion de l'hospitalisation de jour de pneumologie 1 jour/semaine
- 2015- Responsable de l'Unité de Médecine Ambulatoire d'Oncologie thoracique
- 2009- Prise en charge de la mucoviscidose (médecin adjoint CRCM)
- 2009- Bloc technique (1 demi-journée/10) : endoscopies, échographies pleurales...
- 2009- Consultations : 1 demi-journée/semaine
+/- 1 demi-journée primo-prescription des traitements anticancéreux
- 2009- Participation à des astreintes (3-4x/mois) et gardes (1-2x/mois)

RESPONSABILITES PEDAGOGIQUES

- 2009-2013 Assistante -Chef de Clinique, Pneumologie, Faculté de Médecine, Nancy
- 2013- Chargée d'enseignement, Faculté de Médecine, Université de Lorraine

RESPONSABILITES DANS LA RECHERCHE

- 2003-2004 Etudiant en Master de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Cluj Napoca
“Le polymorphisme génétique des récepteurs bêta adrénergiques dans l’asthme”
- 2006-2007 Directeur de grant CNCSIS, thème no. 4/2006 code 474 en Roumanie
“Les implications de la pollution à basse altitude sur les mécanismes moléculaires dans les maladies chroniques respiratoires”
- 2009- Responsable de l’activité de recherche clinique (asthme, allergologie, cancérologie) :
- Investigateur principal : SIROCCO, CIRCASSIA, QUEST, TRAVERSE, CALLISTO (investigateur national), FLAURA, GO29537, MAINRITSAN 2, IFCT 1003 LADIE, IFCT 0703, 0302, 1402, STALKLUNG, ASTHMIRINE, ANDHI, RAMSES, COBRA
 - Co-investigateur : IFCT 0501, 0502, 0702, 0703, 0802, Lilly S124, RADIANT, MAPS, BRAIN, NEXT, GENENTECH METMAB, RTEP5, NéoSAS, ACSé Vemurafénib
- 2013-2016 Etudiant en Doctorat à l’Ecole Doctorale BIOSE (Biologie, Santé, Environnement), Unité DevAH EA-3450 (Développement, Adaptation, Handicap), Physiologie (coordonnateur : Pr. B. Chenuel)
“Modulation du réflexe de toux par l’exercice chez le lapin sensibilisé à l’ovalbumine”
- 2017- Chercheur associé à l’Unité DevAH EA-3450 avec 1 projet de recherche :
“L’influence du montelukast sur la modulation du réflexe de toux à l’exercice chez le lapin sensibilisé à l’ovalbumine”
- 2018-2019 Mobilité à NHLI, Imperial College London (coordonnateur : Pr. KF. Chung)
- Etudes sur le rôle de macrophages dans l’asthme sévère (cohorte UBIOPRED) et BPCO (cohorte ECLIPSE)
 - Etudes sur le rôle des mastocytes dans l’asthme sévère (cohorte UBIOPRED) et BPCO (cohorte ECLIPSE)
 - Etude sur la fonction mitochondriale dans l’asthme sévère (cohorte UBIOPRED)
 - Etude de l’impact de la pollution de l’environnement sur l’asthme sévère (cohorte UBIOPRED)

RESPONSABILITES COLLECTIVES

- 2009 - Correspondant médical en Hygiène hospitalière dans le service
- 2012 - Organisatrice de manifestations à l'occasion de la Journée Mondiale de l'Asthme avec des stands d'information, reportages à la télévision, articles dans les journaux régionaux pour la sensibilisation et l'éducation du grand public sur la pathologie respiratoire.
- 2013- Responsable du logiciel Pharma et Chimio dans le service
- 2009- 2011 Responsable de l'organisation des réunions de morbi-mortalité en Pneumologie
- 2012- Médecin référent pour l'association des patients AIRAS (insuffisants respiratoires et apnéiques de sommeil en Lorraine)
- 2015 - Groupe de travail G2A « Asthme & Allergie » de la Société de Pneumologie de langue française (SPLF)
- 2015 - Promotrice du projet de Réunions de concertation pluridisciplinaire (RCP) de Biologie Moléculaire en Oncologie thoracique dans la région Lorraine avec la participation des hôpitaux publics et privés de Lorraine en visioconférence de manière mensuelle et organisation des formations théoriques sur les actualités thérapeutiques
- 2015- Groupe de travail sur le référentiel lorrain d'Oncologie thoracique (ONCOLOR)
- 2016- Groupe de travail sur le référentiel en Oncologie thoracique Auvergne-Rhône-Alpes (AURA)
- 2016- Groupe de travail « Fonctionnement » pour le projet de fusion de l'Oncologie thoracique du CHRU de Nancy avec l'Institut de Cancérologie Lorrain
- 2017- Groupe de travail sur la "Toux chronique" de la SPLF
- 2018- Groupe 5 « Airway disease » de l'European Respiratory Society (ERS)
- 2018- Chair au Congrès annuel de l'ERS
- 2019- Reviewer pour des articles soumis dans les journaux *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* (rang C, IF=2.68), *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* (rang C, IF=5.70)
- 2020- Reviewer pour la sélection des résumés pour le Congrès ERS 2020
- 2020 Guest editor pour un no spécial sur « Occupational and Environmental Asthma » pour *International Journal of Environmental Research and Public Health* (rang C, IF=2.85)

PARTICIPATION A DES SOCIETES SAVANTES ET ASSOCIATIONS

- Membre du Global Asthma Association (GAA)
- Membre de l'European Respiratory Society (ERS)
- Membre de l'European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI)
- Membre de la Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF)
- Membre de l'Inter groupe Francophone de Cancérologie Thoracique (IFCT)
- Membre du Collège Lorrain de Pathologie Thoracique (CLPT)
- Membre de la Fédération d'Allergologie CHRU de Nancy
- Membre de la Fédération de Cancérologie CHRU de Nancy

MEMOIRES ET THESES

- « Modifications des paramètres Doppler dans les veines sus-hépatiques dans l'insuffisance cardiaque droite » (1999)
- « Repères diagnostiques et thérapeutiques dans la sarcoïdose pulmonaire » (2003)
- « Le polymorphisme génétique des récepteurs bêta 2 adrénergiques dans l'asthme bronchique » (2004)
- « Pneumopathie d'hypersensibilité à *Penicillium chrysogenum* et *Streptomyces mésophile* : Intérêt de l'enquête environnementale à domicile » (2012) (publié)
- « Modulation du réflexe de toux par l'exercice chez le lapin sensibilisé à l'ovalbumine » (2016) (publié)
- « Proposition d'un questionnaire d'évaluation de l'enseignant en Médecine par les étudiants » (2019) (projet de publication)

PRIX ET BOURSES OFFICIELLES

2001 - Financement d'un stage d'Imagerie (1 mois) par un projet interuniversitaire, CHU Pecs, Hongrie

2002 - Bourse ERASMUS (5 mois) : cardiologie, néphrologie, neurologie, CHU Tours, France

2006 - Bourse FOSFOM (1 an), CHU Brugmann, Bruxelles, Belgique

2019 - Soutien financier de la part du CLPT pour le stage post-doctoral à Londres, Angleterre

Tableau 1. Récapitulatif des prix obtenus au décours de la formation et la carrière médicale

Prix	Titre	Lieu	Année
3 Prix d'excellence professionnelle		Faculté de Médecine, Cluj-Napoca, Roumanie	2000, 2001, 2002
Prix pour la meilleure activité scientifique pendant les études médicales		Faculté de Médecine, Cluj-Napoca, Roumanie	2003
1 ^{er} Prix, Section médicale, Journées Médicales de l'Université de Médecine et Pharmacie Cluj-Napoca	« Repères diagnostiques dans la sarcoïdose pulmonaire »	Faculté de Médecine, Cluj-Napoca, Roumanie	2004
1 ^{er} Prix, Session de Communications Scientifiques des étudiants en Médecine	« Les agents biologiques anti-TNF alpha dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde - l'expérience clinique avec Infliximab »	Faculté de Médecine, Cluj-Napoca, Roumanie	2002
1er Prix, III ^{ème} Congrès National des Etudiants en Médecine et des Jeunes Médecins	« Le rôle de la scintigraphie hépatobiliaire dans le diagnostic différentiel des affections des voies biliaires »	Faculté de Médecine, Iasi, Roumanie	1999
Prix spécial, III ^{ème} Congrès de Bioingénierie Médicale	« Algorithmes d'investigation radiologique dans la pathologie de l'aorte »	Faculté de Bioingénierie Médicale, Iasi, Roumanie	2000
Mention au Congrès MEDICALIS	« La maladie de Berger : corrélations cliniques - biopsiques, aspects thérapeutiques »	Faculté de Médecine, Cluj-Napoca, Roumanie	2001
Programme PnuemoPulse	« Accuracy of echocardiography to detect pulmonary hypertension in severe COPD »	ERS Congres, Vienne, Autriche	2009
Programme PnuemoPulse	« Efficacy and safety of erythropoietic agents in anaemic patients with lung cancer »	ERS Congres, Barcelone, Espagne	2010
Prix pour le meilleur poster	« Impact of anxiety and depression in asthma control »	WAO/EAACI Congres, Milan, Italy	2013
Prix de la Fédération Européenne de Physiologie et de la Fédération Française de Physiologie	« Influence of ovalbumine sensitisation on the down-regulation of cough during exercise in rabbits »	FEPS & FPS Congres, Paris, France	2016

**PRIX POUR LE TRAVAIL SUR L'ASTHME ET COMORBIDITES DE TYPE
ANXIETE-DEPRESSION**



**EAACI-WAO
Congress 2013**



Abstract Prize

**for an outstanding abstract presentation
has been awarded to**

Angelica Tiotiu

993 - Impact of anxiety and depression in asthma control

**at the
EAACI-WAO Congress 2013
22 – 26 June, Milan, Italy**

Cezmi Akdis
**Cezmi Akdis
EAACI President**

Ruby Pawankar
**Ruby Pawankar
WAO President**

G. Walter Canonica
**G. Walter Canonica
Local Organising Committee Chair**



PRESENTATION DE L'ACTIVITE D'ENSEIGNEMENT

Etant chargée d'enseignement, à l'heure actuelle, mon activité pédagogique comporte notamment des cours pour les étudiants FASM1 à la Faculté de Médecine de Nancy, lors du module de Pneumologie.

J'ai commencé à m'intéresser à l'activité d'enseignement dans le domaine médical, assez précocement, pendant mes études de Médecine en Roumanie en participant à des cours de pédagogie (48 heures) en 5^{ème} et 6^{ème} année. J'ai été Assistante-Chef de Clinique dans la discipline Pneumologie à l'Université de Lorraine pendant 4 ans (2009-2013) et assuré des cours magistraux PACES (48 points), MED2-6 (33 points), stages de Sémiologie générale et respiratoire (75 points), conférences d'internat (24 points), heures de simulation (20 points), cours de DES, DESC, DU, DIU (33,5 points) à la Faculté de Médecine, cours à l'Institut de Formation en Soins Infirmiers (8 points) et à la Faculté d'Odontologie (5 points). Depuis septembre 2013, je suis chargée d'enseignement et, en dehors des cours aux étudiants FASM1 (35 points), je réalise des conférences d'internat (16 points) et propose des cours pour les DES de Pneumologie et ORL, DESC d'Allergologie, DU d'Imagerie thoracique (14 points).

Les principales thématiques enseignées sont l'asthme et l'allergologie respiratoire, la prise en charge du cancer bronchique, les épanchements pleuraux, le pneumothorax, la toux, les hémoptysies et la BPCO.

Je suis titulaire de la certification SIDES. J'ai participé à des commissions pédagogiques (630 points), à la rédaction des sujets d'examen et à la conception des dossiers SIDES (36 points) dans le service ainsi que lors des réunions de docimologie à la faculté et à la correction des copies d'examens (8 points).

Afin de m'adapter au mieux aux exigences de l'enseignement, j'ai suivi les cours du DIU de Pédagogie Médicale à la Faculté de Médecine de l'Université de Lorraine, durant l'année universitaire 2017-2018. Je n'ai soutenu mon mémoire « Proposition d'un questionnaire d'évaluation de l'enseignant en Médecine par les étudiants » qu'en novembre 2019 en raison de mon départ en mobilité à Londres, (novembre 2018), pour une année. J'envisage de soumettre un article reposant sur ce travail dans la revue de Pédagogie Médicale au decours de cette année.

Depuis mon retour de Londres, je me suis impliquée de manière active dans la réforme du 2^{ème} cycle des études médicales et j'ai intégré le groupe de travail ECOS (Examens cliniques Objectifs et Structurés) de la Faculté de Médecine de Nancy depuis octobre 2020. J'ai fait des formations sur le plan national et local, j'ai participé à la conception et correction des dossiers ECOS surtout pour les FASM1 et FGSM3, à des séances de docimologie, aux examens réalisés les 25-26 avril 2021 et le 18 juin 2021.

Je souhaite intégrer l'équipe de simulation de l'Hôpital Virtuel à la Faculté de Médecine de Nancy avec un projet pédagogique de formation pour les internes en bronchoskopie à la fois par un programme informatique de réalité virtuelle, mais aussi par la simulation sur le mannequin.

A ce jour, et conformément aux recommandations de la Conférence des Doyens des Facultés de Médecine, mon Score Individuel d'Aptitudes Pédagogiques en Santé (SIAPS) s'élève à 1039,5 points. Le détail de ces activités pédagogiques et d'enseignement figure ci-après.

S. I. A. P. S. 2

Score Individuel d'Aptitudes Pédagogiques en Santé



Nom : TIOTIU Faculté de Médecine de : Nancy
 Prénom : Angelica Candidature à : PU-PH
 Date naissance : 28/08/1977
 Sous-section :

Version 5.4 - janvier 2021
 D. GOSSET

Année 2011-12	2012-13	2013-14	2014-15	2015-16	2016-17	2017-18	2018-19	2019-20	2020-21	Coefficient	TOTAL
------------------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	-------------	-------

[1] CHARGES D'ENSEIGNEMENT

[1a] PACES/PASS : nb d'heures de cours magistraux	12	12	0	0	0	0	0	0	0	0	2	48
[1b] MED2 à MED6 : nb d'heures de cours magistraux	18	6	9	9	6	8	6	3	0	3	1	68
[1c] PACES à MED6 : nb d'heures d'ED	24	24	0	0	0	0	0	0	0	0	1	48
[1d] PACES à MED6 : nb d'heures de TP	24	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	27
[1e] MED2 à MED6 : nb d'heures en centre de simulation	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	1	20
[1f] Conférences d'internat au sein de la Faculté de médecine : nombre de conférences	4	4	4	4	4	0	0	0	0	0	2	40
[1g] 3 ^e cycle et autres formations médicales (DES, DESC, DU, DIU) : nb d'heures de cours	18	8,5	7	5	5	4	0	0	0	0	1	47,5
[1h] Masters, thèses d'université : nb d'heures de cours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
[1i] Formations paramédicales facultaires : nb d'heures de cours	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8
[1j] Maieutique : nb d'heures de cours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0
[1k] Formations paramédicales extra-facultaires : nb d'heures de cours	7	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	5
Sous-total [1] CHARGES D'ENSEIGNEMENT											312	

[2] FORMATION PEDAGOGIQUE

[2a] Possession d'un DU ou DIU de pédagogie, ou équivalent (1=oui)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	20	20
[2b] Nombre de journées de formation en pédagogie	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	1	1
[2c] Titulaire de la certification SIDES (1=oui)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	3
Sous-total [2] FORMATION PEDAGOGIQUE											24	

[3] ACTIVITÉS PÉDAGOGIQUES et SERVICES RENDUS

[3a] Production pédagogique numérique, TICE : nb d'heures de cours (hors mise à jour)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	3	30
[3b] Publications en pédagogie ou didactique (nombre)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
[3c] Participation à la rédaction d'un polycopié national ou livre (nombre, hors mise à jour)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
[3d] Participation à une commission pédagogique de la Faculté (nombre)	15	15	9	9	0	0	0	0	0	0	15	10	630
[3e] Rédaction de sujets d'examen de fin d'année (1 par dossier ou pour 15 QCM)	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	24
[3f] Responsabilité d'UE 1er ou 2ème cycle études médicales (1 par UE)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
[3g] Responsabilité d'autre UE (1 par UE)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
[3h] Contributions ECNi validées (Faculté, SIDES) (1 par dossier ou pour 15 QRM)	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	12
[3i] Nombre de copies corrigées	184	202	165	198	0	0	0	0	0	0	0	0,02	8
<i>Sous-total [3] ACTIVITÉS PÉDAGOGIQUES et SERVICES RENDUS</i>													704

Score SIAPS APTITUDES - première évaluation (saisir la note)

Score SIAPS APTITUDES - seconde évaluation (saisir la note)

Scores SIAPS CONGRÈS (saisir la note)

Score SIAPS ACTIVITÉS / Note SIAPS APTITUDES / Note SIAPS CONGRÈS **1039,5 / /**

Le candidat certifie l'exactitude de cette déclaration.

Il atteste être en possession des justificatifs correspondants.

Date :

Signature :

Le Doyen de la Faculté certifie l'exactitude de cette déclaration.

Date : Vandoeuvre les Nancy, le 15 juin 2021

Signature :

PRESENTATION SYNTHETIQUE DES ACTIVITES DE RECHERCHE

1. PRESENTATION THEMATIQUE ET BILAN DES ACTIVITES DE RECHERCHE

1.1. RECHERCHE CLINIQUE

Passionnée par la médecine, j'ai déjà commencé mon activité de recherche clinique en étant étudiante à la Faculté de Médecine de Cluj-Napoca, Roumanie. Je me suis consacrée notamment à l'étude du rôle de la composante génétique dans la pathogenèse des maladies neurologiques, dermatologiques et la carcinogenèse pulmonaire, des mécanismes immunologiques de diverses maladies néphrologiques, respiratoires, rhumatologiques, à l'apport de différentes techniques d'imagerie dans le diagnostic mais également à l'efficacité des nouvelles thérapies dans les maladies néphrologiques et rhumatologiques. Dans le domaine de la pathologie respiratoire, dans le Département de Génétique de l'Université de Médecine et Pharmacie de Cluj Napoca Roumanie, j'ai réalisé une étude sur une série de cas incluant des patients non-fumeurs provenant de la même famille et ayant développé un cancer bronchique en rapport avec leur héritage génétique. Sous la coordination des encadrants universitaires dans les disciplines énumérées, j'ai réussi à finaliser et présenter, lors des congrès et séminaires médicaux, 15 travaux scientifiques (*cf. Liste de Communications No 1-15*), certains récompensés par des prix (**Tableau 1**). A la fin de mes études de Médecine, lors d'un gala, j'ai reçu le prix pour la meilleure activité scientifique parmi les étudiants de ma génération.

J'ai débuté mon internat de Pneumologie en 2004, à l'Hôpital Universitaire de Cluj-Napoca dans le Service de Pneumologie et poursuivi mon activité de recherche clinique avec des travaux scientifiques sur la pathologie infectieuse respiratoire et la résistance acquise aux antibiotiques, le rôle du reflux gastro-oesophagien dans la toux chronique et de l'obésité dans l'hypoventilation alvéolaire, les diverses étiologies possibles des nodules pulmonaires, le management des maladies immunologiques respiratoires telles que la sarcoïdose pulmonaire et les pneumopathies d'hypersensibilité. Concernant l'infectiologie respiratoire, j'ai réalisé une étude dans la Clinique de Pneumologie de Cluj-Napoca, incluant 146 patients hospitalisés pour des infections respiratoires basses, documentées par un examen cytbactériologique des expectorations, lavage bronchiolo-alvéolaire ou hémocultures et par l'analyse des antibiogrammes des germes identifiés. Les germes les plus fréquents à l'origine des infections respiratoires basses étaient *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* et *Haemophilus influenzae* et la résistance acquise de ces germes était corrélée, en général, à la durée trop courte de l'antibiothérapie réalisée précédemment ou à l'administration répétée du même antibiotique. Comme la toux chronique représente 10-30% des consultations chez le pneumologue, j'ai effectué une étude dans la même clinique sur l'intérêt de la réalisation d'un questionnaire spécifique pour le dépistage du reflux gastro-oesophagien chez ces patients. Quatre vingt-huit patients ont été inclus et selon les résultats du questionnaire, 29% d'entre eux avaient un reflux gastro-oesophagien. Le diagnostic a été confirmé par la suite par la pHmétrie dans 23% de cas. L'administration d'un traitement par des inhibiteurs de la pompe à protons permettait une amélioration de la toux dans 92% de cas. La perte de 33 kg dans une année, par un régime alimentaire associé à un réentraînement à l'effort (3 séances d'une heure par semaine) chez un patient ayant un syndrome d'hypoventilation-obésité, a permis une amélioration de la symptomatologie respiratoire, de la fonction respiratoire, de la gazométrie artérielle et du syndrome d'apnées-hypopnées obstructives du sommeil, permettant un sevrage de la ventilation non-invasive. Dans une étude incluant 34 patients opérés pour des nodules

pulmonaires en Roumanie, les étiologies les plus fréquentes étaient la tuberculose (34%), la néoplasie (32%) et le silicose (16%). Mon travail de thèse d'exercice en médecine portait sur les moyens de diagnostic de sarcoïdose pulmonaire et sa prise en charge thérapeutique. Cinquante neuf patients suivis dans la Clinique de Pneumologie à Cluj-Napoca Roumanie étaient inclus. Le diagnostic était établi dans 76% de cas, lors d'une fibroscopie bronchique avec des biopsies bronchiques/transbronchiques et lavages bronchiolos-alvéolaires, démontrant une alvéolite lymphocytaire avec un rapport CD4/CD8 élevé et/ou des granulomes épithélioïdes et géantocellulaires sans nécrose caséuse respectivement par des biopsies transpariétales thoraciques scannoguidées/chirurgicales dans 24% de cas. Près d'un tiers des cas bénéficiait d'une rémission complète en l'absence de tout traitement ; un autre tiers évoluait avec des périodes d'activation nécessitant la mise en place d'une corticothérapie systémique pour obtenir une amélioration de la symptomatologie et sur le plan de l'imagerie ; le dernier tiers incluait des sarcoïdoses difficiles souvent corticodépendantes, nécessitant le rajout d'un traitement immunosuppresseur, évoluant vers la fibrose pulmonaire et l'insuffisance respiratoire. Lors de mes deux premières années d'internat, j'ai présenté une dizaine de mes travaux, lors des manifestations scientifiques de Pneumologie en Roumanie (*cf. Liste de Communications No 16-27*), et participé à la rédaction de trois articles de review publiés dans des journaux nationaux de spécialité en Roumanie sur la pathogénèse de l'œdème pulmonaire de ré-expansion, les diverses étiologies des bronchiectasies, ainsi que le diagnostic et le traitement des pneumopathies d'hypersensibilité (*cf. Liste de Publications Nationales No 1,2,4*).

Contactée par l'équipe du Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire de l'Université de Médecine et Pharmacie de Cluj-Napoca (Pr. G. Benga) qui avait besoin d'un pneumologue pour un projet de recherche sur l'impact de la pollution atmosphérique intérieure et extérieure sur l'apparition et l'évolution de l'asthme chez l'enfant, je me suis intégrée dans ce groupe de travail. Au vu de mon implication dans le projet, j'ai été nommée directrice du grant qui a obtenu un financement du Centre National pour le Soutien de la Recherche Universitaire (CNCSIS) en 2006. Nous avons réalisé des mesures sur les plus fréquents polluants dans l'air de l'environnement intérieur et extérieur dans 5 quartiers différents de la ville de Cluj-Napoca qui possédaient des moyens de chauffage variés et situés dans des zones de trafic routier plus ou moins dense. Les enfants inclus dans l'étude, après la signature d'un consentement écrit par leurs responsables légaux, ont rempli un questionnaire concernant leurs antécédents et symptômes respiratoires, ont été examinés puis ont bénéficié de spirométries. Nous avons démontré qu'il existe un effet additif négatif de la pollution extérieure (liée au trafic routier) et intérieure (chauffage à la biomasse ou au gaz) sur l'apparition des symptômes respiratoires chez l'enfant et une association avec une fonction respiratoire plus basse même en absence de symptômes. Les résultats de l'étude ont fait l'objet de deux communications lors d'un congrès de santé de l'environnement à Brasov, Roumanie en 2006 (*cf. Liste de Communications 28-29*).

Durant l'année universitaire 2006/2007, j'ai obtenu une bourse d'études pour bénéficier d'une année d'internat dans le Service de Pneumologie au CHU Brugmann, Université Libre de Bruxelles, Belgique (Pr. A. Nosedà). En dehors de mon activité de clinicienne, j'ai travaillé sur deux projets de recherche clinique. Le premier portait sur l'étiologie, les tests diagnostics et la prise en charge du syndrome d'hyperventilation, projet proposé par le Dr. S. Abdel Kafi. Les objectifs de mon étude étaient axés sur la réalisation d'un bilan systématique lors d'une suspicion de syndrome d'hyperventilation afin de définir son étiologie (bilan biologique, gazométrie artérielle, questionnaire de Nijmegen, exploration fonctionnelle respiratoire complète avec test de provocation d'hyperréactivité bronchique à la Méthacholine, imagerie cérébrale, bilan cardiaque, questionnaire d'anxiété Spielberger) et de comparer les deux tests utilisés pour le diagnostic dans la pratique courante, à savoir le test de provocation d'hyperventilation et l'épreuve d'effort.

N'ayant inclus que 23 patients lors de mon séjour à Bruxelles, j'ai continué l'étude à Nancy en collaboration avec le Pr. M. Poussel, Service d'Explorations Fonctionnelles Respiratoires du CHU de Nancy. Elle a été finalisée récemment avec un total de 59 patients. Selon nos résultats, la plus fréquente étiologie du syndrome d'hyperventilation retrouvée porte sur l'asthme et le meilleur examen complémentaire pour le diagnostic est le test de provocation d'hyperventilation. L'article vient d'être publié dans le journal *Respiratory Medicine* (cf. *Liste de Publications Internationales No 29*). Par ailleurs, ce travail a fait l'objet d'une communication orale au Congrès de la Société Européenne de Pneumologie (ERS) en 2011, et d'un poster au Congrès de Pneumologie de Langue Française (CPLF) en 2008 (cf. *Liste de Communications No 30,38*). Le deuxième projet m'a été proposé par les Prs. G. Hoffmann (responsable du Laboratoire de Sommeil) et A. Nosedà concernant l'étude de l'influence de la position du corps sur les anomalies respiratoires au décours du sommeil grâce à un capteur thoracique qui permettait l'identification des neuf positions du corps. Cette étude incluant 105 patients a permis d'établir que les anomalies respiratoires diminuaient dans la position décubitus-dorsal-droit ou décubitus-dorsal-gauche vs décubitus dorsal et en décubitus-ventral-droit ou décubitus-ventral-gauche comparativement à la position latérale droite ou latérale gauche. Ce travail a été publié en 2011 (cf. *Liste de Publications Nationales No 5*) et présenté comme poster lors du Congrès ERS en 2010 (cf. *Liste de Communications No 36*).

Après un court retour en Roumanie, je suis venue en France à partir du 01/11/2007 pour continuer ma formation comme interne dans le Service de Pneumologie du Pr. Y. Martinet (12 mois) et le Service des Maladies Respiratoires et Soins Continus du Pr. F. Chabot (6 mois). En dehors de mon activité clinique et de formation, pendant cette période, j'ai réalisé deux études cliniques dans le domaine de l'hypertension pulmonaire sous la coordination du Pr. A. Chaouat. La première avait pour objectif d'établir la sensibilité et la spécificité de l'échographie cardiaque, d'évaluer l'hypertension pulmonaire chez les patients ayant une bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) sévère en la comparant aux valeurs enregistrées lors du cathétérisme cardiaque droit qui est l'examen de référence. Ce travail a démontré que l'échographie cardiaque réalisée par un cardiologue expert dans l'hypertension pulmonaire est fiable pour ce diagnostic même chez les patients ayant une BPCO sévère et a fait l'objet de deux communications aux Congrès ERS (2009) et CPLF (2010) (cf. *Liste de Communications 31,32*). La deuxième étude portait sur la comparaison des paramètres mesurés lors du cathétérisme cardiaque droit pour les patients présentant une hypertension pulmonaire secondaire à une BPCO avec des patients présentant une hypertension pulmonaire idiopathique afin de mieux caractériser l'hémodynamique pulmonaire au repos et à l'effort. Ce travail a confirmé le fait que le comportement à l'effort est significativement différent chez les patients ayant une hypertension pulmonaire secondaire à une BPCO comparativement à ceux qui présentent une hypertension pulmonaire idiopathique avec une augmentation moindre de la pression artérielle pulmonaire moyenne et des résistances vasculaires pulmonaires dans le premier groupe contrairement au débit cardiaque. Les résultats ont été présentés lors du CPLF 2012 (cf. *Liste de Communications No 39*).

A partir du 01/05/2009, comme Assistante Chef de Clinique dans le Service de Pneumologie du Pr. Y. Martinet, je me suis davantage investie dans le développement de l'allergologie respiratoire et l'asthme. Dans ce service, j'ai mis en place des consultations dédiées à cette pathologie, des bilans spécifiques systématiques en hospitalisation de jour, des programmes d'éducation thérapeutique pour les patients et de dépistage dans la population générale, lors de la Journée Mondiale de l'Asthme, ainsi que des projets de recherche clinique. J'ai suivi la formation de deux ans en Immunologie- Allergologie (la première année dans le Service de Médecine Interne – Allergologie du Pr. G. Kanny au CHRU de Nancy et la deuxième dans le

Service de Pneumologie – Allergologie du Pr. F. de Blay au CHRU de Strasbourg). J'ai obtenu mon diplôme d'allergologue en 2012 et mon sujet de mémoire portait sur la description d'un cas clinique de pneumopathie d'hypersensibilité consécutive à l'exposition dans l'environnement domestique aux moisissures de type *Penicillium chrysogenum* et *Streptomyces mesophile* identifiées sur les prélèvements réalisés lors de la visite à domicile de la conseillère de l'environnement intérieur. Ce travail a été présenté lors des congrès d'allergologie et pneumologie en 2012 (cf. *Liste de Communications No 40*) et publié dans un journal français de pneumologie en 2013 (cf. *Liste de Publications Nationales No 6*). Etant donné que l'activité principale du service que j'avais intégré était centrée sur l'oncologie thoracique, j'ai complété ma formation médicale en suivant des cours et séminaires dans ce domaine (ex. gestion de la douleur, échoendoscopie bronchique avec cytoponction ganglionnaire pour staging tumoral, technique d'endoscopie interventionnelle) et, grâce à mon activité riche et soutenue, j'ai obtenu la validation du DESC en Oncologie de l'Université de Lorraine en 2013. Lors de mes quatre années d'assistantat, j'ai suivi des formations de bonne pratique dans la recherche clinique et commencé à m'impliquer de manière active dans la gestion des essais cliniques académiques (promoteur l'Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique IFCT) et industriel ouverts dans le service. J'ai été co-investigatrice dans plusieurs études nationales et internationales testant en général de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le domaine de l'oncologie thoracique (IFCT 0501, 0502, 0702, 0703, 0802, Lilly S124, RADIANT, MAPS, BRAIN, GENENTECH METMAB). Les informations complémentaires concernant ces études sont disponibles dans l'ANNEXE. Durant cette période, comme activité de recherche clinique personnelle, j'ai commencé une étude sur l'efficacité des différents agents stimulateurs de l'érythropoïèse dans l'anémie chimio-induite chez les patients ayant un cancer bronchique (toujours ouverte aux inclusions). Selon mes résultats, l'époétine alfa est la meilleure en terme d'efficacité et de tolérance pour le traitement de l'anémie chimio-induite chez les patients ayant un cancer bronchique comparativement à l'époétine beta et la darbépoétine alfa à 8 semaines de traitement. Les résultats préliminaires de cette étude ont été présentés lors de manifestations scientifiques françaises, européennes et américaines (cf. *Liste de Communications No 35, 46, 48, 52*). J'ai publié deux reviews de la littérature sur le sujet (l'un en français en 2015 et l'autre en anglais, sur invitation en 2013) (cf. *Liste de Publications Nationales No 8 et Internationales No 2*) et j'ai réalisé un interview pour l'équipe de l'Université de Cambridge qui s'occupe des stratégies thérapeutiques, lors du congrès ERS 2013. Par ailleurs, j'ai participé à la rédaction d'un article publié en 2013 portant sur la description d'un syndrome paranéoplasique inhabituel avec sécrétion inappropriée de β -HCG dans un adénocarcinome bronchique (cf. *Liste de Publication Nationales No 7*). Du fait de ma compétence en allergologie, je suis rapidement devenue la référente pour la gestion des réactions anaphylactiques chimio-induites dans le service. En pratique, la plupart des réactions anaphylactiques surviennent à la première perfusion de Paclitaxel, contrairement aux sels de platine où il existe un effet-dose cumulé, et ces réactions sont décrites après 5-6 perfusions administrées. J'ai élaboré des protocoles pour la prophylaxie de ces réactions par l'administration d'une prémédication de corticoïdes par voie systémique \pm antihistaminiques, pour la prise en charge d'une réaction anaphylactique en urgence et pour l'induction de la tolérance au Paclitaxel. En lien avec ce sujet, j'ai publié un article en 2013 (cf. *Liste de Publications Internationales No 1*) et présenté deux travaux scientifiques, lors des congrès d'allergologie en 2011 et 2012, notamment sur les réactions d'hypersensibilité induites par les sels de platine et Paclitaxel (cf. *Liste de Communications No 37 et 41*).

Je suis Praticien Hospitalier dans le Département de Pneumologie du CHRU de Nancy depuis le 01/05/2013. Le Département de Pneumologie du CHRU de Nancy (chef de service, Pr. F. Chabot) comporte, à l'heure actuelle, 46 lits d'hospitalisation avec plus de 2700 séjours en

hospitalisation/an, plus de 11000 consultations/an et plus de 3000 séances de chimiothérapies/an. Comme le service actuel est le résultat de la fusion des 2 services de pneumologie, les activités sont très diverses et comportent : oncologie thoracique (consultations, bloc technique, RCP, séances de chimiothérapies/immunothérapies, endoscopies interventionnelles, consultations de primo-prescription pour les hôpitaux périphériques, soins de support) ; centre de lutte anti-tuberculeux (CLAT) ; centre régional de mucoviscidose (CRCM) ; tabacologie ; centre de compétence en HTAP ; VNI ; laboratoire de sommeil ; pneumopathies interstitielles diffuses, maladies rares pulmonaires, soins intensifs respiratoires, asthme et allergologie respiratoire. Je suis la responsable d'un secteur d'hospitalisation conventionnelle (13 lits) et de l'unité PRIMO d'hospitalisation de jour à Institut de Cancérologie Lorrain où les patients suivis dans notre service bénéficient de séances de chimiothérapies/immunothérapies.

Mon domaine préférentiel de recherche clinique est l'asthme mais j'ai aussi une riche activité scientifique dans d'autres pathologies respiratoires.

1.1.1. ASTHME

Je suis la responsable de l'activité « Asthme-Allergologie respiratoire » dans le service, depuis mai 2009, avec 2 plages de consultations dédiées à cette activité et une moyenne de 800 consultations/an, je suis la référente en pneumologie pour l'asthme dans les services ORL (consultations en binôme avec le Pr. R. Jankowski, réalisées entre 2010-2013, afin d'optimiser la prise en charge des patients ayant une rhino-sinusite chronique avec ou sans polypose nasale et un asthme), en Dermatologie, Pathologies Professionnelles (participation à la réunion mensuelle d'Asthme professionnel et la gestion de tests de provocation réalistes), en EFR, Médecine Interne et les hôpitaux périphériques. La plupart des patients proviennent de la région Lorraine mais on peut avoir aussi des patients provenant de la région Haute Marne et Bourgogne-Franche-Comté pour le réseau « Asthme Sévère ». Je suis amenée à voir régulièrement des patients qui sont adressés pour un 2^{ème} avis ou pour l'instauration des biothérapies pour leur asthme sévère.

Mes activités personnelles de recherche clinique dans l'asthme sont axées sur trois thématiques principales :

- **Asthme et comorbidités**
- **Asthme sévère**
- **Asthme et environnement.**

Mon intérêt pour la thématique « **Asthme et comorbidités** » a débuté avec mes premières consultations d'asthme. La recherche systématique et la prise en charge des comorbidités, qui peuvent entretenir un mauvais contrôle de la maladie asthmatique, représentent des priorités dans la prise en charge de l'asthme avant toute escalade thérapeutique (1). Parmi les plus importantes, figurent les comorbidités ORL (rhinite allergique, rhino-sinusite chronique avec ou sans polypose nasale, dysfonctionnement des cordes vocales), l'obésité, le syndrome d'hyperventilation inapproprié, le reflux gastro-œsophagien, les troubles psychologiques de type anxiété-dépression et le syndrome d'apnées-hypopnées obstructives du sommeil (2,3). Certaines peuvent être prises en charge dans le Département de Pneumologie (ex. syndrome d'apnées-hypopnées obstructives du sommeil), mais pour d'autres, des collaborations avec d'autres services sont nécessaires.

Avec le Pr. R. Jankowski et son équipe (Service ORL du CHRU de Nancy), une collaboration a été mise en place, depuis 2010, par le biais des consultations en binôme ORL-pneumologue pendant 3 ans puis une filière de soins s'est développée qui garde toujours son

actualité. Les médecins ORL doivent adresser leurs patients, pour lesquels il existe une suspicion d'asthme, en consultation de pneumologie pour un bilan spécifique et, inversement, les pneumologues doivent envoyer en consultation ORL les patients asthmatiques présentant un dysfonctionnement nasal chronique pour le diagnostic et la prise en charge de la pathologie naso-sinusienne. Grâce à cette collaboration, il existe une amélioration de la prise en charge des patients ayant un asthme associé à une comorbidité ORL et une cohorte de patients a été créée. Plusieurs travaux de recherche clinique sont en cours et certains ont été publiés (*cf Liste de Publications Internationales No 7,19, 20*).

Face à une suspicion de rhino-conjonctivite allergique à l'ortie (jamais décrite auparavant), suite à l'interrogatoire d'un de mes patients, j'ai réalisé des tests cutanés allergiques et de biologie moléculaire ainsi qu'un test de provocation nasale (avec le Dr. Gallet, spécialiste ORL) qui se sont avérés positifs et, en collaboration avec des chercheurs de l'Institut Pasteur Paris (M. P. Poncet, Mme H. Sénéchal) qui ont identifié les allergènes spécifiques de cette plante, nous avons documenté pour la première fois une allergie à l'ortie. Ce travail a été publié en 2016 (*cf Liste de Publications Internationales No 4*) puis présenté lors du congrès national d'allergologie en 2016 (*cf. Liste de Communications No 51*).

La présence des comorbidités ORL est fréquente dans l'**asthme sévère** (asthme non-contrôlé malgré des doses moyennes/élevées de corticoïdes par voie inhalée associées à un 2^{ème} traitement de fond ou qui nécessite ces traitements pour obtenir un contrôle des symptômes et diminuer le risque d'exacerbation) (4). Dans le registre international d'asthme sévère, la rhinite allergique est retrouvée chez 49% des patients, la rhino-sinusite chronique dans 21% des cas et la polypose nasale chez 7% des asthmatiques sévères (2).

Pour les patients ayant un asthme sévère associé à une rhino-sinusite chronique sans étiologie allergique ou polypose nasale et des exacerbations infectieuses fréquentes, la recherche d'un déficit immunitaire est indispensable (4). Comme il s'agit d'une étiologie rare pour la pathologie ORL et respiratoire, la découverte de différents déficits immunitaires m'a amenée à faire appel au Pr. R. Jaussaud (Médecine Interne) pour recueillir ses avis sur la prise en charge. Les premiers patients identifiés, qui ont bénéficié d'une prise en charge spécifique du déficit immunitaire avec amélioration de la symptomatologie ORL et respiratoire, ont fait l'objet de la publication d'une série de cas en 2018 (*cf. Liste de Publications Internationales No 7,19*) et de communications lors des congrès d'allergologie, immunologie et pneumologie en 2015-2016 (*cf. Liste de Communications No 47,55*). Nous avons enrichi la cohorte locale et, en collaboration avec le Service de Pneumologie de l'Hôpital Foch (Pr. JL. Couderc), centre expert dans les déficits immunitaires, nous avons publié un article original incluant 39 patients suivis dans les deux centres, traités soit par azithromycine, soit par des perfusions d'immunoglobulines, pour leur déficit immunitaire. Les deux traitements ont permis une réduction significative du nombre d'exacerbations d'asthme et de sinusites aiguës à un an et une amélioration du score de contrôle de l'asthme et de la fonction respiratoire (*cf Liste des Publications Internationales No 19*).

Dans la région Grand-Est, j'ai été la promotrice d'un projet d'étude de l'efficacité de l'omalizumab sur l'asthme sévère allergique associée à la polypose nasale avec ou sans intolérance à l'aspirine. Vingt-quatre patients ont été inclus (dont neuf ayant une intolérance documentée à l'aspirine) provenant des CHRU de Besançon, Dijon, Nancy, Strasbourg et du CH de Colmar. Ce travail a démontré le bénéfice de ce traitement non seulement dans l'asthme (comme attendu et démontré auparavant (5,6)) mais aussi sur la symptomatologie ORL, le nombre des sinusites aiguës et la sévérité de l'atteinte radiologique sur le scanner de sinus. D'ailleurs, l'omalizumab a obtenu récemment l'AMM dans la polypose nasale (7). Une publication en 2020 est issue de ce travail (*cf Liste des Publications Internationales No 20*).

Une autre comorbidité importante de l'asthme dont je me suis intéressée est le trouble d'anxiété-dépression. J'ai réalisé une étude de prévalence des troubles psychologiques sur la cohorte des patients asthmatiques suivis au CHRU de Nancy par le calcul systématique du score HAD (hospital anxiety depression scale), lors de la consultation. Ce travail, en cours de rédaction pour une publication, a fait l'objet de communications lors des congrès européens d'allergologie et pneumologie en 2013 et a été récompensé par un prix lors du congrès de l'organisation mondiale d'allergologie (cf. *Liste de Communications No 43*).

Le tabagisme (actif et passif) représente un facteur de risque de non-contrôle de l'asthme et s'accompagne souvent d'un asthme plus sévère (1). En 2015, j'ai commencé une étude de l'impact du tabagisme sur le contrôle de l'asthme, le nombre annuel d'exacerbations et la fonction respiratoire, en instaurant trois groupes : un groupe de patients ayant un tabagisme actif, un 2^{ème} un tabagisme sevré et un 3^{ème} avec des non-fumeurs. L'équipe du Pr. Francisco Javier Gonzalez Barcala, Université de Santiago de Compostela, Espagne, s'est jointe à mon projet en 2018. Cent soixante-seize patients ont été inclus dans les deux centres (48 patients dans le groupe de fumeurs actifs, 38 patients dans le groupe d'ex-fumeurs et 90 patients dans le groupe des non-fumeurs). Nous avons constaté que les asthmatiques fumeurs actifs sont plus à risque d'avoir un asthme non-contrôlé, un nombre plus important d'exacerbations et une fonction respiratoire plus basse comparativement aux non-fumeurs, ainsi qu'une mauvaise perception de la dyspnée. Les premiers résultats de ce travail ont été présentés au congrès européen de pneumologie ERS en 2016 (cf. *Liste de Communications No 54*) et l'étude a été publiée en 2021 (cf. *Liste de Publications Internationales No 32*).

J'ai plusieurs reviews de la littérature publiés dans le domaine de l'asthme et comorbidités (trois sur l'asthme et les comorbidités ORL, un sur l'asthme et l'obésité) et de l'asthme sévère (quatre reviews et deux chapitres de livre) (cf. *Liste des Publications Internationales No 9-10, 12-13, 18, 22, 28, 31 et Ouvrages Internationaux No 1-2*), réalisés seule ou en collaboration avec des collègues faisant partie du groupe Global Asthma Association. J'ai participé à une étude internationale concernant les habitudes des prescriptions des biothérapies dans l'asthme sévère à travers le monde dans le cadre de la même association (cf. *Liste des Publications Internationales No 25*) de même qu'à l'étude nationale STELLAIR qui a évalué l'efficacité du traitement par omalizumab dans l'asthme sévère allergique selon le taux sanguin d'éosinophiles (6).

Ma 3^{ème} thématique d'intérêt est représentée par **l'influence de l'exposition environnementale sur l'asthme**. Je me suis intéressée à ce sujet précocement dans ma carrière, étant interne en Roumanie en 2005, par le projet de grant sur l'impact de la pollution environnementale (extérieure et intérieure) sur l'apparition et l'évolution de l'asthme chez les enfants (déjà détaillé précédemment). Au fil du temps, mon intérêt dans ce domaine n'a fait qu'augmenter. Récemment, j'ai publié un review de la littérature sur l'impact de la pollution de l'environnement intérieur et extérieur sur l'asthme (cf. *Liste des Publications Internationales No 27*).

Depuis mon arrivée au CHRU de Nancy, j'ai commencé à m'intéresser à l'asthme professionnel (asthme déclenché par l'exposition aux allergènes ou irritants dans l'environnement professionnel). En collaboration avec différents services du CHRU de Nancy : Centre des Pathologies Professionnelles, Département de Dermatologie et de d'Allergologie, Service d'Explorations Fonctionnelles Respiratoires et le Service d'ORL, un staff pluridisciplinaire a été créé dans le but de discuter des dossiers cliniques et d'établir l'indication de tests de provocation bronchique spécifique. Au décours de ces séances, une décision collégiale est prise quant à la prise en charge diagnostique et thérapeutique. Ainsi, nous avons pu constituer une cohorte de

patients grâce auxquels nous disposons de l'exhaustivité des explorations nécessaires au diagnostic de l'asthme professionnel. J'ai publié deux reviews de la littérature et deux cas cliniques dans ce domaine (*cf Liste de Publications Internationales No 16, 24, 34 et Nationales No 13*). D'autres travaux de recherche sont en cours.

Je suis l'investigatrice principale au CHRU de Nancy de projets nationaux académiques, comme le PHRC ASTHMIRINE (promoteur, le Pr. C. Taillé, Hôpital Bichat, Paris), qui évaluent l'efficacité à long terme du traitement par aspirine dans le syndrome de Fernand-Widal ; le projet COBRA (responsable, le Pr. P. Berger, CHU Bordeaux) qui inclue des patients ayant un asthme ou une BPCO avec des biomarqueurs afin de pouvoir étudier les différents phénotypes clinico-biologiques de deux maladies chroniques obstructives bronchiques et le registre national d'asthme sévère RAMSES (responsable Pr. C. Taillé, Hôpital Bichat, Paris) servira à étudier les caractéristiques cliniques des asthmatiques sévères en France. J'ai également participé à des essais cliniques industriels qui étudiaient l'efficacité des biothérapies ciblant l'inflammation à éosinophiles dans l'asthme : benralizumab, un anticorps monoclonal ciblant l'unité α du récepteur de l'IL-5 (études SIROCCO, BORA, ANDHI) et dupilumab, un anticorps monoclonal ciblant l'unité α du récepteur de l'IL-4 (études QUEST, TRAVERSE).

1.1.2. AUTRES PATHOLOGIES RESPIRATORIES

Je suis la responsable de l'Oncologie thoracique, depuis juillet 2015, et la modératrice de la RCP hebdomadaire (vendredi après-midi). J'ai mis en place une RCP régionale de Biologie Moléculaire en Oncologie thoracique de manière mensuelle (le premier jeudi du mois) avec la participation, en visioconférence, des hôpitaux privés et publics de la région Lorraine. Je suis la responsable de la réunion hebdomadaire d'Oncologie thoracique du service (lundi après-midi), je réalise des consultations de primo-prescriptions pour les hôpitaux périphériques (mercredi après-midi), j'assure l'activité de l'hospitalisation de jour de l'Oncologie thoracique (mardi après-midi), les visites assises quotidiennes dans mon secteur d'hospitalisation conventionnelle (13 lits), les contre-visites (mardi et jeudi) et les visites au lit du patient (vendredi matin). Je réalise les actes techniques en endoscopie le jeudi matin.

Mes activités personnelles de recherche clinique en Oncologie thoracique sont centrées sur trois thématiques principales :

- **Biologie moléculaire tumorale**
- **Efficacité et tolérance des divers schémas thérapeutiques**
- **Soins de support.**

Ma première thématique d'intérêt en oncologie thoracique concerne l'impact des **altérations moléculaires** sur la survie globale et la survie sans progression dans le cancer bronchique. L'identification des altérations moléculaires, comme EGFR, ALK, ROS1 pour lesquelles des thérapies ciblées efficaces ont été développées, a révolutionné la prise en charge du cancer bronchique au décours de ces dernières années et amélioré de manière significative la survie globale et la survie sans progression des patients (8). La mise en place de la RCP de Biologie moléculaire au CHRU de Nancy s'est fixée pour objectifs la discussion des dossiers des patients ayant des altérations moléculaires et qui ont développé des mécanismes de résistance aux thérapies ciblées en ce domaine ainsi que la stimulation de la mise en place des projets de recherche dans la région Lorraine.

Sous ma coordination, deux thèses d'exercice par des internes en Pneumologie ont été réalisées sur ce sujet : l'une, portant sur les facteurs prédictifs de survie globale et de survie sans progression chez les patients présentant des cancers bronchiques mutés BRAF (soutenue par le

Dr. S. Abderkan en 2019), l'autre, sur l'impact pronostique de la présence des altérations moléculaires sur la survie globale chez les patients ayant un adénocarcinome bronchique métastatique (soutenue par le Dr. G. Treffel en 2020) et présentée comme poster lors du CPLF 2021 (*cf. Liste des Communications No 63*) avec des projets de publications. Ces travaux nous ont permis d'identifier certaines caractéristiques clinico-épidémiologiques pour les patients porteurs des altérations moléculaires et de comparer leurs réponses aux différents traitements. Selon les résultats du premier travail, la prévalence de la mutation BRAF chez les patients ayant un cancer bronchique non à petites cellules en Lorraine est de 2,2% (comparable aux valeurs retrouvées dans la littérature (8)). Concernant les caractéristiques des patients, il s'agissait surtout des hommes, avec une moyenne d'âge de 65 ans, ayant des cancers localisés notamment aux apex pulmonaires et présentant fréquemment des métastases pleurales. La distribution des mutations V600E et non-V600E était comparable dans la population étudiée. La survie globale à 12 mois était similaire pour les patients ayant une mutation V600E et pour ceux porteurs d'autres mutations BRAF (60,5% vs 56,7%). La deuxième étude a inclus 114 patients qui présentaient un adénocarcinome broncho-pulmonaire métastatique diagnostiqué au CHRU de Nancy, entre 2012 et 2014, avec pour objectif l'évaluation de l'impact des altérations moléculaires tumorales sur la survie à 5 ans. La répartition des addictions oncogéniques dans notre population, comparable à celle obtenue sur le plan national, était la suivante: KRAS (27,2 %), EGFR (13,2 %), BRAF (4,4 %) et enfin ALK (1,8 %). Le pronostic de l'adénocarcinome broncho-pulmonaire métastatique restait sombre avec une survie à 5 ans < 1 %. Le seul facteur pronostique positif identifié dans notre population était le Performance Status < 2. Il existait des différences significatives en faveur des patients mutés EGFR, comparativement aux non-mutés, en termes de survie globale (hasard ration HR = 0,5 ; IC 95% [0,3-0,98] ; p = 0,043) et de survie sans progression après une première ligne thérapeutique (HR = 0,3 ; IC 95% [0,1-0,6] ; p = 0,002) grâce à l'existence des thérapies ciblées, efficaces dans cette indication. Il n'existait pas de différences en termes de survie globale et sans progression pour les autres mutations répertoriées (KRAS, BRAF et ALK). Sous ma coordination, le Dr. A. Brindel a rédigé et publié un case-report d'un adénocarcinome bronchique avec une mutation ROS1 découvert dans un contexte de toux sèche avec aspect radiologique de miliaire pulmonaire (*cf. Liste des Publications Nationales No 11*). J'ai publié une revue de la littérature sur les mutations ALK (*cf. Liste des Publications Nationales No 14*) et participé à des travaux de recherche sur les mutations ALK, EGFR et KRAS (*cf. Liste des Publications Internationales No 8, 33 et Liste des Communications No 60, 61*).

Toujours en lien avec les mécanismes moléculaires impliqués dans la pathologie tumorale, je me suis intéressée à la pathogenèse des syndromes paranéoplasiques. Sous ma coordination, le Dr. A. Villemain a présenté son mémoire de DES en Pneumologie (2014) sur le cas d'un patient présentant des hypoglycémies symptomatiques récidivantes en faisant la découverte d'une tumeur fibreuse de la plèvre avec la documentation du mécanisme moléculaire impliqué dans ce syndrome paranéoplasique - la sécrétion par les cellules tumorales d'un Insulin-like Growth Factor décrit comme « big »-IGF2. La résection tumorale a permis la résolution du syndrome paranéoplasique. Ce travail a été publié dans un journal de pneumologie français en 2017 (*cf. Liste des Publications Nationales No 9*).

Concernant la 2^{ème} thématique d'intérêt dans l'Oncologie thoracique « **Efficacité et tolérance des divers schémas thérapeutiques** », j'ai encadré plusieurs travaux de recherche clinique réalisés par des internes et assistants chefs de cliniques. Sous ma coordination, le Dr. D. Huet a réalisé une étude comparative portant sur l'efficacité et la tolérance de deux schémas de radio-chimiothérapie concomitante (l'un, utilisant un protocole de chimiothérapie à base de Cisplatine-Navelbine et l'autre, de Carboplatine-Taxol) chez les patients ayant un carcinome

bronchique non à petites cellules inopérables (thèse d'exercice soutenue en 2015). Ces deux schémas thérapeutiques se sont avérés comparables en termes d'efficacité mais la tolérance clinique sur le plan hématologique était meilleure pour les patients traités par Carboplatine-Taxol. Un autre travail réalisé par le Dr. H. Carette en 2017 étudiait l'intérêt de la radiothérapie sur le trajet du drain thoracique dans les mésothéliomes pleuraux malins. Les résultats démontraient que la réalisation de ce dernier empêcherait la progression de la maladie sur les trajets de drainage. Ce travail a fait l'objet de communications lors des congrès français de Pneumologie et Radiothérapie et d'une publication (*cf. Liste des Publications Nationales No 10 et Communications No 57*). Le Dr. B. Caput, assistant chef de clinique en Chirurgie Thoracique, a réalisé sous ma coordination son mémoire de DIU d'Oncologie Thoracique, en 2018, ayant comme sujet la survie globale et la survie sans récurrence des patients opérés d'un cancer bronchique à petites cellules (CBPC). Conformément aux recommandations internationales, le traitement standard d'un CBPC localisé au thorax est basé sur un protocole de radiochimiothérapie concomitante avec sels de platine-Etoposide. Cependant, il existe parfois des nodules pulmonaires évolutifs sur le plan de l'imagerie qui sont opérés et sur la pièce opératoire, le diagnostic de CBPC est posé. Le Dr. Caput a réalisé une étude rétrospective incluant les patients opérés entre 1991 et 2018 au CHRU de Nancy, ayant un CBPC sur la pièce opératoire, pour établir les facteurs pronostiques de récurrence et l'impact sur la survie globale. Selon les résultats de son étude, les patients ayant subi une pneumonectomie présentaient un risque plus important de récurrence, comparativement à ceux n'ayant eu qu'une lobectomie et une survie globale significativement plus courte. Ce travail est en cours de finalisation et une soumission de l'article en version anglaise est envisagée prochainement.

Dans la thématique de **soins de support** en Oncologie thoracique, en dehors de mes travaux sur l'anémie chimio-induite, j'ai coordonné des travaux de recherche clinique dans le cadre de thèses d'exercices. Un premier travail a été réalisé par le Dr. A. Villemain portant sur l'identification des facteurs pronostiques à l'apparition des événements osseux chez les patients ayant un cancer bronchique métastatique au niveau osseux. Nous avons identifié les taux sériques élevés de phosphatase alcaline et calcium comme facteurs pronostiques d'apparition d'événements osseux (ex. fractures, douleurs) ainsi que la présence des métastases osseuses périphériques. Ces travaux ont fait l'objet de communications lors du CPLF (2016) et d'une publication en français (2020) (*cf. Liste des Communications No 49 et Publications Nationales No 15*). Un autre travail de thèse (Dr. A. Knoepfli) s'intéressait aux particularités de prise en charge des patients âgés ayant un cancer bronchique. Selon les résultats de notre étude, le délai pour la mise en place d'un traitement chez les patients ayant >70 ans était statistiquement plus long que pour les patients ayant ≤60 ans, en partie lié à la présence des comorbidités et un bilan préopératoire plus complexe. Les résultats de cette étude ont été présentés lors du CPLF en 2017 et publiés dans un journal français en 2019 (*cf. Liste des Communications No 56 et Publications Nationales No 12*).

En dehors de mes travaux personnels de recherche, j'ai été l'investigatrice principale au CHRU de Nancy pour des essais cliniques ou PHRC en Oncologie thoracique : CALLISTO, FLAURA, GO29537, IFCT-1003 LADIE, STALKLUNG, RTEP5, NéoSAS, ACSé Vemurafénib testant, en général, de nouveaux schémas thérapeutiques dans ce domaine ou l'intérêt des techniques non-invasives de diagnostic comme la biopsie liquide (plus de détails concernant ces études sont disponibles dans l'ANNEXE). Mon implication dans ces études a été récompensée par l'association de mon nom dans la liste d'auteurs des articles issus de ces travaux (ex. STALKLUNG) (*cf. Liste des Publications Internationales No 33*).

Par ailleurs, j'ai participé à la rédaction des référentiels régionaux en Oncologie thoracique pour la région Lorraine (ONCOLOR 2015), région Auvergne-Rhône-Alpes (AURA

2017, 2018) et à la rédaction d'un review de la littérature, sur le lien entre le sévrage tabagique et le dépistage du cancer bronchique, publié en 2020 (cf. *Liste des Publications Nationales No 16*).

Même si mes activités principales de recherche clinique sont focalisées sur l'asthme et l'oncologie thoracique, je suis tout autant intéressée par les études concernant la tuberculose, la sarcoïdose et d'autres maladies immunologiques (ex. maladie de Behçet, fibrose médiastinale, polyarthrite rhumatoïde). J'ai participé à deux travaux de recherche dans la tuberculose multi-résistante et la sarcoïdose, finalisés par des publications (cf. *Liste des Publications Internationales No 5, 23*) et je travaille actuellement à un projet proposé par le Pr. D. Loeuille, service de Rhumatologie du CHRU de Nancy s'intéressant à la prévalence et la sévérité de l'atteinte respiratoire chez les patients ayant une polyarthrite rhumatoïde. J'ai encadré des travaux de mémoire en Pneumologie portant sur la découverte d'un anévrisme de l'artère pulmonaire dans le cadre d'une maladie de Behçet dans un contexte d'hémoptysie récidivante (soutenus en 2018 par le Dr. H. Beringuer) et sur une triple sténose vasculaire (veine cave supérieure, veine pulmonaire supérieure droite, artère pulmonaire droite) induite par une fibrose médiastinale sans retentissement cardiaque (soutenu en 2018 par le Dr. L. Peretti). Les deux ont été publiés dans des journaux anglais (cf. *Liste des Publications Internationales No 11, 14*). Une autre interne en Pneumologie (Mme L. Roussel), sous ma coordination, a publié un case-report portant sur l'apparition d'une tuberculose pleurale chez un patient ayant un adénocarcinome bronchique métastatique traité par immunothérapie par Pembrolizumab (cf. *Liste des Publications Internationales No 37*).

Mes activités de recherche clinique témoignent de la grande curiosité scientifique qui me caractérise et de mon envie d'aller toujours plus loin dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la pathogénèse des maladies respiratoires afin d'appliquer mieux la médecine translationnelle dans la pratique courante et d'élargir la pratique de la médecine personnalisée en Pneumologie.

1.2. RECHERCHE FONDAMENTALE

1.2.1. PATHOGENESE DE LA TOUX DANS L'ASTHME (EQUIPE EA3450 DEVAH DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE)

Mes activités de recherche expérimentale locale s'effectuent au sein de l'équipe EA3450 DevAH : « *Développement, Adaptation et Handicap* » actuellement dirigée par le Pr. Ph. PERRIN (Service d'ORL, Hôpital d'Enfant, CHRU de Nancy) et se trouve rattachée à l'Ecole Doctorale Biologie, Santé et son Environnement - Université de Lorraine

L'EA3450 DevAH regroupe des enseignants-chercheurs impliqués dans la recherche médicale, menant une démarche centrée sur la physiologie intégrative et la physiopathologie au cours du développement, de la naissance jusqu'à l'âge adulte.

Elle repose sur une forte interconnexion entre :

- des structures universitaires (Laboratoire de Physiologie de la Faculté de Médecine, UFR STAPS),
- des services hospitaliers : LAPEM – Laboratoire d'Analyse de la Posture, de l'Equilibration et de la Motricité, Laboratoire d'Exploration de la Motricité à l'Institut Régional de Réadaptation, deux services d'Explorations Fonctionnelles Adultes (EFR et Aptitude à l'Exercice – Médecine du Sport) et Pédiatriques, Maternité Régionale Universitaire du CHRU de Nancy,
- l'Institut National de Recherche et de Sécurité – INRS.

L'équipe est localisée administrativement à la Faculté de Médecine.

L'activité de recherche y est organisée en trois thèmes :

- 1) Environnement et adaptations, visant à étudier l'impact des conditions environnementales sur le développement de la toux ou de l'asthme, mouvement induisant le mal des transports ;
- 2) Exercice, performance et entraînement : étude des déterminants de la performance musculaire des blessures et interactions entre exercice et pathologies ;
- 3) Incapacité et mécanismes de compensation : adaptation à une vulnérabilité particulière ou consécutive à une atteinte sensorielle ou du système nerveux central.

Je travaille dans cette équipe depuis 2013, date qui correspond au début de ma thèse en qualité de doctorante et suis actuellement chercheur-attaché, depuis janvier 2017. Les chercheurs de l'Unité sont : le Pr. C. Schweitzer (responsable de l'unité, PU-PH de Physiologie à l'Université de Lorraine, Service de Pédiatrie, Hôpital d'Enfants), le Pr. B. Chenuel (PU-PH de Physiologie à l'Université de Lorraine, Service d'EFR, CHRU Brabois Adultes), le Pr. M. Pousset (PU-PH en Physiologie, Service d'EFR, CHRU Brabois Adultes), le Dr. S. Demoulin-Alexikova (MCU-PH en Physiologie, Service d'Explorations Fonctionnelles Pédiatriques, Hôpital d'Enfants), le Dr. I. Ioan (PH, Service d'Explorations Fonctionnelles Pédiatriques, Hôpital d'Enfants), M. B. Demoulin (ingénieur et chercheur associé) et M. L. Foucaud (MCU en Physiologie à l'Université de Lorraine).

La thématique principale de recherche est centrée sur l'étude des mécanismes physiologiques des systèmes de régulation circulatoire, respiratoire et locomotrice, en se basant sur l'expérimentation animale.

A mon arrivée au sein de l'EA 3450 DevAH, en 2013, comme PhD student, je me suis greffée sur la thématique principale de ce laboratoire portant sur l'étude des réflexes de défense respiratoire (réflexe de toux et réflexe expiratoire) chez le modèle animal original (lapin) (9). La prévalence de la toux chronique, qui peut aller jusqu'à 33% dans la population générale, est significativement plus élevée chez les patients asthmatiques que chez les non-asthmatiques (12,9% vs 5,6% dans l'étude E3N) et présente lors des efforts physiques dans 12% des cas dans la population générale, respectivement 40% des cas des patients ayant un asthme (10,11). Il s'agit d'un réflexe de défense respiratoire caractérisé par une phase inspiratoire suivie d'un effort expiratoire à glotte fermée et une phase expulsive avec ouverture de la glotte. La différence majeure entre la toux et le réflexe expiratoire est que, dans le premier cas, il existe une augmentation concomitante du volume courant et du débit ventilé alors que dans la 2^{ème} situation, il existe une augmentation du débit ventilé non précédée d'une augmentation du volume courant (**Figure 1**) (11).

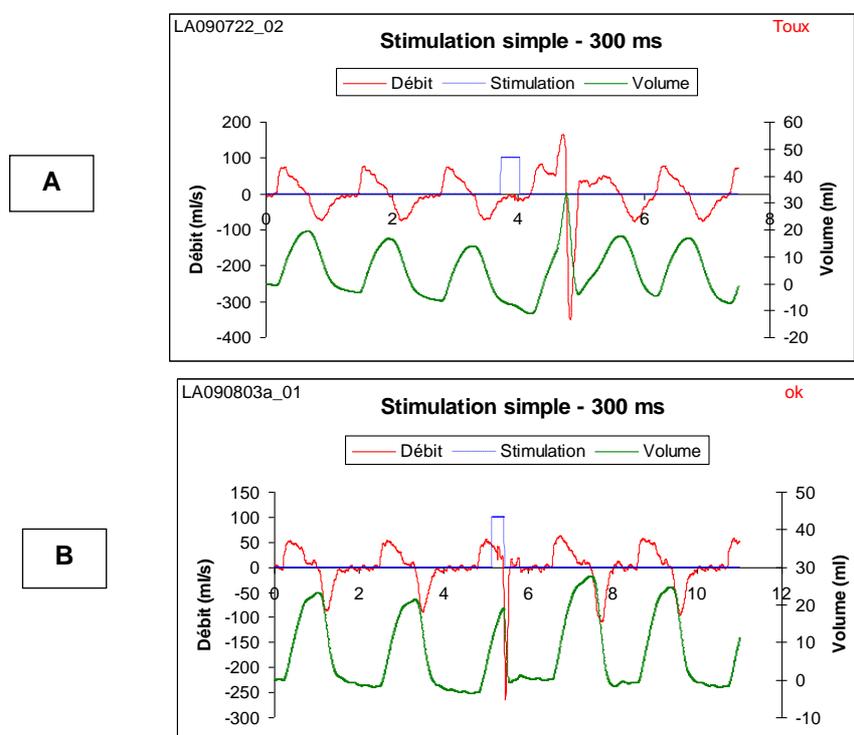


Figure 1 : Réponses ventilatoires à une stimulation trachéale mécanique d'une durée de 300 ms (images personnelles)

A : Réflexe de toux (RT) caractérisé par une augmentation concomitante du volume courant et du débit ventilé.

B : Réflexe expiratoire (RE) caractérisé par une augmentation du débit ventilé, non précédée d'une augmentation du volume courant.

Les Dr. S. Demoulin-Alexikova et M. B. Demoulin ont développé une technique d'étude de la toux par stimulation mécanique trachéale discriminante au sein du cycle respiratoire après trachéotomie sur le modèle de lapin. La fabrication d'un moteur rotatif autorisait une stimulation trachéale mécanique de l'animal *via* un cathéter, et ce, pour de très brèves durées (allant de 50 msec à 1000 msec). De cette manière, on a démontré que la nature de la réponse défensive ventilatoire à une stimulation trachéale mécanique était différente selon le moment du cycle

ventilatoire où cette stimulation intervenait. Si la stimulation trachéale survenait au temps inspiratoire, on provoquait majoritairement un réflexe de toux alors que, si la stimulation était délivrée au temps expiratoire, on obtenait majoritairement un réflexe expiratoire (12). Sur ce modèle fiable et pertinent, plusieurs expérimentations ont été réalisées afin d'étudier la modulation du réflexe de toux par différents stimuli (ex. hyperoxie, solution saline, eau distillée) (13). Grâce à ces résultats, des progrès notables ont été obtenus dans la compréhension de la pathogenèse de la toux comme, par exemple, le fait que l'hyperoxie soit associée à une augmentation du réflexe de la toux probablement par des mécanismes d'origine centrale sans hyperréactivité bronchique associée et que l'instillation nasale de produits avec une composition chimique différente entraîne des effets variables sur la toux (ex. l'eau amène une désensibilisation du réflexe de toux par rapport à la solution saline).

Le Pr. M. Poussel a conçu et validé un modèle expérimental animal (toujours sur le lapin) d'exercice (14). Cela a été possible grâce à un protocole d'électrostimulation musculaire autorisant la simulation d'un effort musculaire chez le lapin et se caractérisant principalement par une accélération de la fréquence cardiaque et une augmentation de la ventilation. Le protocole ainsi élaboré a permis des séquences d'exercice pour des durées de 3 à 4 min, avec une augmentation de ventilation d'environ 50% par rapport à la ventilation de repos. Lors de l'exercice, une bronchodilatation a été observée (mesurée par la technique des oscillations forcées). L'association de ce nouveau modèle d'exercice avec celui précédemment développé (ex. stimulation trachéale mécanique discriminante au sein du cycle respiratoire), nous a permis d'étudier l'influence de l'exercice sur les réflexes de défense respiratoire. Le principal résultat de cette expérimentation a permis de retrouver une désensibilisation du réflexe de toux à l'exercice (vs repos) puisque nous avons pu démontrer que le seuil du réflexe de toux (ainsi que celui du réflexe expiratoire), était augmenté à l'exercice. Ce travail a révélé les interactions entre l'exercice et les réflexes de défense respiratoire en faveur d'une priorisation des réponses. En effet, il semblerait qu'à l'exercice, la priorité soit l'augmentation de la ventilation (nécessaire à l'augmentation des besoins métaboliques liés à l'exercice), alors que le réflexe de toux passe au second plan (ex. désensibilisation). L'hypothèse d'interactions au niveau central semble très probable car les mécanismes impliqués ne sont pas pour l'instant identifiés. Cette expérimentation a également fait l'objet de communications et d'une publication (*cf Liste des Publications Internationales No 3*).

C'est à ce moment que mon travail de thèse a commencé sous la direction du Pr. B. Chenuel et la co-direction du Pr. M. Poussel. Afin de poursuivre sur cette thématique de recherche, en raison de mon profil de pneumo-allergologue, mon objectif était d'étudier l'impact de l'exercice sur le réflexe de toux chez un animal sensibilisé à l'ovalbumine, en le comparant au comportement du lapin contrôle déjà décrit, afin d'établir l'influence de l'inflammation des voies aériennes à éosinophiles sur ces réflexes. La première étape consistait dans la mise en place d'un protocole de sensibilisation du lapin à l'ovalbumine. Nous avons créé un protocole de sensibilisation par des injections intrapéritonéales de 0,1 mg ovalbumine en solution dans 1 ml du NaCl 0,9% à J1 et J14, complété par des aérosols d'ovalbumine (2,5 mg/ml ; 50 mg d'ovalbumine dissolus dans 20 ml du NaCl 0,9%) à J26-28 avec l'expérimentation à J28. Un protocole similaire a été conçu pour les lapins contrôles en utilisant du NaCl 0,9%. La présence de la sensibilisation a été démontrée par des tests intradermiques (injection sc 100 µl de solution d'ovalbumine 200 µg/mL ou NaCl 0,9% sur la région dorsale de l'animal préalablement rasée avec lecture à 1 heure de deux diamètres perpendiculaires et considérés comme positifs si doublement de l'induration au niveau du site d'injection) et la présence d'une éosinophilie $\geq 3\%$ dans le liquide du lavage broncho-alvéolaire. J'ai mis au point la technique de lavage broncho-alvéolaire (3 injections de 5 mL de solution HEPES avec aspiration douce après chaque injection) et validé ce modèle d'animal sensibilisé à l'ovalbumine par la mise en évidence d'une inflammation à prédominance

éosinophile à la lecture des lames contenant les cellules issues du lavage (après centrifugation et coloration spécifique) en microscopie optique (**Figure 2**) et les intradermo-réactions positives.

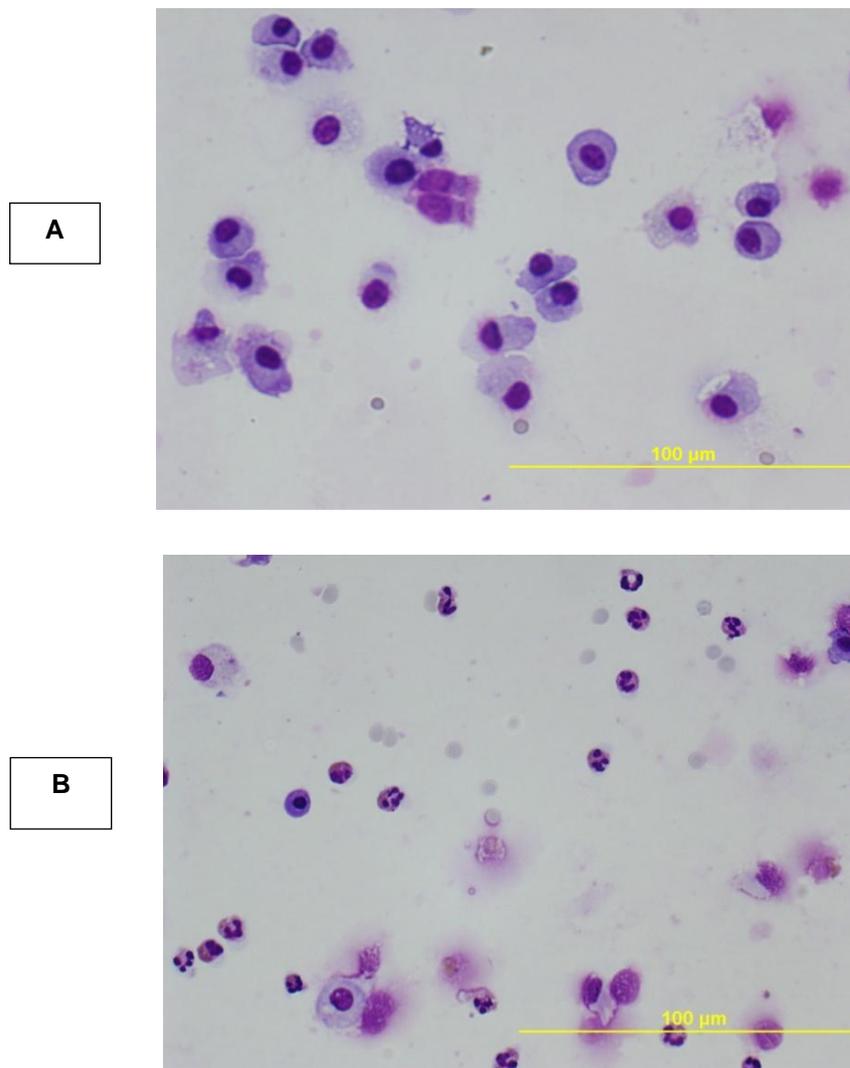


Figure 2 : Cytologie du lavage bronchiolo-alvéolaire en coloration May-Grünwald-Giemsa (Microscope Olympus, objectif 40) : **A).** pour un lapin contrôle ; **B).** pour un lapin sensibilisé à l'ovalbumine (images personnelles)

Quatre cent quatre-vingt quatorze stimulations trachéales ont été réalisées sur 18 lapins (10 sensibilisés à l'ovalbumine, 8 contrôles). Il n'y a pas eu de différences significatives entre les deux groupes par rapport à l'évolution des variables respiratoires au repos et à l'effort, avec augmentation similaire de la ventilation minute et diminution de la résistance des voies aériennes pour les lapins sensibilisés à l'ovalbumine, comparativement aux lapins contrôles, témoignant ainsi d'une bronchodilatation-induite par l'exercice. L'incidence des événements respiratoires au repos après stimulation trachéale a été comparable pour les deux groupes avec une incidence supérieure à 60% pour le réflexe de toux, inférieure à 10% pour le réflexe expiratoire, et entre 20 et 30% pour l'absence de réponse. A l'exercice, on notait une diminution de l'incidence du réflexe de toux (valeurs entre 45 et 60%), une augmentation de l'incidence du réflexe expiratoire (entre 10 et 17%) et une augmentation de l'incidence de l'absence de réponse (entre 30 et 36%) sans

différences significatives entre les groupes. Pendant l'exercice, dans le groupe des lapins sensibilisés à l'ovalbumine, le seuil de toux était comparable à celui de repos (190 vs 230 ms) quand, dans le groupe contrôle, il y avait une augmentation significative de celui-ci (125 vs 62 ms, $p = 0.031$). Ces résultats nous ont permis de conclure à l'absence de désensibilisation du réflexe de toux à l'exercice chez le lapin sensibilisé à l'ovalbumine vs. lapin non sensibilisé. Ce résultat tend à prouver que l'inflammation à éosinophiles semble être capable d'inhiber la désensibilisation de certains réflexes de défense respiratoire à l'effort, comme cela semble aussi être le cas chez le patient asthmatique. Ce travail a fait l'objet d'un prix lors du Congrès de la Fédération Européenne de Physiologie (2016) et d'une publication dans le journal *PlosOne* (2017) (cf *Liste des Publications Internationales No 6*).

Suite à mon travail, qui a permis la validation du lapin sensibilisé à l'ovalbumine comme modèle d'inflammation bronchique à éosinophiles (comme retrouvée fréquemment dans la maladie asthmatique), un interne de Pneumologie, M. S. Valentin, a réalisé son Master 2 sur l'influence des corticoïdes administrés par voie systémique sur le réflexe de toux, et une autre interne, Mlle S. Basin, travaille actuellement sur l'influence de la corticothérapie par voie inhalée sur la modulation du réflexe de toux au repos et à l'effort sur le même modèle. Je me suis impliquée de manière active dans l'encadrement de ce dernier travail de Master 2, puisqu'en raison de mon année de mobilité à Imperial College London, je n'avais pas eu l'occasion de participer au premier. L'analyse des résultats est en cours.

D'autres travaux de recherche se poursuivent dans notre équipe auxquels je participe aussi souvent que me le permet mon travail de clinicien impliqué dans la gestion de la pandémie COVID-19.

1.2.2. MECANISMES IMPLIQUES DANS LA PATHOGENESE DE L'ASTHME SEVERE (EQUIPE « AIRWAY DISEASE » IMPERIAL COLLEGE LONDON)

Depuis plusieurs années, je rêvais de faire ma mobilité dans l'Unité « Airway disease » à Imperial College London, un des plus grands laboratoires de recherche dans l'asthme sévère. Le Pr. K.F. Chung (mon superviseur) est reconnu mondialement comme l'un des plus grands experts dans ce domaine ainsi que dans celui de la « Toux chronique ». C'est pourquoi, peu après la soutenance de ma thèse, j'avais contacté le Pr. K.F. Chung pour lui demander si je pouvais envisager de faire mon post-doctorat dans son équipe. Il avait aussitôt accepté, au début de l'année 2017, mais il m'a fallu encore un an et demi pour que je réussisse à organiser mon départ et mon séjour à Londres avec ma famille. J'y suis arrivée le 01/11/2018. J'ai alors été informée que mon travail de recherche serait dédié à l'asthme sévère et non à la toux. Au décours de cette année de mobilité, j'ai travaillé sur plusieurs projets.

Le premier sujet proposé par le Pr. I.M. Adcock (mon co-superviseur, l'adjoint de Pr. Chung) portait sur l'étude **du rôle des macrophages dans l'asthme sévère** sur les données de transcriptome provenant des prélèvements sanguins, des brossages nasaux et bronchiques, des biopsies bronchiques et des expectorations des patients inclus dans la cohorte européenne UBIO-PRED (Unbiased BIOMarkers in PREDiction of respiratory disease outcomes). Les macrophages pulmonaires jouent un rôle dans l'immunité innée et acquise, l'homéostasie tissulaire, l'angiogenèse et le métabolisme (15). Leurs caractéristiques principales sont la diversité et la plasticité. Deux populations différentes de macrophages coexistent au niveau pulmonaire : les macrophages résidentes tissulaires jouant un rôle primordial dans l'embryogenèse, la prolifération tissulaire et les fonctions plus importantes dans le métabolisme des acides gras et le cycle KREBS, respectivement les macrophages provenant des monocytes sanguines plus impliqués

dans la régulation des procès inflammatoires, la glycolyse et le métabolisme de l'arginine (16). Différentes cytokines agissent sur les macrophages induisant leur polarisation, soit M1 activés par voie classique par IFN γ , LPS, GM-CSF ou TNF α , avec, plus particulièrement, des propriétés pro-inflammatoires et associés à des réponses Th1, soit M2 activés par voie alternative par IL-4, -10, -13, des corticoïdes ou des ligands pour les Toll-like récepteurs, avec des propriétés anti-inflammatoires et associés à des réponses Th2 (15,17). Le rôle des macrophages dans la pathogénèse de l'asthme est méconnu. Certaines études ont suggéré une association entre les macrophages M1 et le remodelage bronchique, d'autres, l'implication des macrophages M2 dans le phénotype T2 de l'asthme (15,18). L'implication des macrophages tissulaires dans la pathogénèse de l'asthme n'a jamais été étudiée auparavant.

Après une courte formation sur la méthode utilisée en pratique pour l'analyse GSVA (gene set variation analysis) et le programme R, afin que je puisse faire les analyses moi-même, j'ai commencé à préparer mon projet. J'ai trouvé dans la littérature 49 listes de gènes pour analyser les différentes voies d'activation des macrophages alvéolaires selon les divers stimuli administrés (ex. IFN γ , IL-4, -10, -13, LPS, TNF α , acides gras, lipoprotéine de haute densité, Pg E2, corticoïdes ou l'association des stimuli) (19), 2 listes de gènes pour étudier leur polarisation (M1-macrophage activé par voie classique et M2-macrophage activé par voie alternative) (20) ainsi qu'une liste de gènes pour voir si les macrophages tissulaires pouvaient avoir un rôle dans l'asthme (21). Ces listes ont été insérées dans le logiciel R afin de pouvoir réaliser l'analyse GSVA. La méthode GSVA permet de calculer un score d'enrichissement entre -1 et 1 selon la présence ou non des gènes étudiés dans les données de transcriptome des patients. Les analyses étaient faites de manière systématique dans les 5 compartiments (sang, brossage nasal et bronchique, biopsie bronchique, expectoration) chez 104 patients asthmatiques (84 patients ayant un asthme sévère, 20 patients ayant un asthme modéré) en les comparant à un groupe contrôle incluant 16 sujets par la méthode ANOVA. Afin d'étudier l'implication des macrophages dans l'obstruction bronchique, nous avons étudié les mêmes listes dans deux groupes de patients asthmatiques ayant ou pas une obstruction bronchique définie par un VEMS<75% de la valeur prédite et un rapport VEMS/CVF<0,7. De manière similaire, afin de déterminer la contribution des macrophages dans la pathogénèse de différents phénotypes inflammatoires de l'asthme, nous avons analysé toutes les listes des gènes dans les trois clusters (TACs) identifiés précédemment dans les données du transcriptome des expectorations dans la cohorte UBIOPRED (22) : TAC1 associé à l'inflammation Th2, éosinophilie dans l'expectoration, asthme plus sévère, prévalence élevée de la dépendance à la corticothérapie systémique, exacerbations fréquentes et obstruction plus importante des voies aériennes ; TAC2 associé à la présence des neutrophiles dans l'expectoration, élévation du taux sérique de la protéine C réactive, avec des mécanismes impliquant l'IFN γ , TNF α et l'inflammasome et TAC3 associé à une inflammation paucigranulocytaire des voies d'activation impliquées dans le métabolisme et une fonction respiratoire préservée. Les résultats les plus probants, avec une significativité statistique, étaient retrouvés dans l'expectoration, raison pour laquelle nous avons choisi de travailler sur celle-ci par la suite.

Nous avons démontré que dans l'expectoration des patients ayant un asthme sévère, il y avait un déficit en macrophages (en numéro absolu et %) et que leur activation était moindre comparativement aux patients ayant un asthme modéré et le groupe contrôle. Par contre, certaines voies d'activation impliquées dans l'inflammation de l'asthme étaient surexprimées (ex. production de leucotriènes, activation du NF- κ B *via* Toll-like et TNF α récepteurs). De plus, l'asthme neutrophilique était davantage associé à une polarisation M1 quand l'asthme éosinophilique et paucigranulocytaire l'était à une polarisation M2 des macrophages. Les macrophages tissulaires étaient plus impliqués dans l'homéostasie et le métabolisme et surexprimés dans l'asthme paucigranulocytaire comparativement aux autres phénotypes inflammatoires. Grâce à ce travail de

recherche, nous pouvons ajouter aux mécanismes impliqués dans la pathogénèse des TAC1 et TAC2 l'activation des Toll-like récepteurs et IL-1R, respectivement la production de leucotriènes *via* le métabolisme de l'acide arachidonique au TAC1. Ce travail a fait l'objet d'un poster au Congrès ERS (2019) et une publication dans le journal *Allergy* (IF 8,706) (*cf Liste des Publications Internationales No 26*).

Mon 2^{ème} projet (proposé par le Pr. K.F. Chung) avait comme objectif l'étude **du rôle des mastocytes dans l'asthme sévère** dans la même cohorte UBIOPRED. Les mastocytes représentent une population hétérogène des cellules retrouvées en abondance dans les différents compartiments pulmonaires (ex. épithélium, muscle lisse, glandes, alvéoles), notamment dans la proximité des vaisseaux sanguins et terminaisons nerveuses qui jouent des rôles importants dans l'immunité innée et adaptative (23–27). Les mastocytes humains sont caractérisés selon leur contenu en protéases et trois sous-types sont décrits : les mastocytes exprimant surtout la tryptase sont plutôt localisés dans les bronchi, bronchioles et le parenchyme pulmonaire, les mastocytes exprimant la tryptase et la chymase sont retrouvés principalement dans la plèvre et les vaisseaux pulmonaires, et les mastocytes exprimant la tryptase et la carboxypeptidase A3 (CPA3) sont plus souvent associés au phénotype d'asthme éosinophilique, l'hyperréactivité bronchique et une bonne réponse à la corticothérapie (28,29).

Les mastocytes expriment une myriade de récepteurs qui peuvent être activés par une multitude de stimuli comme les allergènes et les IgE (*via* le récepteur FcεRI), les agents infectieux (*via* les Toll-like récepteurs 1-7 et 9, nucléotide-binding oligomerization domain-like récepteurs NLR et Mas-related G protein-coupled récepteur X2 MRGPRX2), les facteurs physiques (ex. température, stress mécanique, lumière ultraviolette *via* les récepteurs TRP et adhésion G protein-coupled récepteur E2 ADGRE2) et les médiateurs/cytokines (TNFα, protéases, stem cell factor SCF, IL-33, thymic stromal lymphopoietin TSLP, IL-1β, IFNγ, IL-3, -4, -5, -10, TGFβ, PgE2, complément C3a et C5a etc. *via* les récepteurs spécifiques) (27,28,30–32).

Quelques minutes après leur stimulation, les mastocytes libèrent des médiateurs préformés et stockés dans des granules cytoplasmiques (ex. histamine, héparine, tryptase, chymase, carboxypeptidase A3, TNFα), lors du procès reconnu comme la dégranulation mastocytaire. Ces médiateurs jouent un rôle protecteur pour l'homéostasie tissulaire et luttent contre les agressions induites par différents pathogènes, mais les protéases sont reconnues principalement pour leurs propriétés pro-inflammatoires. Dans une 2^{ème} étape, les mastocytes libèrent des médiateurs néoformés issus principalement du métabolisme de l'acide arachidonique, des cytokines et chimiokines, qui peuvent activer d'autres cellules immunitaires dans l'environnement. Leur activation excessive joue un rôle crucial dans la pathogénèse de l'allergie et d'autres maladies inflammatoires (27). La **Figure 3** représente de manière simplifiée le procès d'activation de mastocytes faisant suite à la stimulation.

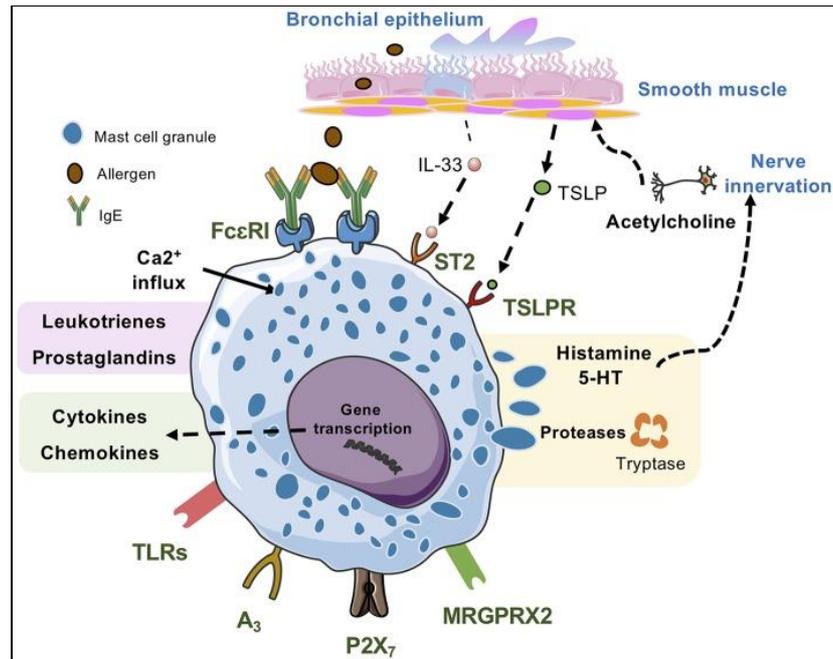


Figure 3 : Activation des mastocytes pulmonaires par différents stimuli avec la dégranulation mastocytaire dans quelques minutes et libération des protéases et histamine, suivi par la libération des métabolites de l'acide arachidonique, des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires dans quelques heures (D'après Méndez-Enriquez (23))

Des études réalisées précédemment sur le rôle des mastocytes dans l'asthme ont démontré leur présence en abondance dans les structures anatomiques des voies aériennes, (épithélium, glandes, muscle lisse) et des taux élevés des médiateurs spécifiques mastocytaires, (ex. histamine, tryptase), dans les expectorations et le liquide de lavage bronchiolo-alvéolaire suggérant leur implication dans plusieurs procès physiopathologiques impliqués dans l'asthme : l'obstruction bronchique par la production excessive de mucus et l'hyperréactivité bronchique, l'inflammation à éosinophiles des voies aériennes et le remodelage bronchique (23,32) (**Figure 4**).

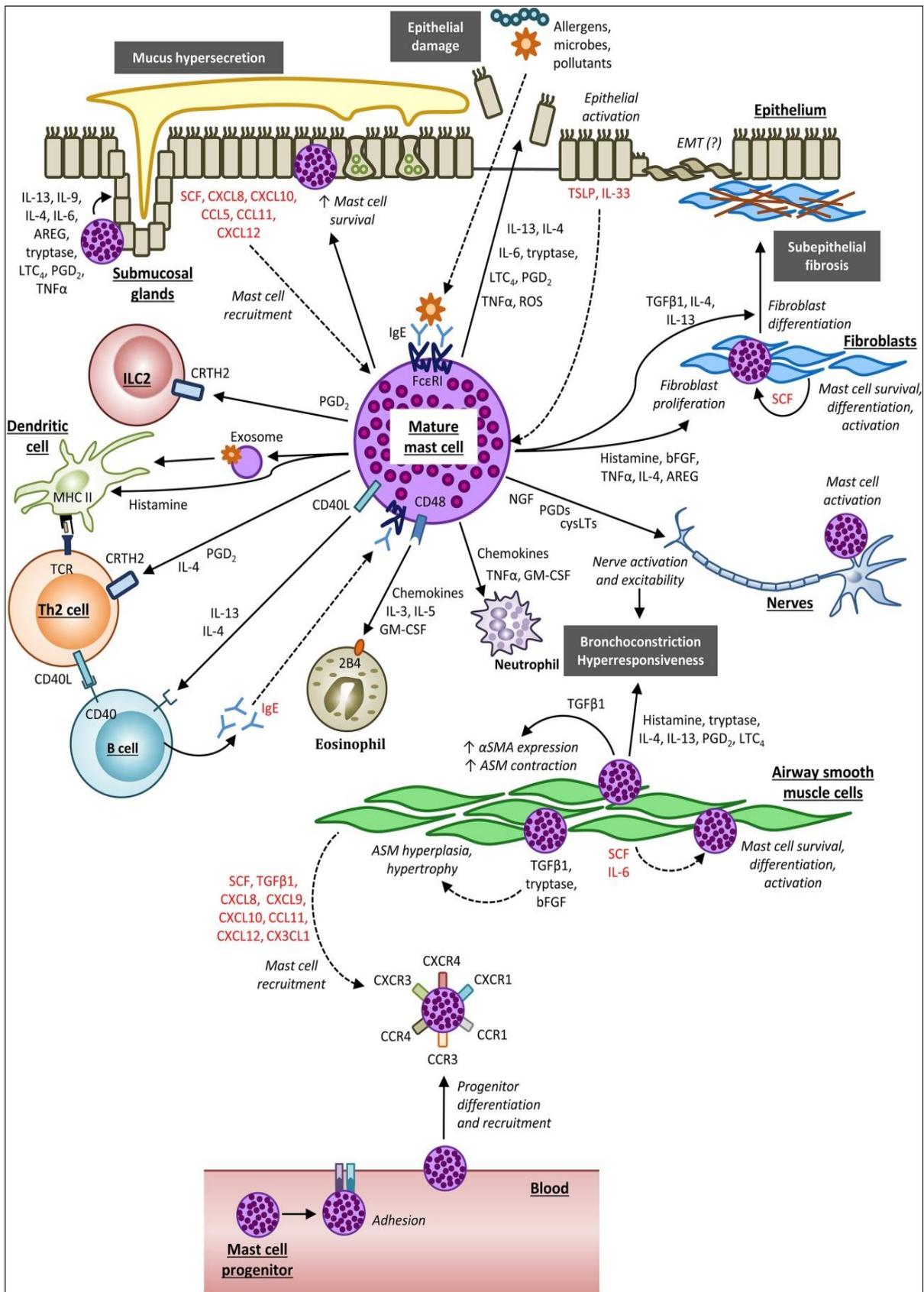


Figure 4 : Interactions des mastocytes avec les cellules structurales et immunes après leur stimulation et leur implication dans différents procès caractéristiques de la pathogenèse de l’asthme (D’après Virk (32))

Malgré les avancées dans ce domaine, le rôle des mastocytes dans l'asthme sévère n'est pas bien défini, raison pour laquelle nous avons réalisé cette étude dans la cohorte UBIOPRED.

Treize listes de gènes ont été analysées pour étudier les mastocytes selon leur état d'activation (inactive ou activée), la réponse aux différents stimuli (ex. stimulation par allergène, stimulation unique ou répétitive par IgE, stimulation par IgE avec agrégation au niveau du FcεRI, stimulation par IL-33, association IgE et IL-33, stimulation par LPS, IFNγ et l'association LPS et IFNγ), ainsi que les trois sous-types des mastocytes décrites selon l'expression des différents biomarqueurs spécifiques (ex. mastocytes exprimant surtout la tryptase, la tryptase et la chymase, la tryptase et la CPA3) (29,33–38). Après avoir analysé les données du transcriptome dans les 5 compartiments (sang, expectoration, brossage nasal et bronchique, biopsie bronchique), nous avons trouvé que les résultats les plus intéressants se rapportaient aux expectorations et nous avons poursuivi les analyses dans ce compartiment.

Nous avons retrouvé une activation très importante des mastocytes dans l'asthme sévère par la plupart des stimuli (à l'exception des mastocytes stimulés par l'IFNγ), comparativement au groupe contrôle et aux patients ayant un asthme modéré sans différence significative entre les deux derniers groupes. Les trois sous-types des mastocytes étaient significativement associés à l'asthme éosinophilique (TAC1) comme les mastocytes stimulés par l'allergène ou par l'administration de l'IgE une seule fois. Par contre, les mastocytes stimulés de manière répétitive par IgE ou stimulés par IL-33, LPS, IFNγ, association IgE et IL-33 ou LPS et IFNγ étaient associés à une inflammation neutrophilique (TAC2). Ces résultats démontrent bien l'implication des mastocytes non seulement dans le phénotype éosinophilique de l'asthme sévère mais également dans les phénotypes non-éosinophiliques. Pour toutes les signatures étudiées, il y avait un enrichissement chez les patients ayant une obstruction bronchique suggérant effectivement le rôle des mastocytes dans le remodelage bronchique.

En faisant des analyses de clustering pour les patients aux scores d'enrichissement élevés pour chaque signature comparativement à ceux ayant des scores bas, nous avons trouvé que les mastocytes activés par IgE étaient impliqués dans la pathogénèse de l'asthme, *via* la voie d'activation impliquant l'IL-18 et les récepteurs de la famille d'IL-1, et que les mastocytes stimulés une seule fois par l'IgE étaient associés aux voies de signalisation impliquant l'IL-4 et l'IL-13 ainsi que dans la différenciation des lymphocytes. Les autres signatures étaient associées à l'activation des neutrophiles, de la voie NF-κB reconnue pour son rôle dans la production des cytokines pro-inflammatoires et dans les mécanismes impliquant l'interféron de type I.

La voie impliquant l'IL-18 dans l'asthme est peu connue mais, selon les données existantes, semble associée à un asthme plus sévère avec obstruction bronchique importante car des taux élevés de cette interleukine ont été retrouvés au niveau sérique lors des exacerbations chez les patients hospitalisés et dans les biopsies bronchiques chez des patients décédés par l'asthme (39–41). L'IL-18 est une cytokine libérée par les macrophages et cellules épithéliales à la suite de leur activation par une agression cellulaire et, classiquement, est considérée comme un produit de l'inflammasome car elle est activée par la caspase-1. Par sa fixation sur les récepteurs de la famille d'IL-1, elle entraîne la production d'IFNγ par les cellules Th1. Cependant, la chymase libérée par les mastocytes peut aussi activer l'IL-18 et cette forme active d'IL-18 (différente de la précédente) semble plus impliquée dans la maturation et la dégranulation des mastocytes car elle entraîne la production d'IL-4 et IL-13, donc l'inflammation Th2-médiée dans l'asthme (40,41). Le développement des thérapies ciblant la voie IL-18 médiée dans l'asthme représentera une piste intéressante à explorer dans l'avenir (39).

Un autre résultat intéressant obtenu dans ce travail de recherche est l'implication de l'IL-33 dans la pathogénèse de l'asthme sévère mais surtout son association avec le phénotype

inflammatoire neutrophilique. En analysant par GSVA la signature des mastocytes stimulés par IL-33 dans la cohorte UBIOPRED, nous avons obtenu des scores d'enrichissement significativement plus élevés dans le groupe des patients ayant un asthme sévère comparativement aux groupes des sujets contrôles et aux patients ayant un asthme modéré, dans le phénotype neutrophilique ou mixte (avec des neutrophiles et éosinophiles), comparativement à celui paucigranulocytaire et chez les patients ayant une obstruction bronchique versus ceux qui ne l'ont pas.

L'IL-33 est une alarmine qui fait partie de la famille d'IL-1 libérée par les cellules épithéliales ou autres cellules stromales suite à des injuriers tissulaires ou exposition à des agents de l'environnement (ex. allergènes, microbes) (30,42). Elle joue une fonction double de cytokine et de facteur de transcription nucléaire (42,43). Par sa fixation sur les récepteurs ST2 (IL-1RL1) exprimés par les mastocytes, elle intervient dans la maturation, l'adhésion à la matrice extracellulaire ou cellules endothéliales, l'activation (production des cytokines IL-4, -5, -6, -8, -13, TNF α) et la dégranulation mastocytaire, impliquées dans la réaction inflammatoire et allergique (42,44) (**Figure 5**). Cependant, le complexe IL-33/ST2 nécessite la présence d'une protéine accessoire (IL-1 receptor accessory protein IL-1RAcP) pour la traduction du signal et l'activation du facteur NF- κ B et de la voie des MAPK (mitogen activated protein kinases) (23,42). Reconnue comme important inducteur pour la fabrication des leucotriènes et prostaglandines, l'IL-33 seule n'est pas capable de déclencher la dégranulation mastocytaire (27,30,42,44). L'IL-33 augmente la dégranulation mastocytaire induite par la fixation des allergènes et de l'IgE sur les récepteurs Fc ϵ RI (23,44–46). Une étude *in vitro* (47) a montré que le prétraitement par l'IL-33 des mastocytes entraîne non seulement la stimulation par IgE d'un nombre plus important des cellules qui commencent le procès de dégranulation et la production des différentes cytokines mais aussi l'amplitude de la réponse de chaque cellule. Au contraire, la stimulation prolongée (>72 heures) des mastocytes par l'IL-33 est associée à une baisse de la réponse (47). Ces résultats suggèrent que les mastocytes jouent un rôle très important dans la modulation de la réaction allergique.

Quelques études *in vivo* ont aussi démontré l'implication de la voie d'activation médiée par l'IL-33 dans la pathogénèse de l'asthme. Le polymorphisme des gènes de l'IL-33 et de son récepteur ST2 a été associé à la présence de maladies allergiques (ex. asthme, dermatite atopique et rhinite allergique) et à l'éosinophilie sanguine. Des taux élevés d'IL-33 ont été retrouvés dans le lavage bronchiolo-alvéolaire et les biopsies bronchiques des patients asthmatiques et sont corrélés en général avec la sévérité de l'asthme et une fonction respiratoire plus altérée (23,44). Des études chez la souris ont mis en évidence une amplification de la bronchoconstriction par l'activation des mastocytes par l'IL-33 et la production consécutive de sérotonine et IL-13 (23,30). Cette voie d'activation des mastocytes a été également proposée récemment comme mécanisme dans la pathogénèse de l'asthme induit par l'aspirine (48). Même si tous les mécanismes impliqués ne sont pas encore identifiés, ces données suggèrent que l'IL-33 occupe un rôle central dans la pathogénèse du phénotype T2 de l'asthme. Par contre, sa contribution dans la pathogénèse de l'asthme neutrophilique ou mixte n'est pas documentée pour le moment.

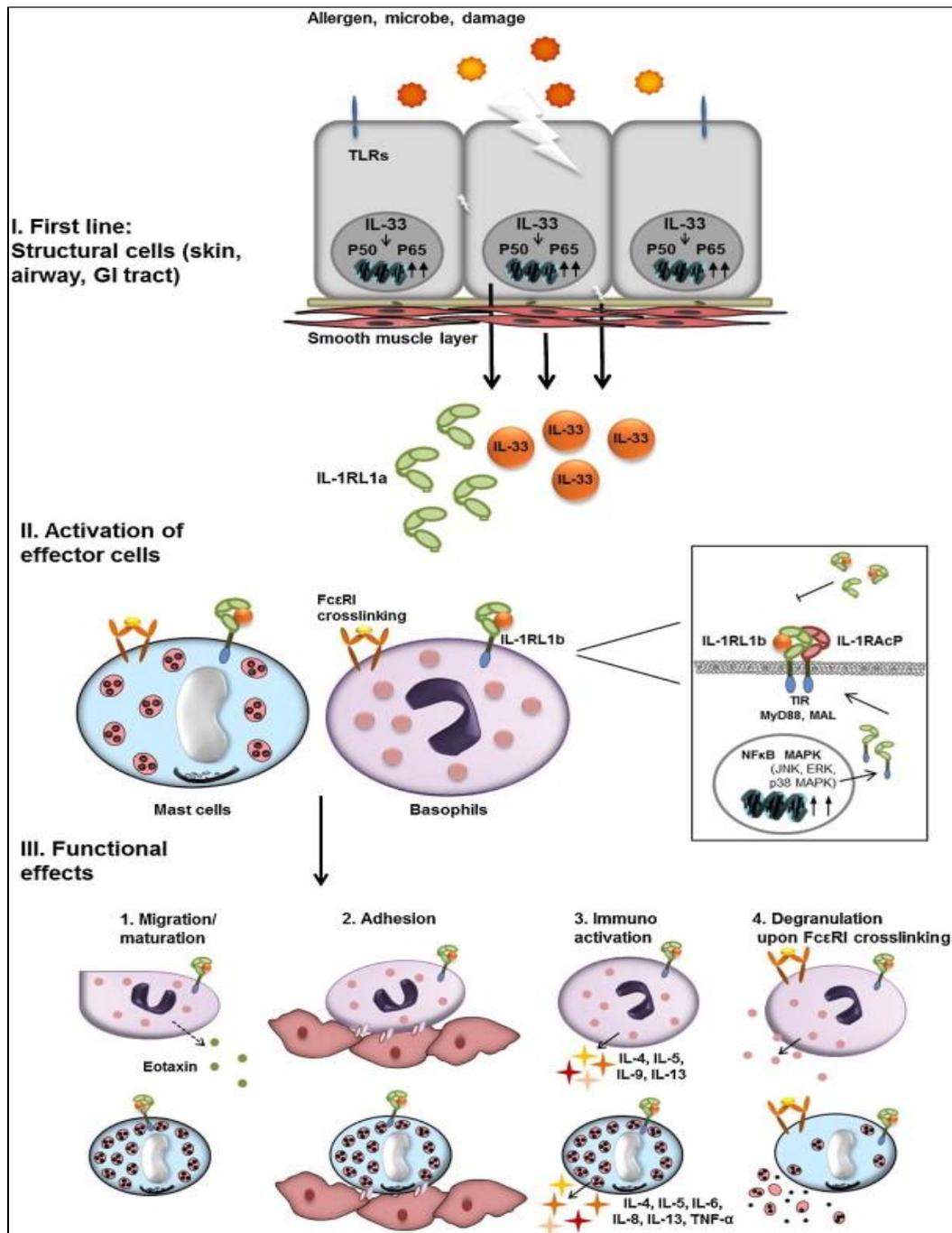


Figure 5 : Représentation schématique de la voie d'activation des mastocytes par l'IL-33 et l'influence sur leurs fonctions : maturation, adhésion, production des cytokines et dégranulation. L'agression tissulaire induite par l'exposition aux allergènes, microbes ou agents physico-chimiques entraîne la libération de l'IL-33 par les cellules épithéliales et les cellules musculaires. L'IL-33 peut se lier aux récepteurs solubles IL1-RL1a ou ceux exprimés par les cellules IL1-RL1b. L'activation des récepteurs IL1-RL1b nécessite la présence de la protéine accessoire IL-1RAcP et initie l'activation des voies dépendantes de la protéine MyD88 (ex. NF-κB, MAPK) impliquées dans la production des cytokines (D'après Saluja 2015 (42)).

Suite aux résultats de mon étude, un doctorant du Pr. K.F. Chung, M. Y. Badi a commencé un travail de recherche dans la cohorte UBIOPRED afin d'établir le rôle de la voie d'activation IL-33 médiée dans la pathogenèse des différents phénotypes de l'asthme. Dès le début, en 2019, j'ai participé à l'encadrement de ce travail, étant initialement sur place, puis avec des réunions à

distance. Ce travail est toujours en cours et doit être finalisé prochainement. Aux dernières nouvelles, M. Badi souhaiterait, dans la mesure du possible, soutenir sa thèse cette année.

Lors de mon travail sur les mastocytes, j'ai découvert que ces cellules peuvent aussi exprimer la protéine CLC (Charcot-Leyden Crystal protein), et non seulement les éosinophiles et les basophiles, comme on le croyait auparavant. Après avoir discuté avec le Pr. P. Bradding (University of Leicester, UK), expert mondial dans les mastocytes, cette découverte n'est pas étonnante mais elle nécessite une vérification sur le plan expérimental.

Les résultats de nos travaux dans la cohorte UBIOPRED démontrent la complexité et l'hétérogénéité des réponses des mastocytes aux divers stimuli ainsi que leur implication selon les différentes voies d'activation, non seulement dans la pathogénèse du phénotype T2 de l'asthme sévère, comme on le pensait auparavant, mais aussi dans les autres phénotypes non-T2.

Mon travail sur le rôle des mastocytes dans l'asthme sévère a fait l'objet d'un poster au Congrès ERS (2020) et SPLF (2021) (*cf. Liste des Communications No 63*). L'article a été soumis dans *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (IF 17,452). Il est, actuellement, en cours de modification selon les recommandations des reviewers.

Toujours dans le domaine de la compréhension des mécanismes impliqués dans la pathogénèse de l'asthme, notamment de l'asthme sévère, pendant mon année de recherche à Londres, j'ai supervisé le travail de master de Mme S. Hassan portant sur l'expression et la contribution de différentes populations et sous-populations lymphocytaires dans l'asthme sévère. Elle a soutenu son mémoire en 2020. Selon les dires de mes superviseurs londoniens, il y aura plusieurs publications issues de ces travaux de recherche auxquels j'ai participé.

Mon 3^{ème} projet réalisé lors de mon séjour à Imperial College London concernait l'étude de **l'impact de la pollution environnementale sur l'asthme** dans la cohorte UBIOPRED (Pr. K.F. Chung). La pollution atmosphérique représente un problème de santé publique qui a pris de l'ampleur au décours des dernières années malgré des signaux d'alarme émis par les experts dans le domaine et des mesures prises pour réduire son impact sur la santé. Selon les données de l'Organisation Mondiale de la Santé, plus de 90% de la population mondiale vit dans des endroits où la pollution atmosphérique dépasse les normes, générant des conséquences importantes sur la santé, notamment l'augmentation du risque et la mortalité liée aux maladies cardio-vasculaires, respiratoires et certains cancers. Les plus importants polluants atmosphériques sont les particules fines (PM), l'ozone (O₃), les oxydes d'azote (NO₂ et NO_x), le dioxyde de soufre (SO₂) qui provient notamment des sources extérieures (ex. transport, industrie, agriculture), mais aussi des sources intérieures (ex. moyens de chauffage dans l'habitat et/ou utilisés pour la cuisine) (49). Des études antérieures ont démontré que l'exposition à différents polluants atmosphériques est associée à une augmentation du risque de développement de l'asthme, au nombre plus élevé d'exacerbations et d'hospitalisations et à une fonction respiratoire plus basse (50–54). Les conséquences néfastes de l'exposition à des polluants atmosphériques semblent plus importantes dans la population pédiatrique que dans la population adulte (51–54). Comme pour le moment, dans la population d'asthmatiques adultes, on ne connaît pas les patients les plus à risque de subir les effets négatifs de la pollution atmosphérique, nous avons décidé de réaliser ce travail de recherche dans la cohorte UBIOPRED.

Vingt-quatre listes de gènes se rapportant à l'exposition aux différents polluants de l'environnement extérieur (ozone, SO₂, NO₂, NO_x, PM_{2.5}, PM₁₀), ont été analysées chez 61 patients présentant un asthme sévère et 20 patients ayant un asthme léger/modéré, puis comparées aux données obtenues chez les 16 sujets contrôles (55–59). Les asthmatiques fumeurs ont été exclus pour éviter l'incidence liée au tabagisme sur l'interprétation des résultats. La plupart des listes étaient obtenues après exposition *in vitro*, mais il y a eu quelques listes provenant du sang ou des expectorations des personnes exposés de manière accidentelle à des taux élevés des polluants.

Les analyses ont été réalisées selon la durée de l'exposition pour chaque polluant définie comme : aiguë (exposition <24h), de courte durée (exposition entre 1 et 21 jours), de durée moyenne (exposition entre 3 semaines et 6 mois), et chronique (entre 6 mois et 5 ans). En utilisant la méthode GSVA, nous avons calculé le score d'enrichissement dans les différents groupes étudiés selon la sévérité de l'asthme, le phénotype inflammatoire (TACs), la présence de l'obstruction bronchique (VEMS/CVF<0,7) et le profil exacerbateur fréquent (≥ 3 exacerbations par an nécessitant le recours à des corticoïdes systémiques). Le score d'enrichissement était positif pour la plupart des listes analysées dans le groupe des patients présentant un asthme sévère, comparativement au groupe des patients ayant un asthme léger/modéré ou aux sujets contrôles, mais les différences étaient significatives du point de vue statistique ($p<0,05$) pour l'exposition aiguë à l'ozone et SO_2 , l'exposition de durée moyenne à l'ozone et aux $PM_{2.5}$ et l'exposition chronique aux $PM_{2.5}$ et NO_x . L'exposition aiguë, de courte durée et de durée moyenne aux différents polluants, était associée à un phénotype inflammatoire neutrophilique (TAC2) ou mixte (TAC1 et 2) en contraste avec l'exposition chronique plutôt associée à une inflammation éosinophilique (TAC1). Tous les scores d'enrichissement étaient positifs pour les asthmatiques ayant une obstruction bronchique, comparativement à ceux qui n'en avaient pas (scores négatifs), mais les résultats atteignaient le seuil de significativité pour l'exposition aiguë à l'ozone et chronique aux $PM_{2.5}$ et NO_x . Même si la plupart des listes étudiées étaient surexprimées dans le groupe de patients asthmatiques exacerbateurs fréquents, comparativement à l'autre groupe, la différence n'était pas significative du point de vue statistique.

Ce travail nous a permis de mettre en évidence un lien clair entre l'exposition à des polluants atmosphériques et la sévérité de l'asthme, respectivement la présence de l'obstruction bronchique. Concernant le profil inflammatoire, il est intéressant de remarquer que la durée de l'exposition a un impact sur le phénotype de l'asthme puisque l'exposition inférieure à 6 mois est associée à un asthme neutrophilique ou mixte et l'exposition au-delà de 6 mois à un asthme éosinophilique. D'autres travaux de recherche sont nécessaires dans ce domaine afin d'identifier les mécanismes impliqués dans la modulation de l'inflammation bronchique dans l'asthme par l'exposition aux polluants atmosphériques. L'article issu de ce travail est en cours de révision par mon superviseur avec l'intention d'être soumis dans *l'European Respiratory Journal*. Un résumé a été envoyé pour le congrès ERS 2021.

2. PRESENTATION DU PROJET SCIENTIFIQUE

2.1. RECHERCHE CLINIQUE

2.1.1. ASTHME

Mon activité principale de recherche clinique concerne la maladie asthmatique et **ses comorbidités**, notamment dans **l'asthme sévère** et **l'impact de l'exposition environnementale sur l'asthme**.

Concernant **l'impact de comorbidités sur l'asthme**, à court terme, je dois finaliser la rédaction de l'article sur le rôle des troubles psychologiques de type anxiété-dépression dans l'asthme (travail commencé il y a quelques années), et aider mon interne M. Nicolas Marozzi à publier les résultats de sa thèse d'exercice (soutenance prévue en 2021). Il étudie l'impact du traitement de la rhinite allergique sur l'évolution de l'asthme et essaie de réaliser une cartographie des allergies respiratoires en Lorraine. La rhinite allergique est la plus fréquente comorbidité de l'asthme retrouvée dans 70-80% (1,3) et dans presque la moitié des cas d'asthme sévère (prévalence de 49% selon les données du registre international d'asthme sévère) (2). Il a recueilli les données des patients asthmatiques suivis dans le Département de Pneumologie du CHRU de Nancy sur 3 ans, présentant des symptômes de rhinite allergique et ayant un bilan allergologique par des prick-tests cutanés aux pneumallergènes courants. Pour étudier l'impact sur l'asthme, il a enregistré le score du questionnaire de contrôle de l'asthme ACQ (1), le nombre d'exacerbations ainsi que les paramètres fonctionnels respiratoires.

Toujours en rapport avec les comorbidités ORL et l'asthme, une étude est en cours de collaboration avec Pr. R. Jankowski et a pour objectif l'étude de l'impact de la pathologie rhino-sinusienne chronique de type rhinite allergique, polypose nasale et rhinopathie mixte (composante allergique et polypose nasale), sur l'évolution de l'asthme et la fonction respiratoire. La question qui se pose est de savoir si la présence d'une rhinopathie mixte représente un fardeau plus important que la rhinite allergique ou la polypose nasale seule pour le patient asthmatique et s'il y a une association entre la pathologie rhino-sinusienne et l'atteinte des voies aériennes proximales et/ou distales. Les patients ayant une maladie asthmatique et une comorbidité ORL documentée par un spécialiste sont répartis dans trois groupes : l'un avec une rhinite allergique, le 2^{ème} avec une polypose nasale et le 3^{ème} avec une rhinopathie mixte allergique plus polypose nasale. Les paramètres étudiés sont le nombre d'exacerbations annuelles d'asthme nécessitant la mise en place d'une corticothérapie systémique, le score du questionnaire de contrôle de l'asthme et la fonction respiratoire.

Un autre projet à mettre en place sur le plan local dans un avenir proche, en collaboration avec mes collègues ORL, Drs. P. Gallet et B. Toussaint (Service d'ORL, CHRU de Nancy), concerne la recherche systématique de la dysfonction des cordes vocales chez les patients ayant un asthme et l'étude de l'impact de sa prise en charge par rééducation orthophonique sur le contrôle de la maladie asthmatique et le nombre d'exacerbations à 6 mois. La dysfonction des cordes vocales représente à la fois une comorbidité de l'asthme, ou une conséquence de son traitement par des corticoïdes par voie inhalée, mais aussi un diagnostic différentiel car les symptômes respiratoires (respiration sifflante, sensation d'oppression thoracique, toux), se ressemblent. En dehors des crises, quand on peut objectiver à l'endoscopie les mouvements paradoxaux des cordes vocales et un aspect aplati de la courbe inspiratoire sur la spirométrie, l'examen clinique et l'examen fonctionnel respiratoire peuvent être normaux. Selon les données de la littérature, la prévalence de la dysfonction des cordes vocales dans l'asthme chez l'adulte oscille entre 35% et 50% mais il est possible qu'elle soit sous-estimée car le diagnostic est

difficile à établir et nécessite la réalisation d'une laryngoscopie avec des exercices de phonation, par un spécialiste ORL ayant de l'expérience dans le domaine, et parfois une épreuve d'effort (3). Les données de la littérature sont limitées concernant l'association asthme et dysfonction des cordes vocales, mais ces patients ont un risque élevé d'exacerbations et d'hospitalisations en urgence, un mauvais contrôle de la maladie asthmatique et une réponse moindre à la corticothérapie systémique (3). Une première réunion avec mes collègues ORL a déjà eu lieu afin de discuter des détails organisationnels. Le synopsis du projet doit être soumis bientôt au Comité d'Ethique du CHRU de Nancy.

Bien évidemment la thématique des comorbidités de l'asthme est étroitement liée à l'**asthme sévère**. En effet, la recherche systématique des comorbidités est une démarche obligatoire chez tout patient asthmatique pour obtenir un contrôle de la maladie défini comme l'absence de symptômes et un nombre d'exacerbations par an nécessitant le recours à une corticothérapie systémique inférieure à deux ou moins d'une hospitalisation par an pour une exacerbation sévère d'asthme (1). Le diagnostic d'asthme sévère peut être simplement établi une fois le diagnostic d'asthme confirmé, les facteurs pouvant entretenir un mauvais contrôle corrigé, (ex. technique inadaptée de prise de traitement, inobservance, traitement des comorbidités, exposition à des allergènes ou des produits irritants dans l'environnement, consommation de tabac, prise de médicaments comme des anti-inflammatoires non stéroïdiens ou bêta-bloquants), et l'optimisation de la prise en charge si l'asthme reste insuffisamment contrôlé lors d'une réévaluation à 3-6 mois (4). Si la prise en charge de certaines comorbidités comme le syndrome d'apnées-hypopnées du sommeil est possible dans notre spécialité, pour la majorité des autres comorbidités, des collaborations avec d'autres spécialistes sont nécessaires pour optimiser la prise en charge des patients asthmatiques : psychothérapeutes ou psychiatres pour les troubles psychologiques de type anxiété-dépression, médecins rééducateurs pour le syndrome d'hyperventilation inappropriée, diététiciens, médecins nutritionnistes, médecins du sport, kinésithérapeutes voire chirurgiens bariatriques pour l'obésité, spécialistes ORL et orthophonistes pour les rhinopathies chroniques et la dysfonction des cordes vocales, respectivement les hépato-gastro-entérologues pour le reflux gastro-oesophagien. Pour l'instant, au CHRU de Nancy, grâce aux collaborations que je suis parvenue à développer pour les patients asthmatiques, la prise en charge des comorbidités ORL (Service d'ORL), du syndrome d'hyperventilation inappropriée (Service d'Explorations Fonctionnelles Respiratoires), et des troubles psychologiques de type anxiété-dépression (Service de Psychiatrie), est quasiment optimale. D'autres collaborations sont nécessaires pour optimiser la prise en charge de l'obésité et du reflux gastro-oesophagien. La **Figure 6** représente les plus fréquentes comorbidités de l'asthme et leurs prévalences dans l'asthme sévère.

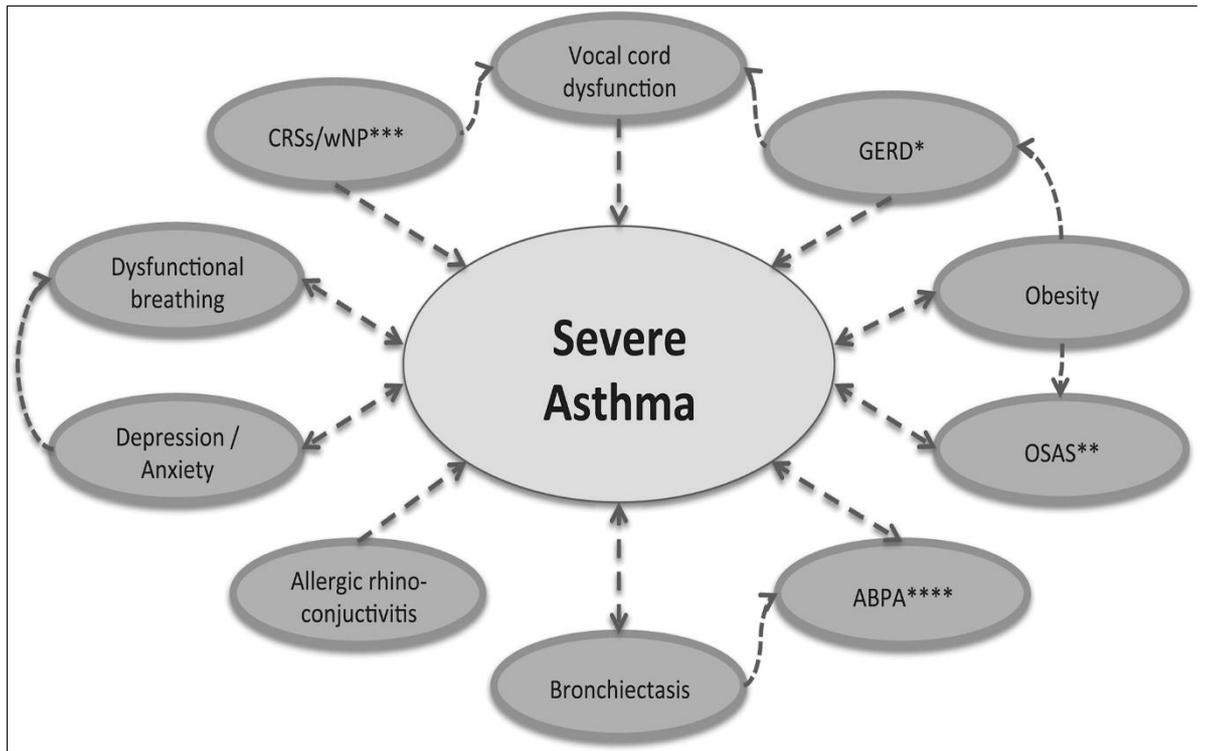


Figure 6. Les comorbidités de l'asthme sévère et les relations causes-effets.

ABPA : aspergillose broncho-pulmonaire allergique ; CRSwNP : rhinosinusite chronique avec polypose nasale ; CRSsNP : rhinosinusite chronique sans polypose nasale ; GERD : reflux gastro-oesophagien ; OSAS : syndrome d'apnées-hypopnées obstructives du sommeil (D'après Porsbjerg (3))

Concernant l'asthme sévère associé à la polypose naso-sinusienne, en appliquant le concept « one airway, one disease » (60,61), j'ai réalisé une étude dans la région Grand-Est sur l'efficacité de l'omalizumab prescrit comme traitement de l'asthme sévère allergique sur la polypose nasale associée, en collaboration avec mes collègues du CHRU de Besançon (Dr. P. Roux), CH de Colmar (Dr. P. Oster), CHRU de Dijon (Pr. P. Bonniaud), CHU de Strasbourg (Pr. F. de Blay), qui vient d'être publiée (*cf Liste des publications Internationales No 20*). La polypose nasale était évaluée par un spécialiste ORL sur le plan clinique, endoscopique et par l'imagerie (TDM sinus). La mise en place de la biothérapie a permis une amélioration significative à six mois de l'asthme, (ex. score de contrôle de la maladie, nombre d'exacerbations, fonction respiratoire), mais aussi de la symptomatologie ORL, une diminution du nombre de rhino-sinusites aiguës et de l'atteinte naso-sinusienne sur l'imagerie des sinus. D'autres biothérapies comme l'anticorps anti-IL5 (mepolizumab) ou l'anticorps anti-récepteur IL5 (benralizumab) ont également prouvé leur efficacité dans l'asthme associé à la polypose nasale (62,63), mais, pour le moment, il n'y a pas d'étude comparative entre ces biothérapies dans cette association. Avec mes collaborateurs de la région Grand-Est, j'ai démarré une étude comparative pour les différentes biothérapies que possédait l'AMM pour le traitement de l'asthme sévère en novembre 2019, (omalizumab, mepolizumab, benralizumab), en n'incluant que les patients ayant une polypose nasale associée. Afin d'établir l'efficacité de ces traitements sur cette population, les paramètres suivants étaient recueillis : nombre de sinusites aiguës et d'exacerbations d'asthme, nombre des cures de corticoïdes par voie systémique et d'antibiotiques, stade de la polypose évalué par endoscopie nasale, scanner sinus-thorax, fonction respiratoire, score de contrôle de l'asthme (ACT), taux sérique d'éosinophiles, six mois avant et après l'instauration de la biothérapie. Etant donné que l'arrivée de la pandémie COVID-19 a ralenti les inclusions dans cette étude, un nouveau centre a

été ouvert en Espagne dans le Service de Pneumologie de l'Hôpital Universitaire de Santiago de Compostela (Pr. F.J. Gonzalez Barcala). Nous avons arrêté les inclusions, mi-avril 2021, et l'analyse statistique est en cours. L'étude pourrait être complétée à l'avenir en rajoutant les patients qui ont un asthme sévère et une polypose nasale traités par dupilumab, qui a obtenu l'AMM récemment dans cette indication.

Sur le plan national, j'envisage de faire une étude sur l'influence de l'obésité sur l'asthme à partir des données du registre national d'asthme sévère (cohorte RAMSES). La prévalence de l'obésité dans les populations des asthmatiques sévères, étudiée jusqu'à présent, est estimée entre 35% et 57% (64). La présence de l'obésité est un facteur de gravité reconnu d'asthme sévère car ces patients présentent souvent des symptômes non-contrôlés, une fonction respiratoire plus basse et des exacerbations fréquentes avec nécessité de prises de corticoïdes par voie systémique (3,64). D'autre part, la corticothérapie systémique favorise la prise de poids et crée ainsi un cercle vicieux. Plus encore, l'obésité est un facteur de risque pour le développement d'autres comorbidités qui pourraient aggraver les symptômes de l'asthme, comme le syndrome d'apnées-hypopnées obstructives du sommeil ou le reflux gastro-oesophagien (3). Même si les mécanismes impliqués dans l'association "obésité-asthme sévère" ne sont pas clairement identifiés, plusieurs hypothèses ont été évoquées, comme le rôle de l'inflammation systémique présente dans l'obésité, par le métabolisme anormal des lipides et la dysbiose intestinale. Au moins deux phénotypes d'asthme sévère associés à l'obésité ont déjà été décrits : le premier phénotype inclue des patients asthmatiques depuis l'enfance ou l'adolescence avec une prévalence importante de l'atopie, une inflammation de type T2 (prédominante eosinophilique) et une bonne réponse, en général, à la corticothérapie ; le 2^{ème} phénotype est caractérisé par un début tardif chez des personnes qui n'ont pas de terrain atopique avec une inflammation non-T2 (prédominante neutrophilique) et plutôt cortico-résistant (64). Ces phénotypes avec les mécanismes impliqués sont décrits en détail dans une revue de la littérature que j'avais publiée récemment avec mes collaborateurs de Global Asthma Association (*cf Liste des Publications Internationales No 22*).

Sur les données des patients de la cohorte RAMSES, je souhaite répartir les patients asthmatiques sévères en cinq groupes selon leur poids : groupe 1 avec un poids normal (IMC entre 18,5 – 24,9 Kg/m²), groupe 2 avec un surpoids (IMC entre 25 - 29,9 Kg/m²), groupe 3 avec une obésité de grade I (IMC entre 30-34,9 Kg/m²), groupe 4 avec une obésité de grade II (IMC entre 35-39,9 Kg/m²) et groupe 5 avec une obésité de grade III (IMC ≥ 40 Kg/m²). Plusieurs paramètres cliniques et démographiques seront étudiés : l'âge, le genre, l'âge du diagnostic de la maladie asthmatique, la présence du terrain atopique, le tabagisme, les comorbidités de l'asthme, (e.g. le syndrome d'apnées-hyperpnées obstructives du sommeil, l'anxiété-dépression, le reflux gastro-œsophagien, la dysfonction des cordes vocales, la rhino-sinusite avec ou sans polypose nasale, le syndrome d'hyperventilation), l'obésité, (e.g. dyslipidémie, HTA, diabète), le nombre d'exacerbations par an, le nombre des consultations en urgence par an, le nombre d'hospitalisations, le nombre des cures de corticoïdes par voie systémique par an, le score de contrôle de l'asthme (ACT), la fonction respiratoire et les traitements de fond de l'asthme instauré (pression thérapeutique). Une analyse comparative sera réalisée entre ces groupes afin de définir les caractéristiques de chaque groupe et d'envisager par la suite une prise en charge personnalisée pour améliorer l'évolution de leur asthme à long terme.

Concernant ma troisième thématique de recherche clinique sur **l'impact de l'exposition environnementale sur l'asthme**, en collaboration avec mes collègues du Service de Pathologie Professionnelle du CHRU de Nancy, (Dr. I. Thaon et Dr. E. Penven), et du Service d'Explorations Fonctionnelles Respiratoires du CHRU de Nancy, (Pr. M. Poussel), nous avons constitué une cohorte des patients ayant un asthme professionnel documentée par un test de provocation

réaliste avec plusieurs projets de publications. Malheureusement, en raison de l'arrivée de la pandémie, nous avons été obligés de mettre en stand-by plusieurs bilans d'asthme professionnel tout en gardant l'espoir de pouvoir reprendre nos activités habituelles bientôt et d'enrichir notre base de données. Cette collaboration perdue depuis quelques années déjà et nos échanges lors des réunions d'Allergologie Professionnelle s'avèrent toujours très intéressantes et constructives.

2.1.2. AUTRES PATHOLOGIES RESPIRATOIRES

Dans le domaine de l'**oncologie thoracique**, à l'avenir, ma thématique principale de recherche restera la biologie moléculaire tumorale et les thérapies ciblées. La découverte des thérapies ciblées efficaces pour les cancers bronchiques non à petites cellules, porteurs des mutations accessibles à ce genre de traitement, a nettement amélioré la survie sans progression et la survie globale de nos patients. Cependant, les tumeurs développent des mécanismes de résistance qui amènent à l'échappement thérapeutique. La compréhension de ces mécanismes de résistance, l'identification des nouvelles mutations et des co-mutations ainsi que le développement des nouvelles thérapies ciblées ou des associations, représentent des pistes intéressantes de recherche pour les prochaines années. Sur le plan local, à court terme, je souhaite finaliser les articles issus des travaux des thèses d'exercice et des mémoires pour la publication. Sur le plan national, j'ai fait partie du groupe de travail de l'Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique (IFCT) pour la réalisation d'un projet de recherche sur l'efficacité et la tolérance en vie réelle d'un inhibiteur de la mutation KRAS G12C (sotorasib) chez les patients ayant un cancer bronchique non à petites cellules et possédant cette mutation.

Dans le domaine de l'**immunologie**, j'ai répondu favorablement à l'invitation de Pr. D. Loeuille, Service de Rhumatologie du CHRU de Nancy aux fins de participer à un projet de recherche concernant l'atteinte respiratoire dans la polyarthrite rhumatoïde. Comme tous les patients porteurs de cette pathologie ont des scanners thoraciques, lors du bilan initial, je fais une relecture d'images pour les 273 patients, suivis pour cette pathologie dans le Service de Rhumatologie à l'heure actuelle, afin d'évaluer la présence des modifications radiologiques de type images en verre dépoli ou en rayon de miel, épaississement de la plèvre ou des septa interlobulaires, emphysème, bronchiectasies et nodules rhumatoïdes. L'évaluation de la sévérité de l'atteinte respiratoire est faite selon un score radiologique en pourcentage. Des corrélations seront établies pour définir s'il existe un lien entre la sévérité de la polyarthrite rhumatoïde et la sévérité de l'atteinte radiologique à l'étage thoracique. Une analyse comparative entre les données obtenues par ma lecture et celles réalisées à l'aide d'un logiciel informatique sera réalisée par une interne de Rhumatologie, Mlle M. Moret, dans le cadre de sa thèse d'exercice (soutenance prévue en 2022).

Depuis que j'ai passé ma thèse de science, mon rêve est de développer au CHRU de Nancy une filière de soins d'expertise pour la prise en charge de la « **toux chronique** », selon le modèle de nos collègues du CHU de Toulouse. La toux est un symptôme connu de l'asthme et peut être l'expression d'un contrôle insuffisant de l'inflammation ou de la présence de comorbidités ORL, (ex. rhinite allergique, rhino-sinusite chronique, dysfonction des cordes), ou digestives (ex. reflux gastro-œsophagien). Comme clinicien, je m'intéresse beaucoup à ce symptôme, lors de l'interrogatoire de mes patients asthmatiques, car sa présence ou persistance est un signal d'alarme nécessitant un bilan complémentaire, (ex. scanner sinus, thorax, pH-métrie, gastroscopie). Mais les étiologies de la toux chronique sont multiples et variées, allant des causes bénignes comme la iatrogénie (ex. inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine), l'hypersensibilité au réflexe de toux (cough hypersensitivity syndrome), facteurs psychologiques (toux psychogène), jusqu'aux maladies plus graves comme les maladies de

système, (ex. syndrome de Sjogren, sclérodermie, polyarthrite rhumatoïde, sarcoïdose), pneumopathies interstitielles diffuses, insuffisance cardiaque ou pathologie tumorale. Étant donné le retentissement négatif sur la qualité de vie des patients, sa prise en charge doit représenter une priorité pour les pneumologues mais, au vu de la complexité du bilan et de l'approche thérapeutique différente, des discussions collégiales lors des réunions pluridisciplinaires sont nécessaires pour la pratique d'une médecine personnalisée dans ce domaine. En dehors de la nécessité des collaborations interdisciplinaires, toujours dans ce cadre, il persiste le besoin d'un développement et d'une mise en place de tests spécifiques (ex. test à la capsaïcine) pour explorer la toux au niveau loco-régionale. Une RCP nationale « Toux chronique » existe déjà pour les dossiers les plus difficiles. Une prise en charge standardisée et intégrative spécifique pourrait nous ouvrir des portes pour des projets de recherche loco-régionaux et nationaux tant les pistes à explorer sont multiples en termes de diagnostic et de thérapeutique.

2.2. RECHERCHE FONDAMENTALE

2.2.1. PATHOGENESE DE LA TOUX DANS L'ASTHME

Dans le prolongement de mes activités actuelles de recherche, mes projets sur le versant expérimental du plan local dans l'Unité EA DevAH : « *Développement, Adaptation et Handicap. Régulations cardio-respiratoires et de la motricité* » concernent la compréhension des mécanismes impliqués dans la toux, l'asthme, et les implications sur le plan thérapeutique.

Le rôle du système cholinergique dans la bronchomotricité et la sécrétion du mucus a été bien étudié avec les deux traitements utilisés dans la pratique courante : le tiotropium, un anticholinergique de longue durée d'action (24 heures) qui peut être rajouté dans le traitement de fond de l'asthme à partir de l'âge de 6 ans nécessitant un palier thérapeutique GINA 4 ou 5, et l'ipratropium, un anticholinergique de courte durée d'action (6 heures) qui peut être utilisé comme traitement de secours en cas d'exacerbation modérée/sévère chez l'adulte et l'enfant. Tous deux permettent une amélioration de la fonction respiratoire chez le patient asthmatique avec la réduction du nombre de jours d'hospitalisation quand l'ipratropium est rajouté au salbutamol en cas d'exacerbation et du nombre annuel d'exacerbation pour le tiotropium (1). Cependant, peu d'études ont été centrées sur l'effet des anticholinergiques dans la toux. De multiples travaux expérimentaux (réalisés notamment chez le cochon d'Inde et le chat) ont montré un possible effet antitussif des anticholinergiques, probablement en lien avec une activité modulatrice sur les récepteurs TRPV1, car il n'y a pas de récepteurs muscariniques sur les fibres nerveuses afférentes impliqués dans le réflexe de toux (65,65). L'effet antitussif des muscariniques a été aussi bien établi dans la toux induite du sujet sain que dans la toux postinfectieuse et dans l'asthme (65,67,68). Des études précédentes ont démontré que le bénéfice de l'ipratropium, sur la toux et la bronchoconstriction induites par l'exercice, serait dépendant des conditions environnementales : présent, quand les sujets sont exposés à l'air humide chaud (49°C) et absent, quand ils sont exposés à l'air froid ou celle de la chambre (20-22°C) (69,70). Une seule étude expérimentale a montré que l'administration de l'ipratropium par voie sous-cutanée inhibe la toux induite par la capsaïcine et celle induite par l'exposition allergénique dans un modèle de cochon d'Inde rendu atopique (71). L'effet des anticholinergiques n'a jamais été étudié sur notre modèle animal de lapin sensibilisé à l'ovalbumine. L'objectif de mes études futures sera d'analyser l'effet des anticholinergiques administrés par voie inhalée sur le réflexe de toux dans des conditions de température ambiante différente (49°C vs 20°C) chez le lapin sensibilisé à l'ovalbumine en repos et à l'exercice, en le comparant au comportement du lapin contrôle dans les mêmes conditions.

Un autre traitement de fond de l'asthme, le montelukast, un antagoniste de récepteur des leucotriènes, a montré un effet antitussif dans les toux variantes de l'asthme chez l'enfant et chez l'adulte mais aussi dans la toux secondaire à une pathologie rhino-sinusienne ou au reflux gastro-oesophagien (72–75). Aucun bénéfice de l'administration du montelukast n'a été démontré dans une étude randomisée contre placebo dans les toux postinfectieuses (76). Jusqu'à présent, aucune recherche n'a évalué son effet dans la toux induite par l'exercice. Sur le plan expérimental, la plupart des études concernant le montelukast a été réalisée chez le cochon d'Inde (77,78) mais aucun chez le lapin. L'objectif de mon étude, comme projet pour un étudiant en Master 2, sera d'analyser l'effet du montelukast sur le réflexe de toux chez le lapin sensibilisé à l'ovalbumine vs contrôle à l'exercice et en repos. Les lapins seront répartis en 2 groupes : un contrôle et un autre traité par montelukast 4 mg par voie orale pendant 4 semaines avant l'expérimentation.

A long terme, des études avec d'autres classes thérapeutiques disponibles pour le traitement de l'asthme comme les biothérapies, (ex. anticorps anti-IL5/IL5R, anti-IL4R), pourront être envisagées.

2.2.2. MECANISMES IMPLIQUES DANS LA PATHOGENESE DE L'ASTHME SEVERE

Dans ce domaine, je poursuis mes travaux de recherche en lien avec avec mes collaborateurs, les Prs. I.M. Adcock, K.F. Chung et C. Wiegman, Imperial College London (Angleterre) ainsi que le Pr. P.M. Hansbro, University of Newcastle (Australie), et je continue à travailler dans la cohorte européenne d'asthme sévère UBIOPRED.

Depuis déjà un certain nombre d'années, on parle de l'hétérogénéité de la maladie asthmatique, de la présence de plusieurs phénotypes cliniques et inflammatoires et de la nécessité d'identifier les mécanismes impliqués dans la pathogenèse de chaque phénotype, afin de pouvoir appliquer la médecine personnalisée dans ce domaine (79). Les premiers phénotypes cliniques ont été identifiés dans la cohorte anglaise de Leicester, en 2008, puis d'autres études ont été réalisées dans les cohortes : américaine SARP (Severe Asthma Research Program), européenne UBIOPRED et asiatique COREA. Malgré l'hétérogénéité des cohortes, des phénotypes similaires ont été identifiés à travers le monde comme, par exemple, l'asthme de début précoce (en enfance), avec prévalence importante de l'atopie, symptômes non-contrôlés, fonction respiratoire préservée, inflammation prédominant eosinophilique nécessitant une pression thérapeutique importante ; l'asthme de début tardif (à l'âge adulte), associé souvent à une polypose nasale avec des exacerbations récurrentes, obstruction bronchique importante, inflammation eosinophilique et recours fréquent à des corticoïdes par voie systémique, l'asthme de début tardif non-atopique fréquemment associé à l'obésité, avec un taux élevé d'exacerbations, obstruction bronchique, inflammation neutrophilique et souvent cortico-dépendant (80–83).

Beaucoup de progrès dans l'identification des mécanismes impliqués dans les différents phénotypes ont été réalisés au décours des dernières années grâce à la méthode GSVA (Gene Set Variation Analyses), notamment dans les cohortes SARP et UBIOPRED. En général, l'asthme à eosinophiles (reconnu aussi comme le phénotype T2) est associé à l'activation des lymphocytes Th2 avec production des IL-4, IL-5 et IL-13. Pour l'asthme neutrophilique (phénotype non-T2), le rôle des lymphocytes Th1 et Th17 a été suggéré avec l'activation de l'inflammasome des voies médiées par l'IFN γ et TNF α (79,84). Certaines de mes publications sont des revues de la littérature dans le phénotypage/endotypage de l'asthme, les biomarqueurs pouvant identifier les différents phénotypes et les progrès concernant l'application de la médecine personnalisée dans l'asthme (*cf Liste des Publications Internationales No 9, 13, 28*).

Malheureusement, malgré des progrès notables dans le domaine, l'identification des mécanismes impliqués dans l'inflammation non-T2 dans l'asthme reste encore un défi pour les chercheurs et pour les cliniciens. De retour en France, j'ai contacté le Pr. P. Berger, coordinateur du projet COBRA, avec lequel je participe en étant l'investigateur principal pour le CHRU de Nancy, et nous avons discuté sur plusieurs projets de recherche, notamment celui concernant le phénotype non-T2. La cohorte COBRA contient des données cliniques et biologiques des patients asthmatiques en France et mon expérience dans la cohorte UBIOPRED est la bienvenue. Lors de mon année de recherche à Imperial College London, je me suis familiarisée avec la méthode GSVA et son application en pratique dans les cohortes des patients contenant des données de génomique et j'ai acquis de l'expérience dans la gestion de « big-data ». Ma pratique de clinicien m'a été très utile dans l'interprétation des résultats et la corrélation des données de biologie moléculaire et génomique avec les phénotypes cliniques et inflammatoires. En raison de l'arrivée de la pandémie, mes projets de recherche dans ce domaine ont été décalés.

Lors de mon travail de recherche sur la pollution dans la cohorte UBIOPRED, étant donné le lien entre la fonction mitochondriale et l'exposition aux particules fines (85), selon les résultats obtenus, j'avais suspecté une dysfonction mitochondriale dans l'asthme sévère, raison pour laquelle j'ai commencé une étude pour analyser les différentes fonctions de la mitochondrie dans cette population. Si dans la BPCO, la dysfonction mitochondriale est une notion déjà connue, peu de données existent dans l'asthme. Afin de valider mes résultats obtenus par GSVa dans la cohorte UBIOPRED, j'ai demandé à M. C. Wiegman, référent dans le domaine de la mitochondrie à Imperial College London et qui possède une expérience importante dans l'étude de la dysfonction mitochondriale dans la BPCO, son aide et sa collaboration pour la finalisation de ce projet. Après avoir réalisé avec lui un travail d'immersion dans les techniques d'étude de la mitochondrie, j'ai commencé la recherche des listes des gènes et démarré leur analyse. A l'avenir, si les résultats confirment nos hypothèses, je souhaite mettre en place une collaboration à long terme avec lui et son équipe d'Imperial College London sachant que la réciproque est tout aussi valable.

ATTESTATION DE LA PART DE M. C. WIEGMAN

Angelica Tiotiu, M.D.
Chest Physician
Department of Pulmonology
University Hospital of Nancy
France

**Imperial College
London**

LETTER OF INTERNATIONAL COLLABORATION

Dear Angelica,

This letter is to express the intent of continued collaboration on present and future research projects with aligned scientific interests. Your research on macrophages and mast cells in the UBIOPRED cohort at Imperial College London prompted a collaboration to investigate the role of mitochondria dysfunction in (severe) asthma.

It is the intent to develop this collaboration into a successful and fruitful scientific relationship that will lead to joint-publications and awarded research grants to further strengthen this collaboration in the future.

The expertise in the field of airways disease, pulmonary toxicity and modeling of respiratory diseases that I have at Imperial College London will aid to create various opportunities for collaborations on future projects.

At the moment you are trying to publish the results from the work that was done at Imperial College London and I am happy to assist in any way to make this a success.

Yours sincerely,

CHWiegman

Dr. Coen Wiegman, PhD
Lecturer in Respiratory Science
National Heart & Lung Institute
Faculty of Medicine
Imperial College London
United Kingdom

ATTESTATION DE LA PART DE PR. P.M. HANSBRO

Professor Phil Hansbro
NHMRC Level 2 Investigator

Director, Centre for Inflammation, Centenary Institute,
Sydney NSW 2050 &
University of Technology Sydney, Ultimo NSW 2007
M +61 427 263 084 Email p.hansbro@centenary.org.au



Deputy Director Centenary Institute

Conjoint Professor, Priority Research Centre for Asthma and
Respiratory Disease,
University of Newcastle, Newcastle, NSW 2308 Australia
Vaccines, Infection, Viruses, and Asthma,
Hunter Medical Research Institute, NSW 2305, Australia



15th of July, 2020

To whom it may concern,

Dr Angelica Tiotiu

This is to certify that Dr Angelica Tiotiu MD PhD is my collaborator from 2019 on several research works concerning the study of the role of different innate immune cells (e.g. macrophages and mast cells) and environmental pollutants in asthma and COPD. This collaboration started during her research year at Imperial College London in the Airway Disease Section in the National Heart & Lung Institute.

Our joint manuscript on the results of the first study of macrophages in asthma was recently accepted for publication in the high impact journal Allergy. The second work on mast cells in asthma is still under review by Prof Fan Chung with submission planned in a few weeks. Currently, I am performing the revision of a manuscript describing the impact of environmental pollutants on asthma outcomes (UBIOPRED cohort) that she studied during her stay in London.

We recently started working on mast cells in COPD over the past few months and several analyses have already been completed. The results are interesting and we hope that a paper will be written before the end of this year. Our joint future research is focused on the study of macrophages and pollutants in COPD. It is likely that several papers will result from these two studies.

Yours sincerely,

Professor Phil Hansbro

3. TRAVAUX D'ENCADREMENT

3.1. THESE D'UNIVERSITE ET MASTER

Lors de mon séjour à Imperial College London, j'ai co-encadré avec le Pr. I.M. Adcock le travail de Master de Mme S. Hassan intitulé « Le rôle des différents types de lymphocytes dans l'asthme » dans la cohorte UBIORED. J'ai aidé l'étudiante en Master à rédiger son projet, à trouver les listes de gènes dans la littérature, à réaliser la synthèse et l'interprétation des résultats. En raison d'une grossesse, la soutenance de son mémoire de Master a été repoussée et je n'ai pas pu assister à la présentation des résultats.

De manière similaire, j'ai co-encadré M. Y. Badi, PhD student dans son travail de thèse ayant pour titre « Vers une approche moléculaire personnalisée pour la prise en charge de l'asthme, la BPCO et la dermatite atopique ». Il s'agissait d'un doctorant qui venait de commencer son doctorat en 2018, quand je suis arrivée à l'Imperial College London, et qui avait pour base une formation en biochimie. Il devait travailler dans la cohorte UBIORED pour la partie asthme, dans la cohorte ECLIPSE pour la BPCO et dans une équipe américaine de dermatologues pour la dermatite atopique. Comme j'avais travaillé sur les mastocytes, reconnus pour leur rôle dans l'asthme et la dermatite atopique, je lui ai communiqué certaines de mes listes de gènes afin qu'il les étudie chez les patients ayant développé une dermatite atopique et je l'ai aidé dans la synthèse et l'interprétation des résultats car il n'avait pas les connaissances médicales nécessaires. A la suite de ma découverte sur le rôle de la voie d'activation médiée par l'IL-33 dans l'asthme, et après mon départ de Londres, il a continué ce travail de recherche dans la cohorte UBIORED. Actuellement, il rédige l'article sur le sujet où j'aurai la place de 2^{ème} auteur, une fois celui-ci finalisé.

De retour de Londres, après avoir rencontré mes collègues de l'équipe DevAH, j'ai proposé des sujets de recherche sur le réflexe de toux chez le modèle animal aux étudiants de Master 2 et, pour l'année 2020/2021, on devait travailler sur l'effet du montelukast sur la toux chez le lapin sensibilisé à l'ovalbumine. Malheureusement, avec l'arrivée de la pandémie, ce projet a été décalé. J'ai fait un lancement d'offre auprès des internes en Pneumologie et Allergologie, mais pour le moment, je n'ai pas encore trouvé de candidat. Cette année, j'ai participé de manière ponctuelle à l'encadrement du travail de Master 2 de Mlle Sarah Basin, interne en Pneumologie, sur la modulation du réflexe de toux chez le lapin sensibilisé à l'ovalbumine par la corticothérapie et voie inhalée, idée issue suite à mon travail de thèse de doctorat.

ATTESTATION DE LA PART DE PR. I.M. ADCOCK

**Imperial College
London**

National Heart and Lung Institute
Imperial College London

Guy Scadding Building, Royal Brompton campus
Dovehouse Street, London SW3 6LY, UK
Telephone: +44 (0)20 759 47840
Fax: +44 (0) 20 7351 8126

ian.Adcock@imperial.ac.uk
www.imperial.ac.uk

Professor Ian Adcock PhD
Professor of Respiratory Cell & Molecular Biology

To whom it may concern,

14-07-2020

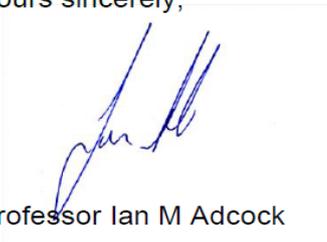
Dr Angelica Tiotiu

This is to certify that Dr Angelica Tiotiu MD PhD was involved in supporting the project of a Masters student (Sara Hassan) during her research year at the Airway Disease Section within the National Heart & Lung Institute. This project involved GSVa analysis of immune cell subtype expression across asthma severity.

Dr Tiotiu also worked with Yusef Badi, a PhD student, whose project examined cross-disease efficacy of therapeutic interventions with a focus on identifying subjects with asthma who may be stratified as more likely to respond to drugs effective in atopic dermatitis. Again this project utilised GSVa analysis as a major tool.

It is likely that several papers will result from these two studies.

Yours sincerely,



Professor Ian M Adcock

Imperial College of Science, Technology and Medicine

ATTESTATION DE LA PART DE PR. K. F. CHUNG

**Imperial College
London**

Experimental Studies Medicine
Airway Disease Section
Imperial College London
National Heart & Lung Institute
Guy Scadding Building, Royal Brompton
Campus
Dovehouse Street
London SW3 6LY
Tel: +44 (0) 207 59 47954

Fan Chung MD DSc FRCP
Professor of Respiratory Medicine
Honorary Consultant Physician

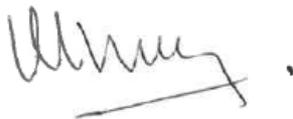
f.chung@imperial.ac.uk
www.imperial.ac.uk

24 October 2019

Angelica Tiotiu

This is to certify that Angelica Tiotiu was an Honorary Research Fellow in the Experimental Studies of Airway Disease Section, Imperial College London, from 1st November 2018 to 31st October 2019. While she was here, she was allowed access to the UBIOPRED data base and studied the contribution of macrophages, mast cells, pollutants and mitochondria using gene analysis approaches. She also had access to the ECLIPSE cohort. In addition, she worked with a Masters and a PhD student, on other aspects of UBIOPRED analysis.

Yours sincerely,



Fan Chung

3.2. THESES D'EXERCICE

Comme sujets de thèses d'exercice, à l'heure actuelle, cinq ont été soutenus publiquement et un autre est en cours. J'avais commencé deux autres travaux en 2018, l'un portant sur une étude comparative concernant l'efficacité et la tolérance des inhibiteurs de tyrosine kinase de première et deuxième génération dans le cancer bronchique non à petites cellules métastatiques mutées EGFR, (Mlle P. Mauguin), et l'autre sur la valeur pronostique des mutations KRAS dans le cancer bronchique non à petites cellules dans la réponse à l'immunothérapie anti-tumorale, (Mlle J. Ruuth-Praz). Comme la soutenance de ces deux travaux était prévue en 2019, en raison de mon départ en mobilité, le Pr. F. Chabot, responsable du DES de Pneumologie à Nancy, m'a retiré la direction de ces thèses pour me remplacer par le Pr. S. Renaud (Service de Chirurgie Thoracique, CHRU de Nancy) alors que le recueil des données était quasiment achevé. Les résultats de deux thèses d'exercice que j'avais encadrées ont été publiés dans des journaux avec comité de lecture et trois autres sont en préparation pour des publications. Trois thèses ont fait l'objet de communications en format poster aux décours de Congrès SPLF. J'étais invitée dans 8 jurys de thèse.

Par ailleurs, je participe comme co-encadrante au travail de thèse de Mlle S. Guyot, interne en Allergologie (directrice de thèse Dr. C. Mouton-Faivre), concernant les mécanismes du bronchospasme peropératoire induits par les produits d'anesthésie (soutenance prévue en 2021), et à celui de Mlle M. Moret, interne en Rhumatologie (directeur de thèse Pr. D. Loeuille), concernant l'étude comparative de l'atteinte respiratoire dans la polyarthrite rhumatoïde à la lecture par un pneumologue vs un logiciel informatique (soutenance prévue en 2022).

Voici la liste des thèses ainsi que leur valorisation :

1. **Aurélié Villemain** (DES de Pneumologie – 2014), poster Congrès SPLF 2016, une publication en Français
« Identification des facteurs prédictifs clinico-biologiques de la survenue d'évènements osseux dans les cancers bronchiques métastatiques au niveau osseux »
Rev Mal Respir, vol 33, Supplement January 2016 Pages a92-a93
« Predictive Factors for Skeletal-Related Events in Lung Cancer »
Villemain A, Ribeiro Baptista B, Paillot N , Soudant M, Menard O, Martinet Y, **Tiotiu A.**
Rev Mal Respir 2020;37:111-116
2. **Dimitri Huet** (DES de Pneumologie – 2015), article en cours de correction
« Etude comparative de deux protocoles de chimiothérapie Cisplatine-Etoposide versus Carboplatine-Paclitaxel utilisés dans le traitement par radiochimiothérapie concomitante des cancers bronchiques non à petites cellules de stade III non opérable »
3. **Arnaud Knoepfli** (DES de Pneumologie – 2016), poster au Congrès SPLF 2017, une publication en Français
« Influence de l'âge du patient sur le délai de prise en charge thérapeutique du cancer bronchique : expérience au CHRU de Nancy »
Rev Mal Respir vol 34, Supplement January 2017 Page a194
« The Impact of the Patient's Age on the Delay of the Lung Cancer Treatment »
Knoepfli A, Vaillant P, Billon Y, Zysman M, Menard O, **Tiotiu A**
Bull Cancer. 2019;106:421-430.

4. **Said Abderkan** (DES de Pneumologie – 2019), article en cours de rédaction
« Détermination des paramètres clinico-évolutifs des cancers bronchiques non à petites cellules avec mutation BRAF dans la région Lorraine »

5. **Gautier Treffel** (DES de Pneumologie – 2020), poster au Congrès SPLF 2021, article en cours de rédaction
« Répartition et facteurs pronostiques des addictions oncogéniques dans l'adénocarcinome broncho-pulmonaire métastatique : une étude rétrospective monocentrique au CHRU de Nancy »
Treffel G, Baumann C, Luc A, Chabot F, **Tiotiu A**
<https://doi.org/10.1016/j.rmra.2020.11.241>

6. **Nicolas Marcozzi** (DES de Pneumologie – soutenance prévue en 2021)
« Impact de la rhinite allergique et l'exposition aux pneumo-allergènes sur l'évolution de l'asthme ».

3.3. MEMOIRES DE DES/DESC/DIU DE MEDECINE

J'ai assuré la direction de 10 mémoires de DES/DESC/DIU de Médecine dont 7 sont publiés dans des journaux avec comité de lecture, un article est en cours de rédaction et 2 travaux ont été présentés comme poster lors des congrès.

La liste est ci-dessous avec leur valorisation :

1. **Aurélie Villemain** (Mémoire DES de Pneumologie – 2014), publication en Français
« Hypoglycémie secondaire à une récurrence maligne d'une tumeur fibreuse pleurale »
« Paraneoplastic hypoglycemia: The hopes of pathophysiological documentation ».
Villemain A, Menard O, Mandry D, Siat J, Vignaud JM, Martinet Y, **Tiotiu A**.
Rev Pneumol Clin. 2017;73:140-145.
2. **Hortense Carette** (Mémoire DES Pneumologie – 2017), poster au Congrès SPLF 2018, publication en Français
« Rôle de la radiothérapie prophylactique sur le site de thoracoscopie dans le mésothéliome pleural malin »
Rev Mal Respir vol 35, Supplement January 2018 Page a209
« Prophylactic radiotherapy in a single fraction of 10Gy at intervention pleural site in patient with malignant pleural mesothelioma: A retrospective monocentric cohort study ».
Carette H, Faivre JC, Salleron J, Baumann AS, Uwer L, Clément-Duchêne C, Vignaud JM, Petit I, Siat J, **Tiotiu A**, Beckendorf V.
Cancer Radiother. 2017;21:774-783.
3. **Hélène Beringuer** (Mémoire DES de Pneumologie – 2018), publication en Anglais
« Unexpected cause of recurrent haemoptysis ».
Beringuer H, Vaillant P, Chaouat A, **Tiotiu A**.
Vasc Med. 2019;24: 91-92.
4. **Antoine Legoff** (Mémoire DES de Médecine Interne – 2018), poster au Congrès de Médecine Interne 2014
« Anévrisme pulmonaire dans une maladie de Behçet : une nouvelle observation »
La Revue de Médecine Interne vol 35, Supplement December 2014 Page a151
5. **Laura Peretti** (Mémoire DES de Pneumologie – 2018), publication en Anglais
« A Long Time History of a Mediastinal Fibrosis with Triple Vascular Stenosis »
Peretti L, Vaillant P, Billon Y, Menard O, **Tiotiu A**
Current Respiratory Medicine Reviews 2018;14:177-180
6. **Aurelien Brindel** (Mémoire DES de Pneumologie – 2019), publication en Français
« Cause rare de miliaire pulmonaire : adénocarcinome bronchique avec mutation ROS1 »
« ROS-1 rearranged bronchopulmonary adenocarcinoma revealed by a pulmonary milary ».
Brindel A, Huet D, Vaillant P, Vignaud JM, **Tiotiu A**.
Bull Cancer. 2018;105:549-551.

7. **Pierre Thoré** (Mémoire DES de Pneumologie – 2019), publication en Français
« Uncontrolled Occupational Asthma: Talking About Comorbidities »
Thoré P, **Tiotiu A.**
Rev Mal Respir. 2019;36:633-637

8. **Brice Caput** (Mémoire DIU d'Oncologie thoracique – 2019), article en cours de rédaction
« Survie globale et sans récurrence des cancers bronchiques à petites cellules opérés : étude rétrospective unicentrique »

9. **Amaury Berrier** (Mémoire DES de Pneumologie – 2020), publication en Anglais
« Assessment of bronchial obstruction and its reversibility by shape indexes of the flow-volume loop in asthmatic children »
Berrier A, **Tiotiu A.**, Bonabel C, Richard D, Nguyen-Thi PL, Demoulin-Alexikova S, Schweitzer C, Ioan I.
Pediatr Pulmonol. 2021;56:226-233

10. **Lucile Roussel** (Mémoire DES de Pneumologie – 2022), publication en Anglais
«Pleural Effusion Occurring During Lung Cancer Immunotherapy: A Challenge for the Clinician»
Arch Bronconeumol. 2021 Jun 4:S0300-2896(21)00177-0. doi: 10.1016/j.arbres.2021.05.021

LISTE COMPLÈTE ET CLASSÉE DES PUBLICATIONS, OUVRAGES INTERNATIONAUX, COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS INTERNATIONALES

- 1- **A. Tiotiu**, C. Clément-Duchêne, P. Vaillant, Y. Martinet
“Anaphylactic reaction induced by Paclitaxel in the treatment of Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)”
International Journal of Clinical & Medical Allergy 2013; 1:101-102
- 2- **A. Tiotiu**, Y. Martinet
“Management with Erythropoietic Agents of Chemotherapy-induced Anemia in Patients with Lung Cancer”
Treatment Strategies - Respiratory 2013; 3: 67-70
- 3- M. Poussel, G. Bossier, S. Varechova, B. Demoulin, B. Chalon, O. Ruckebusch, **A. Tiotiu**, P. Renaud, C. Schweitzer, B. Chenuel
“Desensitization of the cough reflex during limb muscle contraction in anesthetized rabbits”
Pulmonary Pharmacology & Therapeutics 2014; 1: 96-101
- 4- **A. Tiotiu**, A. Brazdova, C. Longé, P. Gallet, M. Morisset, V. Leduc, C. Hilger, C. Broussard, R. Couderc, J. Sutra, H. Senechal, P. Poncet
“Urtica dioica pollen allergy: clinical, biological, and allergomics analysis”
Ann Allergy Asthma Immunol 2016; 117:527-534
- 5- N. Veziris, C. Bernard, L. Guglielmetti, D. Le Du, D. Marigot-Outtandy, M. Jaspard, E. Caumes, I. Lerat, C. Rioux, Y. Yazdanpanah, **A. Tiotiu**, N. Lemaitre, F. Brossier, V. Jarlier, J. Robert, W. Sougakoff and A. Aubry
“Rapid emergence of *Mycobacterium tuberculosis* bedaquiline resistance: lessons not to repeat past errors”
Eur Respir J 2017;49. pii: 1601719
- 6- **A. Tiotiu**, B. Chenuel, L. Foucaud, B. Demoulin, S. Demoulin-Alexikova, C. Christov, and M. Poussel
“Lack of desensitization of the cough reflex in ovalbumin-sensitized rabbits during exercise”
PlosOne 2017;12:e0171862
- 7- **A. Tiotiu**, Y. Martinet, R. Jankowski, P. Devillier
“Gamma globulin replacement therapy in uncontrolled, severe asthma associated with humoral immunodeficiency: a series of five case reports”
J Asthma. 2018; 8:1-5
- 8- S. Renaud, J. Seitlinger, F. Guerrero, J. Reeb, M. Beau-Faller, A. Voegeli, J. Siat, C. Clément-Duchêne, **A. Tiotiu**, N. Santelmo, L. Costardi, E. Ruffini, P. Falcoz, JM. Vignaud, G. Massard
“Prognostic value of exon 19 vs 21 *EGFR* mutations varies according to disease stage in surgically resected non-small-cell lung cancer adenocarcinoma”
Ann Surg Oncol. 2018;25:1069-1078.
- 9- F. Braido, **A. Tiotiu**, K. Kowal, S. Mihaicuta, P. Novakova, IK. Oguzulgen.
“Phenotypes/endotypes-driven treatment in asthma”.
Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2018;18:184-189.

- 10- A. Padilla Galo, M. Labor, **A. Tiotiu**, I. Baiardini, N. Scichilone, F. Braido
 "Impact of reslizumab on outcomes of severe asthmatic patients: current perspectives."
Patient Relat Outcome Meas. 2018;9:267-273
- 11- L. Peretti, P. Vaillant, Y. Billon, O. Menard, **A. Tiotiu**
 "A long time history of a mediastinal fibrosis with triple vascular stenosis"
Current Respiratory Medicine Reviews 2018;14:177-180
- 12- **A. Tiotiu**, D. Plavec, S. Novakova, S. Mihaicuta, P. Novakova, M. Labor, A. Bikov
 "Current opinions for the management of asthma associated with ear, nose and throat comorbidities"
Eur Respir Rev. 2018; 21;27. pii: 180056
- 13- **A. Tiotiu**
 "Biomarkers in asthma: state of the art"
Asthma Res Pract. 2018; 21;4:10. doi: 10.1186/s40733-018-0047-4.
- 14- H. Beringuer, P. Vaillant, A. Chaouat, **A. Tiotiu**
 "Images in vascular medicine. Unexpected cause of recurrent haemoptysis"
Vasc Med. 2019;24:91-92.
- 15- **A. Tiotiu**, C. Poreaux, P. Poncet, H. Senechal, JL. Schmutz
 "Is the high risk of anaphylaxis to omalizumab a contraindication to this treatment?"
Eur J Dermatol. 2019;29:101-102.
- 16- **A. Tiotiu**, I. Thaon, M. Poussel, E. Penven
 "Occupational Asthma Caused by Powder Paint in the Automotive Industry"
J Investig Allergol Clin Immunol. 2019;29:316-318
- 17- **A. Tiotiu**, P. Novakova, K. Kowal, A. Emelyanov, H. Chong-Neto, S. Novakova, M. Labor
 "Beta-blockers in asthma: myth and reality"
Expert Rev Respir Med. 2019; 13:815-822
- 18- P. Novakova, **A. Tiotiu**, I. Baiardini, B. Krusheva, H. Chong-Neto, S. Novakova
 "Allergen immunotherapy in asthma: current evidence"
J Asthma. 2019; 31:1-8. doi: 10.1080/02770903.2019.1684517.
- 19- **A. Tiotiu**, H. Salvator, R. Jaussaud, R. Jankowski, LJ. Couderc, E. Catherinot, P. Devillier
 "Efficacy of immunoglobulin replacement therapy and azithromycin in severe asthma with antibody deficiency".
Allergol Int. 2020;69:215-222
- 20- **A. Tiotiu**, J.P. Oster, P. Roux, P.L. Nguyen Thi, G. Peiffer, P. Bonniaud, J.C. Dalphin, F. de Blay
 "Omalizumab's effectiveness in severe allergic asthma and nasal polyps: a real-life study "
J Investig Allergol Clin Immunol. 2020;30:49-57
- 21- D.E.A. Komi, E. Mortaz, S. Amani, **A. Tiotiu**, G. Folkerts, I.M. Adcock
 "The Role of Mast Cells in IgE-Independent Lung Diseases"
Clin Rev Allergy Immunol. 2020;58:377-387
- 22- **A. Tiotiu**, M. Labor, D. Nedeva, S. Novakova, I. Kivilcim Oguzulgen, S. Mihaicuta, F. Braido
 "How to apply personalized medicine in the obese-asthma phenotype?"
Expert Rev Respir Med. 2020. doi: 10.1080/17476348.2020.1780123

- 23- F. Goehring, **A. Tiotiu**, E. Schvoerer, R. Jaussaud, B. Hoen
 “Maraviroc, a Future Treatment of Sarcoidosis? An Unexpected Drug Effect”
J Invest Allergol Clin Immunol. 2020. doi: 10.18176/jiaci.0537
- 24- **A. Tiotiu**, S. Novakova, M. Labor, A. Emelyanov, S. Mihaicuta, P. Novakova, D. Nedeva
 “Progress in occupational asthma”
Int J Environ Res Public Health. 2020;17:4553. doi: 10.3390/ijerph17124553
- 25- A. Bikov, I. Kivilcim, I. Baiardini, M. Contoli, A. Emelyanov, **A. Tiotiu** et al.
 “Beliefs and preferences regarding biological treatments for severe asthma”
World Allergy Organization Journal 2020; 13:100441
- 26- **A. Tiotiu**, P. Novakova, D. Nedeva, H.J. Chong-Neto, S. Novakova, P. Steiropoulos, K. Kowal
 “Impact of air pollution on asthma outcomes”
Int J Environ Res Public Health. 2020;17:E6212. doi: 10.3390/ijerph17176212
- 27- **A. Tiotiu**, N. Kermani, Y. Badi, S. Pavlidis, P.M. Hansbro, Y. Guo, K.F. Chung, I.M. Adcock
 “Sputum macrophage diversity and activation in asthma: role of severity and inflammatory phenotype”
Allergy. 2021;76:775-788. doi: 10.1111/all.14535
- 28- **A. Tiotiu**
 “Applying personalized medicine to adult severe asthma”
Allergy Asthma Proc 2021;42:e8-e16. doi: 10.2500/aap.2021.42.200100
- 29- **A. Tiotiu**, I. Ioan, M. Poussel, C. Schweitzer, S. Abdel Kafi
 “Comparative analysis between available challenge tests in the Hyperventilation Syndrome”
Respir Med. 2021;179:106329. doi: 10.1016/j.rmed.2021.106329
- 30- A. Berrier, **A. Tiotiu**, C. Bonabel, D. Richard, P.L. Nguyen-Thi, S. Demoulin-Alexikova, C. Schweitzer, I. Ioan
 “Assessment of bronchial obstruction and its reversibility by shape indexes of the flow-volume loop in asthmatic children”
Pediatr Pulmonol. 2021;56:226-233.
- 31- **A. Tiotiu**, P. Novakova, I. Baiardini, A. Bikov, H.J. Chong-Neto et al.
 “Manifesto on United Airways Diseases (UAD): An Interasma (Global Asthma Association - GAA) document”
J Asthma. 2021;1-33. doi: 10.1080/02770903.2021.1879130.
- 32- **A. Tiotiu**, I. Ioan, N. Wirth, R. Romero-Fernandez, F.J. Gonzalez-Barcala
 “The Impact of Tobacco Smoking on Adult Asthma Outcomes”
Int J Environ Res Public Health. 2021;18:992. doi:10.3390/ijerph18030992.
- 33- M. Ilie, J. Mazières, E. Chamorey, S. Heeke, J. Benzaquen, B. Thamphya, J. Boutros, **A. Tiotiu** et al.
 “Prospective multi-center validation of the detection of ALK rearrangements of circulating tumor cells for non-invasive longitudinal management of patients with advanced non-small cell lung cancer”
J Thorac Oncol. 2021;S1556-0864 :01664-6. doi: 10.1016/j.jtho.2021.01.1617

- 34- M. Poussel, I. Thaon, E. Penven, **A. Tiotiu**.
 “Pulmonary Function Testing in Work-Related Asthma: An Overview from Spirometry to Specific Inhalation Challenge”
Int J Environ Res Public Health. 2021;18:2325. doi: 10.3390/ijerph18052325.
- 35- **A. Tiotiu**.
 “Impact of COVID-19 on the Most Frequent Middle and Lower Obstructive Airway Diseases/Syndromes in Adult Population”
Arch Bronconeumol. 2021;S0300-2896 :00064-8. doi: 10.1016/j.arbres.2021.02.006
- 36- **A. Tiotiu**, P. Novakova, G. Guillermo, J. Correira de Sousa, F. Braido.
 “Management of adult asthma and chronic rhinitis as one airway disease”
Expert Rev Respir Med. 2021 May 31:1-13. doi: 10.1080/17476348.2021.1932470.
- 37- L. Roussel, A. Brindel, C. Pouget, G. Treffel, Y. Billon, P. Vaillant, **A. Tiotiu**.
 “Pleural Effusion Occurring During Lung Cancer Immunotherapy: A Challenge for the Clinician”
Arch Bronconeumol. 2021 Jun 4:S0300-2896(21)00177-0. doi: 10.1016/j.arbres.2021.05.021

PUBLICATIONS NATIONALES

- 1- D. Todea, **A. Tiotiu**, N. Ariesanu, C. Zamora
 “The etiopathogenesis of bronchectasies”
Clujul Medical, 2004; 2: 231-7. Romanian
- 2- D. Todea, **A. Tiotiu**, D. Tiotiu, C. Zamora
 "Ex-vacuo pulmonary oedema - aetiology, diagnosis, treatment"
Clujul Medical, 2004; 4:631-9. Romanian
- 3- **A. Tiotiu**, D. Todea, D. Tiotiu, V. Sandor
 “The distribution and polymorphism of beta-2-adrenoreceptors in the bronchi “
Pneumologia. 2005; 4: 177-80. Romanian.
- 4- D. Todea, **A. Tiotiu**
 “The diagnostic and therapeutic management in allergic alveolitis”
Sibiul Medical, 2006; 3:256-260. Romanian
- 5- **A. Tiotiu**, O. Mairesse, G. Hoffmann, D. Todea, A. Nosedá
 “Body position and breathing abnormalities during sleep: a systematic study”
Pneumologia 2011; 4:216-221
- 6- **A. Tiotiu**, C. Metz-Favre, G. Reboux, R. Kessler, F. de Blay
 “Hypersensitivity pneumonitis related to *Penicillium chrysogenum* and mesophilic *Streptomyces*: The usefulness of Medical Indoor Environment Councilor (MIEC)”
Rev Pneumol Clin 2013; 5:278-282. French
- 7- B. Godbert, **A. Tiotiu**, C. Masias, Y. Martinet
 “Inadequate secretion of β -human chorionic gonadotropin in lung cancer”
Rev Pneumol Clin 2013; 5:298-301. French

- 8- **A. Tiotiu**, C. Clément-Duchene, Y. Martinet
 "Management of chemotherapy-induced anemia in lung cancer"
Rev Mal Respir, 2015; 8: 809-821. French
- 9- A. Villemain, O. Menard, D. Mandry, J. Siat, JM. Vignaud, Y. Martinet, **A. Tiotiu**.
 "Paraneoplastic hypoglycemia: The hopes of pathophysiological documentation"
Rev Pneumol Clin. 2017; 3:140-145. French
- 10- H. Carette, JC. Faivre, J. Salleron, AS. Baumann, L. Uwer, C. Clément-Duchêne, JM. Vignaud, I. Petit, J. Siat, **A. Tiotiu**, V. Beckendorf
 "Prophylactic radiotherapy in a single fraction of 10Gy at intervention pleural site in patient with malignant pleural mesothelioma: A retrospective monocentric cohort study"
Cancer Radiother. 2017; 8:774-783. French
- 11- A. Brindel, D. Huet, P. Vaillant, JM. Vignaud, **A. Tiotiu**
 "ROS-1 rearranged bronchopulmonary adenocarcinoma revealed by a pulmonary miliary"
Bull Cancer. 2018 Apr 26. pii: S0007-4551(18)30124-3.French
- 12- A. Knoepfli, P. Vaillant, Y. Billon, M. Zysman, O. Menard, **A. Tiotiu**
 "The impact of the patient's age on the delay of the lung cancer treatment"
Bull Cancer. 2019;106:421-430. French
- 13- P. Thoré P, **A. Tiotiu**
 "Uncontrolled occupational asthma: Talking about comorbidities"
Rev Mal Respir. 2019;36:633-637. French
- 14- **A. Tiotiu**, Y. Billon, P. Vaillant, O. Menard, P. Hofman, C. Mascaux
 "Therapeutic strategies in advanced ALK positive non-small cell lung cancer"
Rev Mal Respir. 2019;36:1107-1116
- 15- A. Villemain, B. Ribeiro Baptista, N. Paillot, M. Soudant, O. Menard, Y. Martinet, **A. Tiotiu**
 "Predictive factors for skeletal-related events in lung cancer"
Rev Mal Respir. 2020;37:111-116
- 16- G. Peiffer, M. Underner, J. Perriot, A.M. Ruppert, **A. Tiotiu**
 "Sevrage tabagique et dépistage du cancer du poumon"
Rev Mal Respir. 2020;37:722-734.

OUVRAGES INTERNATIONAUX

- 1- **A. Tiotiu**, KF. Chung
 "Defining Molecular Phenotypes or Endotypes of Severe Asthma: Towards Treatable Mechanisms"
 eBook: "Allergy, Asthma, COPD, Immunophysiology & Immunorehability: Innovative technologies" 2019, Filodiritto Editore, p. 87-98
- 2- **A. Tiotiu**, KF. Chung
 "Personalised Approach to Severe Asthma"
 eBook: "Allergy, Asthma, COPD, Immunophysiology & Immunorehability: Innovative technologies" 2019, Filodiritto Editore, p. 123-136

MANUSCRITS EN COURS D'EVALUATION

1. **Tiotiu A**, Badi Y, Zounemat Kermani N, Sanak M, Kolmert J, Wheelock C, Hansbro PM, Dahlen SE, Sterk PJ, Djukanovic R, Guo Y, Adcock IM, Chung KF, *on behalf of the U-BIOPRED consortium project team*
“Phenotypic characteristics of severe asthma from differential mast cell activation signatures” version révisée envoyée dans *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (classe A, IF=17.452)
2. Liu G, Jarnicki A, **Tiotiu A**, Fricker M, Dua K, Zounemat Kermani N, Adcock IM, Wark P, Oliver B, Stevens R, Hansbro PM
“Adverse roles of mast cell chymase-1 in human and experimental chronic obstructive pulmonary disease” soumis dans *European Respiratory Journal* (classe A, IF=12.339)
3. **Tiotiu A**, Chong Neto H, Bikov A, Kowal K, Steiropoulos P, Labor M, Cherrez-Ojeda I, Badellino H, Emelyanov A, Garcia R, Guidos G
“Impact of the COVID-19 pandemic on the management of chronic non-infectious respiratory diseases” accepté dans *Expert Review of Respiratory Medicine* (classe C, IF=2.622)

COMMUNICATIONS

1. « Clinical and Genetics of the Charcot-Marie-Tooth Disease » - Oral communication
Congress of University of Medicine of Cluj-Napoca, Romania (1998)
2. « Heritability in psoriasis » - Oral communication
3rd National Congress of Medical students, Sibiu, Romania (1999)
3. « The role of hepatobiliary sequential scintigraphy in the differential diagnosis of bile duct abnormalities » -Oral communication
Medical students Congress, Iasi, Romania (1999)
4. « Changes in Doppler parameters in renal arteries in patients with acute urinary obstruction » - Oral communication
Medical students Congress, Iasi, Romania (1999)
5. « Comparative study of radiography of the cervical spine and medullary MRI in cervical myelopathy » - Oral communication
« Medis Congress », Timisoara, Romania (1999)
6. « The role of bone scintigraphy in rheumatic diseases » - Oral communication
Medical students Congress, Craiova, Romania (1999)
7. « The influence of genetics in lung cancer » - Oral communication
Medical students Congress, Craiova, Romania (1999)
8. « The influence of narcotics on the electrical activity of cerebral mice » - Oral communication
Medical students Congress, Iasi, Romania (2000)
9. « A radiological investigation algorithm in the aorta pathology » - Oral communication

Medical students Congress, Iasi, Romania (2000)

10. « The contribution of medical imaging in the diagnosis of hepatic hydatid cyst » - Oral communication
The 4th Balkan Congress in Medicine, Craiova, Romania (2000)
11. « Ig A nephropathy: clinical and histological correlations, therapeutic aspects » - Oral communication
« Medicalis » Congress, Cluj-Napoca, Romania (2001)
12. « Diagnostic concordance between the general practitioner and the specialist in rheumatology » -Oral communication
« Medicalis » Congress, Cluj-Napoca, Romania (2001), National Congress in Rhumatology OSART, Cluj, Romania (2002)
13. « Virtual reality - a certainty in modern radiology »- Oral communication,
Medical students Congress, Cluj-Napoca, Romania (2001)
14. « Immunotherapy with anti-TNF α in the treatment of rheumatoid arthritis - clinical experience with Infliximab » - Oral communication,
Medical students Congress, Cluj-Napoca, Romania (2002)
15. « Immuno-serological and immuno-histological changes in IgA nephropathy » - Oral communication,
Congress « Medica », Oradea, Romania (2003)
16. « Diagnostic difficulties in solitary pulmonary nodule » - Poster
National Symposium in Pneumology, Gura Humorului, Romania (2004)
17. « Diagnostic in pulmonary sarcoidosis » - Poster
National Symposium in Pneumology, Gura Humorului, Romania (2004)
18. « The implication of gastroesophageal reflux in patients with chronic cough » -Poster
Congress of chest physicians INSPIRIASI, Iasi, Romania (2004)
19. « Clinical and functional respiratory improvement by weight loss in a patient with hypoventilation-obesity syndrome"- Poster
Congress of chest physicians INSPIRIASI, Iasi, Romania (2004)
20. « Etiologies of middle lobe syndrome » - Poster
Congress of chest physicians INSPIRIASI, Iasi, Romania (2004)
21. « The polymorphism of bronchial β -adrenergic receptors » - Oral communication
Congress of chest physicians INSPIRIASI, Iasi, Romania (2004)
22. « Isoprenaline -verapamil interactions in experimental cardiac hypertrophy » -Oral communication
Congress of chest physicians INSPIRIASI, Iasi, Romania (2004)
23. « The prevalence of active smoking and nicotine dependence in medical students of University of Cluj-Napoca » - Poster
Congress of chest physicians INSPIRIASI, Iasi, Romania (2004)
24. « Clinical-radiological and respiratory functional correlations in pulmonary sarcoidosis » - Poster

- The 8th National Congress of Young doctors, Bucharest, Romania (2004)
25. « Diagnostic landmarks in pulmonary sarcoidosis » - Poster
Congress of students in Medicine, Cluj-Napoca, Romania (2004)
 26. « Clinical and epidemiological aspects of multifocal pneumonia » - Poster
Congress of chest physicians INSPIRIASI, Romania (2005)
 27. « Antibiotic resistance of etiological agents of pneumonia » - Poster
Medical students Congress Cluj-Napoca, Romania (2005)
 28. « Comparative Evaluation of the Indoor and Outdoor Pollution by Nitrogen Oxides in Cluj-Napoca by Burning Fossil Fuels in Small Heating Devices” -Poster
EnvEdu Congress, Brasov, Romania (2006)
 29. « Determination of NO, NO₂ and CO concentrations in Combustion Gases Evacuated Through the Horizontal Stacks of the Small Heating Devices” -Poster
EnvEdu Congress, Brasov, Romania (2006)
 30. « The contribution of ergospirometry in hyperventilation syndrome » - Poster
SPLF Congress, Lille, France (2008)
 31. « Accuracy of echocardiography to detect pulmonary hypertension in severe COPD » - Poster
ERS Congress, Vienna, Austria (2009)
 32. «Contribution of echocardiography in the evaluation of pulmonary hypertension associated with severe COPD » - Oral communication
SPLF Congress, Marseille, France (2010)
 33. « Diffuse pulmonary calcifications » - Poster
SPLF Congress, Marseille, France (2010)
 34. « Does inappropriate secretion of chorionic gonadotropin beta hormone during lung adenocarcinoma exist? » - Poster
SPLF Congress, Marseille, France (2010)
 35. « Efficacy and safety of erythropoietic agents in anemic patients with lung cancer » - Poster
ERS Congress, Barcelona, Spain (2010)
 36. « Body position and breathing abnormalities during sleep: a systematic study » - Poster
ERS Congress, Barcelona, Spain (2010)
 37. « Chemo-induced hypersensitivity reactions in patients with lung cancer » -Poster
The 6th French Congress of Allergology, Paris, France (2011)
 38. « Utility of ergospirometry in the diagnosis of hyperventilation syndrome (HVS) » - Oral Communication
ERS Congress, Amsterdam, Netherlands (2011)
 39. « Comparative study of hemodynamics at exercise in the patients with pulmonary hypertension secondary to COPD (HTPs) *versus* the patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension (PAHP) » - Oral communication

SPLF Congress, Lyon, France (2012)

40. «Hypersensitivity pneumonitis to *Penicillium chrysogenum* and *Streptomyces mesophile*: interest of the environmental survey at home»- Oral Communication
The 7th French Congress of Allergology, Paris, France; EAACI Congress Geneva, Swiss;
ERS Congress, Vienna, Austria (2012)
41. «Hypersensitivity reactions to chemotherapeutic agents in advanced lung cancer » - Poster
EAACI Congress, Geneva, Swiss (2012)
42. «Management of chemotherapy-induced anemia in patients with lung cancer (LC): a comparative study of erythropoietic agents » - Oral Communication
ERS Congress, Vienna, Austria (2012)
43. « Impact of anxiety and depression in asthma control » - Poster
EAACI Congress, Milan, Italy; ERS Congress, Barcelona, Spain (2013)
45. « Pulmonary anevrysm in Behçet's disease: a new observation » - Poster
Internal Medicine Congress, Paris, France (2014)
46. « Evaluation of efficacy and tolerability of erythropoiesis-stimulating agents in chemotherapy induced anemia in lung cancer patients » - Poster
SPLF Congress, Lille, France (2015)
47. « Gamma globulin (Ig) replacement– a potential treatment in uncontrolled asthma associated with humoral immunodeficiency (hulD)? » - Poster
EAACI Congress, Barcelona, Spain; ERS Congress, Amsterdam, Netherlands (2015)
48. «Efficiency of erythropoiesis-stimulating agents (ESA) in the treatment of chemotherapy-induced anemia in patients with lung cancer (LC)» - Oral communication
ERS Congress, Amsterdam, Netherlands (2015)
49. « Predictive factors of survival in patients with lung cancer and bone metastasis » - Poster
SPLF Congress, Lille, France (2016)
50. « A comparative study of cisplatin-etoposide *versus* carboplatin-paclitaxel chemotherapy regimens used in the concomitant radiochemotherapy of non-operable stage III non-small cell lung cancer: retrospective analysis in the Department of Pulmonology of Nancy University between 2008 and 2014 » -Poster
SPLF Congress, Lille, France (2016)
51. « Allergens of nettle pollen (*Urtica dioica*) » - Poster
French Congress of Allergology, Paris, France (2016)
52. « Clinical benefits and risks associated with darbepoetin alfa and epoetin alfa treatment in patients with lung cancer and chemotherapy-induced anemia » -Poster
ASCO Congress, Chicago, USA (2016)
53. «Influence of ovalbumine sensitisation on the down-regulation of cough during exercise in rabbits» - Poster
FEPS Congress, Paris, France (2016)
54. « Influence of tobacco smoking on asthma control » - Oral communication
ERS Congress, London, UK (2016)

55. « Gamma globulin (Ig) replacement– a potential treatment in uncontrolled asthma associated with humoral immunodeficiency (hulD) ? » - Poster
ESID Congress, Barcelona, Spain (2016)
56. « Influence of the age of the patient on the delay in therapeutic management of lung cancer : experience in CHRU Nancy » - Poster
SPLF Congress, Marseille, France (2017)
57. « Prophylactic radiotherapy in a single fraction of 10Gy at intervention pleural site in patient with malignant pleural mesothelioma: A retrospective monocentric cohort study » - Poster
SPLF Congress, Lyon, France (2018)
58. « Traitement par Nivolumab dans le cancer bronchique non à petites cellules et manifestations d'effets indésirables d'origine immunologique : un signe d'efficacité ? »
Hopipharm Congress, Marseille, France (2019)
59. « Differential macrophage activation in asthmatic sputum using U-BIOPRED transcriptomics » - Poster
ERS Congress, Madrid, Spain (2019)
60. « Prognostic value of KRAS mutations in advanced lung adenocarcinoma treated by immunotherapy » – Oral communication
SPLF Congress, Marseille, France (2020)
61. « Comparisons of outcomes between first and second generations EGFR-TKIs in stage IV non-small cell lung cancer harboring EGFR mutations » – Poster
SPLF Congress, Marseille, France (2020)
62. « Differential mast cell activation by transcriptomic signature analysis in the U-BIOPRED severe asthma cohort » - Oral communication
ERS Congress, Vienna, Austria (2020) ; SPLF Congress, France (2021)
63. « Répartition et facteurs pronostiques de l'addiction oncogénique dans l'adénocarcinome broncho-pulmonaire métastatique : une étude rétrospective monocentrique au CHRU de Nancy » - Poster
SPLF Congress, France (2021)

CONFERENCES *INVITEES

- 1 « Place de l'éducation thérapeutique face à un asthme non-contrôlé »
Semaine Médicale de Lorraine
Nancy, novembre 2010, Faculté de Médecine
- 2 «Le traitement par anti-IgE »
Semaine Médicale de Lorraine
Nancy, novembre 2010, Faculté de Médecine
- *3 «Asthme de A à Z : conférence débat »
Association des patients ALIRAS
Mairie de Nancy, octobre 2012, Nancy
- 4 « Asthme et comorbidités (tabac, pathologie ORL, obésité) »
Semaine Médicale de Lorraine
Nancy, novembre 2012, Faculté de Médecine
- 5 « Poumon et hyperéosinophilie »
Semaine Médicale de Lorraine
Nancy, novembre 2012, Faculté de Médecine
- 6 « Impact de l'environnement intérieur sur l'apparition et le contrôle de l'asthme »
Semaine Médicale de Lorraine
Nancy, novembre 2013, Faculté de Médecine
- *7 « Eveil nocturne, asthme ou apnée du sommeil ? »
Association des patients AIRAS
Domaine de Charmois, mai 2014, Vandoeuvre-lès-Nancy
- 8 « Conduite à tenir devant une toux chronique de l'adulte »
Semaine Médicale de Lorraine
Nancy, novembre 2014, Faculté de Médecine
- *9 « Tabac & Asthme : interactions thérapeutiques »
Association des tabacologues lorrains Tab'Actu
Nancy, novembre 2015, Faculté de Médecine
- 10 « Suivi d'un asthme au cabinet : questions/réponses à propos de 2 cas cliniques »
Semaine Médicale de Lorraine
Nancy, novembre 2015, Faculté de Médecine
- *11 « Asthme sévère : de la physiopathologie aux phénotypes »
Collège Lorrain de Pathologie Thoracique
Metz, septembre 2017
- *12 « Rôle de l'allergie dans l'asthme sévère : actualités thérapeutiques »
Association des allergologues lorrains ADALOR
Nancy, octobre 2019, CHRU Nancy
- *13 « Quelle est la place du traitement anti-inflammatoire comme traitement de secours dans l'asthme ? »
Congrès de la Société de Médecine d'Urgence
Marseille, juin 2021

ACTIVITE DE REVIEWING

2020 –reviewer du Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology (classe C, IF=5.172)

Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology (classe C, IF=5.172)

“Pollen-induced allergic asthma and rhinoconjunctivitis outcomes clearly differ between seasonal exposure and out of the pollen season: The LANDSCAPE STUDY”.

Pulmonary Pharmacology and Therapeutics (classe C, IF=2.681)

“Real-World Evaluation of the Clinical Safety and Efficacy of Fluticasone/Formoterol FDC via the Revolizer® in Patients with Persistent Asthma in India”

COPIE DES 5 PUBLICATIONS LES PLUS SIGNIFICATIVES

1. Allergy (Rang A ; IF =8.705)

A. Tiotiu, N. Kermani, Y. Badi, S. Pavlidis, P.M. Hansbro, Y. Guo, K.F. Chung, I.M. Adcock
“Sputum macrophage diversity and activation in asthma: role of severity and inflammatory phenotype”
Allergy. 2020 Aug 1. doi: 10.1111/all.14535

2. Annals of Allergy, Asthma & Immunology (Rang B ; IF = 4.969)

A. Tiotiu, A. Brazdova, C. Longé, P. Gallet, M. Morisset, V. Leduc, C. Hilger, C. Broussard, R. Couderc, J. Sutra, H. Senechal, P. Poncet
“Urtica dioica pollen allergy: clinical, biological, and allergomics analysis”
Ann Allergy Asthma Immunol 2016; 117:527-534

3. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology (Rang C ; IF = 5.172)

A. Tiotiu, JP. Oster, P. Roux, PL Nguyen Thi, G. Peiffer, P. Bonniaud, JC. Dalphin, F. de Blay
“Omalizumab's effectiveness in severe allergic asthma and nasal polyps: a real-life study ”.
J Investig Allergol Clin Immunol. 2019 ; 1:0. doi: 10.18176/jiaci.0391

4. Allergology International (Rang B ; IF = 4.806)

A. Tiotiu, H. Salvator, R. Jaussaud, R. Jankowski, L.J. Couderc, E. Catherinot, P. Devillier
“Efficacy of immunoglobulin replacement therapy and azithromycin in severe asthma with antibody deficiency”.
Allergol Int. 2020;69:215-222

5. PLoS One (Rang B ; IF =3.057)

A. Tiotiu, B. Chenuel, L. Foucaud, B. Demoulin, S. Demoulin-Alexikova, C. Christov, M. Poussel
“Lack of desensitization of the cough reflex in ovalbumin-sensitized rabbits during exercise”.
PLoS One. 2017 Feb 9;12(2):e0171862 doi: 10.1371/journal.pone.0171862



ORIGINAL ARTICLE

Asthma and Lower Airway Disease



WILEY

Sputum macrophage diversity and activation in asthma: Role of severity and inflammatory phenotype

Angelica Tiotiu^{1,2} | Nazanin Zounemat Kermani³ | Yusef Badi^{1,3} | Stelios Pavlidis^{1,3} | Philip M. Hansbro^{4,5} | Yi-Ke Guo³ | Kian Fan Chung¹ | Ian M. Adcock^{1,4} | the U-BIOPRED consortium project team

¹National Heart and Lung Institute, Imperial College London, London, UK

²Department of Pulmonology, University Hospital of Nancy, Nancy, France

³Department of Computing, Data Science Institute, Imperial College London, London, UK

⁴Priority Research Centre for Healthy Lungs, Hunter Medical Research Institute, The University of Newcastle, Newcastle, NSW, Australia

⁵Centre for Inflammation, Centenary Institute and University of Technology Sydney, Sydney, NSW, Australia

Correspondence

Ian M. Adcock, Respiratory Division, National Heart and Lung Institute, Imperial College London, Dovehouse Street, London, SW3 6LY UK.
Email: ian.adcock@imperial.ac.uk

Abstract

Background: Macrophages control innate and acquired immunity, but their role in severe asthma remains ill-defined. We investigated gene signatures of macrophage subtypes in the sputum of 104 asthmatics and 16 healthy volunteers from the U-BIOPRED cohort.

Methods: Forty-nine gene signatures (modules) for differentially stimulated macrophages, one to assess lung tissue-resident cells (TR-Mφ) and two for their polarization (classically and alternatively activated macrophages: M1 and M2, respectively) were studied using gene set variation analysis. We calculated enrichment scores (ES) across severity and previously identified asthma transcriptome-associated clusters (TACs).

Results: Macrophage numbers were significantly decreased in severe asthma compared to mild-moderate asthma and healthy volunteers. The ES for most modules were also significantly reduced in severe asthma except for 3 associated with inflammatory responses driven by TNF and Toll-like receptors via NF-κB, eicosanoid biosynthesis via the lipoxygenase pathway and IL-2 biosynthesis (all $P < .01$). Sputum macrophage number and the ES for most macrophage signatures were higher in the TAC3 group compared to TAC1 and TAC2 asthmatics. However, a high enrichment was found in TAC1 for 3 modules showing inflammatory pathways linked to Toll-like and TNF receptor activation and arachidonic acid metabolism ($P < .001$) and in TAC2 for the inflammasome and interferon signalling pathways ($P < .001$). Data were validated in the ADEPT cohort. Module analysis provides additional information compared to conventional M1 and M2 classification. TR-Mφ were enriched in TAC3 and associated with mitochondrial function.

Conclusions: Macrophage activation is attenuated in severe granulocytic asthma highlighting defective innate immunity except for specific subsets characterized by distinct inflammatory pathways.

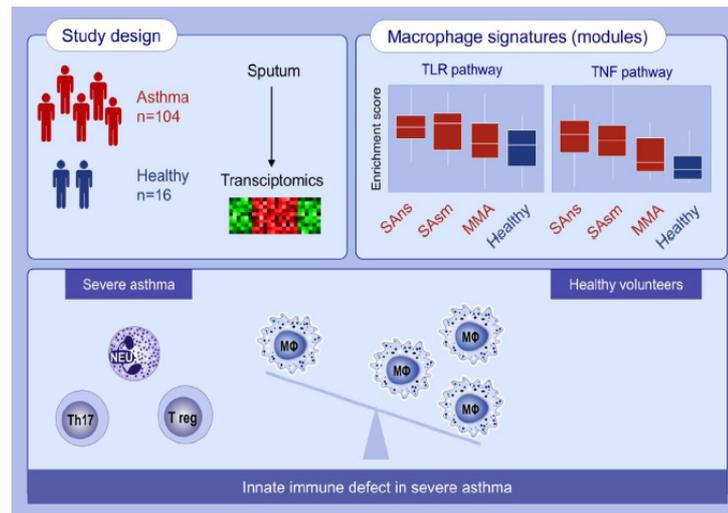
Consortium project team members are listed under Acknowledgments

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Allergy* published by European Academy of Allergy and Clinical Immunology and John Wiley & Sons Ltd

KEYWORDS

asthma, gene set variation analysis, macrophage subtypes, sputum, tissue-resident



GRAPHICAL ABSTRACT

This study investigates gene signature of macrophage phenotypes in sputum of asthmatic and healthy controls. Several specific macrophage subsets identified by gene signatures are highly activated in severe granulocytic asthma and involved distinct inflammatory pathways (eg tumour necrosis factor [TNF] and Toll-like receptor [TLR] signalling pathways). Macrophage activation and numbers are reduced in severe granulocytic asthma highlighting defective innate immunity.

1 | INTRODUCTION

Asthma is a heterogeneous disease driven by diverse inflammatory mechanisms, which presents in various clinical forms. Severe asthma is a clinically defined subset of asthma that remains partly or totally unresponsive to known asthma treatments.¹ Both recruited inflammatory and resident airway structural cells participate in the inflammatory and remodelling processes associated with asthma phenotypes.² Recently, type-2-related and non-type-2-related molecular phenotypes or transcriptomic-associated clusters (TACs) have been described.³ TACs were derived from clustering of differentially expressed genes identified in the sputum of asthmatic patients and provide mechanistic pathways beyond eosinophilic subtyping.

Macrophages within the lung play a role in the control of both innate and acquired immunity, tissue homeostasis, angiogenesis and metabolism.⁴ Hallmarks of macrophages are their plasticity and diversity. Two populations of macrophages coexist in the lung: (a) tissue-resident macrophages (TR-Mφ) that arise during embryogenesis are associated with proliferation and defined by Krebs cycle, amino acid and fatty acid (FA) metabolic processes and (b) recruited macrophages that originate postnatally from circulating monocytes and are involved in immune signalling and inflammation and defined by glycolysis and arginine metabolism.⁵ Tissue damage or infection results in TR-Mφ activation with production of inflammatory mediators,

together with monocyte recruitment.^{4,6} Cytokines drive macrophage polarization (diversity) with two classical subtypes according to their functional properties: classically activated M1 driven by IFN- γ , LPS, GM-CSF or TNF- α exposure and alternatively activated M2 macrophages induced by IL-4, IL-10, IL-13, glucocorticoids or TLR ligands.⁴ While M1 macrophages have pro-inflammatory properties and are associated with Th1 responses, M2 macrophages control inflammation through the high expression of IL-10 and are involved in Th2-mediated immunity.^{4,7}

The role of macrophages in asthma pathogenesis is unclear because of the limited methods available to characterize them.⁶ Current data suggest that the presence of M1 macrophages is associated with disease progression and airway remodelling, M2 macrophages are associated with type-2 asthma^{4,8} and the role of TR-Mφ remains unknown. However, human monocyte-derived macrophages stimulated with 28 different stimuli produced 49 distinct transcriptomic modules highlighting the spectrum of macrophage diversity.⁹

We hypothesized that analysis of these 49 macrophage transcriptomic signatures will indicate activation of distinct macrophage subsets in severe asthma. We assessed this using gene set variation analysis (GSVA) using sputum cells from the U-BIOPRED (Unbiased BIOMarkers in PREDiction of respiratory disease outcomes) asthma cohort¹⁰ with validation in the ADEPT (Airway Disease Endotyping for Personalized Therapeutics) cohort.¹¹ This is the first comprehensive analysis of airway macrophage subtypes in asthma.

TABLE 1 Characteristics of study participants from U-BIOPRED cohort providing sputum transcriptomics

	Severe asthma		Mild-moderate asthma	Healthy volunteer	P-value
	Nonsmoking	Smoking			
Subjects n	61	23	20	16	
Age years	53.89 ± 12.14	52.65 ± 11.15	42.05 ± 15.85	38.06 ± 13.27	<.001
Female n (%)	37 (60.66)	12 (52.17)	11 (55)	4 (25)	<.001
BMI kg/m ²	27.90 ± 5.26	29.40 ± 4.98	25.76 ± 4.96	25.71 ± 2.79	.034
Current smoking n (%)	0 (0)	8 (34.78)	0 (0)	0 (0)	<.001
Atopy n (%)	42 (68.85)	13 (56.52)	16 (80)	5 (31.25)	<.001
Comorbidities					
Allergic rhinitis n (%)	24 (39.34)	7 (30.43)	11 (55)	2 (12.50)	.020
Eczema n (%)	17 (27.87)	9 (39.13)	7 (35)	0 (0)	.046
Nasal polyposis n (%)	22 (36.07)	8 (34.78)	4 (20)	1 (6.25)	.049
Oral corticosteroids daily	22 (36.07)	12 (52.17)	0 (0)	NA	<.001
Exacerbations number/year	2.41 ± 2.01	2.35 ± 2.59	0.45 ± 0.76	NA	<.001
ACQ5	2.26 ± 1.31	2.14 ± 1.20	1.00 ± 0.75	NA	<.001
Lung function					
FEV1% predicted	61.25 ± 21.66	67.87 ± 18.01	92.45 ± 13.00	105.90 ± 10.29	<.001
FVC % predicted	87.25 ± 18.53	95.38 ± 19.37	108.57 ± 14.32	113.58 ± 10.49	<.001
FEV1/FVC ratio	0.55 ± 0.13	0.59 ± 0.09	0.71 ± 0.08	0.79 ± 0.03	<.001
FeNO ppb	40.84 ± 39.64	27.04 ± 19.67	40.37 ± 33.92	19.71 ± 9.86	<.001
Sputum cells (%)					
Eosinophils	13.93 ± 21.12	12.83 ± 15.72	1.82 ± 3.07	0.12 ± 0.25	<.001
Neutrophils	60.09 ± 27.73	55.97 ± 19.65	50.01 ± 25.48	43.16 ± 25.85	.030
Lymphocytes	1.26 ± 1.34	1.39 ± 0.88	1.11 ± 1.17	1.26 ± 1.01	.987
Macrophages	24.69 ± 21.47	29.78 ± 19.49	47.02 ± 24.45	55.45 ± 25.67	<.001
Mast cells	0.03 ± 0.08	0.02 ± 0.08	0.04 ± 0.08	0.01 ± 0.05	.404
Sputum cells count ×10 ³ /μL					
Total cells	590.51 ± 122.94	602.29 ± 93.99	614.50 ± 91.01	680.47 ± 149.15	.004
Eosinophils	71.03 ± 107.72	69.70 ± 86.61	10.45 ± 17.89	0.63 ± 1.31	<.001
Neutrophils	315.90 ± 149.14	297.91 ± 104.02	270.55 ± 252.50	228.81 ± 140.25	.039
Macrophages	132.36 ± 123.50	158.26 ± 103.48	253.45 ± 133.56	289.13 ± 133.67	<.001
Blood cells ×10 ³ /μL					
Eosinophils	0.38 ± 0.33	0.30 ± 0.15	0.21 ± 0.11	0.13 ± 0.09	<.001
Neutrophils	5.20 ± 2.35	5.99 ± 2.42	3.69 ± 1.22	3.85 ± 1.55	.009
Serum markers					
Total IgE IU/mL	234.14 ± 417.61	377.14 ± 513.62	336.04 ± 861.59	113.66 ± 172.99	.089
Periostin ng/mL	53.01 ± 18.45	51.49 ± 17.94	45.79 ± 10.77	47.33 ± 5.38	.059
IL-13 pg/mL	1.07 ± 1.56	0.63 ± 0.38	0.68 ± 0.44	0.36 ± 0.21	.003
Eotaxin pg/mL	140.84 ± 80.77	109.35 ± 41.20	92.06 ± 45.18	92.19 ± 37.03	.001
TNF-α pg/mL	1.97 ± 0.57	1.96 ± 0.65	1.88 ± 0.79	1.71 ± 0.33	.028
IL-6 pg/mL	1.33 ± 1.22	1.05 ± 0.49	0.83 ± 0.73	0.52 ± 0.26	<.001
IFN-γ pg/mL	9.99 ± 9	7.84 ± 7.49	9.81 ± 7.50	6.95 ± 3.86	0.057
MCP1 pg/mL	122.18 ± 38.02	113.25 ± 42.32	92.02 ± 31.14	85.16 ± 20.19	<.001
CCL18 pg/mL	217.04 ± 125.40	193.78 ± 70.60	148.41 ± 109.45	107.20 ± 58.76	<.001
CRP mg/L	8.31 ± 16.18	3.17 ± 3.01	2.04 ± 2.74	0.89 ± 0.73	<.001

Note: Data are presented in mean ± SD.

Abbreviations: ACQ5, Asthma Control Questionnaire 5; BMI, body mass index; CCL18, C-C motif chemokine ligand 18; CRP, C-reactive protein; FeNO, fractional exhaled nitric oxide; FEV1, forced expiratory volume in 1s; FVC, forced vital capacity; IFN-γ, interferon gamma; Ig E, immunoglobulin E; IL-13, interleukin 13; IL-6, interleukin 6; MCP1, monocyte chemoattractant protein 1; NA, not applicable; TNF-α, tumour necrosis factor.

TABLE 2 Description of macrophage modules according to stimuli and corresponding pathways and functions (KEGG 2019, Reactome 2016, WikiPathways Humans 2019)

Module	Stimuli	Function
1	Fatty acids (LA, OA)	Glycolysis/gluconeogenesis, metabolism of carbohydrates, biosynthesis of amino acids
2	Fatty acids (LA)	Methionine de novo and salvage pathway, cysteine and methionine metabolism, ribosome biogenesis
3	M1 (LPS, LPS + IFN- γ)	Vesicle biogenesis by lysosome and vesicle-mediated transport, development of macrophages and dendritic cells, IL-6 signalling pathway
4	Fatty acids (OA, PA)	Mitochondrial fatty acid beta-oxidation of saturated fatty acids, ligand-independent caspase activation, TRAF6-mediated activation in TLR7/8 or 9, regulation of neutrophil-mediated immunity and degranulation
5	Fatty acids (PA, OA, LA)	Protein processing in endoplasmic reticulum, base excision repair, cellular response to sterol depletion
6	Fatty acids (OA, LA, PA)	Carbohydrate metabolism, negative regulation of leucocyte leucocytes degranulation, positive regulation of IL-8 secretion
7	M1 (IFN- γ)	Interferon-signalling pathways, antiviral mechanism by interferon stimulated genes, IL-10 anti-inflammatory signalling pathway
8	M1 (IFN- γ , IFN- γ + TNF- α)	Phagosome, type II interferon signalling pathway (IFN- γ), Toll-like receptor signalling pathway
9	M1 (IFN- γ + TNF- α , IFN- γ)	Aminoacyl-tRNA biosynthesis, signalling by WNT, positive regulation of TNF-mediated signalling pathway
10	M2 (IL-4, IL-10)	Ribosome, electron transport chain in mitochondria, interferon type I signalling pathway
11	M2 (IL-4, IL-13)	Modulation of viral transcription, ribosome
12	M2 (IL-4)	Galactose, fructose, mannose metabolism, target of rapamycin (mTOR) signalling pathway, regulation of TP53 activity
13	M2 (IL-4, IL-13)	Oxidative phosphorylation and citrate cycle in mitochondria, regulation of leucocyte activation, Toll-like receptor 2 signalling pathway, positive regulation of TNF- α biosynthesis
14 (SAsm)	M2 (IL-4, IL-13)	Phagosome-lysosome fusion ($r = .60, P < .001$)
15	M2 (IL-4, IL-13)	Inflammatory response, neutrophil chemotaxis ($r = .55, P < .001$) Toll-like receptors (1, 2, 4, 6) pathway ($r = .67, P < .001$) IL-17 signalling pathway ($r = .34, P < .001$) Arachidonic acid metabolism ($r = .28, P = .002$)
16	Fatty acids (PA, SA)	Cholesterol metabolism, PPAR signalling pathway, IL-1 β induced activation of NF- κ B pathway
17	Fatty acids (PA, SA)	Glycosphingolipid biosynthesis
18	Fatty acids (PA, LiA, OA)	Proteasome, regulation of apoptosis
19	Fatty acids (PA, SA, OA)	Proteasome, phagosome
20	Fatty acids (PA, SA, LiA)	Positive regulation of cholesterol storage, positive regulation of T-helper cell differentiation, IL-10 anti-inflammatory signalling pathway
21	Fatty acids (PA, SA)	Eicosanoid biosynthetic process on the lipoxygenase pathway, Unsaturated fatty acids biosynthesis ($r = .53, P < .001$)
22	Fatty acids (OA, LA, LiA)	Cell cycle, mitosis
23	Fatty acids (OA, LA, LiA)	Methylation pathway, mitochondrial complex I assembly model OXPPOS system, IL-1 β induced activation of NF- κ B pathway
24	Fatty acids (OA, LA, LiA)	rRNA metabolic process, PI3K-AKT-mTOR signalling pathway, Mitochondrial translation
25	Fatty acids (PA, LiA, SA)	Golgi vesicle transport, protein transport
26	Fatty acids (LiA, OA, PA)	RNA binding, NF- κ B binding
27	Fatty acids (LA, LA, SA)	Regulation of steroid and cholesterol biosynthesis
28	Fatty acids (OA, LiA)	Phagosome-lysosome fusion, regulation of Toll-like receptor 9 signalling pathway, positive regulation of granulocyte differentiation
29	Others (TPP, TPP + IFN)	NF- κ B signalling pathway ($r = .62, P < .001$), TNF- α signalling pathway ($r = .50, P < .001$), Positive regulation of IL-2 biosynthetic process ($r = .66, P < .001$)
30	Others (TPP, TPP + IFN)	Positive regulation of acute inflammatory response, regulation of chemokines production, cytokine-cytokine receptor interaction and neutrophil-mediated immunity

(Continues)

TABLE 2 (Continued)

Module	Stimuli	Function
31	Fatty acids (PA, SA)	Toll-like receptor signalling pathway, TNF- α signalling pathway, IL-1 β signalling pathway
32	Others (TPP, TPP + IFN)	Fatty acids, triacylglycerol and ketone metabolism, regulation of neutrophil-mediated immunity and degranulation, regulation of IL-1 β production and NK cell mediated cytotoxicity
33	M1 (LPS)	IL-2 signalling pathway, T-cell antigen receptor (TCR) pathway, intrinsic apoptosis in response to oxidative stress
34	Others (TPP, TPP + IFN)	Oxidative phosphorylation (OXPHOS) in mitochondria, modulation of TGF β signalling pathway, positive regulation of adaptive immune response
35	M1 (IFN- γ + TNF- α)	OXPHOS system in mitochondria (electron transport)
36	Others (TPP)	Staphylococcus aureus infection, phagosome
37	M2 (IL-4)	Proteasome degradation, inositol phosphate metabolic process
38	Others (TPP, TPP + IFN)	Positive regulation of microtubule activity, snRNA metabolic process
39	Others (TPP, TPP + IFN)	Glycolysis/gluconeogenesis, amino acid metabolism, steroid catabolic process
40	Others (TPP, TPP + IFN)	Ribosome biogenesis, DNA replication
41	Others (GC)	Sphingolipid metabolic pathway, apoptotic cell clearance, insulin-like growth factor (IGF1)-Akt signalling pathway
42	Others (GC)	Lysosome, Toll-like receptor pathway, carbohydrate digestion and absorption
43	Others (GC, HDL)	Complement and coagulation cascades, superoxide metabolic process, regulation of lymphocyte activation
44	Fatty acids (OA)	TGF β -signalling pathway, regulation of IL-10 secretion, mitochondrial DNA metabolic process
45	M2 (IL-4, IL-10, IL-13)	NF- κ B signalling pathway, TNF signalling pathway, fatty acids biosynthesis
46	M2 (IL-4, PGE2)	Antigen processing and presentation via MHC class II, Th-17 differentiation, allograft rejection
47	M2 (IL-4, PGE2)	DNA damage induced protein phosphorylation, positive regulation of extracellular matrix assembly, TP53 network
48	M2 (IL-4, IL-13, PGE2)	Ions homeostasis, Toll-like receptor signalling pathway, angiogenesis
49	Unstimulated	Negative regulation of acute inflammatory response, negative regulation by host of viral process, intrinsic apoptotic signalling pathway in response to oxidative stress

Note: Modules enriched in severe asthma are highlighted in BOLD with *r* and *P* values indicated.

Abbreviations: IFN, interferon; IL-13, interleukin 13; IL-17, interleukin 17; IL-2, interleukin 2; IL-4, interleukin 4; M2, alternatively polarized macrophage; NF- κ B, nuclear-factor kappa B; PA, palmitic acid; SA, stearic acid; SAsm, severe asthma smokers and ex-smokers; TNF, tumour necrosis factor alpha; TPP, tumour necrosis factor alpha + prostaglandin E2 + Toll-like receptor 2 ligand.

2 | METHODS

2.1 | Study population and design

We studied data from participants of the U-BIOPRED adult cohort¹⁰ who underwent sputum cell transcriptomic analysis.³ This included 104 asthmatics: mild-moderate asthma (*n* = 20), nonsmoking severe asthmatics (*n* = 61) and current or ex-smokers with severe asthma (*n* = 23), and 16 healthy volunteers (Table 1). All participants gave written informed consent. For the asthmatic patients, the analyses were done also according to the presence of airflow limitation defined as FEV1/FVC < 0.70 and FEV1 < 75% of predicted.³

A description of the analytical plan is provided in Figure S1.

2.2 | Microarray analysis of sputum transcriptomes

Sputum induction¹² and transcriptomic analysis has been described previously.¹³ In brief, sputum cells were obtained from

plugs obtained following inhalation of hypertonic saline. Gene expression profiling was performed on extracted RNA using microarrays.³ A comparison of sputum gene expression profiles from asthmatics with high ($\geq 1.5\%$) or low (<1.5%) sputum eosinophilia and the healthy volunteer group identified 508 differentially expressed genes. Batch/technical effects, age, sex and administration of oral corticosteroid were adjusted for as covariates. Unsupervised hierarchical clustering based on Euclidean distance on these 508 genes identified 3 transcriptomic-associated clusters (TACs): TAC1 was associated with Th2 inflammation, sputum eosinophilia, more severe asthma, high rate oral corticosteroid dependency, frequent exacerbations and severe airflow obstruction, TAC2 with IFN- γ , TNF- α and inflammasome-signalling pathways, sputum neutrophilia, high prevalence of eczema and serum C-reactive protein levels and TAC3 with paucigranulocytic inflammation, metabolic pathways and better preserved lung function.³ These groups are considered as reflective of different molecular phenotypes of asthma in the U-BIOPRED cohort and were used in our analyses.

2.3 | Gene set variation analysis (GSVA)

Gene set variation analysis is a gene set enrichment method that estimates the variation in a pathway activity across a sample population in an unsupervised manner. It is used to detect changes in pathway or gene signature activity over a sample population and indicates differences within populations and between groups of subjects.^{13,14} GSVA calculates sample-wise enrichment scores (ES) across the whole data set with a range from -1 to +1.

2.4 | Macrophage signatures

Forty-nine distinct modules previously published⁹ derived from 28 distinct treatments (eg IFN- γ , IL-4, IL-10, LPS, TNF- α , IL-13, free fatty acids, high-density lipoprotein, prostaglandin E2, corticosteroids or various association of these stimuli), containing 27 to 884 genes per module, were manually curated in R Bioconductor (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) to analyse macrophage signatures according to asthma severity, TACs and airflow limitation. Validated M1 and M2 signatures (stimulated by IFN- γ + LPS or TNF- α , and IL-4 + IL-13, respectively)¹⁵ and a TR-M ϕ signature adapted from a murine model¹⁶ were also examined (Table S1). Although some of the stimuli were the same, the module genes were often different reflecting altered cellular states resulting from distinct pathways characterizing the modules and highlighting macrophage heterogeneity (Table 2). Validation of the module signatures was performed using GSE90010 comparing purified MDMs populations against alveolar macrophages (AM) from idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients (Table S2).

2.5 | Pathway analysis

The functions and pathways for each gene signature were assessed using KEGG 2019, WikiPathways 2019 and Reactome 2016 databases within Enrichr¹⁷ (Table 2), and for the pooled activated genes by STRING (www.string-db.org).

2.6 | Statistical analysis

A linear model for microarray data (Bioconductor R package limma) with a false discovery rate (FDR) correction was used for differential gene expression analysis and recursive partitioning (party package in R) for decision tree learning. An FDR ≤ 0.05 was considered statistically significant. The ES was calculated for each gene set for each subject. ANOVA was used to analyse ES differences between group means, and the Student *t* test was applied to compare ES differences between two means.

3 | RESULTS

3.1 | Macrophage signatures according asthma severity

In initial analysis to determine whether macrophage modules were selective for macrophages, we demonstrated that 41/49 module signatures were similarly enriched in AM and MDMs from healthy volunteers and IPF patients (Table S2). Two of the signatures were significantly decreased while 6 of the signatures were significantly enriched in AM compared with monocyte-derived macrophages.

The total number and percentage of macrophages in sputum was reduced by ~50% in severe asthma but not in mild-moderate asthma (Table 1). However, not all macrophages subtypes were decreased according to GSVA analysis. Figure 1 represents the ES values for the 49 macrophage modules showing a significant reduction in the ES for most macrophage modules in severe asthma vs healthy volunteers. The ES for modules 7, 8, 9, 20, 27, 30-32, 36 and 45 which are associated with antiviral activity by IFN-stimulated genes, phagosome activation and FA metabolism were similar between asthma and healthy volunteers (Figure 1). The most significant biological pathways and functions ascribed to each module are summarized in Table 2 with the respective *r* and *P* values for modules 15, 21 and 29, which were significantly enriched in severe asthma, also being shown.

Representative dot plots of the GSVA ES for selected modules are shown in Figure 2 to indicate the range of enrichment within subject groups. In contrast to the reduced numbers of macrophages seen in severe asthma compared with mild-moderate asthma and healthy volunteers, modules 15, 21, respectively 29 were significantly enriched in severe asthma vs mild-moderate asthma and healthy volunteers (Figures 1 and 2A,B). These modules reflect IL-4/IL-13 activation (module 15), FA (stearic and palmitic acid)-stimulated macrophages (module 21) and macrophages associated with chronic inflammation (CI-M ϕ) (module 29, stimulated by TPP: TNF- α + PGE2 + the TLR2-ligand Pam3CSK4).⁹ Their genes are involved in innate inflammatory responses, eicosanoid biosynthesis *via* the 5-LOX pathway, T-cell differentiation through the regulation of IL-2 production and IL-17 signalling (Table 2). Only module 14, associated with the phago-lysosome fusion, lymphocyte migration and fat cell proliferation, was significantly enriched in severe asthma smokers vs severe asthma nonsmokers (*P* = .02). In contrast, representative GSVA plots of the enrichment of module 18 (FA) show significant down-regulation in severe asthma compared to mild-moderate asthma and healthy volunteers (Figure 2C). There were no significant differences in the enrichment of TR-M ϕ , M1 or M2^{14,15} or in sputum across asthma severity using GSVA (Figure 2D-F).

These data highlight the plasticity of macrophages in that macrophage subtypes or states distinguished by WGCNA modules provide additional signals compared to validated M1 and M2 signatures. Overall, the data indicate reduced macrophage numbers

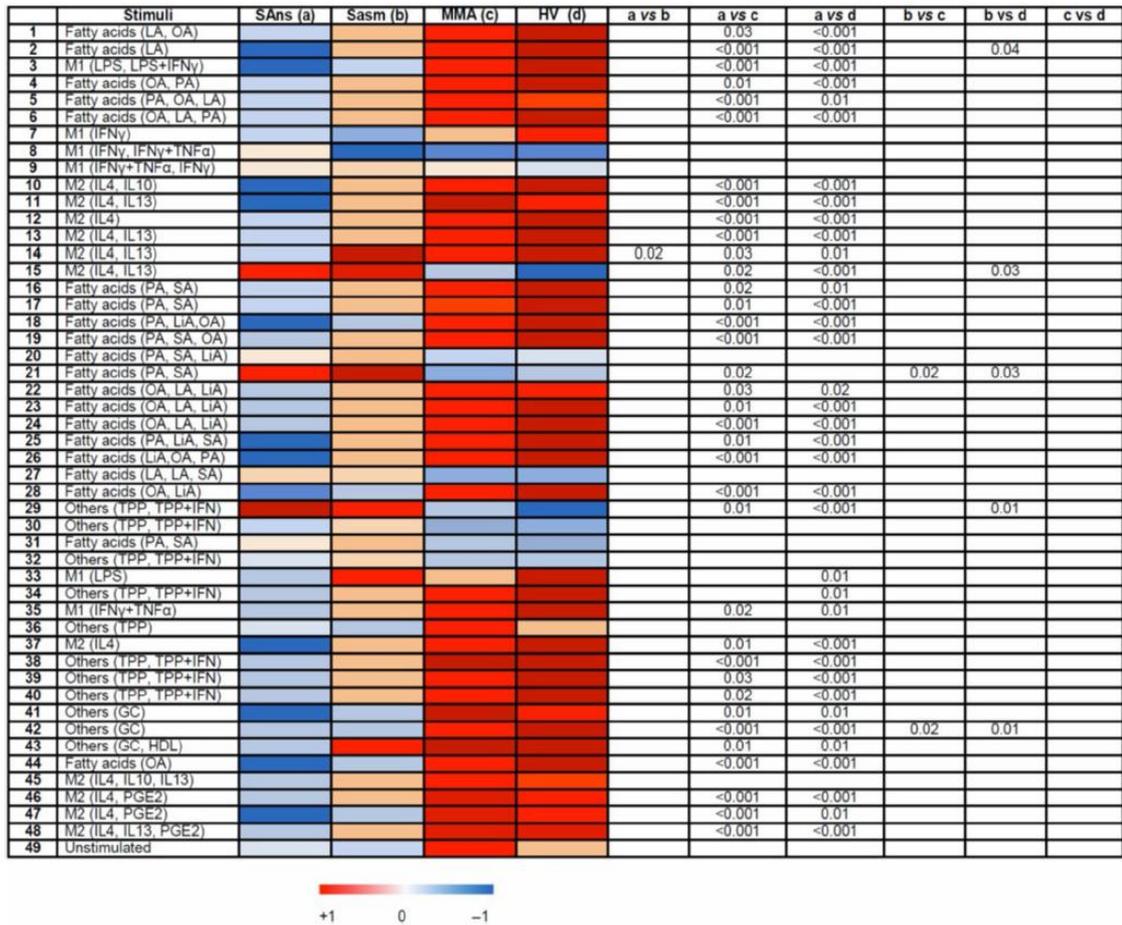


FIGURE 1 Heat map of enrichment scores (ES) for the 49 macrophage activation modules according to clinical category. GC, glucocorticoids; HDL, high-density lipoprotein; HV, healthy nonsmoking controls; IFN- γ , interferon γ ; IL-10, interleukin 10; IL-13, interleukin 13; IL4, interleukin 4; LA, lauric acid; LiA, linoleic acid; LPS, bacterial lipopolysaccharide; MMA, mild/moderate asthma; OA, oleic acid; PA, palmitic acid; PGE2, prostaglandin E2; SA, stearic acid; SAns, severe asthma nonsmokers; Sasm, severe asthma smokers; TNF- α , tumour necrosis factor; TPP, TNF- α + prostaglandin E2 + Toll-like receptor 2 ligand. Where no value is given the results were not significant

and activation status in severe asthma compared to mild-moderate asthma and healthy volunteers suggesting an attenuated innate immune response in these patients. However, there is a limited subtype-specific activation of macrophages in severe asthma compared to mild-moderate asthma.

3.2 | Macrophage enrichment according to sputum granulocytes

When the sputum transcriptome was assessed according to TAC signature as representative of sputum asthma molecular phenotypes, there was a significant decrease of the macrophage absolute cell count in TAC1 ($141.53 \times 10^3/\mu\text{L}$) compared to TAC2 ($195.46 \times 10^3/\mu\text{L}$) and TAC3 ($202.88 \times 10^3/\mu\text{L}$) subjects ($P = .009$ and $P = .003$, respectively) (Table S3) without significant difference between TAC2

and TAC3 ($P = .705$). The ES of most (35/49) macrophage modules were increased in TAC3 compared to TAC1 and TAC2 (Figure 3) while only 4 modules being significantly enriched in TAC1 compared to TAC3. These were module 15 implicated in positive regulation of inflammatory response by neutrophil chemotaxis, arachidonic acid metabolism, activation of TLR and IL-17 signalling pathways; module 21 associated with eicosanoids (via 5-LOX pathway) and unsaturated FA biosynthesis; module 27 including genes that regulate steroid and cholesterol biosynthesis and module 29 characterized by genes encoding TNF- α and NF- κB pathways and positive regulation of IL-2 production.

In TAC2, the modules 15, 27 and 29 are also highly enriched compared to TAC3 as well the modules 7-8 associated with antiviral activity via the IFN- γ pathway; module 20 with IL-10 signalling pathway and Th-cell differentiation; modules 30-32 with the inflammatory response with neutrophil chemotaxis involving

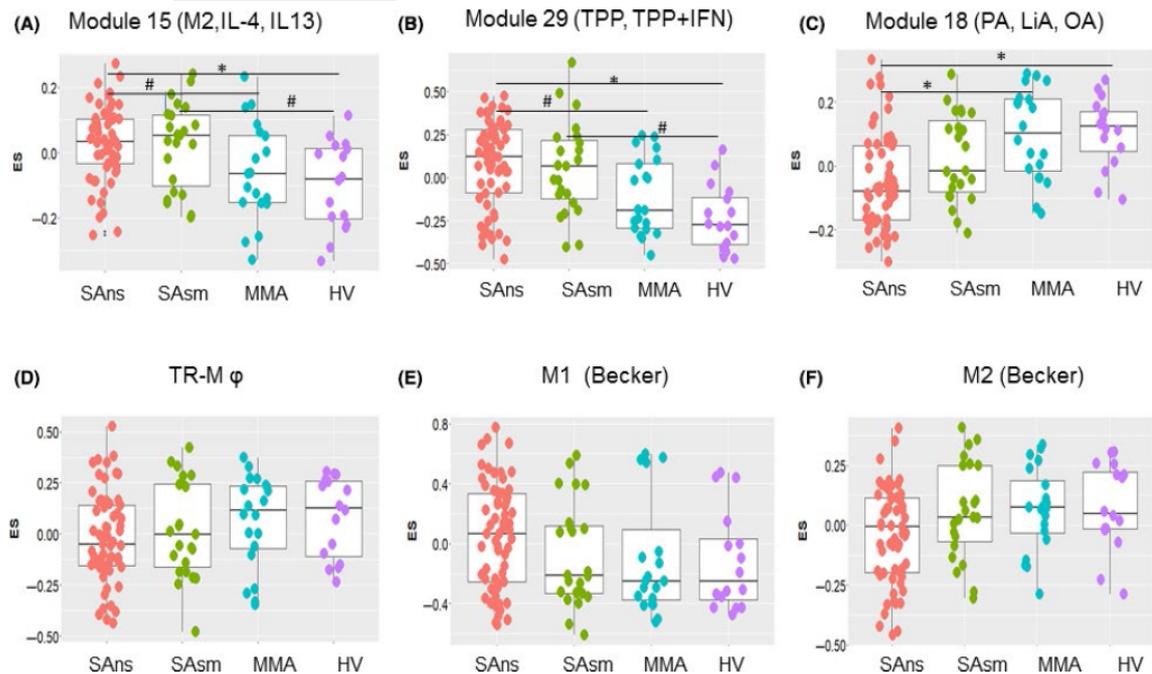


FIGURE 2 Representative analysis of selected macrophage module enrichment scores (ES) according asthma severity. Gene set variation analysis (GSVA) plots of individual subject ES for (A) module 15—IL-4- and IL-13-stimulated, (B) module 29—TPP- and TPP + IFN-stimulated and (C) module 18—PA-, LiA- and OA-stimulated. The ES for tissue-resident macrophages (D, TR-Mφ), classically activated macrophages (E, M1 from Becker) and alternatively activated macrophages (F, M2 from Becker) are also shown. HV, healthy volunteers; IFN- γ , interferon γ ; IL-13, interleukin 13; IL-4, interleukin 4; LiA, linoleic acid; MMA, mild/moderate asthma; OA, oleic acid; PA, palmitic acid; SAns, severe asthma nonsmokers; SAsm, severe asthma smokers and ex-smokers; TPP, TNF- α + prostaglandin E2 + Toll-like receptor 2 ligand (Pam3CSK4). * $P < .001$; # $P < .05$; $P = NS$ (NS, nonsignificant)

TLR, inflammasome and TNF- α signalling pathways; and modules 47 and 49 with mitochondrial process and apoptosis secondary to the oxidative stress.

We observed an enrichment of module 15 in both TAC1 (eosinophilic) and TAC2 (neutrophilic) groups. However, other M2-related signatures such as module 47 (IL-4, PGE₂) was enriched in TAC2 compared to TAC1 and module 48 (IL-4, IL-13 and PGE₂) was enriched in TAC3. This suggests that these M2-related subtypes reflect the local inflammatory milieu and that not all M2 cells are the same. In contrast, TAC2 was more enriched with macrophage signatures encoding M1-like modules (modules 7 and 8) and macrophages stimulated by either FAs (modules 20, 21, 27 and 31) or TPP (modules 29, 30 and 32) (Figure 3). This indicates either the presence of low-grade sub-clinical infection or of a skewed immune response following previous infection since no overt infection had been reported in the 3 months prior to sputum induction.

Representative dot plots of the GSVA ES for selected modules indicate the range of enrichment within subject groups. Module 21 (FA) was significantly down-regulated in TAC2 compared with TAC1 and TAC3 (Figure 4A), module 29 (TPP) was significantly enriched in TAC1 and TAC2 compared with TAC3 (Figure 4B) while module 30 (a different TPP module) (Figure 4C) was enriched in TAC2 compared to both TAC1 and TAC3.

In contrast, the TR-Mφ macrophage signature was significantly enriched in the TAC3 module (Figure 4D), the M1 validated

signature¹⁴ in TAC2 (Figure 4E) and the M2 validated signature¹⁴ was significantly reduced in TAC2 (Figure 4F). The genes from TR-Mφ signature¹⁵ encode proteins involved in metabolic process, tissue homeostasis and immunity (Table S4).^{16,18}

The M1 validated signature was highly correlated with sputum neutrophilia (TAC2), with T naïve cells and with pathways involved in inflammation (NF- κ B, TNF, TLR and inflammasome pathways) (Table S5). The M2-validated signature was significantly correlated with TAC3 and the TR-Mφ signature with TAC3, to phago-lysosome activity and to oxidative phosphorylation (OXPHOS) (Table S5). More detailed information about TR-Mφ functions is provided in the (Table S6).

Overall, these data suggest that patients with severe granulocytic asthma have a reduced innate immune response as indicated by the reduced enrichment of most macrophage subsets. However, a select number of macrophage modules/subsets are enhanced in TAC1 and TAC2. These results were validated by the analyses on the ADEPT cohort which present similar characteristics in terms of severity and inflammatory clusters as U-BIOPRED (2) and Table S7. Figure S2 shows a heat map of the macrophage module ES according to sputum granulocytes. In summary, these data highlighted the relative enrichment of most modules in paucigranulocytic and healthy volunteers with the same modules enriched in neutrophilic (modules 8, 27, 30-31 and 49) (all $P < .001$) and eosinophilic (modules 15, 21 and 29) (all $P \leq .03$)

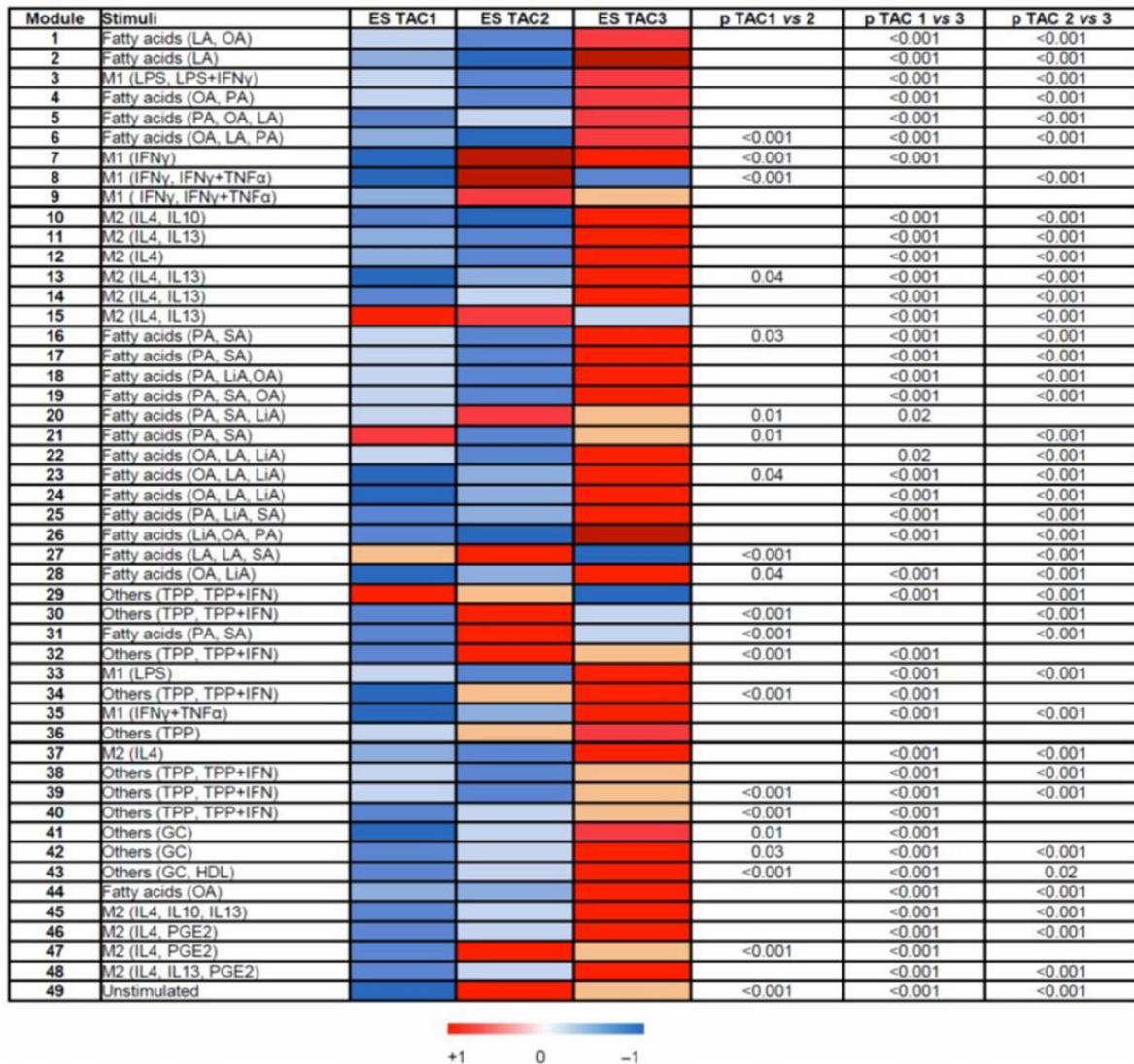


FIGURE 3 Heat map of enrichment scores (ES) for the 49 macrophage activation modules according to transcriptomic-associated cluster (TAC1, TAC2 or TAC3). GC, glucocorticoids; HDL, high-density lipoprotein; IFN- γ , interferon γ ; IL-10, interleukin 10; IL-13, interleukin 13; IL-4, interleukin 4; LA, lauric acid; LIA, linoleic acid; LPS, bacterial lipopolysaccharide; OA, oleic acid; PA, palmitic acid; PGE2, prostaglandin E2; SA, stearic acid; TNF- α , tumour necrosis factor; TPP, TNF- α + prostaglandin E2 + Toll-like receptor 2 ligand. Where no value is given, the results were not significant

asthma as described using TAC analysis in the U-BIOPRED cohort. The same modules as in TAC3 were decreased in ES in the ADEPT paucigranulocytic group (modules 8, 15, 27, 29, 30 and 31).

3.3 | Macrophages signatures in airflow obstruction

The same modules 15, 21 and 29 that were overexpressed in severe asthma and associated with inflammation driven by innate immunity were correlated with airflow obstruction (Figure S3). In contrast, most M1- and

M2-related modules were inversely associated with obstruction. The TR-M ϕ signature did not correlate with airflow obstruction (Figure S4).

3.4 | Drivers of macrophage activation according to severity and TAC characterization

A number of different macrophage signatures were enriched in severe asthma and according to TAC categorization. Examination of the specific mediators associated with each macrophage module

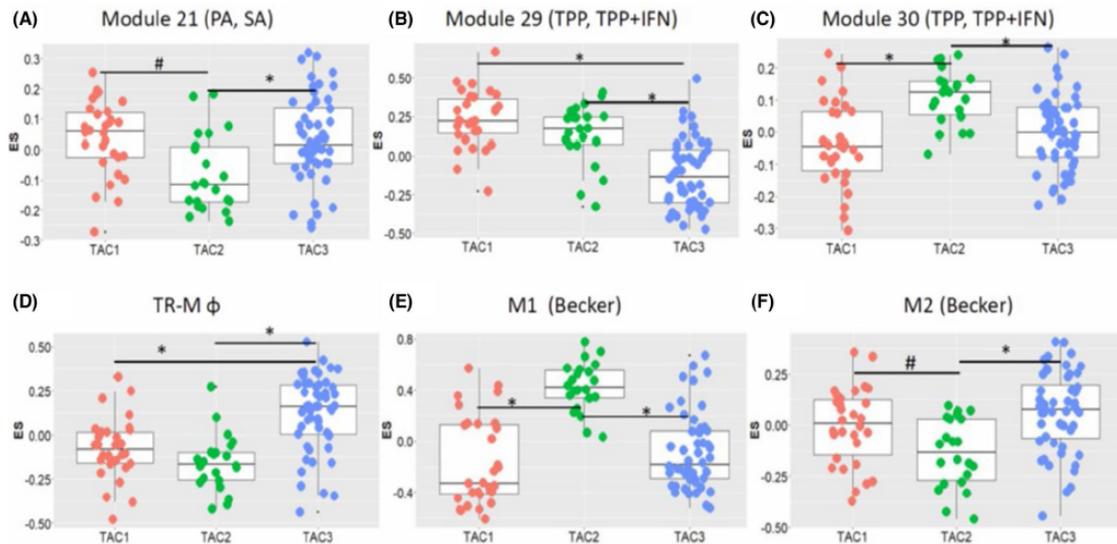


FIGURE 4 Representative analysis of selected macrophage module enrichment scores (ES) according to transcriptomic clusters (TACs). Gene set variation analysis (GSVA) plots of individual subject ES for (A) module 21—PA- and SA-stimulated, (B) module 29—TPP- and TPP + IFN-stimulated and (C) module 30—TPP- and TPP + IFN-stimulated. The ES for tissue-resident macrophages (D, TR-M ϕ), classically activated macrophages (E, M1 from Becker) and alternatively activated macrophages (F, M2 from Becker) are also shown. HV, healthy volunteers; IFN- γ , interferon γ ; MMA, mild/moderate asthma; PA, palmitic acid; SA, stearic acid; SAns, severe asthma nonsmokers; SAsm, severe asthma smokers and ex-smokers; TPP, TNF- α + prostaglandin E2 + Toll-like receptor 2 ligand (Pam3CSK4). * $P < .001$; # $P < .05$. Where no value is given, the results were not significant

according to TAC does not provide clear evidence for the critical factors that may underpin macrophage activation in each TAC (Figure S5). We therefore pooled the activated genes within each module⁹ for severe asthma and for each TAC and examined the pathways and gene ontology terms associated with these groups to determine whether specific pathways or driver mechanisms were present.

Combining the macrophage gene signatures enriched in severe asthma and performing PPI network analysis identified several pathways important in severe asthma including innate immunity, leucocyte activation, neutrophil degranulation, IL-4/IL-13 signalling, TLR and IL-17 signalling and leukotriene synthesis (Table 3, Figure 5). The pathways associated with macrophages activated in TAC1 patients highlighted cholesterol and steroid biosynthesis pathways along with pathways associated with Th2 activation and defence responses (Figure S6, Table S8). In addition, the PPI networks identified as being preferentially activated in TAC2 patients included immune and inflammatory pathways linked to inflammasome and neutrophil activation (Figure S7, Table S9). Finally, TAC3-associated PPI pathways reflect metabolic and mitochondrial function in addition to cytokine signalling and viral response pathways (Figure S8, Table S10). These data expand the pathways associated with TACs described previously and highlight the importance of macrophages in severe asthma pathophysiology.

4 | DISCUSSION

Sputum macrophage numbers are reduced in severe asthma compared to mild-moderate asthma and healthy volunteers. GSVA analysis of macrophage signatures demonstrated decreased ES in severe asthma compared to mild-moderate asthma and healthy volunteers except for Cl-M ϕ activated by FA and an M2-like module. Module enrichment occurs in purified AM populations validating the use of signatures to give additional insight compared with that obtained using the classic M1 and M2 classification. Glucocorticoid/high-density lipoprotein-exposed and M1-like macrophages were enriched in the severe asthma smokers vs severe asthma nonsmokers. Sputum macrophage numbers are significantly decreased in TAC1 compared to TAC2 and TAC3 groups and the ESs for most signatures were greater in TAC3 compared to TAC1 and TAC2 subjects. TR-M ϕ were enriched in TAC3 and associated with mitochondrial function. Overall, macrophage activation is attenuated in severe granulocytic asthma except for enrichment of specific macrophage subsets indicative of distinct inflammatory pathways.

NF- κ B activation is common to both modules 15 and 29 suggesting its activation in severe TAC1 and TAC2 asthmatics. NF- κ B regulates inflammatory and innate immune gene expression¹⁸ during asthma pathogenesis.¹⁹ Module 15 (an M2 subtype) is also associated with TLR pathway activation. Most TLRs are expressed on

macrophages and their activation induces inflammatory cytokines involved in the recruitment of T cells (CCL3 and CCL4), monocytes (CCL1) and neutrophils (CXCL1 and CXCL8).²⁰⁻²³ Module 29 is associated with chronic inflammation and TNF pathway activation.⁹ Macrophages possess several TNF receptors including TNFR1 and 2, TL1A, OX40, 4-1BB, CD30, CD40, LIGHTR, LTβR, GITR, BAFF, APRIL and TWEAK which all stimulate NF-κB.^{24,25} In addition, OX40 stimulation promotes T-cell proliferation and survival^{26,27} by the regulation of IL-2 production.²⁸

The third module enriched in severe asthma is module 21 that is associated with eicosanoids biosynthesis via the 5-LOX pathway. These macrophages are stimulated by palmitic acid, a pro-inflammatory factor for monocytes and associated with increased mitochondrial ROS production.²⁹ CysLT promotes Th2 polarization, activation of eosinophils (confirmed by the high ES in TAC1) and collagen production by fibrocytes³⁰ which could explain the association with airway limitation found in the present study.

The most significant difference between severe asthma smokers and severe asthma nonsmokers in our analysis is the high enrichment of module 14 in smoking severe asthmatics, which is involved in phago-lysosome fusion and lymphocyte migration. In mice, nicotine inhibits phagosome formation in infected macrophages and induces the production of TGF-β by regulatory T cells.³¹

Modules 15, 21 and 29 were enriched in both severe asthma and TAC1 subjects reflecting those with severe eosinophilic T2 asthma. Module 15 represents a subset or state of M2 macrophages stimulated by IL-4/IL-13 which secrete chemokines including CCL18 and CCL24 (eotaxin 2) recognized to promote eosinophil infiltration.^{3,4} According to the specific stimuli, M2 macrophages are divided in 4 subpopulations: M2a induced by IL4/IL13 which activate Th2 responses; M2b stimulated by LPS or IL-1R ligand with an immunoregulator effect and favoured by Th2 response, increasing the production of IL-10; M2c prompted by glucocorticoids or IL-10 involved in the inflammation resolution and tissue remodelling (production of TGFβ).^{4,7}

Even though the M2a state seems to be particularly involved in severe asthma and TAC1, this does not preclude a downstream cascade linking with M2b activation. This may explain the association of the module 15 with the Toll-like receptor signalling pathway. In contrast with TAC1, all subsets of M2 macrophages are enriched in TAC3 and involved in metabolic processes (modules 10-14 and 45), homeostasis (modules 47-48), inflammatory resolution by stimulating phagocytosis, antigen processing and immunoregulation (modules 14 and 46). These results reflect the complex activation state of sputum macrophages in asthma in response to distinct stimuli and their high transcriptional and functional diversity.

TAC2 subjects were enriched for macrophage modules involved pathogen responses including M1 macrophages. IFN-γ- and LPS-stimulated M1 macrophages enable phagocytosis of viral/bacterial antigens by cross-presentation via MHC class I,³² inflammasome and TNF-α activation^{24,33} and neutrophilic airway inflammation.³⁴ Other modules up-regulated in TAC2 indicate the importance of Th17 (modules 15 and 20) and NK cells (module 32).^{33,35,36} Taken together, these data highlight the heterogeneity of sputum macrophages and that modules identify greater differences than consensus M1 and M2 signatures.

Data concerning the role of TR-Mφ in severe asthma are lacking. We show no significant change in TR-Mφ enrichment according to severity but elevated enrichment in TAC3 subjects. Most of the genes within the TR-Mφ signature are involved in mitochondrial function (*TOMM20*, *RAC1*, *NDUFA4*, *CAD*, *SIRPA*, *APOA1BP*), lipid metabolism, tissue homeostasis and apoptosis but some play roles in anti-infectious defence via TNF-α (*TNF*), TLR (*CD36*) and inflammasome (*SIGLEC1*) pathways.³⁷ During early inflammation, TR-Mφ could switch from M2 (associated with OXPHOS) to M1 polarization with enhanced glycolysis to rapidly obtain the energy needed for migration, ROS and pro-inflammatory cytokines production (via NF-κB activation) and phagocytosis.²⁹ Conversely, the resolution of inflammation occurs through the interaction of oxidized

TABLE 3 Pathways involved in macrophage activation in severe asthma compared to mild-moderate asthma and healthy controls using PPI network analysis (String db)

Pathway	ID	FDR P value
Innate immune system	Reactome: HSA-168249	<.001
Regulation of cellular response to stimulus	GO: 0048583	<.001
Inflammatory response	GO: 0006954	<.001
Leucocyte activation involved in immune response	GO: 0002366	<.001
Neutrophil degranulation	Reactome: HSA-6798695	<.001
Interleukin-4 and interleukin-13 signalling	Reactome: HSA-6785807	<.001
NF-κB signalling	KEGG:04064	.004
Toll-like receptor cascades	Reactome: HSA-168898	.015
IL-17 signalling	KEGG: 04657	.016
Synthesis of leukotrienes	Reactome: HSA-2142691	.028

Abbreviation: FDR, false discovery rate.

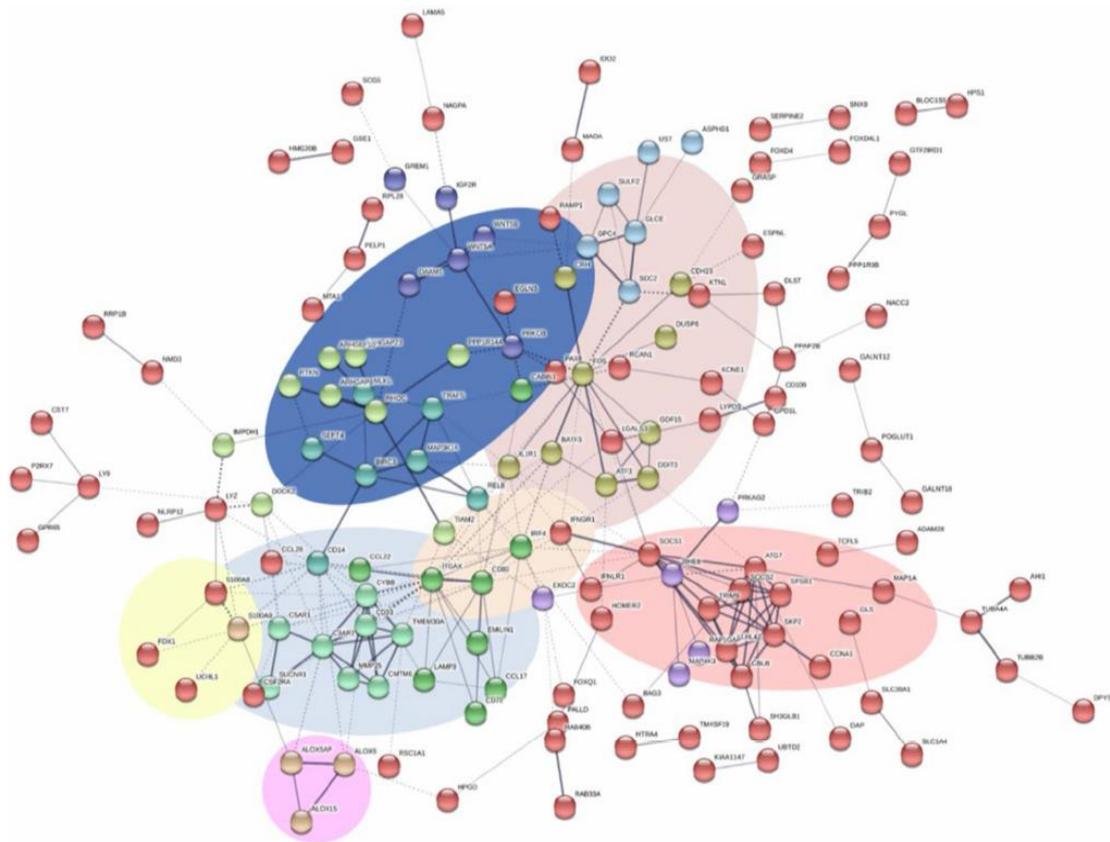


FIGURE 5 Protein-protein interaction (PPI) network analysis of module genes significantly enriched in macrophages activated in severe asthma compared to mild-moderate asthma and healthy controls. Pink: arachidonic acid metabolism; light blue: leucocyte activation and neutrophil degranulation; green: IL-4 and IL-13 signalling; dark blue: NF- κ B signalling; light brown: cellular response to stimuli; red: immune system; and yellow: Toll-like receptor cascades. All genes in each module that was differentially expressed were pooled and used in this analysis

phosphatidylserine from apoptotic membranes and CD36 with to elicit mitochondrial biogenesis, arginase expression and return to an M2 phenotype.²⁹ The dynamic differentiation of macrophages in response to environmental signals is highly dependent on NF- κ B activation and mitochondrial function with increased expression of numerous pro-inflammatory gene characteristic of M1 during the early phase of inflammation while the M2 subtype, predominant in the later phase of inflammation, have reduced inflammatory capacity.⁴

The heterogeneous population of airway macrophages are the primary cell type to encounter airborne pathogens.³⁸ Our data indicate that in mild-moderate asthma these cells are in a state of preparedness despite ongoing treatment with inhaled corticosteroids but that is not the case in patients with severe disease. Previous evidence has highlighted a defect in BAL macrophage and monocyte-derived macrophage phagocytosis in severe asthma.³⁹⁻⁴¹ This has been reported as being associated with enhanced expression of PGE₂,³⁹ reduced IL-10 expression⁴² or the persistent presence of viral infection.⁴³

The importance of macrophages in mediating asthmatic inflammation is becoming increasingly clear.³⁸ In mice, pharmacological suppression of alternatively activated YM1 + M2 macrophages using the galactin-3 pathway inhibitor cynaropicrin resulted in reduced eosinophilic lung inflammation and less collagen deposition around airways and a shift towards neutrophilic inflammation and worse lung function.⁴⁴ These data revealed an important role for M2 macrophages generally in airway remodelling and the role of specific M2-like macrophages associated in airway remodelling and AHR should be further studied.

This is the first study using gene signatures to extensively analyse the enrichment and activation of macrophage subtypes in asthma according to severity, molecular phenotype and the presence of airflow limitation. To the best of our knowledge, it is the first time that the enrichment of TR-M ϕ has been analysed in asthma where it plays a more important role in the paucigranulocytic inflammatory phenotype. Another strength of this study is the relatively large data set, the validation in another severe asthma cohort (ADEPT)

and the relative accessibility of the sputum compartment for future comparative analysis. Nevertheless, there are several limitations to the study including the failure to obtain functional data from these macrophage modules and the need to isolate or define these macrophage subtypes using another approach such as cell sorting. It is possible that the results may reflect, at least in part, the varying proportional make-up of the immune cells present across the various subgroup comparisons, and future studies should use single cell sequencing or other approaches to address this. Furthermore, analysis of BAL and tissue macrophages may provide additional insights in the pathogenesis of severe asthma.

In summary, macrophage numbers and activation status are generally decreased in severe asthma suggesting an innate immune defect in this population. Enrichment was found only in three modules involved in the regulation of inflammatory response by TLR/TNF/NF- κ B activation, IL-2 production and leukotriene biosynthesis. M1 macrophages were highly expressed in TAC2 and correlate with sputum neutrophilia, inflammasome, IFN, TNF and TLR pathways in contrast to M2 which were more highly expressed in TAC1 and TAC3 and correlated with metabolic process and eicosanoids biosynthesis. TR-M ϕ were predominantly associated with paucigranulocytic asthma. Understanding the functional diversity of macrophages and the modulation of their phenotypes in asthma might provide us a great opportunity for designing novel and more effective therapeutic strategies.

ACKNOWLEDGMENTS

U-BIOPRED was supported by an Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking (No.115010), resources from the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) and EFPIA companies' in-kind contribution (www.imi.europa.eu). We acknowledge the contribution of the whole U-BIOPRED team as listed in the Appendix S1. Angelica Tiotiu thanks Collège Lorrain de Pathologie Thoracique for supporting her Fellowship at Imperial College London. We thank Professor Louise Donnelly for her comments on this manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AT, NZK, YB and SP made substantial contributions to the acquisition and analysis of the data, and PH, YG, KFC and IMA made substantial contributions to the conception and interpretation of the work. AT and IMA drafted the initial manuscript, and all authors provided substantial input into the revision and interpretation of the manuscript. All authors approved the final version for submission and accept responsibility for the accuracy and integrity of the work.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The transcriptomic data are deposited in the GEO (Gene Expression Omnibus) database (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) with accession number GSE76262.

ORCID

Angelica Tiotiu  <https://orcid.org/0000-0002-8038-9559>

Kian Fan Chung  <https://orcid.org/0000-0001-7101-1426>

Ian M. Adcock  <https://orcid.org/0000-0003-2101-8843>

REFERENCES

1. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J*. 2014;43:343-373.
2. Kuo C-HS, Pavlidis S, Loza M, et al. A Transcriptome-driven analysis of epithelial brushings and bronchial biopsies to define asthma phenotypes in U-BIOPRED. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195:443-455.
3. Kuo C-HS, Pavlidis S, Loza M, et al. T-helper cell type 2 (Th2) and non-Th2 molecular phenotypes of asthma using sputum transcriptomics in U-BIOPRED. *Eur Respir J*. 2017;49(2):1602135.
4. Arora S, Dev K, Agarwal B, Das P, Syed MA. Macrophages: their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology*. 2018;223:383-396.
5. Mould KJ, Barthel L, Mohning MP, et al. Cell origin dictates programming of resident versus recruited macrophages during acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017;57:294-306.
6. Lumeng CN. Lung macrophage diversity and asthma. *Ann Am Thorac Soc*. 2016;13(Suppl 1):S31-S34.
7. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13.
8. Kim Y-K, Oh S-Y, Jeon SG, et al. Airway exposure levels of lipopolysaccharide determine type 1 versus type 2 experimental asthma. *J Immunol*. 2007;178:5375-5382.
9. Xue J, Schmidt SV, Sander J, et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity*. 2014;40:274-288.
10. Shaw DE, Sousa AR, Fowler SJ, et al. Clinical and inflammatory characteristics of the European U-BIOPRED adult severe asthma cohort. *Eur Respir J*. 2015;46:1308-1321.
11. Loza MJ, Djukanovic R, Chung KF, et al. Validated and longitudinally stable asthma phenotypes based on cluster analysis of the ADEPT study. *Respir Res*. 2016;17:165.
12. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax*. 2002;57:875-879.
13. Hänzelmann S, Castelo R, Guinney J. GSEA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data. *BMC Bioinformatics*. 2013;14:7.
14. Pavlidis S, Monast C, Loza MJ, et al. I_MDS: an inflammatory bowel disease molecular activity score to classify patients with differing disease-driving pathways and therapeutic response to anti-TNF treatment. *PLoS Comput Biol*. 2019;15:e1006951.
15. Becker M, De Bastiani MA, Parisi MM, et al. Integrated transcriptomics establish macrophage polarization signatures and have potential applications for clinical health and disease. *Sci Rep*. 2015;5:1-12.
16. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Reyfman PA, et al. Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *J Exp Med*. 2017;214:2387-2404.
17. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:W90-W97.
18. GeneCards. <https://www.genecards.org>. Cited 2019 Jun 26.
19. Schuliga M. NF-kappaB signaling in chronic inflammatory airway disease. *Biomolecules*. 2015;5:1266-1283.
20. Sun S-C. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2017;17:545-558.

21. Zakeri A, Russo M. Dual role of toll-like receptors in human and experimental asthma models. *Front Immunol.* 2018;9:1027.
22. De Nardo D. Activation of the innate immune receptors: guardians of the micro galaxy : activation and functions of the innate immune receptors. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1024:1-35.
23. De Nardo D. Toll-like receptors: activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine.* 2015;74:181-189.
24. Grassin-Delyle S, Abrial C, Salvator H, Brollo M, Naline E, Devillier P. The role of toll-like receptors in the production of cytokines by human lung macrophages. *J Innate Immun.* 2020;12:63-73.
25. Dostert C, Grusdat M, Letellier E, Brenner D. The TNF family of ligands and receptors: communication modules in the immune system and beyond. *Physiol Rev.* 2019;99:115-160.
26. Croft M, Duan W, Choi H, Eun S-Y, Madireddi S, Mehta A. TNF superfamily in inflammatory disease: translating basic insights. *Trends Immunol.* 2012;33:144-152.
27. Ward-Kavanagh LK, Lin WW, Šedý JR, Ware CF. The TNF receptor superfamily in co-stimulating and co-inhibitory responses. *Immunity.* 2016;44:1005-1019.
28. Pereira LMS, Gomes STM, Ishak R, Vallinoto ACR. Regulatory T cell and forkhead box protein 3 as modulators of immune homeostasis. *Front Immunol.* 2017;8:605.
29. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012;12:180-190.
30. Griffiths HR, Gao D, Pararasa C. Redox regulation in metabolic programming and inflammation. *Redox Biol.* 2017;12:50-57.
31. Lukic A, Larssen P, Fauland A, et al. GM-CSF- and M-CSF-primed macrophages present similar resolving but distinct inflammatory lipid mediator signatures. *FASEB J.* 2017;31:4370-4381.
32. Bai X, Stitzel JA, Bai A, et al. Nicotine impairs macrophage control of mycobacterium tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2017;57:324-333.
33. Rock KL, Reits E, Neefjes J. Present yourself! By MHC class I and MHC class II molecules. *Trends Immunol.* 2016;37:724-737.
34. He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends Biochem Sci.* 2016;41:1012-1021.
35. Ray A, Kolls JK. Neutrophilic inflammation in asthma and association with disease severity. *Trends Immunol.* 2017;38:942-954.
36. Bruchard M, Rebé C, Derangère V, et al. The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. *Nat Immunol.* 2015;16:859-870.
37. Besnard A-G, Togbe D, Couillin I, et al. Inflammasome-IL-1-Th17 response in allergic lung inflammation. *J Mol Cell Biol.* 2012;4:3-10.
38. Souza de Lima D, Nunes VCL, Ogusku MM, et al. Polymorphisms in SIGLEC1 contribute to susceptibility to pulmonary active tuberculosis possibly through the modulation of IL-18. *Infect Genet Evol.* 2017;55:313-317.
39. Fricker M, Gibson PG. Macrophage dysfunction in the pathogenesis and treatment of asthma. *Eur Respir J.* 2017;50(3):1700196.
40. Brugha RE, Mushtaq N, Round T, et al. Carbon in airway macrophages from children with asthma. *Thorax.* 2014;69:654-659.
41. Liang Z, Zhang Q, Thomas CM, et al. Impaired macrophage phagocytosis of bacteria in severe asthma. *Respir Res.* 2014;15:72.
42. Kawano H, Kayama H, Nakama T, Hashimoto T, Umemoto E, Takeda K. IL-10-producing lung interstitial macrophages prevent neutrophilic asthma. *Int Immunol.* 2016;28:489-501.
43. Finney LJ, Belchamber KBR, Fenwick PS, et al. Human rhinovirus impairs the innate immune response to bacteria in alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;199:1496-1507.
44. Draijer C, Robbe P, Boorsma CE, Hylkema MN, Melgert BN. Dual role of YM1+ M2 macrophages in allergic lung inflammation. *Sci Rep.* 2018;8:5105.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Tiotiu A, Zounemat Kermani N, Badi Y, et al; the U-BIOPRED consortium project team. Sputum macrophage diversity and activation in asthma: Role of severity and inflammatory phenotype. *Allergy.* 2020;00:1-14. <https://doi.org/10.1111/all.14535>



Urtica dioica pollen allergy Clinical, biological, and allergomics analysis



Angelica Tiotiu, MD^{*}; Andrea Brazdova, PhD^{†,‡}; Cyril Longé, MSc[†]; Patrice Gallet, MD^{*}; Martine Morisset, MD[§]; Virginie Leduc, PhD^{||}; Christiane Hilger, PhD[¶]; Cédric Broussard, Ing^{#,**}; Rémy Couderc, PhD[†]; Jean-Pierre Sutra, PhD[†]; Hélène Sénéchal, PhD[†]; Pascal Poncet, PhD^{†,††}

^{*} Pneumology-Allergology Department, University Hospital, Nancy, France

[†] Biochemistry Laboratory, Allergy & Environment Team, Armand Trousseau Children Hospital, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France

[‡] Immunopathology and Immunoregulation Section, INSERM U1098, University of Burgundy, Dijon, France

[§] Immunology-Allergology Department, Luxembourg Hospital, Luxembourg-Ville, Luxembourg

^{||} ALK-Abello, Varennes en Argonne, France

[¶] Department of Infection and Immunity, Luxembourg Institute of Health, Esch-sur-Alzette, Luxembourg

[#] Cochin Institute, INSERM U1016, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR8104, Paris-Descartes University, Paris, France

^{**} Proteomics Platform 3P5, Paris-Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

^{††} Center for Innovation and Technological Research, Pasteur Institute, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received for publication July 21, 2016.

Received in revised form September 1, 2016.

Accepted for publication September 8, 2016.

ABSTRACT

Background: The most emblematic members of Urticaceae at allergic risk level are wall pellitories (*Parietaria*), whereas nettle (*Urtica*) pollen is considered as poorly allergenic. No allergen from nettle pollen has yet been characterized, whereas 4 are listed for *Parietaria* pollen by the International Union of Immunological Societies. Clinical and biological profiles of 2 adult men who developed symptoms against nettle pollen and/or leaves were studied.

Objective: To characterize the allergic reaction and identify the potential nettle pollen sensitizing allergens.

Methods: IgE-mediated reaction to nettle pollen extract was evaluated by skin prick test, immunoassay, nasal provocation, and basophil activation test. To characterize specific nettle pollen allergens, an allergomic (IgE immunoproteomic) analysis was performed combining 1- and 2-dimensional electrophoresis, IgE immunoblots of nettle pollen extract, identification of allergens by mass spectrometry, and database queries.

Results: The results of biological and immunochemical analyses revealed that the allergic rhinitis was due to *Urtica dioica* pollen in both patients. The allergomic analysis of nettle pollen extract allowed the characterization of 4 basic protein allergens: a thaumatin-like protein (osmotin) with a relative molecular mass of 27 to 29 kDa, a pectinesterase (relative molecular mass, 40 kDa), and 2 other basic proteins with relative molecular masses of 14 to 16 kDa and 43 kDa. There is no or only very weak allergen associations between pellitory and nettle pollen.

Conclusion: Exposure to nettle pollen can be responsible of allergic symptoms, and several allergens were characterized. Unravelling the allergens of this underestimated allergy might help to improve diagnosis and care for patients, to predict cross-reactivities and design adapted specific immunotherapy.

© 2016 American College of Allergy, Asthma & Immunology. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Urticaceae belong to the Herbaceous family, which includes nearly 2625 species divided into 60 genera. The most allergenic are pellitories (*Parietaria*), whereas nettle (*Urtica*) pollen is not considered very allergenic. A documented case of urticaria

attributable to *Urtica dioica* in a neonate¹ and severe tongue edema induced by the stinging nettle² have been reported, whereas some cases of allergic rhinitis have been reported in the United States.^{3–5} The prevalence of nettle pollen sensitization is therefore unknown in contrast to wall pellitory pollen, which has a reported prevalence of 35% in Spain⁶ and up to 75% in Southern Italy.⁷

In Europe, 4 nettle species and 2 pellitory species with morphologically indistinguishable pollen grains have been described. Four allergens with several isoforms have been characterized for *Parietaria judaica* pollen, Par j 1 and 2, belonging to the lipid transfer protein (LTP) family, types 1 and 2, respectively.^{8,9} Par

Reprints: Pascal Poncet, PhD, Center for Innovation and Technological Research, Institut Pasteur, 25-28 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France; E-mail: pascal.poncet@pasteur.fr.

Disclosures: Dr Leduc is an employee at ALK-Abello. No other disclosures were reported.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaai.2016.09.426>

1081-1206/© 2016 American College of Allergy, Asthma & Immunology. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

j 3 belongs to the profilin pan allergen family (actin-binding protein),¹⁰ and Par j 4 (polcalcin) is a 2 EF-hand calcium-binding protein.¹¹ No molecularly defined allergen from nettle (*U dioica*) pollen has yet been characterized, and no cross-reactivity has been observed between the pollen of *Parietaria* and *Urtica*¹² and *Boehmeria nivea* (ramie), another plant of the Urticaceae family.¹³

Nettles are ubiquitous in temperate areas, such as Northern Europe, North America, Western South America, Central Asia, and Southern Africa. The botanically related Urticaceae pellitories (especially *P judaica*) are found in Southern Europe and in some regions of the United States.^{14,15} Nettles are found in open areas and especially in nitrate-rich soils. They are wind pollinated, and most nettle species flower from April to October. *U dioica* (stinging nettle) is perennial, whereas *Urtica urens* (dwarf nettle) is annual. Their leaves and stems are covered with stinging hairs (dwarf nettle leaves are smooth and more delicate). Besides a respiratory route for nettle pollen sensitization, ingestion of nettle proteins might also sensitize individuals because the leaves (*U dioica* and *U urens*) are consumed in salads, soups, tea, as a curdling agent, and as herbal remedies recommended notably for their anti-inflammatory properties, especially in the case of allergic rhinitis.^{16–18}

In this study, we investigated the IgE response of 2 patients with clinical symptoms after exposure to nettle pollen. The clinical relevance of nettle pollen protein sensitization was assessed by the skin prick test (SPT), nasal provocation, and the basophil activation test, and an allergomic (IgE immunoproteomic) analysis was performed to characterize the specific nettle pollen allergens.

Methods

Patients and Patient Sera

Both patients (patients 1 and 2) experienced rhinoconjunctivitis symptoms from May to September. Written informed consent, in accord with an institutional board review by the Pneumology-Allergology Department, University Hospital, was obtained from the 2 patients.

Serum samples from 3 patients (patients 3, 4, and 5) were selected as positive controls for IgE reactivity to total protein extract from nettle and/or pellitory pollen and corresponded to residues from biological analysis performed to diagnose the allergy. Serum from a healthy individual (nonallergic, nonatopic) was used as a negative control. Serum samples were stored at -20°C until use.

Specific IgE Evaluations

Serum IgE specific to nettle (*U dioica*) pollen extract were quantified by fluorescence enzyme immunoassay (Thermo Fisher Scientific, Villebon, France, and Phadia, Uppsala, Sweden) using an ImmunoCAP 250 apparatus. SPTs using pollen extracts provided by ALK-Abello (Vandeuil, France) and Stallergenes Laboratories (Antony, France), including *U dioica* pollen, were performed according to guidelines.¹⁹ Skin prick to prick tests (SPPTs) were performed with fresh food provided by patient 2.

Nasal provocation tests (NPTs) were performed with 1/100, 1/10, and 1/1 diluted nettle pollen extract solution (ALK-Abello) applied every 10 minutes to one side of the nose.²⁰ Total nasal symptom scores were assessed using a visual analog scale (VAS) for rhinitis symptom severity as recommended by the Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma guidelines. A VAS score of less than 5 cm is associated with mild rhinitis and a VAS score more than 6 cm with moderate to severe rhinitis.²¹ Endoscopic examination was recorded at a 1/1 dilution of nettle pollen extract. The basophil activation test was performed on the cells of the patient allergic to nettle pollen according to the manufacturer's instructions (Bühlmann, Schönenbuch, Switzerland) with the same nettle pollen extract

solution (1/1) as the activating allergenic source. The negative control was performed on cells with no source of allergens.

Pollen Protein Extractions

Parietaria officinalis pollen was supplied by Allergon AB (Angelholm, Sweden), and *U dioica* pollen was a generous gift from ALK Abello. Pollen (50 mg) was extracted with lysing matrix A or C (MP-Biomedicals, Illkirch, France) in 0.5 mL of phosphate buffer saline (PBS) (pH 7.4) using a multidirectional grinder (FastPrep-24; MP-Biomedicals) (6 m/s for 40 sec at 4°C) and centrifuged at $18,000g$ for 20 minutes at 4°C . Supernatants were collected and stored as aliquots at -20°C .²²

Gel Electrophoresis Separation

Proteins from the different pollen extracts were separated by 1-dimensional (1-D) sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and 2-dimensional (2-D) electrophoresis according to Shahali et al.²³ Molecular mass markers (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) ranging from 14.4 to 94 kDa and isoelectric point (pI) markers (Bio-Rad, Hercules, California) ranging from 4.45 to 9.6 were used as comparative references. For protein detection, gels were stained with Coomassie blue or silver. The 1-D and 2-D electrophoresis gels used for mass spectrometry analysis were stained with colloidal Coomassie blue.

Immunoblotting

Proteins separated by 1-D and 2-D electrophoresis were electrotransferred onto 0.2 μm cyanogen bromide–activated nitrocellulose as described²⁴ (Optitran BA-S 83, Schleicher and Schuell, Dassel, Germany). Membranes were then dried and stored at -20°C until use. For multiplexed 1-D electrophoresis immunoblot analysis, cyanogen bromide–activated nitrocellulose was cut into 2.5-mm-wide strips. For 2-D electrophoresis immunoblot, the whole cyanogen bromide–activated nitrocellulose was treated. Each strip or whole cyanogen bromide–activated nitrocellulose was then blocked with PBS that contained 0.3% (vol/vol) Tween 20 and incubated overnight with individual sera diluted 1:10 in PBS with 0.1% Tween. After washing, the membranes were incubated with alkaline phosphatase–conjugated goat anti-human IgE (ϵ specific; Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri), and alkaline phosphatase activity was detected using nitro blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate according to Shahali et al.²³

IgE-Binding Inhibition Using Bromelain

To assess the oligosaccharide or peptide nature of IgE epitopes, binding inhibition tests were performed on immunoblots by preincubation of the individual serum with 0.1% bromelain (from pineapple stem; Sigma-Aldrich) as previously described.^{23,24}

Mass Spectrometry Analysis

After matching of the coordinates (relative molecular mass and pI) between IgE-binding proteins revealed by immunoblotting and gel proteins, the spots were manually excised. Proteins were then treated according to Abou Chakra et al.²⁵ Mass spectrometry (MS) and MS/MS Orbitrap analyses were performed using an Ultimate 3000 rapid separation liquid chromatographic system (Thermo Fisher Scientific) online with a hybrid linear trap quadrupole–Orbitrap–Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Peptide treatment and mass spectrometer data acquisition were performed according to Immel et al.²⁶

Database Search

Proteome Discover software, version 1.4.0.288 (Thermo Fisher Scientific), was used to create search files and to interpret MS and

MS/MS spectra. The search engine Mascot Server 2.4 (MatrixScience, London, United Kingdom) was used on Viridiplantae taxonomy (Green Plants, 36,711 sequences) from either the National Center for Biotechnology Information nr databank, containing 67,337,701 sequences (May 2015), or SwissProt, containing 549,008 sequences (August 2015) (www.ncbi.nlm.nih.gov/). The database search was performed for tryptic peptides only, with cysteine carbamidomethylation and methionine oxidation as variable modifications. Precursor and fragment error tolerances were set to 5 ppm and 0.56 Da, respectively. Up to 1 missed cleavage was accepted. Protein identification was validated if the search yielded an identification score associated with a significance level better than 95% and if at least 2 peptides were sequenced with an ion score above a threshold of 25.

Results

Patients' Symptoms and Tests

Both patients studied presented seasonal rhinoconjunctivitis from May to September during the nettle flowering and pollination period. Patient 1, a 48-year-old man from a nonatopic family, was monosensitized to nettle pollen. Ear, nose, and throat symptoms were very disabling despite treatment with antihistamines and topical steroids. The results of SPTs with 32 aeroallergens, including house dust mites, cat and dog dander, and several pollen extracts,

were all negative except for nettle pollen extract (Fig 1A). IgE specific to this pollen extract was clearly detectable, and test results were slightly positive to rPar j 2 (Table 1). The NPT result was positive, with a total nasal symptom score progressively increasing from 0 at baseline to 5 after the instillation of 1 mL of 1/100 diluted solution to 7 after 1 mL of 1/10 diluted solution to 9 after 1 mL of undiluted solution. Endoscopic examination, performed before (Fig 1B) and after (Fig 1C) these nasal instillations, revealed a total obstruction. Results of the basophil activation test using nettle pollen extract, performed with patient cells, was strongly positive, with 93% of basophils expressing CD63 on activation (Fig 1D).

Patient 2, a 53-year-old man, is polysensitized to various pollens, horse, and dog dander and has rhinoconjunctivitis and asthma symptoms from May to June (Table 1). SPTs were performed with 11 aeroallergens, and results were positive for *Dermatophagoides pteronyssinus*, cat, dog and different pollen extracts. The strongest reaction was observed with the nettle pollen extract. Moreover, this patient had anaphylactic shock (hives, palpebral edema, and laryngeal dyspnea) in June 2015 after exercise (mountain climbing), 2 hours after ingesting a nettle leaf soup and drinking a beer. During the meal, roasted peanuts and dough wheat flour with pesto sauce were also eaten. The SPT results were slightly positive for the nettle soup and nettle leaves (Table 1). This result is likely to be related to a lower concentration of nettle leaf allergens and/or

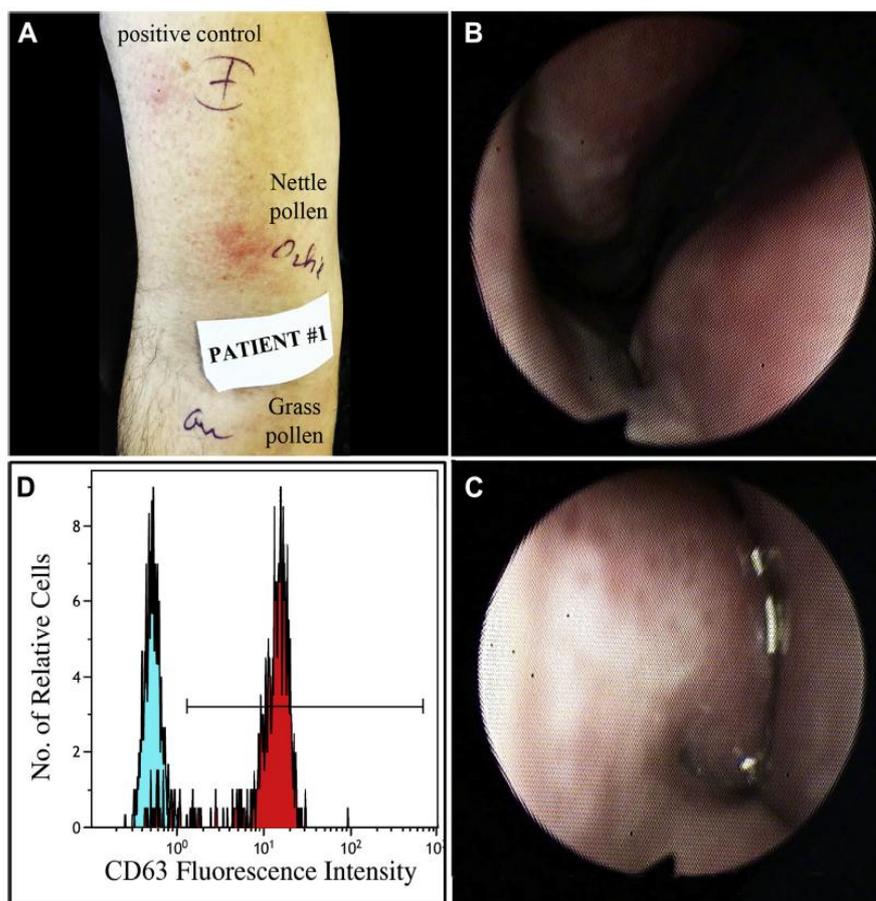


Figure 1. Clinical and biological test results for patient 1. A, Skin prick test to nettle and grass pollen extracts. B and C, Nasal provocation test with nettle pollen extract. Right nostril is shown before (B) and after (C) instillation of undiluted nettle pollen extract. D, Basophil activation test showing percentage of CD63-positive basophils after activation with nettle pollen extract (red histogram) or not activated (negative control, blue histogram).

Table 1
Clinical Data of the 2 Studied Nettle Pollen Allergic Patients

Characteristic	Patient 1	Patient 2
Sex	M	M
Date of birth	July 2, 1968	April 15, 1963
Age at symptom onset, y	44	51
Months of ENT symptoms	July–September	May–June
Symptoms		
Nettle soup	Unknown	AS
Nettle pollen	RC	RC
Specific IgE, kU/L		
<i>Urtica dioica</i> pollen extract	9.84	20
<i>Parietaria judaica</i> pollen		
Extract	0.10	ND
rPar j 2	0.63	ND
<i>Artemisia vulgaris</i> pollen		
Extract	ND	0.45
nArt v 1	<0.1	<.01
nArt v 3	<0.1	<.01
<i>Ambrosia artemisiifolia</i> pollen		
nAmb a 1	<0.1	ND
<i>Phleum pratense</i> pollen		
rPhl p 1+5	ND	14
rPhl p 7	ND	<0.1
<i>Betula verrucosa</i> pollen		
rBet v 1	ND	0.7
rBet v 2	<0.1	<0.1
rBet v 4	<0.1	ND
<i>Olea europea</i> pollen nOle e 7	<0.1	ND
<i>Prunus persica</i> fruit rPru p 3	<0.1	<0.1
Skin prick test or prick to prick test wheal diameter, mm		
Nettle leave	0	4
Cooked nettle soup	0	2
Dough wheat flour	0	0
Peanut	0	0
Pesto sauce	0	0
Beer	0	0
Nettle pollen	9	10
Grass pollen	0	6
Birch pollen	0	5.5
Ash pollen	0	5
Plantain pollen	0	5
NPT result for nettle pollen	Positive	ND
BAT result for nettle pollen	Strongly positive (93% of basophils CD63 ⁺)	ND

Abbreviations: AS, anaphylactic shock; BAT, basophil activation test; ENT, ear, nose, and throat; ND, not determined; NPT, nasal provocation test; RC, rhinoconjunctivitis.

modified allergens by cooking in nettle soup. The SPPT results were negative for peanut, wheat, pasta, tomato, and beer. Specific IgE test results were positive for nettle pollen and mugwort pollen extracts. All other components of the meal were reintroduced without any reaction, except for the nettle leaf soup.

Immunoblot 1-D Electrophoresis: IgE Sensitization to Nettle Pollen Extract of Allergic Patients

The specificity of serum IgE was evaluated by immunoblot after 1-D electrophoresis separation (SDS-PAGE) of proteins extracted from *U. dioica* (Fig 2A) and *P. officinalis* pollen (Fig 2B). Although no IgE reactivity was observed with control PBS (lane C1) or control serum from nonallergic individuals (lane C2), patients' serum samples revealed IgE reactivity against nettle pollen proteins (Fig 2A, lanes 1 and 2). IgE from patient 1 had strong reactivity against a 14-kDa protein and weak reactivity against 2 proteins with relative molecular masses of 27 and 43 kDa. IgE reactivity against the latter protein (43 kDa) was mainly directed against carbohydrate moieties because it was inhibited by bromelain. Conversely, IgE binding was to peptide epitopes for the 14- and 27-kDa proteins (Fig 2A, lane 1, bromelain inhibition). The serum sample of patient 1

did not reveal IgE reactivity against pellitory pollen extract (Fig 2B, lane 1). Patient 2 had a heterogeneous IgE reactivity profile, including the profile of patient 1 with an additional band of approximately 30 kDa (Fig 2A, lane 2). Simultaneous incubation of serum 2 with bromelain resulted in inhibition of binding to all proteins larger than 25 kDa. Therefore, as for patient 1, anti-14-kDa IgE of patient 2 was directed against peptide epitopes. Interestingly, serum from patient 2 had some IgE reactivity against proteins larger than 30 kDa from pellitory pollen extract (Fig 2B, lane 2), which are likely to be anti-cross-reactive carbohydrate determinants.

The use of additional patient sera with IgE specific to nettle pollen confirmed the specificity of the IgE reactivities of patients 1 and 2 to nettle pollen. Patient 5, who was sensitized to nettle pollen, had IgE reactivity to proteins larger than 30 kDa in pellitory and nettle pollen extracts, all inhibited by bromelain, and reactivity to proteins of approximately 14 kDa in pellitory pollen only (Fig 2A and B, lane 5). Patient 4, who was sensitized to pellitory pollen, exhibited IgE binding to 2 proteins with low relative molecular masses (10 and 14 kDa) in pellitory pollen extract, but the only IgE reactivity to nettle pollen extract was to proteins smaller than 10 kDa (Fig 2A and B, lane 4), and reactivity against proteins with high relative molecular masses was inhibited by bromelain for the 2 pollen extracts. Patient 3, who was sensitized to pellitory pollen, had very strong IgE reactivity to proteins with low relative molecular masses (<30 kDa) (Fig 2B, lane 3), but no IgE binding to nettle pollen was observed (Fig 2A, lane 3).

Characterization of Nettle Pollen Allergens by MS Analysis After 2-D Electrophoresis Separation

Approximately sixty proteins from nettle pollen extract were silver stained after 2-D electrophoresis separation (Fig 3A), with relative molecular masses between 14 and 94 kDa and pIs ranging from 3.0 to 9.5. Some proteins had a very basic pI (from 9 to 10).

The cyanogen bromide-activated nitrocellulose membranes obtained after transfer of proteins from 2-D electrophoresis gels were incubated with the allergic patients' sera. IgE from the serum of patient 1 revealed 3 groups of basic allergens, each one with putative isoforms, with relative molecular masses of 14, 27, and 43 kDa (Fig 3B). The most basic allergen, with a relative molecular mass of 14 kDa, presented strong IgE reactivity. IgE responses of the serum from patient 2 were more heterogeneous (Fig 3C) than those of the serum from patient 1. Serum from patient 2 had strong IgE reactivity to 14-, 27-, and 35-kDa proteins and weaker binding to a 43-kDa basic allergen and to several other allergens between 35 to 70 kDa, with pIs from 5 to 9. In agreement with the 1-D electrophoresis experiments, coinubation of the serum from patient 2 with bromelain inhibited IgE binding to proteins with high relative molecular masses (>30 kDa) and resulted in an IgE reactivity profile very close to that of patient 1 (Fig 3D).

After matching the coordinates (relative molecular mass and pI) between IgE-binding proteins from studied sera and stained proteins, 8 IgE-binding protein spots were excised from the 2-D electrophoresis gel (spots 5, 8, 9, 10, 11, 16, 17, and 18) (Fig 3A). Ten other non-IgE-binding proteins were also excised from the gel (spots 1, 2, 3, 4, 6, 7, 12, 13, 14, and 15) (Fig 3A). Then, these proteins and IgE-binding proteins were submitted to MS and MS/MS analysis, and the results of databank queries are given in Table 2. The list of identified proteins in the Viridiplantae database is presented together with data related to protein names, the plant species in which the optimal homology was found, the total ion scores, the number of peptides identified and also the coordinates as relative molecular mass and pI.

With regard to relevant allergenic spots, hypothetical proteins were found in spot 5, with a theoretical relative molecular mass of 46 to 47 kDa, and in spot 8 a pectinesterase or pectin

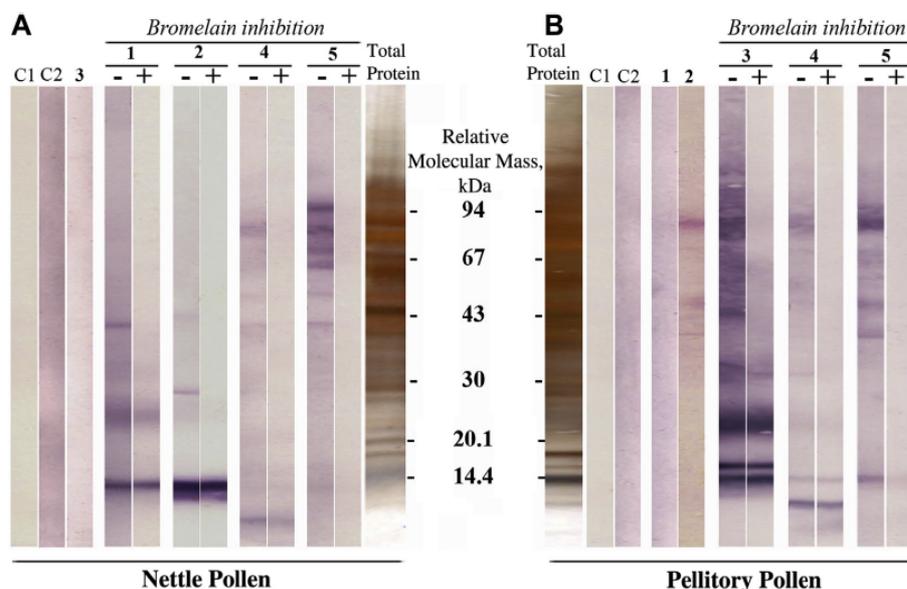


Figure 2. IgE immunoreactivity of selected patients' serum samples studied by immunoblots after sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis separation of nettle (*Urtica dioica*) (A) or pellitory (*Parietaria officinalis*) (B) pollen extracts. Strips were incubated with selected patients' sera diagnosed allergic to pellitory and/or nettle pollen (1 to 5) without (–) or with (+) bromelain. Specific IgE (kU/L) for additional patients were as follows: patient 3, *P. officinalis* pollen 3.50; patient 4, *Parietaria judaica* pollen 15.6 and grass pollen 33.7; patient 5, *U. dioica* pollen 1.93, grass pollen 30.6, and cypress pollen 0.52. Relative molecular masses are indicated for both gels. Total protein indicates total protein pattern stained with silver nitrate; C1, negative control 1 (no serum); C2, negative control 2 (serum from a nonallergic individual).

methylesterase homologous to that of *Eucalyptus grandis* was found, with a theoretical relative molecular mass of 52 kDa. In spots 10 and 11, a member of the thaumatin-like family of proteins was identified: an osmotin, similar to that of *Piper colubrinum*. In spot 17 a cytochrome C–like protein was revealed together with an unknown protein also found in spot 16.

Among proteins not recognized by IgE from the 2 studied patients, some have been described as allergens in other plants, fungi, or fruits: a methionine synthase, an endopeptidase-like enzyme, a β -xylosidase, an enolase, an aldolase, and a β -glucosidase. Fourteen additional proteins, not reported as allergens to our knowledge, were identified (Table 2).

Discussion

The allergenic potential of a specific pollen is difficult to define because it depends on the degree of exposure, a value related to the total amount of pollen in the atmosphere (from intact or fragmented grains), the phenologic conditions in the area considered, and other cofactors, such as temperature, hygrometry, and air pollution. However, pollen sources are highly variable in their allergenicity. The pollen of nettle (*U. dioica*) is considered less allergenic than its botanically related species wall pellitory (*Parietaria*), the pollen of which is one of the most common causes of pollinosis currently known in the Mediterranean area.

Two cases of rare respiratory allergy to nettle pollen are reported herein. Both patients have rhinitis. One (patient 2) also experienced an anaphylactic shock after consumption of a nettle soup. Besides the SPT performed to confirm the diagnosis of allergic rhinitis caused by nettle pollen, an NPT result in the other patient (patient 1) was positive, as was the basophil activation test result with total extract. Therefore, nettle pollen allergens should be considered as clinically relevant, and the prevalence of nettle pollen allergy is probably underestimated because its pollination period overlaps with that of grasses.

To gain insight into the specific allergens involved in allergy to nettle pollen, Urticaceae sensitized allergic patients were tested in parallel using *Urtica* and *Parietaria* pollen extracts and immunoprinting methods. Besides anti–cross–reactive carbohydrate determinants, no cross-reactivities were observed, suggesting that despite the botanical association between these 2 plants, protein structures are different, at least at the level of peptide IgE epitopes. These results are in accordance with an immunocytochemical study also showing no cross-reactivity between *Parietaria* and *Urtica* pollen.²⁷

Ours is the first study, to our knowledge, to investigate the allergens from *U. dioica* pollen extract by means of an allergomic approach. Nettle pollen proteins were PBS extracted using a multidirectional grinder, which is qualitatively and quantitatively very efficient.

Using 2-D analysis, 8 IgE-binding proteins from *U. dioica* pollen were characterized. Four of them were hypothetical or unidentified proteins. Two of them were isoforms of the pathogenesis-related protein 5 osmotin, with a relative molecular mass of 27 to 29 kDa and a pI of 8.35 to 8.9, close to the relative molecular mass and pI of osmotin from *Piper colubrinum* (wild pepper). An osmotin from the leaves of *Nicotiana tabacum* (Nict Osmotin) has been reported to be allergenic,²⁸ and Cap a 1, an osmotin-like protein, is the major allergen of *Capsicum annuum*, the bell pepper.²⁹ Osmotin proteins belong to the family of thaumatin-like protein allergens, which are physiologically related to plant stress responses. They constitute the third group of cypress pollen allergens that are upregulated in polluted environment.^{30,31} It is not known whether this last characteristic also applies to nettle osmotin and might be relevant because nettles are found in cities where atmospheric pollution is sometimes high. Thaumatin-like proteins are also reported to be involved in pollen food–associated syndromes.³² Patient 2 underwent an anaphylactic shock 2 hours after consumption of a nettle soup. It is not known whether osmotin or other nettle allergens are involved in food-dependent exercise-induced anaphylaxis, and this should be investigated further. A pectin methylesterase was also

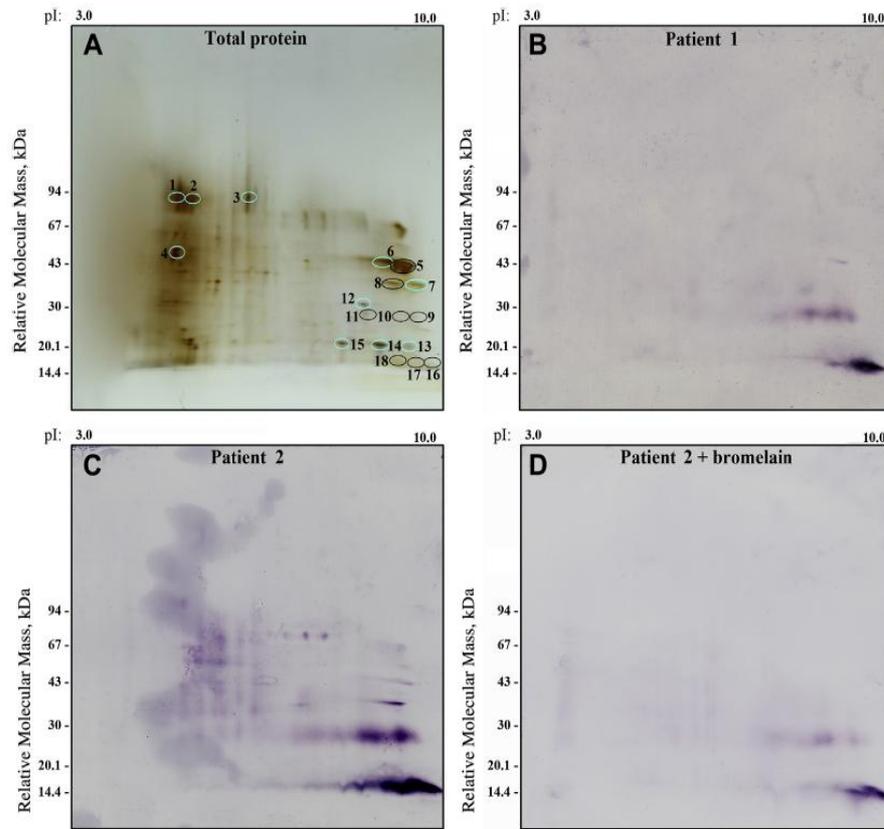


Figure 3. IgE immunoreactivity of the serum samples from patients 1 and 2 studied by immunoblots after 2-dimensional (2-D) electrophoresis separation of nettle (*Urtica dioica*) pollen extract. A, Total proteins of nettle pollen extract silver stained with indications as ellipses and numbers of excised spots for mass spectrometry analysis. IgE-binding proteins are circled with black ellipses and additional proteins with blue ellipses. B–D, 2-D electrophoresis immunoblots obtained after incubation with serum from patient 1 (B), serum from patient 2 (C), and serum from patients 2 in the presence of bromelain 0.1% (D). Isoelectric point (pI) values (at the top) and relative molecular mass on the left side are indicated for each gel.

identified in the nettle pollen extract. This protein has been described as a pollen allergen in several trees or shrubs, such as Bet v 8 in birch³³ and Fra e 11 in ash.³⁴ Pectin methylesterases are also food allergens in *Actinidia deliciosa*, kiwi fruit (Act d 7),³⁵ and *Solanum lycopersicum* (Sola l PME).³⁶

We found strong IgE reactivity, likely against 3 isoforms of the same protein, in both our patients at basic pH in a low relative molecular mass zone (approximately 14–17 kDa). The allergens were not satisfactorily identified by MS analysis, although cytochrome c (a well-known allergen in grass pollen for instance³⁷) and an unknown protein were listed after data bank searches. Because of their low relative molecular mass and high pI, they might correspond to *Urtica* LTPs, homologues of the major allergens *Parietaria* LTPs. However, anti-LTP antibodies specifically directed against Pru p 3, the LTP from peach, or against Tri a 14, the LTP from wheat, did not bind to these proteins in immunochemical experiments. More experiments are needed to unravel the physical-chemical nature of this highly IgE-reactive allergen reminiscent of what was found for *Cupressus sempervirens* pollen.²³

We identified further proteins in nettle pollen extract. A methionine synthase and an endopeptidase could be considered as putative allergens in nettle pollen because they were found to be allergenic in *Salsola kali* pollen (Sal k 3)³⁸ and in the fungus *Rhizopus oryzae* (Rhi o 1). In addition, a β -xylosidase similar to the one found in

Malus domestica has been described as an allergen in *Aspergillus awamori* and *Aspergillus niger* (Asp aw 14 and Asp n 14). An enolase and an aldolase characterized in spots 3 and 4 have been described as allergens in *Cynodon dactylon* (Cyn d 22), *Plantago lanceolata* (Pla l 22 and Pla l PFA), *Manihot esculenta* in the case of the aldolase (Man e FPA) (<http://www.allergome.org/>), *Zea mays* (Zea m 22)³⁹ pollen, and *Hevea brasiliensis* in the case of the enolase (Hev b 9).⁴⁰ A β -glucosidase was also found in spot 7: β -glucosidase has been described as an allergen in different fungi (Asp f glucosidase)⁴¹ and in fruit such as *Lycium barbarum* (Lyc ba glucosidase).⁴²

To conclude, we found, with documented clinical and biological data from 2 patients, that *U dioica* pollen, which is not considered very allergenic despite its abundance in some regions¹⁵ (www.pollens.fr/toustaxons2015.pdf, www.worc.ac.uk/discover/pollenforecast.html), sensitizes individuals and induces symptoms. Biochemical studies were conducted with the patients' serum samples to characterize the allergens involved. These nettle pollen allergens do not cross-react with wall pellitory allergens despite the common botanical origin of these 2 plants. The main IgE reactivities were found against a thaumatin-like protein and an unidentified basic allergen with low relative molecular mass. More patients and further research are needed to identify all the proteins responsible for this allergy and to establish the genuine allergenic potential of this pollen.

Table 2
MS and MS/MS Analysis of Proteins and Allergens From Nettle Pollen Extracts After 2-Dimensional Electrophoresis Separation

Spot No.	Experimental relative molecular mass, kDa	Experimental pI	Proteins	Species	Theoretical relative molecular mass, kDa	Theoretical pI	Total Ion Score	No. of peptides identified	Coverage, %
1	94	3.3	Methionine synthase	<i>Orobanche ramosa</i>	85	6.0	758	13	21
			Phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D1	<i>Cynara cardunculus</i>	92	5.2	212	4	5
			Prolyl endopeptidase-like	<i>Elaeis guineensis</i>	85	5.3	171	3	4
2	94	3.5	Cytosolic aconitase	<i>Nicotiana tabacum</i>	98	5.9	119	3	3
			β -xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase 1-like	<i>Malus domestica</i>	83	6.2	102	2	3
			Methionine synthase	<i>Orobanche ramosa</i>	85	6.0	826	14	23
			Protease 2	<i>Morus notabilis</i>	89	5.8	332	8	7
3	94	5.5	Puromycin-sensitive aminopeptidase-like isoform	<i>Glycine max</i>	111	6.3	281	5	5
			HPL1 protein precursor, putative	<i>Ricinus communis</i>	76	5.0	110	2	3
			β -xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase 1-like	<i>Malus domestica</i>	83	6.2	91	2	3
			5-methyltetrahydropteroyltri-glutamate-homocysteine-methyltransferase	<i>Sesamum indicum</i>	85	6.2	380	6	10
			β -xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase 1-like	<i>Malus domestica</i>	83	6.2	96	2	3
4	54	3.3	Enolase-like	<i>Pyrus x bretschneideri</i>	48	6.1	500	8	23
			Uncharacterized protein LOC101205302	<i>Cucumis sativus</i>	48	5.6	363	6	17
			Hypothetical protein PRUPE_ppa005968mg	<i>Prunus persica</i>	47	6.5	349	7	16
			Monodehydroascorbate reductase	<i>Solanum lycopersicum</i>	47	5.7	456	4	12
			Cytosolic aldolase	<i>Fragaria x ananassa</i>	38	6.9	145	2	8
5 ^a	43	8.9	Hypothetical protein ARALYDRAFT_487142	<i>Arabidopsis lyrata</i>	47	5.5	162	3	9
			Hypothetical protein POPTR0019x09470g, partial	<i>Populus trichocarpa</i>	46	9.3	75	1	3
			Monodehydroascorbate reductase	<i>Solanum lycopersicum</i>	47	5.8	94	1	3
			Glucan endo-1,3- β -glucosidase, basic isoform	<i>Morus notabilis</i>	38	9.3	116	2	6
8 ^a	40	8.6	Pectinesterase 2-like	<i>Eucalyptus grandis</i>	52	8.0	157	2	4
			Hypothetical protein POPTR_0011s13830g	<i>Populus trichocarpa</i>	60	6.1	102	2	3
9 ^a	27	9.1	No protein identified	NA	NA	NA	NA	NA	
10 ^a	29	8.9	Osmotin	<i>Piper colubrinum</i>	25	8.1	70	1	6
11 ^a	29	8.35	Osmotin	<i>Piper colubrinum</i>	25	8.1	95	2	12
12	32	8.2	No protein identified	NA	NA	NA	NA	NA	
13	21	9.1	Cytochrome c-like	<i>Brachypodium distachyon</i>	12	9.5	173	4	33
14	22	8.3	Osmotin	<i>Piper colubrinum</i>	25	8.1	78	1	6
			Cytochrome c-like	<i>Brachypodium distachyon</i>	12	9.5	139	3	25
15	22	7.4	Perchloric acid soluble translation inhibitor protein	<i>Arachis hypogaea</i>	20	8.9	91	2	12
16 ^a	16	9.4	Unknown	<i>Lotus japonicus</i>	13	9.7	73	1	6
17 ^a	16	9.0	Cytochrome c-like	<i>Brachypodium distachyon</i>	12	9.5	147	3	25
18 ^a	17	8.6	Unknown	<i>Lotus japonicus</i>	13	9.7	70	1	6
			No protein identified	NA	NA	NA	NA	NA	

Abbreviations: NA, not applicable; pI, isoelectric point.

^aProteins recognized by IgE from patient serum samples that were studied.

Acknowledgments

We would like to thank Y. Martinet, C. Mouton-Faivre, and C. Kohler from the University Hospital, Nancy, France, for their help in basophil activation tests, SPTs, and NPTs. We thank also P. Chafey, from Cochin Institute, Paris, France, for helpful discussions and K. Dinard and M.-A. Selva, from Armand Trousseau Hospital, Paris, France, for their skillful technical assistance.

References

- [1] Uslu S, Bulbul A, Diler B, Bas EK, Nuhoglu A. Urticaria due to *Urtica dioica* in a neonate. *Eur J Pediatr*. 2011;170:401–403.
- [2] Caliskaner Z, Karaayvaz M, Ozturk S. Misuse of a herb: stinging nettle (*Urtica urens*) induced severe tongue oedema. *Complement Ther Med*. 2004;12:57–58.
- [3] Levetin E, Buck P. Hay fever plants in Oklahoma. *Ann Allergy*. 1980;45:26–32.
- [4] Lewis WH, Vinay P, Zenger VE. *Airborne and Allergenic Pollen of North America*. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press; 1983.
- [5] Piness G. Regional Allergy of the United States, Southern California. In: Samter M, Durhan OC, eds. *Regional Allergy of the United States, Canada, Mexico and Cuba: A Symposium of Thirty-Nine Contributors*, Vol. 356. Springfield, IL: CC Thomas; 1955.
- [6] Belver MT, Caballero MT, Contreras J, et al. Associations among pollen sensitizations from different botanical species in patients living in the northern area of Madrid. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007;17:157–159.
- [7] Mari A, Artale A, Bonura A, Scala E, Colombo P. Par j 2 as a *Parietaria* sensitisation marker allergen: definition of its use in epidemiology and diagnosis. *Allergy Clin Immunol Int*. 2005;17(suppl 1):205.
- [8] Bonura A, Passantino R, Costa MA, et al. Characterization of a Par j 1/Par j 2 mutant hybrid with reduced allergenicity for immunotherapy of *Parietaria* allergy. *Clin Exp Allergy*. 2012;42:471–480.
- [9] Gadermaier G, Hauser M, Ferreira F. Allergens of weed pollen: an overview on recombinant and natural molecules. *Methods*. 2014;66:55–66.
- [10] Bonura A, Trapani A, Gulino L, et al. Cloning, expression in *E. coli* and immunological characterization of Par j 3.0201, a *Parietaria* pollen profilin variant. *Mol Immunol*. 2014;57:220–225.
- [11] Bonura A, Gulino L, Trapani A, et al. Isolation, expression and immunological characterization of a calcium-binding protein from *Parietaria* pollen. *Mol Immunol*. 2008;45:2465–2473.
- [12] Bousquet J, Hewitt B, Guérin B, Dhivert H, Michel FB. Allergy in the Mediterranean area, II: cross-allergenicity among Urticaceae pollens (*Parietaria* and *Urtica*). *Clin Allergy*. 1986;16:57–64.
- [13] Miura N. Ramie (*Boehmeria nivea*) pollen-induced bronchial asthma and allergenic cross-reactivity of ramie and *Parietaria*. *Arerugi*. 1993;42:649–655.
- [14] Esch RE, Hartsell CJ, Crenshaw R, Jacobson RS. Common allergenic pollens, fungi, animals, and arthropods. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2001;21:261–292.
- [15] Hyde HA. Volumetric counts of pollen grains at Cardiff, 1954–1957. *J Allergy*. 1959;30:219–234.
- [16] Mittman P. Randomized, double-blind study of freeze-dried *Urtica dioica* in the treatment of allergic rhinitis. *Planta Med*. 1990;56:44–47.
- [17] Rodriguez-Fragoso I, Reyes-Esparza J, Burchiel SW, Herrera-Ruiz D, Torres E. Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;227:125–135.
- [18] Sayin I, Cingi C, Oghan F, Baykal B, Ulusoy S. Complementary therapies in allergic rhinitis. *ISRN Allergy*. 2013;2013:938751.
- [19] Heinzerling L, Mari A, Bergmann KC, et al. The skin prick test: European standards. *Clin Transl Allergy*. 2013;3:3.
- [20] Gosepath J, Amedee RG, Mann WJ. Nasal provocation testing as an international standard for evaluation of allergic and nonallergic rhinitis. *Laryngoscope*. 2005;115:512–516.
- [21] Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008;63(suppl 86):8–160.
- [22] Shahali Y, Sutra J-P, Peltre G, Charpin D, Sénéchal H, Poncet P. IgE reactivity to common cypress (*C. sempervirens*) pollen extracts: evidence for novel allergens. *World Allergy Organ J*. 2010;3:229–234.
- [23] Shahali Y, Sutra J-P, Charpin D, et al. Differential IgE sensitization to cypress pollen associated to a basic allergen of 14 kDa. *FEBS J*. 2012;279:1445–1455.
- [24] Poncet P, Sénéchal H, Clément G, et al. Evaluation of ash pollen sensitization pattern using proteomic approach with individual sera from allergic patients. *Allergy*. 2010;65:571–580.
- [25] Abou Chakra OR, Sutra JP, Demey Thomas E, et al. Proteomic analysis of major and minor allergens from isolated pollen cytoplasmic granules. *J Proteome Res*. 2012;11:1208–1216.
- [26] Immel F, Broussard C, Catherinet B, et al. The shell of the invasive bivalve species *Dreissena polymorpha*: biochemical, elemental and textural investigations. *PLoS ONE*. 2016;11:e0154264.
- [27] Vega-Maray AM, Fernández-González D, Valencia-Barrera R, Suárez-Cervera M. Allergenic proteins in *Urtica dioica*, a member of the Urticaceae allergenic family. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006;97:343–349.
- [28] Min K, Ha SC, Hasegawa PM, Bressan RA, Yun DJ, Kim KK. Crystal structure of osmotin, a plant antifungal protein. *Proteins*. 2004;54:170–173.
- [29] Shama P, Singh AK, Singh BP, Gaur SN, Arora N. Allergenicity assessment of osmotin, a pathogenesis-related protein, used for transgenic crops. *J Agric Food Chem*. 2011;59:9990–9995.
- [30] Cortegano I, Civantos E, Aceituno E, et al. Cloning and expression of a major allergen from *Cupressus arizonica* pollen, Cup a 3, a PR-5 protein expressed under polluted environment. *Allergy*. 2004;59:485–490.
- [31] Suarez-Cervera M, Castells T, Vega-Maray A, et al. Effects of air pollution on Cup a 3 allergen in *Cupressus arizonica* pollen grains. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008;101:57–66.
- [32] Palacin A, Rivas LA, Gomez-Casado C, et al. The involvement of thaumatin-like proteins in plant food cross-reactivity: a multicenter study using a specific protein microarray. *PLoS One*. 2012;7:e44088.
- [33] Mahler V, Fischer S, Heiss S, Duchene M, Kraft D, Valenta R. cDNA cloning and characterization of a cross-reactive birch pollen allergen: identification as a pectin esterase. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;124:64–66.
- [34] Mas S, Torres M, Garrido-Arandia M, et al. Ash pollen immunoproteomics: Identification, immunologic characterization, and sequencing of 6 new allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133:923–926.
- [35] Ciardiello MA, D'Avino R, Amoresano A, et al. The peculiar structural features of kiwi fruit pectin methyltransferase: amino acid sequence, oligosaccharides structure, and modeling of the interaction with its natural proteinaceous inhibitor. *Proteins*. 2008;71:195–206.
- [36] Di Matteo A, Giovane A, Raiola A, et al. Structural basis for the interaction between pectin methyltransferase and a specific inhibitor protein. *Plant Cell*. 2005;17:849–858.
- [37] Ekramoddoullah AK, Kisel FT, Sehon AH. Allergenic cross-reactivity of cytochromes c of Kentucky bluegrass and perennial ryegrass pollens. *Mol Immunol*. 1982;19:1527–1534.
- [38] Assarehzadegan MA, Sankian M, Jabbari F, Tehrani M, Falak R, Varasteh A. Identification of methionine synthase (Sal k 3), as a novel allergen of *Salsola kali* pollen. *Mol Biol Rep*. 2011;38:65–73.
- [39] Ramavovolona, Sénéchal H, Andrianarisoa A, et al. High IgE sensitization to maize and rice pollen in the highlands of Madagascar. *Pan Afr Med J*. 2014;19:284.
- [40] D'Amato A, Bachi A, Fasoli E, et al. In-depth exploration of *Hevea brasiliensis* latex proteome and "hidden allergens" via combinatorial peptide ligand libraries. *J Proteomics*. 2010;73:1368–1380.
- [41] Singh B, Oellerich M, Kumar R, et al. Immuno-reactive molecules identified from the secreted proteome of *Aspergillus fumigatus*. *J Proteome Res*. 2010;9:5517–5529.
- [42] D'Amato A, Esteve C, Fasoli E, Citterio A, Righetti PG. Proteomic analysis of *Lycium barbarum* (Goji) fruit via combinatorial peptide ligand libraries. *Electrophoresis*. 2013;34:1729–1736.

Effectiveness of Omalizumab in Severe Allergic Asthma and Nasal Polyposis: A Real-Life Study

Tiotiu A^{1,2}, Oster JP³, Roux PR⁴, Nguyen Thi PL⁵, Peiffer G⁶, Bonniaud P⁷⁻⁹, Dalphin JC^{4,10}, de Blay F^{11,12}

¹Department of Pulmonology, University Hospital of Nancy, Nancy, France

²EA 3450 DevAH - Development, Adaptation and Disadvantage, Cardiorespiratory Regulations and Motor Control, University of Lorraine, Nancy, France

³Department of Pulmonology, Hospital of Colmar, Colmar, France

⁴Department of Pulmonology, University Hospital of Besançon, Besançon, France

⁵Centre hospitalier universitaire de Nancy, Plateforme d'aide à la recherche clinique, Nancy, France

⁶Department of Pulmonology, Hospital of Metz-Thionville, Thionville, France

⁷Department of Pulmonary Medicine and Intensive Care Unit, University Hospital, Dijon, France

⁸Inserm, LNC UMR866, LipSTIC LabEx team, Dijon, France

⁹Bourgogne Franche-Comté University, Dijon, France

¹⁰Franche-Comté University, Besançon, France

¹¹Department of Pulmonology-Allergology, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France

¹²University of Strasbourg, Strasbourg, France

J Investig Allergol Clin Immunol 2020; Vol. 30(1): 49-57

doi: 10.18176/jiaci.0391

Abstract

Background: Omalizumab is a human anti-IgE antibody approved for the treatment of severe allergic asthma (SAA). However, its effectiveness in SAA associated with chronic rhinosinusitis with nasal polyposis (CRSNP+) is less well documented.

Objective: The aim of this study was to evaluate the real-life effectiveness of omalizumab in patients with SAA and CRSNP+ who tolerated and did not tolerate aspirin.

Methods: We performed a retrospective, observational, multicenter, real-life study of patients with SAA and CRSNP+ treated with omalizumab for 6 months. Asthma outcome parameters (symptoms, number of salbutamol rescues/wk, number of moderate/severe exacerbations, Asthma Control Test score, and lung function), sinonasal outcome parameters (symptoms, number of episodes of acute rhinosinusitis, sinus computed tomography images, nasal polyps endoscopy score), and serum eosinophil levels were analyzed 6 months before and after treatment with omalizumab.

Results: Twenty-four adult patients were included (9 with documented aspirin intolerance). All respiratory parameters were significantly improved by the treatment. In parallel, a significant improvement was observed in sinonasal clinical outcomes and sinus computed tomography images, with no major effect on the nasal polyps endoscopy score. The serum eosinophil count decreased significantly after 6 months of treatment with omalizumab.

Conclusion: Treatment of SAA with omalizumab improves the outcome of associated CRSNP+, thus supporting the concept of a "one airway disease".

Key words: Severe allergic asthma. CRSNP+. Effectiveness of omalizumab.

Resumen

Antecedentes: El omalizumab es un anticuerpo anti-IgE humanizado aprobado para el tratamiento del asma alérgica grave (SAA), si bien su eficacia, cuando ésta se asocia a la rinosinusitis crónica con poliposis nasal (CRSNP+), está menos documentada.

Objetivo: El objetivo de este estudio fue evaluar en "vida real" la eficacia de omalizumab en pacientes con SAA y CRSNP+ con o sin intolerancia a la Aspirina.

Métodos: Se realizó un estudio retrospectivo, observacional y multicéntrico, en vida real que incluyó pacientes con SAA y CRSNP+ que fueron tratados con omalizumab durante 6 meses. Las variables de eficacia en relación al asma (síntomas, número de inhalaciones de rescate de salbutamol por semana, número de exacerbaciones moderadas/graves, puntuación de la prueba de control del asma (ACT) y función pulmonar), y de la rinosinusitis (síntomas, número de rinosinusitis aguda, puntuación en tomografía computarizada, puntuación del tamaño de los pólipos en la endoscopia nasal) y el nivel de eosinófilos en sangre se analizaron antes y después de 6 meses de tratamiento con omalizumab.

Resultados: Se incluyeron veinticuatro pacientes adultos (nueve con una intolerancia a la Aspirina documentada). Todas las variables de eficacia en relación al asma mejoraron significativamente con el tratamiento. Paralelamente, las variables clínicas de eficacia en rinosinusitis y la puntuación de las imágenes tomográficas de los senos paranasales mejoraron significativamente, si bien no se observó un efecto relevante en la puntuación de los pólipos en la endoscopia nasal. El nivel de eosinófilos en sangre disminuyó significativamente después de 6 meses de tratamiento con omalizumab.

Conclusión: El tratamiento con omalizumab en pacientes con SAA induce paralelamente una mejoría clínica y radiológica de la CRSNP+ asociada, lo que apoya el concepto de una única enfermedad de las vías respiratorias.

Palabras clave: Asma alérgica grave. CRSNP+. Efectividad de omalizumab.

Introduction

Chronic rhinosinusitis (CRS) is an inflammation of the nasal cavity and paranasal sinuses characterized by symptoms such as nasal obstruction, rhinorrhea, facial pain, and reduction in or loss of smell lasting for ≥ 12 weeks, with objective evidence on nasal endoscopy and sinus CT scan. Based on the presence of nasal polyps defined as benign edematous masses in the nasal cavities, CRS is classified as CRS with nasal polyposis (CRSNP+) and CRS without nasal polyposis (CRSNP-) [1]. Nasal polyposis has a negative impact on quality of life and can lead to considerable workplace absenteeism [2]. The standard treatment of CRSNP+ is medical management with nasal saline irrigations and intranasal corticosteroids for maintenance therapy, systemic corticosteroids and antibiotics for exacerbations, and endoscopic sinus surgery in patients whose medical therapy fails [3].

Asthma is a heterogeneous inflammatory airway disease comprising several phenotypes driven by different pathways [4]. The diagnosis of asthma is based on the presence of intermittent symptoms of wheeze, cough, and chest tightness that may change over time and in intensity with variable expiratory airflow limitation [5]. Inhaled corticosteroids remain the cornerstone of treatment, and current guidelines recommend a step-up approach, with incremental dosing and additional controller medication in order to achieve symptom control and prevent exacerbations [4-6]. While most patients respond well to these guideline-based treatment approaches, 5%-10% remain refractory despite the maximal therapeutic regimen defining the "severe asthma" population [5,7]. The severe allergic asthma (SAA) phenotype is a type of severe asthma in patients with an allergic background and high serum IgE level. The introduction of anti-IgE antibody treatment (omalizumab) at Step 5 of the Global Initiative for Asthma (GINA) guidelines paved the way for personalized medicine in asthma [4].

A strong association between CRS and asthma has been recognized, with a higher prevalence of CRSNP+ in asthma patients than in the general population (7% vs 4%) and the presence of asthma in up to 45% of patients with CRSNP+ [8,9]. In addition, approximately 10% of patients with asthma and CRS report aspirin-exacerbated respiratory disease (AERD) [10]. Many previous studies have provided consistent evidence based on clinical epidemiology, pathophysiology, histology, and treatment outcomes for the CRSNP+ and asthma phenotype, thus sustaining the concept of "one airway disease" [8,9]. The clinical phenotype of asthma and associated CRSNP+ is characterized by adult-onset asthma, higher incidence of allergic rhinitis, longer duration of nasal symptoms, increased risk of exacerbation, airway obstruction, uncontrolled and severe asthma, higher CT and endoscopy scores, higher numbers of sinonasal surgical procedures, and poorer quality of life [8,11]. Patients with this phenotype may have more intense lower airway inflammation and remodelling associated with the presence of CRSNP+ [12]. Upregulation of the T_H2 system with predominantly eosinophilic inflammation and elevated serum and nasal levels of IL-5 and IgE is found in up to 85% of cases of CRSNP+ [13]. A recent analysis of inflammatory endotypes in CRS [14] found the cluster

associated with high IL-5 levels to be an exclusive phenotype of nasal polyposis, with the highest IgE concentrations and prevalence of asthma. In addition, all samples expressed enterotoxin-specific *Staphylococcus aureus* IgE. Based on these data, omalizumab, which is currently approved for the management of the SAA, could prove beneficial in the management of CRSNP+ in selected patients [3].

Data on the effectiveness of omalizumab for treatment of SAA in patients with CRSNP+ are currently limited to small series and studies with sometimes contradictory results concerning patient outcomes [15-19]. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of omalizumab in real life in patients with SAA and CRSNP+ who tolerated and did not tolerate aspirin.

Methods

Patients

This multicenter, noninterventional, retrospective, observational, real-life study was performed in the Department of Pulmonology of the University Hospitals of Besançon, Dijon, Nancy, and Strasbourg and the Regional Hospital of Colmar, France from December 1, 2016 to October 31, 2017. The study was approved by the Institutional Review Board of Société de Pneumologie de Langue Française (French Language Society of Respiratory Medicine) (no. CEPRO 2017-042), and all patients provided their informed consent before their data were retrieved and studied.

Chest physicians with experience in treating severe asthma (based on the European Respiratory Society/American Thoracic Society definition [20]) were asked to provide data on all their patients with SAA and CRSNP+ treated with omalizumab for at least 6 months. To be included, patients had to be adults with uncontrolled SAA despite treatment with Step 4 or 5 of the GINA guidelines [3], for which it was necessary to add omalizumab to improve symptom control and prevent exacerbations. In addition, patients had to have CRSNP+ evaluated by an ear, nose, and throat (ENT) specialist and treated with intranasal corticosteroids. Atopy was proved by skin prick test with common aeroallergens according to European standards [21], and sensitization to at least 1 perennial allergen was confirmed before starting omalizumab. Total serum IgE level was between 120 IU/mL and 996 IU/mL. The dose (in milligrams) and dosing frequency (every 2 or 4 weeks for 6 months) of omalizumab were based on total serum IgE levels (IU/mL) and body weight (in kilograms), with a maximum dose of 600 mg every 2 weeks. The response to omalizumab at 6 months of treatment was recorded and evaluated by a physician.

Outcome Measures

The outcome of asthma was assessed based on clinical parameters (dyspnea, cough, number of daytime asthma symptoms/wk, number of nocturnal asthma symptoms/wk, number of salbutamol rescues/wk, number of moderate/severe exacerbations), Asthma Control Test (ACT) score, and lung function variables 6 months before and after treatment with omalizumab. Asthma was considered well controlled with an

ACT score ≥ 20 , poorly controlled with an ACT score ≤ 19 , and clinically relevant with a change of ≥ 3 points [10]. A moderate-severe asthma exacerbation was defined as aggravation of respiratory symptoms requiring systemic corticosteroids for at least 3 days and/or hospitalization.

The ENT evaluation included symptoms (pruritus, loss of smell, rhinorrhea, sneezing, nasal obstruction), number of episodes of acute rhinosinusitis, sinus CT images, and endoscopy-based scoring of nasal polyposis 6 months before and after initiation of omalizumab. The severity of the ENT symptoms was evaluated using a visual analog scale (0, not troublesome; and 10, worst possible) [2]. Endoscopy was performed in each nostril separately and graded as follows: 0, no polyps; 1, small polyps in the middle meatus not reaching below the inferior border of middle turbinate; 2, polyps reaching below the lower border of the middle turbinate; 3, large polyps reaching the lower border of the inferior turbinate or polyps medial to the middle turbinate; 4, large polyps causing complete obstruction of the inferior nasal cavity [18]. Acute rhinosinusitis was defined as the presence of symptoms/signs such as discolored discharge and purulent secretion in the cavum nasi, severe local pain, and fever ($>38^{\circ}\text{C}$) for at least 5 days requiring antibiotics.

The diagnosis of AERD, which was based on clinical history and a positive result in an oral aspirin challenge test performed several years previously, was obtained from the clinical history of the patients at each center. It was impossible to perform the oral aspirin challenge test sooner because of the criteria for uncontrolled asthma [10]. The protocol currently used in the North-East of France includes incremental doses (30 mg, 60 mg, 100 mg, 160 mg, 325 mg) every 2 hours, with monitoring in hospital for a few hours up to 1 day, as recommended by current guidelines [10].

The only biological marker in this study was serum eosinophil count, which was measured before and after treatment with omalizumab.

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using SAS 9.4 (SAS Institute). Qualitative variables are expressed as number or percentage. Quantitative variables are presented as mean (SD). Comparisons of values between baseline and 6 months after treatment with omalizumab were performed using the *t* test (all patients); comparisons between patients with and without aspirin intolerance were performed using the Fisher exact test. The limit of significance was $P < .05$.

Results

Patients

Twenty-four patients were included in the study, 15 who tolerated aspirin and 9 with AERD. Many patients (83%) had adult-onset asthma. All patients had atopy with symptoms of asthma and rhinitis. The most frequent allergies were to dust mite (75%), pet dander (cat, 37.5%; dog, 33.3%), grass pollen (33.3%), and birch pollen (20.8%). Some patients had multiple allergies (41.7%), although all patients were sensitized to at least 1 perennial allergen. Most patients had never smoked

Table 1. Clinical and Demographic Characteristics of the Population at Baseline

Mean (SD) age, y	49 (16)
Men/women, %	58/42
Smoking, %	
Never smoker	62.50
Ex-smoker	33.33
Active smoker	4.17
Pack-year mean (SD)	4.21 (7.37)
Family history, %	
Atopy	12.50
Asthma	12.50
Asthma diagnosis early/late onset, %	17/83
Allergy, %	
Dust mite	75
<i>Aspergillus</i>	12.50
<i>Alternaria</i>	8.33
Cat	37.50
Dog	33.33
Birch pollen	20.83
Ash pollen	12.50
Cypress pollen	4.17
Grass pollen	33.33
Plantain pollen	12.50
Mugwort pollen	8.33
AERD, %	37.50
Previous polyp surgery, %	75
Sinus computed tomography scan, %	
Nasal polyposis	29.17
Sinusitis	12.50
Nasal polyposis + sinusitis	58.33
Mean (SD) total serum IgE, IU/mL	494 (337)

Abbreviation: AERD, aspirin-exacerbated respiratory disease.

(62.5%). The baseline characteristics are summarized in Table 1.

Effectiveness of Omalizumab

Nasal polyposis: Based on total serum IgE levels and body weight, half of the patients received omalizumab every 2 weeks, and the other half every 4 weeks. After 6 months of treatment with omalizumab, ENT symptoms were significantly improved (pruritus, $P = .002$; loss of smell, $P < .001$; rhinorrhea, $P < .001$; sneezing, $P < .001$; nasal obstruction, $P < .001$), in parallel with a decrease in the number of episodes of acute rhinosinusitis (4.2 vs 1.3, $P < .001$).

Three quarters of the patients had undergone surgery for nasal polyposis, which was diagnosed by an ENT specialist during nasal endoscopy at baseline and 6 months after initiating omalizumab. At baseline, 45.8% of patients had stage 2 nasal polyposis based on endoscopic criteria, 37.5% had stage 3 disease, and 16.7% had stage 1 disease. The stage of nasal polyposis improved after 6 months in several patients (Table 2), although the difference was not statistically significant.

At baseline, the sinus CT scan showed images of sinusitis with nasal polyposis in 58.3% of patients, only nasal polyposis in 29.2% of patients, and sinusitis without nasal polyposis in

Table 2. Clinical, Respiratory, Biological, and Imaging Parameters Before and After 6 Months of Treatment With Omalizumab

Parameter	Before	After	P Value
Mean (SD) ENT severity, VAS symptom score			
Pruritus	1.88 (2.85)	0	.002
Loss of smell	8.50 (1.58)	5.08 (3.42)	<.001
Rhinorrhea	8.00 (2.57)	4.83 (3.27)	<.001
Sneezing	8.00 (2.57)	0.42 (1.38)	<.001
Nasal obstruction	7.38 (3.97)	1.17 (3.39)	<.001
Mean (SD) number of episodes of acute rhinosinusitis	4.21 (1.28)	1.29 (1.49)	<.001
Endoscopic nasal polyp score, No. %			.415
1	16.67	20.83	
2	45.83	58.33	
3	37.50	20.83	
Sinus computed tomography scan, %			.006
Nasal polyps	29.17	70.83	
Sinusitis	12.50	4.17	
Nasal polyps + sinusitis	58.33	25.00	
Respiratory symptoms			
Dyspnea (mMRC) score, No. (%)			<.001
0	0	25.00	
1	20.83	41.67	
2	12.50	29.16	
3	62.50	4.17	
4	4.17	0	
Cough, No. (%)	83.33	62.50	.028
Mean (SD) number of daytime asthma symptoms/wk	5.25 (2.95)	1.67 (1.28)	<.001
Mean (SD) number of nocturnal asthma symptoms/wk	2.88 (2.09)	0.54 (0.96)	<.001
Mean (SD) number of salbutamol rescues/wk	13.29 (7.51)	3.63 (3.08)	<.001
Mean (SD) ACT score	12.21 (4.09)	19.46 (3.34)	<.001
Mean (SD) number of asthma exacerbations	4.58 (1.25)	1.42 (1.44)	<.001
Mean (SD) lung function			
FEV ₁ , %	60.08 (18.24)	72.88 (19.43)	<.001
FVC, %	83.17 (17.88)	93.38 (17.06)	<.001
FEV ₁ /FVC, %	61.50 (13.96)	66.67 (11.21)	.017
Mean (SD) blood eosinophil count, G/L	0.91 (0.51)	0.52 (0.38)	.006

Abbreviations: ACT, Asthma Control Score; ENT, ear, nose, and throat; FEV₁, forced expiratory volume in the first second; FVC, forced vital capacity; mMRC, modified Medical Research Council; VAS, visual analog scale.

12.5% of patients. Omalizumab significantly improved the CT scan opacities indicative of sinusitis, thus making the images of nasal polyposis more visible (Table 2). The improvement in the scan image at 6 months was evident in 37.5% of patients.

Asthma: Omalizumab significantly improved respiratory symptoms (dyspnea, $P<.001$; and cough, $P=.028$) and decreased the number of asthma daytime and nocturnal symptoms per week, thus reducing the need for rescue medication ($P<.001$). The change in the mean ACT score was significant, increasing from 12.2 to 19.5 ($P<.001$). Omalizumab significantly reduced the number of asthma exacerbations at 6 months (4.6 vs 1.4, $P<.001$).

Lung function was significantly improved by treatment, with an increase of 12.8% in FEV₁ ($P<.001$), an increase of 10.2% in FVC ($P<.001$), and a decrease in bronchial obstruction (FEV₁/FVC 61.5% before treatment vs 66.7% after, $P=.017$).

Omalizumab significantly decreased the blood eosinophil level (0.91 G/L at baseline vs 0.52 G/L at 6 months, $P=.006$).

The clinical, lung function, biological, and imaging characteristics before and after the treatment are summarized in Table 2.

AERD: There were no differences in clinical, respiratory functional, biological, and imaging parameters at baseline in patients with and without AERD (Table 3). The comparative analysis of the same parameters after 6 months of treatment with omalizumab in patients with and without AERD progressed similarly in terms of clinical, respiratory, and biological outcomes. The only significant difference between the groups was a more marked improvement in sinus opacities indicative of sinusitis in patients with AERD than in patients without AERD (Table 4).

Discussion

Our real-life study showed that omalizumab was an effective therapy in patients with SAA and CRSNP+ and that

Table 3. Clinical, Respiratory, Biological, and Imaging Parameters at Baseline in Patients With and Without AERD

Parameter	Without AERD (n=15)	With AERD (n=9)	P Value
ENT severity, mean (SD) VAS symptom score			
Pruritus	2.00 (2.40)	1.67 (2.59)	.809
Loss of smell	8.40 (1.44)	8.67 (1.33)	.701
Rhinorrhea	7.60 (1.87)	8.67 (1.63)	.309
Sneezing	3.00 (2.80)	2.67 (2.96)	.821
Nasal obstruction	7.53 (3.29)	7.11 (3.41)	.813
Mean (SD) number of episodes of acute rhinosinusitis	4.53 (1.10)	3.67 (1.63)	.276
Endoscopic nasal polyp score, %			.519
1	20.00	33.33	
2	46.67	33.33	
3	33.33	33.33	
Sinus CT scan, %			.278
Nasal polyps	33.33	22.22	
Sinusitis	20.00	0	
Nasal polyps + sinusitis	46.67	77.78	
Respiratory symptoms			
Dyspnea (mMRC) score, No. (%)			.837
1	13.33	33.33	
2	20.00	0	
3	66.67	55.56	
4	0	11.11	
Cough, No. (%)	93.33	66.67	.167
Mean (SD) number of daytime asthma symptoms/wk	5.47 (2.49)	4.89 (2.09)	.660
Mean (SD) number of nocturnal asthma symptom/wk	2.93 (1.78)	2.78 (1.48)	.863
Mean (SD) number of salbutamol rescues/wk	15.13 (7.08)	10.22 (4.02)	.100
Mean (SD) ACT score	12.00 (3.33)	12.56 (3.48)	.759
Mean (SD) number of asthma exacerbations	4.53 (1.10)	4.47 (1.26)	.818
Mean (SD) values for lung function			
FEV ₁ , %	63.67 (17.33)	54.11 (10.57)	.182
FVC, %	84.13 (18.56)	81.56 (5.60)	.691
FEV ₁ /FVC, %	63.40 (10.43)	58.33 (13.63)	.445
Mean (SD) blood eosinophil count, G/L	0.81 (0.29)	1.07 (0.47)	.312
Mean total serum IgE, IU/mL	517 (320)	455 (284)	.679

Abbreviations: ACT, Asthma Control Score; AERD, aspirin-exacerbated respiratory disease; ENT, ear, nose, and throat; FEV₁, forced expiratory volume in the first second; FVC, forced vital capacity; mMRC, modified Medical Research Council; VAS, visual analog scale.

it led to improvement of asthma (symptoms, control, lung function, rescue medication for attacks, and exacerbation), and ENT outcomes (symptoms, CT scan images, number of episodes of acute rhinosinusitis) independently of the presence of AERD. The study population is characteristic of the asthma-CRSNP+ phenotype, with predominant adult-onset asthma, a high prevalence of allergic rhinitis and previous sinonasal surgery, a high exacerbation rate, poorly controlled asthma, airway obstruction, and an eosinophilic inflammatory pattern [7,8,12,22].

The prevalence of AERD in this study was 37.5%, which was higher than previously reported for severe asthma (14.9%) [10]. One possible explanation for this difference is the general underestimation of AERD. Furthermore, prevalence increases to 21% in severe asthma when the aspirin challenge test is performed systematically [10]. Similarly, the prevalence of AERD in patients with CRSNP+ is estimated at 8.7%, while up to 70% of patients report sensitivity to red wine and other alcoholic beverages, thus indicating a diagnosis of

AERD, albeit one that has not been confirmed with a challenge test [23]. Large-scale studies on the association between asthma and CRSNP+ are needed to determine the real prevalence of AERD based on an aspirin challenge test when the clinical history is compatible with the diagnosis.

The present study confirmed the benefit of omalizumab for relief of the symptoms of persistent allergic rhinitis (pruritus, loss of smell, rhinorrhea, sneezing, nasal obstruction) in SAA patients, as previously reported [24]. In a recent meta-analysis including 2870 patients with allergic rhinitis [25], omalizumab reduced both daily nasal symptoms and use of nasal rescue medication. These results are not surprising, given that allergic asthma and allergic rhinitis share pathogenic mechanisms and common triggers and are considered to be components of a single IgE-mediated inflammatory condition. The allergic profile identified in this study is typical for the northeastern region of France.

While data on omalizumab and allergic airway disease are abundant, data on CRSNP+ in the literature are limited

Table 4. Clinical, Respiratory, Biological, and Imaging Parameters After 6 Months of Treatment by Omalizumab in Patients With and Without AERD

Parameter	Without AERD (n=15)	With AERD (n=9)	P Value
ENT severity, Mean (SD) VAS symptom score			
Pruritus	0	0	
Loss of smell	4.87 (2.59)	5.44 (2.62)	.703
Rhinorrhea	4.87 (2.59)	4.78 (2.12)	.950
Sneezing	0.33 (0.62)	0.56 (0.98)	.736
Nasal obstruction	4.20 (2.83)	4.11 (2.74)	.952
Mean (SD) number of acute rhinosinusitis episodes	1.47 (1.29)	1.00 (1.11)	.454
Endoscopic nasal polyp score, %			
1	13.33	33.33	1.000
2	73.33	33.33	
3	13.33	33.33	
Sinus CT scan, %			
Nasal polyps	53.33	100.00	.004
Sinusitis	6.670		
Nasal polyps + sinusitis	40.00	0	
Respiratory symptom			
Dyspnea (mMRC) score, No. (%)			
0	33.33	11.11	.370
1	33.33	0	
2	33.33	55.56	
3	0	33.33	
Cough, No. (%)	73.33	44.44	.192
Mean (SD) number of daytime asthma symptoms/wk	1.73 (1.12)	1.56 (0.94)	.748
Mean (SD) number of nocturnal asthma symptom/wk	0.33 (0.53)	0.89 (0.99)	.255
Mean (SD) number of salbutamol rescue/wk	3.87 (2.29)	3.22 (2.47)	.659
Mean ACT score	18.80 (2.85)	20.56 (2.39)	.195
Mean (SD) number of asthma exacerbations	1.47 (1.29)	1.33 (1.04)	.823
Mean (SD) values for lung function			
FEV ₁ , %	76.00 (20.53)	67.67 (7.78)	.258
FVC, %	94.60 (17.17)	91.33 (8.00)	.609
FEV ₁ /FVC, %	68.53 (8.03)	63.56 (9.73)	.313
Mean (SD) blood eosinophil count, G/L	0.51 (0.25)	0.54 (0.39)	.881

Abbreviations: ACT, Asthma Control Score; AERD, aspirin-exacerbated respiratory disease; ENT, ear, nose, and throat; FEV₁, forced expiratory volume in the first second; FVC, forced vital capacity; mMRC, modified Medical Research Council; VAS, visual analog scale

to a few small studies with a short treatment period (usually 16 weeks) [3,26]. Three-quarters of the study population had previously undergone surgery for nasal polyposis. In several cases of recalcitrant CRSNP+ with severe ENT symptoms and multiple surgical interventions, additional adjuvant medical therapies such as leukotriene antagonists, low-dose macrolides, topical antibiotics, and oral antifungal and biologic agents could prove beneficial [3].

In this study, omalizumab was effective against ENT symptoms secondary to CRSNP+ (loss of smell, rhinorrhea, nasal obstruction) and asthma symptoms (dyspnea, cough, number of daytime asthma symptoms/wk, number of nocturnal asthma symptom/wk), in line with other published data [15,18]. A previous study including patients with nasal polyposis and asthma treated with omalizumab for 16 weeks [18] showed a significant improvement in several symptoms, such as nasal congestion, rhinorrhea, loss of smell, dyspnea, and wheeze, with no benefit for cough. Decreased cough in patients with SAA and CRSNP+ who have taken omalizumab for 6 months is an original finding of our study.

Similarly, consistent with data from a real-life study by Bidder et al [17], we observed a significant improvement in asthma control (ACT score) at 6 months of treatment in patients with SAA and CRSNP+. The authors demonstrated a significant improvement in sinonasal outcomes (SNOT-22) and asthma control (Asthma Control Questionnaire [ACQ] 7) after 16 weeks of treatment with omalizumab in a similar population. Other previous studies including patients with SAA reported the benefit of omalizumab for disease control, with an improvement in the ACQ or ACT score [27,28], although data on the impact of this treatment in patients with SAA and CRSNP+ are currently very limited.

Other original results of this study are the significant decrease in the number of acute rhinosinusitis and asthma exacerbations requiring medical treatment and rescue β -agonists 6 months after initiation of omalizumab. To the best of our knowledge, this is the first study in the literature to report this finding in patients with SAA and CRSNP+. The positive impact of omalizumab on the outcome of SAA has been demonstrated elsewhere [29,30]. A systematic

review including 24 real-life studies on the effectiveness of omalizumab in SAA [29] confirmed the short- and long-term benefit of anti-IgE therapy in terms of the following: asthma control; relief of symptoms; severe exacerbations; associated work/school days lost; use of healthcare resources, in particular hospitalization; hospital length of stay; specialist or emergency department visits; reduction in or discontinuation of other asthma medications; lung function; and quality of life.

In the present study, FEV₁ was significantly increased (>10%) at 6 months of treatment compared with baseline; this finding is consistent with the data reported by Mansur et al [27] in patients with SAA without CRSNP+ [27]. The improvement in lung function parameters after treatment with omalizumab was previously reported in SAA patients, independently of the presence of CRSNP+ [27,30]. However, our study is the first to report this effect in patients with SAA and CRSNP+.

The impact of omalizumab on endoscopic scoring of nasal polyposis is controversial. Consistent with Pinto et al [31] and in contrast with other authors [15,18], the present study did not show any significant change in the endoscopic polyp score after 6 months of treatment with omalizumab. Two possible explanations for this observation are first, that all published data are the results of series or small cohorts and “big” data are lacking, and second, our study is a retrospective multicenter study in which endoscopy was not performed by the same ENT specialist.

The present study confirms the improvement in CT sinus scan opacities in patients treated with omalizumab, as previously described [15,18,31]. Interestingly, in the study by Gevaert et al [18], omalizumab significantly improved the Lund-Mackay score only in patients with allergic asthma and CRSNP+ (in contrast to those with nonallergic asthma). All the patients included in our study were allergic, although the Lund-Mackay score was not available in all cases.

To the best of our knowledge, this is the first study to show a significant decrease in blood eosinophil count in SAA patients with CRSNP+ treated with omalizumab. Eosinophil counts before treatment were higher (0.91 G/L) than in the study by Gevaert et al [18] (0.39 G/L). One possible explanation for this observation could be that in our study, all patients were allergic, while in the other study, the population was mixed: 7 patients were allergic and 8 nonallergic. High blood eosinophil counts (>0.3 G/L) in asthmatic patients are associated with diminished lung function, more frequent exacerbations, and poorer asthma control [32], and omalizumab decreases the blood eosinophil count in treated patients with SAA [33], as also found in our study. Recent data [28,34] showed that omalizumab is equally effective in patients with high counts (≥ 0.3 G/L) and low counts (<0.3 G/L), with a significant improvement in asthma control and a reduction in the annual exacerbation/hospitalization rate.

The present study confirms previous data, which show similar effectiveness of omalizumab for patients with and without AERD [18]. The mechanisms which could explain the benefit of omalizumab in AERD are not fully understood. One of the pathogenic mechanisms recognized in AERD is the activation of mast cells via cysteinyl leukotriene-driven IL-33 [10]. A recent study showed that omalizumab reduces overproduction of cysteinyl leukotriene [35] probably by decreasing the activation of mast cells on the IL-33 pathway

involved in persistent type 2 inflammation in patients with AERD.

Our results are in line with data from a Japanese cohort including 21 patients with AERD treated with omalizumab. A significant improvement was observed in all asthma and ENT symptoms, with a decrease in the frequency of asthma exacerbations and in the blood eosinophil count [35]. On the other hand, this study failed to show a significant improvement in lung function, as was the case in the present study. In addition, our study showed that omalizumab significantly improved CT scan images of sinusitis in patients with AERD compared with patients without AERD. Ours is the first report of this finding. In a case series of patients with AERD, 6 months of therapy with omalizumab significantly decreased the number of exacerbations and improved patients' quality of life. In addition, patients developed tolerance to nonsteroidal anti-inflammatory drugs [36]. Another recent study confirmed that administration of omalizumab in atopic patients with AERD, even for 16 weeks, improved clinical tolerability to desensitization to aspirin [37]. Omalizumab seems to be an interesting therapeutic approach for patients with AERD.

A recent study [17] showed the effectiveness of omalizumab (16 weeks) compared with surgery in patients with CRSNP+ and SAA, with a parallel improvement in sinonasal outcomes and asthma control in both groups, thus supporting the “one airway disease” hypothesis. Recent progress in this domain indicates that “one airway disease” may soon be treated with a single biologic agent (anti-IgE, anti-IL5, or anti-IL4/13) [3,26].

Ours is the largest real-life study to date to analyze the effectiveness of omalizumab in patients with SAA and CRSNP+. Omalizumab improved asthma outcomes (symptoms, control, lung function, asthma attacks and exacerbations, use of rescue medication), ENT symptoms, CT scan images, the number of episodes of acute rhinosinusitis, and blood eosinophil count, with no significant effect on the nasal polyposis score.

Outcomes were similar in patients with AERD and patients without AERD, except for the improvement in sinusitis on sinus CT scans after 6 months of treatment with omalizumab, which was more evident in the first group. These results need to be verified by prospective studies including large cohorts of patients. Biologic therapy could be an alternative in the treatment of recalcitrant CRSNP+ in SAA patients with or without AERD.

Funding

The authors declare that no funding was received for the present study.

Conflicts of Interest

A Tiotiu has participated on scientific advisory boards for Menarini and Novartis Pharma and has been a coinvestigator in studies for AstraZeneca, Novartis Pharma, and Sanofi.

JP Oster has participated on scientific advisory boards for Novartis Pharma.

P Roux has participated on scientific advisory boards for Novartis Pharma.

G Peiffert has participated on scientific advisory boards for Chiesi and Novartis Pharma.

P Bonniaud has participated on scientific advisory boards for Novartis Pharma and has been a coinvestigator in studies for AstraZeneca, GSK, Novartis Pharma, and Sanofi.

JC Dalphin has participated on scientific advisory boards for Novartis Pharma and Teva.

F de Blay has participated on scientific advisory boards for ALK, AstraZeneca, GSK, Novartis Pharma, and Teva and has been a coinvestigator in studies for ALK, AstraZeneca, GSK, Novartis Pharma, and Sanofi.

PL Nguyen declares no conflicts of interest.

References

1. Wu D, Bleier BS, Li L, Zhan X, Zhang L, Lv Q, et al. Clinical Phenotypes of Nasal Polyps and Comorbid Asthma Based on Cluster Analysis of Disease History. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018;6:1297-305.
2. Bachert C, Sousa AR, Lund VJ, Scadding GK, Gevaert P, Nasser S, et al. Reduced need for surgery in severe nasal polyposis with mepolizumab: Randomized trial. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140:1024-31.
3. Rivero A, Liang J. Anti-IgE and Anti-IL5 Biologic Therapy in the Treatment of Nasal Polyposis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2017;126:739-47.
4. Chung KF. Precision medicine in asthma: linking phenotypes to targeted treatments. *Curr Opin Pulm Med.* 2018;24:4-10.
5. (*NEW) 2018 GINA Report: Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Available from: <https://ginasthma.org/2018-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention>
6. Valero A, Olaguibel J, Delgado J, Plaza V, Álvarez F, Molina J, et al. Re-evolution of asthma management: dilemmas and new paradigms. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2018 Nov 9;0. doi: 10.18176/jiaci.0345
7. Opina MTD, Moore WC. Phenotype-Driven Therapeutics in Severe Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2017;17:10. doi: 10.1007/s11882-017-0678-1
8. Tiotiu A, Plavec D, Novakova S, Mihaicuta S, Novakova P, Labor M, et al. Current opinions for the management of asthma associated with ear, nose and throat comorbidities. *Eur Respir Rev.* 2018 Nov 21;27. doi: 10.1183/16000617.0056-2018
9. Langdon C, Mullol J. Nasal polyps in patients with asthma: prevalence, impact, and management challenges. *J Asthma Allergy.* 2016;9:45-53.
10. Kowalski ML, Agache I, Bavbek S, Bakirtas A, Blanca M, Bochenek G, et al. Diagnosis and management of NSAID-Exacerbated Respiratory Disease (N-ERD)-a EAACI position paper. *Allergy.* 2019;74:28-39.
11. Westerhof GA, Coumou H, de Nijs SB, Weersink EJ, Bel EH. Clinical predictors of remission and persistence of adult-onset asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141:104-9.
12. Porsbjerg C, Menzies-Gow A. Co-morbidities in severe asthma: Clinical impact and management. *Respirology.* 2017;22:651-61.
13. Gurrola J, Borish L. Chronic rhinosinusitis: Endotypes, biomarkers, and treatment response. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140:1499-508.
14. Tomassen P, Vandeplas G, Van Zele T, Cardell L-O, Arebro J, Olze H, et al. Inflammatory endotypes of chronic rhinosinusitis based on cluster analysis of biomarkers. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137:1449-56.
15. Tajiri T, Matsumoto H, Hiraumi H, Ikeda H, Morita K, Izuhara K, et al. Efficacy of omalizumab in eosinophilic chronic rhinosinusitis patients with asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2013;110:387-8.
16. Vennera M del C, Picado C, Mullol J, Alobid I, Bernal-Sprekelsen M. Efficacy of omalizumab in the treatment of nasal polyps. *Thorax.* 2011;66:824-5.
17. Bidder T, Sahota J, Rennie C, Lund VJ, Robinson DS, Kariyawasam HH. Omalizumab treats chronic rhinosinusitis with nasal polyps and asthma together-a real life study. *Rhinology.* 2018;56:42-5.
18. Gevaert P, Calus L, Van Zele T, Blomme K, De Ruyck N, Bauters W, et al. Omalizumab is effective in allergic and nonallergic patients with nasal polyps and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131:110-6.
19. Penn R, Mikula S. The role of anti-IgE immunoglobulin therapy in nasal polyposis: a pilot study. *Am J Rhinol.* 2007;21:428-32.
20. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro M, Sterk PJ, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J.* 2014;43:343-73.
21. Heinzerling L, Mari A, Bergmann K-C, Bresciani M, Burbach G, Darsov U, et al. The skin prick test - European standards. *Clin Transl Allergy.* 2013;3:3. doi: 10.1186/2045-7022-3-3.
22. de Groot JC, Storm H, Amelink M, de Nijs SB, Eichhorn E, Reitsma BH, et al. Clinical profile of patients with adult-onset eosinophilic asthma. *ERJ Open Res.* 2016;2. pii: 00100-2015
23. Kennedy JL, Stoner AN, Borish L. Aspirin-exacerbated respiratory disease: Prevalence, diagnosis, treatment, and considerations for the future. *Am J Rhinol Allergy.* 2016;30:407-13.
24. Masieri S, Cavaliere C, Begvarfaj E, Rosati D, Minni A. Effects of omalizumab therapy on allergic rhinitis: a pilot study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20:5249-55.
25. Tsaouri S, Tseretopoulou X, Priftis K, Ntzani EE. Omalizumab for the treatment of inadequately controlled allergic rhinitis: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2014;2:332-40.
26. Tsetos N, Goudakos JK, Daskalakis D, Konstantinidis I, Markou K. Monoclonal antibodies for the treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyposis: a systematic review. *Rhinology.* 2018;56:11-21.
27. Mansur AH, Srivastava S, Mitchell V, Sullivan J, Kasujee I. Longterm clinical outcomes of omalizumab therapy in severe allergic asthma: Study of efficacy and safety. *Respir Med.* 2017;124:36-43.
28. Casale TB, Luskin AT, Busse W, Zeiger RS, Trzaskoma B, Yang M, et al. Omalizumab Effectiveness by Biomarker Status in Patients with Asthma: Evidence From PROSPERO, A Prospective Real-World Study. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019;7:156-64
29. Abraham I, Alhossan A, Lee CS, Kutbi H, MacDonald K. 'Real-life' effectiveness studies of omalizumab in adult patients with severe allergic asthma: systematic review. *Allergy.* 2016;71:593-610.

30. Alhossan A, Lee CS, MacDonald K, Abraham I. 'Real-life' Effectiveness Studies of Omalizumab in Adult Patients with Severe Allergic Asthma: Meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017;5:1362-70.
31. Pinto JM, Mehta N, DiTineo M, Wang J, Baroody FM, Naclerio RM. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of anti-IgE for chronic rhinosinusitis. *Rhinology.* 2010;48:318-24.
32. Pretolani M, Soussan D, Poirier I, Thabut G, Aubier M, COBRA Study Group, et al. Clinical and biological characteristics of the French COBRA cohort of adult subjects with asthma. *Eur Respir J.* 2017;50(2). doi: 10.1183/13993003.00019-2017
33. Pelaia C, Calabrese C, Barbuto S, Busceti MT, Preianò M, Gallelli L, et al. Omalizumab lowers asthma exacerbations, oral corticosteroid intake and blood eosinophils: Results of a 5-YEAR single-centre observational study. *Pulm Pharmacol Ther.* 2019;54:25-30
34. Humbert M, Taillé C, Mala L, Le Gros V, Just J, Molimard M, et al. Omalizumab effectiveness in patients with severe allergic asthma according to blood eosinophil count: the STELLAIR study. *Eur Respir J.* 2018;51. doi: 10.1183/13993003.02523-2017
35. Hayashi H, Mitsui C, Nakatani E, Fukutomi Y, Kajiwara K, Watai K, et al. Omalizumab reduces cysteinyl leukotriene and $9\alpha,11\beta$ -prostaglandin F₂ overproduction in aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137:1585-7.
36. Phillips-Angles E, Barranco P, Lluch-Bernal M, Dominguez-Ortega J, López-Carrasco V, Quirce S. Aspirin tolerance in patients with nonsteroidal anti-inflammatory drug-exacerbated respiratory disease following treatment with omalizumab. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2017;5:842-5.
37. Lang DM, Aronica MA, Maieron ES, Wang X-F, Vasas DC, Hazen SL. Omalizumab can inhibit respiratory reaction during aspirin desensitization. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2018;121:98-104.

■ *Manuscript received December 10, 2018; accepted for publication March 22, 2019.*

■ **Angelica Tiotiu**

Department of Pulmonology
University Hospital of Nancy
9 Rue du Morvan
54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France
E-mail: angelica.tiotiu@yahoo.com



Contents lists available at ScienceDirect

Allergy International

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/alit>

Original Article

Efficacy of immunoglobulin replacement therapy and azithromycin in severe asthma with antibody deficiency



Angelica Tiotiu ^{a, b, c, *}, H el ene Salvator ^{d, e}, Roland Jaussaud ^{f, g}, Roger Jankowski ^{g, h},
Louis-Jean Couderc ^{d, e}, Emilie Catherinot ^d, Philippe Devillier ^{d, e}

^a Department of Pulmonology, Nancy University Hospital, Nancy, France

^b Development, Adaptation and Disadvantage, Cardio-Respiratory Regulations and Motor Control, University of Lorraine, Nancy, France

^c National Heart and Lung Institute, Airway Disease Section, Imperial College London, London, UK

^d Department of Airway Diseases, Foch Hospital, Suresnes, France

^e Foch Hospital, Paris Saclay University, Suresnes, France

^f Department of Internal Medicine, Nancy University Hospital, Nancy, France

^g Faculty of Medicine, University of Lorraine, Nancy, France

^h ENT Department, Nancy University Hospital, Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 June 2019

Received in revised form

25 October 2019

Accepted 30 October 2019

Available online 4 December 2019

Keywords:

Antibody deficiency

Asthma

Azithromycin

Immunoglobulin replacement

Respiratory infections

Abbreviations:

SA, severe asthma; ATS/ERS, American Thoracic Society/European Respiratory Society; AD, antibody deficiency; HGG, hypogammaglobulinaemia; sIgAD, selective immunoglobulin A deficiency; CVID, common variable immunodeficiency; IgGSD, immunoglobulin G subclass deficiency; IRT, immunoglobulin replacement therapy; GINA, Global Initiative for Asthma; BL, B lymphocyte; NK, natural killer; SCIg, subcutaneous immunoglobulin; OCS, oral corticosteroids; ACQ-7, Asthma Control Questionnaire; LTRA, leukotriene receptor antagonist; CT, computed tomography

ABSTRACT

Background: Although antibody deficiency (AD) is a well-known cause of recurrent respiratory infections, there are few data on its impact in adults with asthma. The objective of the present study was to assess outcomes in adults with severe asthma and AD after treatment with either azithromycin or subcutaneous immunoglobulins (SCIg).

Methods: We performed a 5-year, prospective, observational, two-centre study of adults with severe asthma and AD in France. Bronchiectasis was ruled out by high-resolution computed tomography. Patients were treated for one year with either azithromycin (250 mg every other day) or SCIg (0.4–0.6 g/kg/months, weekly). All patients were evaluated for exacerbations, asthma control and lung function at baseline and then one year after treatment initiation.

Results: Thirty-nine patients with severe asthma were included in the study: 14 had been treated with azithromycin and 25 had been treated with SCIg. Before the initiation of treatment for AD, all patients had an Asthma Control Questionnaire (ACQ-7) score > 1.5 (mean \pm SD: 2.71 \pm 0.53) despite treatment at GINA step 4 or 5, and had a high exacerbation rate requiring oral corticosteroids and/or rescue antibiotics (-7.2 ± 2.1 /patient/year). One year after treatment initiation, we observed a significantly higher FEV1 (mean: 0.18 \pm 0.22 L) and ACQ-7 score (1.26 \pm 0.68), and a significantly lower exacerbation rate (1.63 \pm 1.24/patient/year).

Conclusions: Treatment of AD dramatically improved asthma outcomes – suggesting that adults with severe asthma and recurrent respiratory infections should be screened and (if appropriate) treated for AD.

Copyright   2019, Japanese Society of Allergy. Production and hosting by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Asthma is a heterogeneous inflammatory airway disease; it comprises several phenotypes driven by different underlying disease processes.^{1,2} According to the Global Initiative for Asthma (GINA) guidelines, the management of asthma depends on the

* Corresponding author. Department of Pulmonology, Nancy University Hospital, 9 Rue du Morvan, F-54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France.
E-mail address: angelica.tiotiu@yahoo.com (A. Tiotiu).

Peer review under responsibility of Japanese Society of Allergy.

<https://doi.org/10.1016/j.alit.2019.10.011>

1323-8930/Copyright   2019, Japanese Society of Allergy. Production and hosting by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

severity of the condition; incremental dosing of ICS and additional controller medications are used to achieve symptom control and prevent exacerbations.^{1,2} Asthma exacerbations are a major cause of morbidity and mortality, and have high socioeconomic costs.³ The vast majority of asthma exacerbations are caused by respiratory viruses, although exposure to allergens, air pollution, temperature variations, poor adherence to treatment, and bacterial infections are other well-known risk factors.^{1,3–5} About 10% of patients will display uncontrolled asthma despite an optimal, guideline-based therapeutic regimen; this lack of control contributes to high healthcare resource use and has a negative impact on quality of life.² These patients have severe asthma (SA), according to the American Thoracic Society/European Respiratory Society (ATS/ERS) definition.^{6,7} A key component of the systematic assessment of SA is the identification and management of factors that aggravate asthma symptoms and worsen asthma control, such as comorbidities.^{1,8}

The main clinical manifestations of antibody deficiency (AD) are recurrent bacterial infections of the respiratory tract,⁹ which can contribute to inflammatory and obstructive processes in the lower airways.¹⁰ Little is known about the putative association between asthma and AD. Most of the studies to date have been conducted in paediatric populations,^{11,12} and limited data are available for adults.^{13–16} Hypogammaglobulinaemia (HGG) appears to be more prevalent in asthmatic patients (12%) than in the general population,¹³ and people with asthma are more likely to be diagnosed with selective immunoglobulin A deficiency (sIgAD)/common variable immunodeficiency (CVID) than people without asthma.¹⁴ Two recent studies have shown that IgG subclass deficiency (IgGSD) is associated with a high risk of asthma exacerbation.^{17,18} The standard treatments for AD are antibiotic prophylaxis and/or Ig replacement therapy (IRT).⁹

The objective of the present observational study was to analyse asthma outcomes (the exacerbation rate, asthma control, and lung function) after the treatment of concomitant AD in patients with SA.

Methods

Study design

An observational study was performed between January 2012 and December 2017 in the pulmonology departments at Nancy University Hospital (France) and Foch Hospital (Suresnes, France). The study was approved by the institutional review board at the French Society for Respiratory Medicine (*Société de Pneumologie de Langue Française*, reference CEPRO 2017–039). All patients provided prior written, informed consent to participation.

Study population

Adult patients with SA (based on the ERS/ATS definition of severity,⁷ and having been diagnosed by a respiratory physician more than 1 year previously) were included in the study. Asthma was diagnosed according to the GINA criteria with regard to the clinical history and respiratory symptoms, and was confirmed by lung function tests (including a test for airway reversibility or a methacholine challenge, if lung function was normal).¹ Atopy was documented by at least one positive skin prick test to an aeroallergen, in line with the European guidelines.¹⁹

A large number of descriptive variables were recorded: age, gender, smoking status, history of atopy, time of asthma diagnosis (in childhood or adulthood), history of infectious diseases, and the family history of atopy, asthma, and infectious diseases. A systematic sinus-thorax computed tomography (CT) scan was used to evaluate the presence of sinusitis, bronchiectasis or secondary

causes of AD (such as thymoma). Three patients with bronchiectasis and two patients with thymoma were excluded from the study.

The diagnosis of AD was based on an extensive laboratory assessment of the patient's immune functions.⁹ The B lymphocyte (BL) count was studied using flow cytometry, serum Ig levels were measured in a nephelometric assay, and serum concentrations of antibodies against the components of pneumococcal polysaccharide vaccine (23-valent, Pneumo 23™) and tetanus vaccine were assessed using ELISAs.^{9,20} The diagnostic criteria for CVID were reductions in two or more major Ig classes, low levels of specific antivaccine antibodies, and (in some cases) a low BL count.⁹ The diagnostic criteria for HGG were significant morbidity from infections, abnormally low serum Ig levels, normal cellular immunity, and no other conditions potentially predisposing to AD.⁹ The diagnosis of IgGSD was established in patients with recurrent infections, one or more serum IgG subclass levels below the fifth percentile, and normal levels of IgG, IgM, and IgA. Specific anti-pneumococcal and anti-tetanus IgG levels were interpreted with regard to the patient's immunization record and the laboratory's reference values. A normal response was defined as a 4-fold increase in specific IgG 4 weeks after booster vaccination.⁹

The diagnosis of AD and the treatment strategies were usually validated in multidisciplinary team meetings (comprising an ENT specialist, a pulmonologist, an immunologist, and an internal medicine specialist).

Outcome measures

Patients were monitored regularly (at least every 3–6 months) in a clinical setting during the year preceding the initiation of AD treatment and for at least one year thereafter. As recommended in the current guidelines on AD,⁹ all patients were treated first with a macrolide (azithromycin, 250 mg every other day) for at least 6 months. In the event of failure (primarily defined as ≥ 2 respiratory infections requiring antibiotics/patient/6 months, no improvement in the level of asthma control level and/or the FEV1, or very limited improvement or no appreciable overall change in the physician's evaluation), azithromycin was discontinued, and Ig replacement therapy was initiated with the weekly subcutaneous Ig (SCIg) perfusion of Gammanorm™ (Octapharma, France) or Hizentra™ (CSL Behring GmbH, Germany) (0.4–0.6 g/kg/month). The treatment of AD (with either azithromycin or SClg) was initiated in clinically stable patients with no severe exacerbations in the preceding 4 weeks.

We analysed the number of SA exacerbations per patient per year, the level of asthma control, and lung function parameters at baseline and 12 months after initiation of the specific treatment for AD.

A respiratory infection was defined as the presence of discoloured discharge in the nasal cavity, sinus pain, fever (>38 °C), and a productive cough for ≥ 5 days requiring antibiotics. Severe asthma exacerbation was defined as aggravation of respiratory symptoms for at least 48 h and requiring treatment with oral corticosteroids (OCSs) for at least 3 days and/or hospitalization.

Asthma control was assessed with the Asthma Control Questionnaire (ACQ-7).²¹ Controlled asthma was defined as an ACQ-7 score ≤ 0.75 , partially controlled asthma was defined as a score from 0.75 to 1.5, and uncontrolled asthma was defined as a score > 1.5 . In the ACQ-7, the minimal clinically significant difference for improvement is 0.5.²²

Lung function tests were performed using flow–volume curves and plethysmography to measure the FEV1, forced vital capacity, total lung capacity, and diffusion capacity for carbon monoxide, all

of which were expressed as a percentage of the predicted value (adjusted for age, gender, weight, stature, and ethnic background, and interpreted according to the ATS/ERS guidelines²³). A positive reversibility test was defined as an increase in FEV1 of more than 12% and 200 mL after inhalation of a short-acting bronchodilator. The challenge test was considered to be positive if a methacholine dose <1600 µg caused a decrease in the FEV1 of >20%, relative to baseline.¹ A baseline ACQ-7 score and spirometry data were recorded immediately prior to the initiation of AD treatments.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (version 6, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Qualitative variables were expressed as the number (percentage). Quantitative variables were expressed as the mean ± standard deviation (SD). Comparisons were performed using paired or unpaired t-tests, as appropriate, or Fisher's exact test. The threshold for statistical significance was set to $p < 0.05$.

Results

Population characteristics

A total of 244 patients with SA were screened, and 39 (16%) (predominantly women) were included in the study: 14 patients had been treated with azithromycin but not SCiG, and 25 had been subsequently treated with SCiG after the failure of azithromycin prophylaxis with a wash-out period of at least three weeks. The baseline characteristics of the study population are summarized in Table 1. All patients had a confirmed diagnosis of AD (HGG: 59%; CVID: 23%; IgGSD: 18%). Nine (39%) of the 23 patients with HGG had regularly received OCS in the preceding years, and could be considered as having secondary HGG. Only three (7.6%) of the patients had a family history of asthma. A family history of atopy was noted for one (7.1%) of the patients in the azithromycin group and four (16.0%) of the patients in the SCiG group ($p = 0.64$). Overall, atopy was found in 21 (53.8%) of the patients; the difference between the two groups was not significant. Most patients (74.4%)

Table 1
Demographic and clinical characteristics of the study population upon initiation of subcutaneous immunoglobulin (SCiG) or azithromycin treatment.

Parameter	Total population N = 39	Azithromycin N = 14	SCiG N = 25	P
Age (mean ± SD)	59 ± 14	59 ± 14	59 ± 14	0.999
Sex ratio F/M	29/10	11/3	18/7	0.721
Smoking				
Non-smokers/Former smokers - n	17/22	7/7	10/15	0.737
Atopy - n (%)	21 (53.8)	7 (50.0)	14 (56.0)	0.749
Asthma diagnosis: childhood/adulthood	10/29	2/12	8/17	0.278
Diagnostic lung function tests				
Reversibility test - n (%)	28 (71.8)	7 (50.0)	21 (84.0)	0.033*
Methacholine challenge test - n (%)	11 (28.2)	7 (50.0)	4 (16.0)	
Courses of OCSs for asthma patient/year - mean ± SD	7.31 ± 2.13	6.21 ± 2.04	7.92 ± 1.97	0.014*
Courses of rescue antibiotics patient/year - mean ± SD	7.18 ± 2.13	6.07 ± 1.98	7.80 ± 1.98	0.013*
ACQ7 - mean ± SD	2.71 ± 0.53	2.55 ± 0.41	2.80 ± 0.57	0.158
Lung function- mean ± SD				
FEV1 (%)	69.26 ± 27.19	86.93 ± 23.88	59.36 ± 24.03	0.001*
FVC (%)	88.13 ± 24.31	108.00 ± 20.51	77.00 ± 18.67	<0.001*
FEV1/FVC (%)	63.97 ± 16.17	64.43 ± 11.47	63.72 ± 18.51	0.898
TLC (%)	105.63 ± 13.98	113.36 ± 5.21	101.47 ± 16.84	0.109
TLCO (% predicted)	89.44 ± 15.31	90.21 ± 15.63	89.00 ± 15.44	0.725
Laboratory characteristics*				
Blood cell count (G/L)- mean ± SD				
Eosinophils	0.25 ± 0.20	0.22 ± 0.19	0.26 ± 0.21	0.736
BLs	0.26 ± 0.14	0.21 ± 0.14	0.29 ± 0.13	0.086
TLs	1.33 ± 0.41	1.20 ± 0.35	1.41 ± 0.43	0.125
NK cells	0.28 ± 0.14	0.27 ± 0.15	0.29 ± 0.14	0.797
Serum Ig & C (g/L) – median [IQR]				
IgA	1.39 [0.99–1.91]	1.59 [1.37–1.80]	1.26 [0.95–2.27]	0.501
IgM	0.96 [0.55–1.84]	0.83 [0.49–1.37]	1.24 [0.63–1.93]	0.303
IgG	5.95 [5.36–6.98]	6.63 [5.65–8.04]	5.85 [4.87–6.52]	0.021*
IgG1	2.61 [2.19–3.45]	2.79 [2.49–3.33]	2.40 [2.09–3.49]	0.298
IgG2	1.34 [1.13–2.84]	2.70 [1.17–3.51]	1.21 [1.06–2.81]	0.147
IgG3	0.41 [0.22–1.06]	0.69 [0.30–0.92]	0.25 [0.20–1.11]	0.114
IgG4	0.28 [0.08–0.80]	0.13 [0.07–0.53]	0.36 [0.08–0.86]	0.178
C3	1.16 [1.06–1.32]	1.15 [1.04–1.35]	1.17 [1.06–1.31]	0.808
C4	0.26 [0.20–0.32]	0.26 [0.19–0.27]	0.28 [0.23–0.32]	0.048*
Serum IgE (kU/L) – median [IQR]	89.0 [37.8–231.0]	64.3 [24.6–199.3]	127.0 [38.2–257.5]	0.193
Serum antibody – median [IQR] to:				
tetanus (kU/L)	0.41 [0.38–0.47]	0.44 [0.39–0.52]	0.40 [0.36–0.43]	0.076
<i>Pneumococcus</i> (mg/L)	68.0 [55.0–78.0]	66.5 [38.0–77.2]	68.0 [56.0–81.0]	0.215
CT scan of the sinus: sinusitis – n (%)	31 (79.5)	11 (78.6)	20 (80.0)	1
Treatments: n (%)				
High-dose ICS + LABAs	39 (100)	14 (100)	25 (100)	0.975
LAMAs	33 (84.6)	14 (100)	19 (76.0)	0.071
Leukotriene receptor antagonist	19 (48.7)	2 (14.2)	17 (43.5)	0.002
NCSs	24 (61.5)	8 (57.1)	16 (64.0)	0.739

NCS, nasal corticosteroid; LAMA, long acting muscarinic antagonist; IQR, interquartile range; ACQ7, Asthma Control Questionnaire 7; FVC, forced vital capacity; TLC, total lung capacity; TLCO/VA, transfer coefficient for carbon monoxide/volume alveolar ratio; BL, B lymphocyte; TL, T lymphocyte; NK, natural killer; Ig, immunoglobulin; IgG1-IgG4, IgG subclasses 1 to 4; C3, complement factor 3; C4, complement factor 4.

Normal values: blood eosinophil count <0.5 G/L; BLs 0.1–0.5 G/L; TLs 0.7–2.1 G/L; NK cells 0.1–0.6 G/L; C3 0.2–1.5 g/L; C4 0.1–0.34 g/L; serum IgA level 0.7–4.1 g/L; IgM 0.4–2.4 g/L; IgG 6.9–14 g/L; IgG1 = 3.42–11.18 g/L; IgG2 = 1.48–5.25 g/L; IgG3 = 0.21–1.14 g/L; IgG4 = 0.07–0.89 g/L; IgE <114 kU/L. * Statistically significant.

had late-onset asthma; again, the difference between the two groups was not significant.

Twenty-eight patients (72%) had airway obstruction with a positive reversibility test, and 11 patients (28%) had normal airway function with a positive methacholine challenge test. Lung function was worse in the SClg group (Table 1).

All patients were treated with a combination of high-dose ICS (>1000 µg/day of beclomethasone or its equivalent) and a LABA. Thirty-three patients also received a long-acting muscarinic antagonist, and 19 also received a leukotriene receptor antagonist (LTRA). All the patients receiving OCS came from the SClg group. Similarly, the number of patients receiving an LTRA was significantly higher in the SClg group than in the azithromycin group (17 vs. 2, respectively; $p = 0.002$). None of the patients was treated with monoclonal antibodies (anti-IgE or anti-IL-5) during the study. Despite asthma treatment at GINA steps 4 and 5,¹ all patients had uncontrolled asthma (i.e. an ACQ-7 score >1.5); the mean \pm SD ACQ-7 score was 2.71 ± 0.53 (intergroup difference: non-significant) (Table 1).

None of the patients had a family history of recurrent infections, although all patients had suffered from recurrent respiratory infections requiring antibiotics. The sinus CT scan evidenced chronic sinusitis in 31 (79.5%) of the patients, none of whom had anatomic abnormalities or nasal polyposis.

The mean number of asthma exacerbations requiring OCSs during the preceding year was significantly higher in the SClg group than in the azithromycin group (7.92 ± 1.97 vs. 6.21 ± 2.04 , respectively; $p = 0.014$). More than 90% of the study participants had experienced at least five exacerbations within the year prior to the treatment of AD. All these episodes ($n = 285$) were caused by infections, and required antibiotics. When documented, the bacteria involved were *Haemophilus influenzae* (15%), *Streptococcus pneumoniae* (13%), *Pseudomonas aeruginosa* (5%), *Staphylococcus aureus* (2.5%), *Klebsiella pneumoniae* (2.5%), and *Proteus mirabilis* (2.5%).

The mean blood eosinophil count was similar in the two groups of patients, although five patients (36%) in the azithromycin group and 11 patients (44%) in the SClg group had a blood eosinophil count $\geq 300/\mu\text{L}$ at baseline. Fifteen percent of the patients had B lymphopenia. None of the patients had abnormal T or NK cell counts. Serum levels of complement fractions 3 and 4 were normal in all patients (Table 1).

The serum levels of the Ig classes and subclasses and the presence of IgG antibodies against pneumococcal and tetanus vaccine antigens are summarized in Table 1, and the types of AD are shown in Figure 1. The serum levels of the Ig classes and subclasses in each patient and in the CVID, HGG and IgGSD subgroups are summarized in Supplementary Table 1, 2. Titres of anti-pneumococcal antibodies were below the protective value in 15 patients, and remained low after a booster dose of vaccine in five patients in the IgGSD group. Titres of anti-tetanus antibodies were below the protective threshold in only two patients, both of whom received a booster dose of tetanus vaccine. Forty-six percent of the patients had an abnormally high serum IgE level.

Outcome measures

The variation in FEV1 and the improvement in the ACQ-7 score one year after initiation of the AD treatments are summarized in Table 2. A significant increase in FEV1 was observed in both groups, with a gain of at least 100 mL in 50% of the patients in the azithromycin group and in 72% of the patients in the SClg group.

There was also a dramatic decrease in the ACQ-7 score in both groups after 12 months of treatment. All patients achieved a clinically meaningful (0.5-point) reduction in the ACQ-7 score. Four patients in each treatment group achieved an ACQ-7 score ≤ 0.75 ($p = 0.42$). The proportion of the study participants with controlled

Patient	IgA	IgM	Tot IgG	IgG subclass			
				IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
1			○	◆			
2			○	◆			
3			●	◆			
4			●	◆			
5			○		■		
6			○		■		
7			●		■		
8			●			▲	
9			●			▲	
10			●	◆	■		
11			●	◆	■		
12			●	◆	■		
13			●	◆	■		
14			●	◆	■		
15			●	◆	■		
16			○	◆		▲	
17			●	◆		▲	
18			●	◆		▲	
19			●	◆		▲	
20			●	◆		▲	
21			●	◆		▲	
22			●	◆			▼
23			●	◆			▼
24			○		■		
25			●		■		▼
26			●		■		▼
27			○		■	▲	
28			●	◆	■		
29			●	◆	■	▲	
30			●	◆	■		▼
31			●	◆	■	▲	▼
32		✓	○	◆			
33		✓	○	◆			
34		✓	●	◆		▲	
35		✓	●	◆	■		▼
36		✓	●	◆	■	▲	
37		✓	●		■		▼
38		✓	●		■		▼
39	x	✓	○	◆			▼
n	1	8	29	28	20	13	10
median	0.3	0.29	5.72	2.30	1.14	0.20	0.035
IQR 25 th	/	0.25	5.23	2.06	0.93	0.16	0.017
IQR 75 th	/	0.35	6.37	2.81	1.19	0.21	0.055

Fig. 1. Distribution of immunoglobulin G/A/M (IgG/A/M) class and IgG (IgG1/2/3/4) subclass deficiencies in the study population. ●, Total IgG deficiency combined with IgG subclass deficiency; ○, IgG subclass deficiency without total IgG deficiency.

or partly controlled asthma after treatment of the AD was 56.4% (Fig. 2).

The treatment of AD greatly reduced the number of asthma exacerbations requiring OCSs or antibiotics (Table 3, Fig. 3). Overall, 14 of the 39 patients (36%) responded adequately to first-line treatment with azithromycin, and the majority of azithromycin non-responders responded adequately to SClg: the annual number of exacerbations at least halved in all the patients, and fell by at least 75% in 37.5%. Furthermore, 60% of the patients achieved an ACQ-7 score of 1.5 or less. It should be noted that severe exacerbations in the previous year were more frequent and baseline lung function was worse in patients treated with SClg (i.e. azithromycin non-responders) than in azithromycin responders. The use of SClg as a second-line treatment of AD in azithromycin non-responders may explain this observation. In the group of patients treated with SClg, we did not evidence a relationship between the IgG level at baseline on one hand and the asthma severity or the

Table 2
Lung function and asthma control before and after one year of treatment with SClg or azithromycin.

	SClg (n = 25)		Azithromycin (n = 14)		Total (n = 39)	
	Before	After	Before	After	Before	After
FEV1 (L)	1.73 ± 0.89	1.91 ± 0.86	2.19 ± 0.70	2.35 ± 0.65	1.90 ± 0.85	2.07 ± 0.81
Annual change (L)	0.18 ± 0.21		0.16 ± 0.25		0.18 ± 0.22	
FEV1 (%)	59.4 ± 24.0	66.7 ± 22.4	86.9 ± 23.9	94.9 ± 22.3	69.3 ± 27.2	76.8 ± 26.0
Annual change (%)	7.3 ± 7.1		8.00 ± 7.1		7.56 ± 6.98	
ACQ-7 score	2.80 ± 0.57	1.35 ± 0.74	2.55 ± 0.41	1.10 ± 0.54	2.71 ± 0.53	1.26 ± 0.68
Annual change	-1.45 ± 0.56		-1.45 ± 0.47		-1.45 ± 0.52	

Data are presented as the n (%) or the mean ± SD. * Statistically significant.

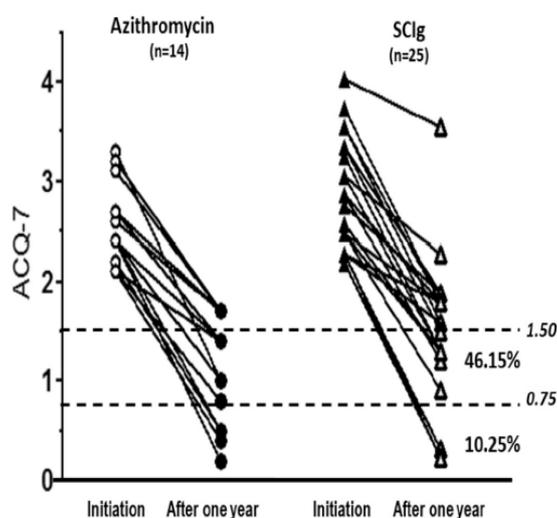


Fig. 2. Effect of azithromycin and subcutaneous immunoglobulin (SClg) administration on the Asthma Control Questionnaire score (ACQ-7). Each point represents the ACQ-7 score for an individual patient. Horizontal dotted lines indicate the ACQ-7 scores corresponding to the cut-offs for uncontrolled asthma (≥ 1.50) and well-controlled asthma (≤ 0.75). After a one-year course of treatment, 46.15% patients were partially controlled and 10.25% were well-controlled.

improvement in asthma outcomes after treatment initiation on the other. However, our sample size was probably too small for an adequate assessment of this relationship in patients with various types of AD. The responses to treatment in the CVID, HGG and IgGSD subgroups (expressed as the reductions in the annual number of exacerbations and in the ACQ-7 score) are shown in

Supplementary Figure 1, 2. The results were similar in these three types of AD.

We did not observe any serious adverse events related to treatment with SClg or azithromycin.

Discussion

Our present results showed that treatment with azithromycin or SClg improved outcomes in patients with SA and AD. Both treatments for AD were associated with (i) a marked reduction in the annual number of SA exacerbations caused by respiratory infections (relative to the year preceding treatment initiation), (ii) significantly better asthma control in all patients, with more than half achieving at least partly control one year after treatment initiation, and (iii) a significantly greater FEV1. However, only 14 of the 39 patients (36%) responded adequately to first-line treatment with azithromycin.

Severe asthma is a heterogeneous disease with several phenotypes, including allergic and eosinophilic asthma. Asthma exacerbations represent a major source of morbidity and mortality with important socio-economic consequences. One third of patients with SA have frequent exacerbations (≥ 3 /year), and so SA constitutes a distinct subphenotype.²⁴ In the present study, patients with SA and AD were especially likely to experience severe exacerbations (mainly caused by respiratory infections); over 90% of the participants had experienced at least five severe exacerbations in the year preceding the initiation of effective treatment for AD.

Bronchiectasis is frequently associated with AD (30–50%)^{25,26} but was rarely evidenced by high-resolution CT in our population. Patients with bronchiectasis were excluded from our study. A survey of USA registries has suggested that asthma (rather than bronchiectasis) is the most common respiratory complication among patients with CVID, with a prevalence of about 40%.¹⁰ In a population-based case-control study, a history of asthma was

Table 3
Exacerbation rate before and after one year of treatment with SClg or azithromycin.

	SClg (n = 25)		Azithromycin (n = 14)		Total (n = 39)	
	Before	After	Before	After	Before	After
Exacerbations treated with OCSs	7.92 ± 1.96	1.54 ± 1.32	6.21 ± 2.04	1.79 ± 1.12	7.31 ± 2.13	1.63 ± 1.24
Absolute annual change (n)	-6.44 ± 2.08		-4.43 ± 1.69		-5.72 ± 2.16	
Relative annual rate change (%)	-81.2 ± 14.9		-71.2 ± 14.8		-77.6 ± 15.4	
Exacerbations treated with ABTs	7.80 ± 1.98	1.42 ± 1.32	6.07 ± 1.98	1.79 ± 1.12	7.18 ± 2.13	1.55 ± 1.24
Absolute annual change (n)	-6.44 ± 2.10		-4.29 ± 1.44		-5.67 ± 2.14	
Relative annual rate change (%)	-82.4 ± 15.0		-71.2 ± 14.8		-78.4 ± 15.7	

Data are presented as the n (%) or the mean ± SD. * Statistically significant. OCS, Oral corticosteroid; ABT, Rescue antibiotics.

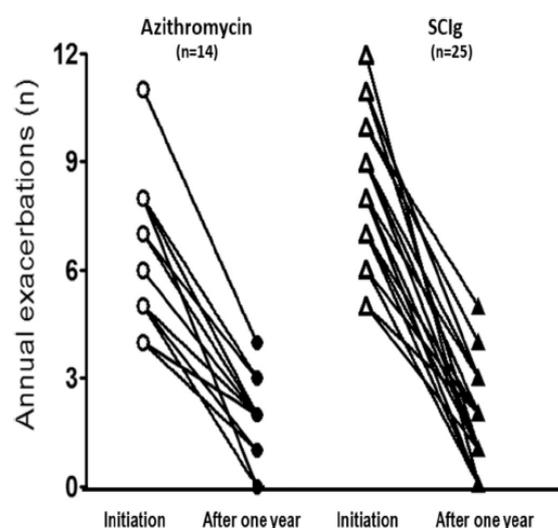


Fig. 3. Effect of azithromycin and subcutaneous immunoglobulin (SCiG) administration on the number of asthma exacerbations during the year preceding initiation of the treatments (empty symbols) and during the first year of treatment (filled symbols). Each point represents the number of exacerbation for an individual patient.

more prevalent among patients with sIgAD/CVID (31%) than among matched controls (12%).¹⁴ Furthermore, over 20% of adults and children with an isolated IgG3 deficiency and recurrent upper respiratory tract infections were found to have prevalent asthma.²⁷ Therefore, asthma status appears to be frequently associated with AD. However, late diagnosis (6–12 years) and delayed initiation of appropriate treatment remain problematic.^{10,15} In the present study, the mean patient age was 59 ± 14 – a value corresponding to the majority of patients with primary immunodeficiency diseases in a national survey in the USA,²⁸ and close to the age of a population of asthmatic patients with an IgG subclass deficiency described in a recent Korean study.¹⁷

The standard treatments for primary AD are antibiotic prophylaxis and/or IRT.⁹ In this setting, IRT is associated with a significant decrease (by about half to two-thirds) in the number of infections, the need for antibiotics, and the frequency of hospitalization, and significantly improves quality of life.^{29–32} Furthermore, IRT has proven long-term effectiveness in adults with recurrent respiratory tract infections and severe or milder forms of humoral immunodeficiency,³² and can be administered at home.³³ The mechanism by which IRT reduces infections is probably related to the passive transfer of specific antibodies against multiple pathogens.³⁴ Apart from primary AD, IRT is a well-proven treatment for symptomatic secondary HGG in patients with multiple myeloma or chronic lymphoid leukaemia. If antibiotic prophylaxis has failed, IRT can be prescribed in secondary HGG with other causes.³⁵

The efficacy of IRT has been evaluated in patients with asthma but without AD.¹⁵ Several open studies of small numbers of patients have shown that intravenous IRT (IVIg) was moderately efficacious in patients with moderate-to-severe asthma but without AD.¹³ In seven patients with steroid-dependent asthma, IVIg reduced the steroid requirement and decreased the frequency of hospital admission but did not improve lung function.³⁶ A double-blind trial failed to demonstrate the efficacy of IVIg in the treatment of 25 steroid-dependent patients with SA.³⁷ In 28 steroid-dependent asthmatic patients, there was a significant steroid-sparing effect in those requiring the highest doses of OCSs; however, there were no improvements in any of the asthma outcomes.³⁸ Intravenous IRT

of asthmatic children was not associated with a significant impact on symptoms or a reduction in the incidence of upper respiratory tract infections in the short term (over 4 months), although the upper respiratory infections that did occur appeared to be less protracted.³⁹ Overall, IRT has not demonstrated its clinical relevance in patients with SA but without AD.

A few studies have evaluated the efficacy of IRT in patients with SA and AD. A recent Korean, multicentre, open-label study assessed the efficacy of monthly IVIg in 24 adults with moderate-to-severe SA and IgGSD.¹⁵ A 6-month course of IRT was associated with a significant (58%) reduction in the number of infection-related asthma exacerbations. This reduction was mainly driven by a decrease in the number of asthma exacerbations triggered by a common cold – explaining the absence of a reduction in antibiotic consumption. Furthermore, there was no reduction in the number of asthma exacerbations treated with OCSs. However, the observation of a significant reduction in exacerbations requiring unscheduled visits or hospital admission indirectly suggested a favourable impact of the IVIg on the most severe episodes. There were no significant changes in lung function, although a significant improvement in asthma control (ACT score) and asthma-related quality of life were observed.¹⁵ In a retrospective analysis, 20 patients with difficult-to-treat asthma were found to have clinical and laboratory evidence of specific AD.⁴⁰ Intravenous IRT was associated with a reduction in morbidity, the number of hospitalizations, steroid therapy, and respiratory infections in this group of patients.

Both IVIg and SCiG treatment appear to be safe, and have similar levels of effectiveness. The benefits of weekly SCiG infusions over thrice-weekly IVIg therapy include stable IgG levels, less frequent and less severe systemic side effects, the absence of a requirement for venous access, and greater flexibility in the patient's social life.³¹ In contrast to the report by Kim *et al.*,¹⁵ our study of 25 patients with SA found that a home-based course of weekly SCiG treatment was associated with a marked (78%) reduction in the annual number of SA exacerbations requiring antibiotics and OCSs. This discrepancy might be due (at least in part) to interstudy differences in disease severity (all our patients had severe, uncontrolled asthma; in the Korean study, about half of the patients had moderate asthma, and only 41% had uncontrolled asthma) and a greater number of severe exacerbations in the year preceding initiation of an effective treatment of the AD. The number of exacerbations treated with antibiotics in the year following the initiation of SCiG treatment was reduced to 1.5 ± 1.3 – a frequency that appears to be somewhat lower than the value of 2.5 infections per patient year in previous efficacy studies of IRT^{41,42}; this finding suggests that the home-based administration of SCiG is effective. Furthermore, the mean FEV1 in our SCiG group (60% predicted) was lower than in the Korean study (close to 80% predicted). This lower FEV1 might also explain the improvement in FEV1 after treatment in the present study. To the best of our knowledge, the present study is the first to have reported on the effectiveness of SCiG in patients with SA and AD. No serious adverse reactions to SCiG were reported. The most common adverse reactions to SCiG therapy are local swelling, redness, and an itching or burning sensation. These reactions are rarely serious, and disappear after a few hours.³¹

It was recently reported that add-on azithromycin therapy for almost a year was effective and safe in adult patients whose asthma was not controlled by treatment with ICS and LABAs.⁴³ Azithromycin benefited patients with eosinophilic and non-eosinophilic asthma by reducing moderate and SA exacerbations by ~40% versus placebo, and slightly improved asthma control and asthma-related quality of life. It is noteworthy that azithromycin exerted a beneficial effect by reducing the frequency of lower respiratory tract infections.⁴³ These asthmatic patients were not immunocompromised and were much less prone to exacerbation

than the patients treated with azithromycin in the present study (1.1 vs. 6.2 severe exacerbations per person-year, respectively). Among the azithromycin responders, however, we observed a marked reduction (by 71%) in the frequency of severe infection-related asthma exacerbations, a clinically relevant improvement in asthma control, and a significant increase in FEV1. These results were achieved despite the continued use of the previous asthma treatments throughout the study.

The present study had several limitations, primarily related to the observational design and the relatively small number of patients. To overcome these limitations, we included well-characterized patients with SA, regularly monitored⁴⁴ one year before and after initiation of an effective therapy of AD. This follow-up period was appropriate for assessing the impact on asthma exacerbations. In the absence of a placebo group, the true effect of treating AD on asthma outcomes is difficult to ascertain. However, it is known that placebos have very little (if any) effect on long-term outcomes, such as the rate of asthma exacerbations during a year of routine care - particularly when all the episodes are related to infections, as was the case in the present study. For instance, omalizumab's effectiveness on the frequency of asthma exacerbations in real-life settings was similar to the efficacy results obtained during the drug's clinical development.^{45,46} It is also noteworthy that the effect size of azithromycin and SCIG on SA exacerbations appears to be at least as large as the effect size of omalizumab measured in a retrospective, observational study of adults in France.⁴⁵ In the latter study, a 58% reduction in the exacerbation rate (compared with the 12-month pre-treatment period) was observed.

In conclusion, our present results suggest that the addition of SCIG or azithromycin to standard asthma treatments in patients with SA and AD reduces the frequency of SA exacerbations and improves asthma control. Asthmatic patients with a history of exacerbations triggered by recurrent respiratory infections should be screened for AD (i.e. by measuring serum levels of Ig and IgG subclasses) and, if appropriate, should be treated for this condition.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.alit.2019.10.011>.

Conflict of interest

AT reports personal fees from Novartis, AstraZeneca, Menarini, Boehringer Ingelheim, and non-financial support from Sanofi, outside the submitted work. HS reports non-financial support from Oxyvie, GSK, LVL Medical, and grants from AMS, outside the submitted work.

IJC reports personal fees from CSL Behring, grants from LVL/AMS, outside the submitted work. EC reports non-financial support from LVL Medical, CSL Behring, Shire, and SOS Oxygene, outside the submitted work. PD reports personal fees from ALK/Ingelheim-Abelló, Astra Zeneca, Boehringer Ingelheim, Chiesi, GlaxoSmithKline, IQVIA, Menarini, Mundipharma, Novartis, Sandoz, Sanofi, and Stallergenes Greer, outside the submitted work. The rest of the authors have no conflict of interest.

Authors' contributions

AT and PD designed the study, collected the data, performed the statistical analysis, interpreted the results, and wrote the paper. EC, IJC, RJAU and HS helped to interpret the results. All authors read and approved the final manuscript.

References

- GINA Report: Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Available from: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2019/06/GINA-2019-main-report-june-2019-wms.pdf>.
- Opina MT, Moore WC. Phenotype-driven therapeutics in severe asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2017;17:10.
- Edwards MR, Saglani S, Schwarze J, Skevaki C, Smith JA, Ainsworth B, et al. Addressing unmet needs in understanding asthma mechanisms: from the European asthma research and innovation partnership (EARIP) work package (WP)2 collaborators. *Eur Respir J* 2017;49.
- Chauhan AJ, Inskip HM, Linaker CH, Smith S, Schreiber J, Johnston SL, et al. Personal exposure to nitrogen dioxide (NO₂) and the severity of virus-induced asthma in children. *Lancet* 2003;361:1939–44.
- Qiu H, Yu IT-S, Tse IA, Chan EYY, Wong TW, Tian L. Greater temperature variation within a day associated with increased emergency hospital admissions for asthma. *Sci Total Environ* 2015;505:508–13.
- Chung KF. Diagnosis and management of severe asthma. *Semin Respir Crit Care Med* 2018;39:91–9.
- Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro M, Sterk PJ, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J* 2014;43:343–73.
- Porsbjerg C, Menzies-Gow A. Co-morbidities in severe asthma: clinical impact and management. *Respirology* 2017;22:651–61.
- Bonilla FA, Khan DA, Ballas ZK, Chinen J, Frank MM, Hsu JT, et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:1186–205.
- Berger M, Geng B, Cameron DW, Murphy LM, Schulman ES. Primary immune deficiency diseases as unrecognized causes of chronic respiratory disease. *Respir Med* 2017;132:181–8.
- Özcan C, Metin A, Erkoçoğlu M, Kocabas CN. Bronchial hyperreactivity in children with antibody deficiencies. *Allergol Immunopathol* 2015;43:57–61.
- Baris S, Karakoc-Aydiner E, Ozen A, Ozdemir C, Bahceciler NN, Barlan IB. Serum immunoglobulin levels as a predictive factor for a better outcome of non-atopic childhood asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2011;22:298–304.
- Hamilos DL, Young RM, Peter JB, Agopian MS, Iklé DN, Barka N. Hypogammaglobulinemia in asthmatic patients. *Ann Allergy* 1992;68:472–81.
- Urm S-H, Yun HD, Fenta YA, Yoo KH, Abraham RS, Hagan J, et al. Asthma and risk of selective IgA deficiency or common variable immunodeficiency: a population-based case-control study. *Mayo Clin Proc* 2013;88:813–21.
- Kim JH, Ye YM, Ban GY, Shin YS, Lee HY, Nam YH, et al. Effects of immunoglobulin replacement on asthma exacerbation in adult asthmatics with IgG subclass deficiency. *Allergy Asthma Immunol Res* 2017;9:526–33.
- Dupin C, Marchand-Adam S, Favelle O, Costes R, Gatault P, Diot P, et al. Asthma and hypogammaglobulinemia: an asthma phenotype with low type 2 inflammation. *J Clin Immunol* 2016;36:810–7.
- Kim JH, Park S, Hwang YI, Jang SH, Jung KS, Sim YS, et al. Immunoglobulin G subclass deficiencies in adult patients with chronic airway diseases. *J Korean Med Sci* 2016;31:1560–5.
- Lee SH, Ban GY, Kim SC, Chung CG, Lee HY, Lee JH, et al. Association between primary immunodeficiency and asthma exacerbation in adult asthmatics. *Korean J Intern Med* 2020;35:449–56.
- Heinzerling L, Mari A, Bergmann K-C, Bresciani M, Burbach G, Darsow U, et al. The skin prick test – European standards. *Clin Transl Allergy* 2013;3:3.
- Daly TM, Hill HR. Use and clinical interpretation of pneumococcal antibody measurements in the evaluation of humoral immune function. *Clin Vaccin Immunol* 2015;22:148–52.
- Juniper EF, O'Byrne PM, Guyatt GH, Ferrie PJ, King DR. Development and validation of a questionnaire to measure asthma control. *Eur Respir J* 1999;14:902–7.
- Juniper EF, Bousquet J, Abetz L, Bateman ED, GOAL Committee. Identifying 'well-controlled' and 'not well-controlled' asthma using the Asthma Control Questionnaire. *Respir Med* 2006;100:616–21.
- Laszlo G. Standardisation of lung function testing: helpful guidance from the ATS/ERS Task Force. *Thorax* 2006;61:744–6.
- Kupczyk M, ten Brinke A, Sterk PJ, Bel EH, Papi A, Chané P, et al. Frequent exacerbators – a distinct phenotype of severe asthma. *Clin Exp Allergy* 2014;44:212–21.
- Agondi RC, Barros MT, Rizzo LV, Kalil J, Giavina-Bianchi P. Allergic asthma in patients with common variable immunodeficiency. *Allergy* 2010;65:510–5.
- Westh L, Mogensen TH, Dalgaard LS, Bernth Jensen JM, Katzenstein T, Hansen A-BE, et al. Identification and characterization of a nationwide Danish adult common variable immunodeficiency cohort. *Scand J Immunol* 2017;85:450–61.
- Oxelius VA, Hanson LA, Björkander J, Hammarström L, Sjöholm A. IgG3 deficiency: common in obstructive lung disease. Hereditary in families with immunodeficiency and autoimmune disease. *Monogr Allergy* 1986;20:106–15.
- Immune Deficiency Foundation. Available from: <https://primaryimmune.org/wp-content/uploads/2011/04/Primary-Immunodeficiency-Diseases-in-America-2007The-Third-National-Survey-of-Patients.pdf>.
- Abdou NI, Greenwell CA, Mehta R, Narra M, Hester JD, Halsey JF. Efficacy of intravenous gamma globulin for immunoglobulin G subclass and/or antibody deficiency in adults. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;149:267–74.
- Olinder-Nielsen A-M, Granert C, Forsberg P, Friman V, Viatorisz A, Björkander J. Immunoglobulin prophylaxis in 350 adults with IgG subclass deficiency and recurrent respiratory tract infections: a long-term follow-up. *Scand J Infect Dis* 2007;39:44–50.
- Maarschalk-Ellebrog IJ, Hoepelman IM, Ellebrog PM. Immunoglobulin treatment in primary antibody deficiency. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:396–404.
- van Kessel DA, Hoffman TW, van Velzen-Blad H, Zanen P, Grutters JC, Rijkers GT. Long-term clinical outcome of antibody replacement therapy in humoral immunodeficient adults with respiratory tract infections. *EBioMedicine* 2017;18:254–60.

33. Zuizewind CA, van Kessel P, Kramer CM, Muijs MM, Zwieters JC, Triemstra M. Home-based treatment with immunoglobulins: an evaluation from the perspective of patients and healthcare professionals. *J Clin Immunol* 2018;**38**:876–85.
34. Barlan IB, Geha RS, Schneider LC. Therapy for patients with recurrent infections and low serum IgG3 levels. *J Allergy Clin Immunol* 1993;**92**:353–5.
35. Patel SY, Carbone J, Jolles S. The expanding field of secondary antibody deficiency: causes, diagnosis, and management. *Front Immunol* 2019;**10**:33.
36. Haque S, Boyce N, Thien FCK, O'Hehir RE, Douglass J. Role of intravenous immunoglobulin in severe steroid-dependent asthma. *Intern Med J* 2003;**33**:341–4.
37. Kishiyama JL, Valacer D, Cunningham-Rundles C, Sperber K, Richmond GW, Abramson S, et al. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of high-dose intravenous immunoglobulin for oral corticosteroid-dependent asthma. *Clin Immunol* 1999;**91**:126–33.
38. Salmun LM, Barlan I, Wolf HM, Eibl M, Twarog FJ, Geha RS, et al. Effect of intravenous immunoglobulin on steroid consumption in patients with severe asthma: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *J Allergy Clin Immunol* 1999;**103**:810–5.
39. Niggemann B, Leupold W, Schuster A, Schuster R, Berg AV, Grübl A, et al. Prospective, double-blind, placebo-controlled, multicentre study on the effect of high-dose, intravenous immunoglobulin in children and adolescents with severe bronchial asthma. *Clin Exp Allergy* 1998;**28**:205–10.
40. Schwartz HJ, Hostoffer RW, McFadden ER, Berger M. The response to intravenous immunoglobulin replacement therapy in patients with asthma with specific antibody deficiency. *Allergy Asthma Proc* 2006;**27**:53–8.
41. Suez D, Stein M, Gupta S, Hussain I, Melamed I, Paris K, et al. Efficacy, safety, and pharmacokinetics of a novel human immune globulin subcutaneous, 20 % in patients with primary immunodeficiency diseases in north America. *J Clin Immunol* 2016;**36**:700–12.
42. Wasserman RL, Church JA, Stein M, Moy J, White M, Strausbaugh S, et al. Safety, efficacy and pharmacokinetics of a new 10% liquid intravenous immunoglobulin (IVIG) in patients with primary immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2012;**32**:663–9.
43. Gibson PG, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, Hodge S, James AL, et al. Effect of azithromycin on asthma exacerbations and quality of life in adults with persistent uncontrolled asthma (AMAZES): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2017;**390**:659–68.
44. Jolles S, Sánchez-Ramón S, Quinti I, Soler-Palacín P, Agostini C, Florin B, et al. Screening protocols to monitor respiratory status in primary immunodeficiency disease: findings from a European survey and subclinical infection working group. *Clin Exp Immunol* 2017;**190**:226–34.
45. Humbert M, Taille C, Mala L, Le Gros V, Just J, Molimard M, et al. Omalizumab effectiveness in patients with severe allergic asthma according to blood eosinophil count: the STELLAIR study. *Eur Respir J* 2018;**51**.
46. Grimaldi-Bensouda L, Zureik M, Aubier M, Humbert M, Levy J, Benichou J, et al. Pharmacoeconomics of Asthma and Xolair (PAX) Study Group. Does omalizumab make a difference to the real-life treatment of asthma exacerbations?: results from a large cohort of patients with severe uncontrolled asthma. *Chest* 2013;**143**:398–405.

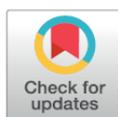
RESEARCH ARTICLE

Lack of desensitization of the cough reflex in ovalbumin-sensitized rabbits during exercise

Angelica Tiotiu^{1,2*}, Bruno Chenuel^{1,3}, Laurent Foucaud¹, Bruno Demoulin¹, Silvia Demoulin-Alexikova¹, Christo Christov⁴, Mathias Pousset^{1,3}

1 EA 3450 DevAH - Development, Adaptation and Disadvantage, Cardiorespiratory regulations and motor control, Université de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, France, **2** Pulmonology Department, CHRU Nancy, Nancy, France, **3** Pulmonary Function Testing and Exercise Physiology, CHRU Nancy, Nancy, France, **4** Department of Histology, Université de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, France

* a.tiotiu@chru-nancy.fr



Abstract

Introduction

Cough is a major symptom of asthma frequently experienced during exercise but little is known about interactions between cough and exercise. The goal of our study was to clarify the potential modulation of the cough reflex (CR) by exercise in a spontaneously breathing anaesthetized animal model of airway eosinophilic inflammation.

Materials & methods

Ten ovalbumin (OVA) sensitized adult rabbits and 8 controls were studied. The ventilatory response to direct tracheal stimulation, performed both at rest and during exercise was determined to quantify the incidence and the sensitivity of the CR.

Broncho-alveolar lavages (BAL) and cell counts were performed to assess the level of the airway inflammation following OVA-induced sensitization. Exercise was mimicked by Electrically induced hindlimb Muscular Contractions (EMC).

Results

Among 494 tracheal stimulations, 261 were performed at rest and 233 at exercise. OVA challenges in sensitized rabbits caused a significant increase in the percentage of eosinophils ($p = 0.008$) in BAL. EMC increased minute ventilation by 36% and 35% in OVA and control rabbits respectively, compared to rest values. The sensitivity of the CR decreased during exercise compared to baseline in control rabbits ($p = 0.0313$) while it remained unchanged in OVA rabbits.

Conclusion

The desensitization of the CR during exercise in control rabbits was abolished in OVA rabbits. The precise role of airway inflammation in this lack of CR desensitization needs to be further investigated but it might contribute to the exercise-induced cough in asthmatics.

OPEN ACCESS

Citation: Tiotiu A, Chenuel B, Foucaud L, Demoulin B, Demoulin-Alexikova S, Christov C, et al. (2017) Lack of desensitization of the cough reflex in ovalbumin-sensitized rabbits during exercise. PLoS ONE 12(2): e0171862. doi:10.1371/journal.pone.0171862

Editor: Bernhard Ryffel, Centre National de la Recherche Scientifique, FRANCE

Received: October 9, 2016

Accepted: January 26, 2017

Published: February 9, 2017

Copyright: © 2017 Tiotiu et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Cough is a major airway defensive reflex [1, 2]. It is one of the most common medical afflictions for which patients seek medical attention and which remains an unmet need given the lack of effective and safe treatments [3, 4]. Little is known about the modulation of cough associated with human activities, particularly during exercise [5]. The major cardiorespiratory adjustments occurring during exercise [6] undoubtedly may influence the cough reflex (CR). Some evidence suggest that cough is decreased during exercise in healthy subjects [7] as well as in animals models [8]. In contrast, exercise-induced cough is frequently reported by asthmatic patients [9] or even by athletes exhibiting airway inflammation [10], suggesting the potential of airway inflammation to enhance the CR during exercise. As only limited (and sometimes contradictory) information is available concerning the impact of exercise on cough, our study was conceived to develop an animal model as close as possible to the “asthmatic” airway inflammation and to assess the specific role of exercise on the occurrence of stimulated CR. Electrically induced muscle contractions (EMC) have been extensively used in the study of the control of breathing at exercise (animals and human studies). Consequently, it has long been demonstrated that EMC provides a hyperpnea that follows the same characteristics as the physiological increase in ventilation induced by volitional exercise, particularly matched to metabolism. Therefore, the EMC model appears as a valid model of exercise. Our main goal was then to determine whether airway inflammation could modulate the cough-induced by mechanical stimulation of the trachea during experimental exercise in ovalbumin (OVA)-sensitized rabbits compared to controls. We hypothesized that cough may be either increased or at least not decreased during exercise in OVA rabbits while cough is decreased during exercise in control rabbits.

Materials and methods

All animal procedures (housing and experiments) were approved by the Lorraine University Committee for the Use and Care of Laboratory animals and performed according to Council Directive 86–609 EEC, issued by the Council of the European Communities, under license from “Ministère de l’Agriculture et de la Pêche” and the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” (A5418-03409), and supervision by the “Services Vétérinaires Départementaux de Meurthe et Moselle”. Eighteen anesthetized, tracheotomized and spontaneously breathing New Zealand adult rabbits (weight: 3.07 ± 0.30 kg; age: 3 months) were studied (SARL HYCOLE—Route de Villers Plouich, 59159 MARCOING, France, <http://www.hycole.com/>). Among them, 10 were sensitized to ovalbumin (OVA) and 8 were sham sensitized (controls).

Ovalbumin sensitization protocol and control group

The month before the acute experiment with tracheal stimulations and exercise, an OVA sensitization protocol was performed. As previously described, OVA sensitized rabbits [11, 12] received intra-peritoneal (i.p.) injections of 0.1 mg OVA and 10 mg $Al(OH)_3$ dissolved in 1 ml saline (0.9%) on day 1 and day 14. From day 26 to 28, sensitized rabbits were exposed daily to an aerosol of OVA during 20 minutes (2.5 mg/ml; 50 mg OVA dissolved in 20 ml saline). Aerosols were administrated in a closed Plexiglas box (Fig 1) using an ultrasonic-nebulizer (SYSTAM, LS290). A sham protocol was used on control rabbits. They were treated similarly but saline was systematically used instead of OVA solutions, either intra-peritoneally or in nebulizations. All acute experiments were performed on day 28.

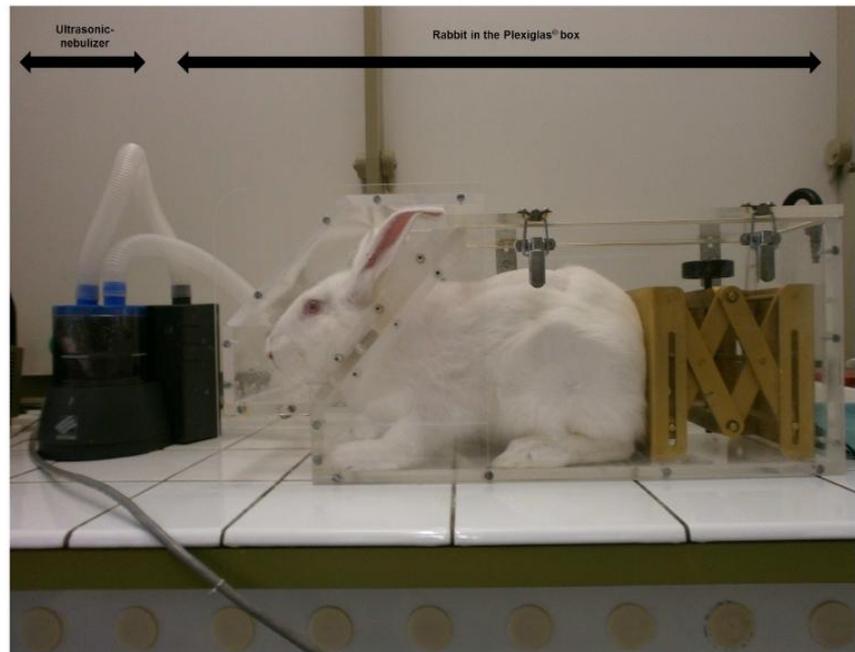


Fig 1. Rabbit exposed to an aerosol administered in a closed Plexiglas box using an ultrasonic-nebulizer (SYST'AM, LS290). The box was conceived to allow the head of the rabbit to be maintained in front of the aerosol particles and drops cloud generated by the nebulizer. Aerosol sessions were performed 15–20 min daily from day 26 to day 28 either with ovalbumin (OVA rabbits) or with saline (control rabbits).

doi:10.1371/journal.pone.0171862.g001

Ovalbumin sensitization evaluation

Intradermal skin tests. Seven days before acute experiments (day 21), sensitization to OVA was tested in both groups by intradermal skin tests. A 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OVA solution and saline (for control) were used. One hundred microliters of solutions (OVA and saline) were injected subcutaneously, symmetrically in the shaved dermis on the back of each animal. The extent of the reaction was measured 1h later using a calliper. Two measurements were taken at right angles to one another, in order to calculate the wheal area (mm^2) [13].

Bronchoalveolar lavage (BAL). BAL was performed at the end of each acute experiment (from 1.5 to 2.5 hours after the last OVA challenge on day 28), following immediately the animal euthanasia. A polyethylene-190 catheter was advanced through the endotracheal cannula into the trachea and gently wedged into a bronchus. Slow injection (followed by removal aspiration) of 5 ml of HEPES solution (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 MgCl₂, 10mM glucose, and 10 mM HEPES; pH 7.4) was repeated three times (overall injected volume = 15ml). BAL was then collected into a tube placed on ice and previously filtrated on nylon tissue with 60 μm mesh to remove mucus. An aliquot of this suspension was then centrifuged (600 rpm, 10 minutes) and the resulting Cytospin cell preparations were stained with May-Grünwald-Giemsa.

Microscopy and cell counting protocol. Images were acquired by an Olympus CDD camera coupled to an Olympus microscope with a x40 objective, so that final pixel size in a 1360 x 1024 image was 0.32 μm . At least 100 cells were included in the differential cellular

count: macrophages, lymphocytes, neutrophils, eosinophils, basophils, and monocytes were separately counted. Epithelial and unidentifiable cells were excluded.

Anesthesia and surgical preparation before acute experiment

Anesthesia was induced with a mixture of intravenous (through the ear vein) pentobarbital (0.30 ml.kg^{-1}) and intramuscular ketamine (0.10 ml.kg^{-1}), and pursued with continuous pentobarbital infusion (0.6 ml.h^{-1}). Anesthetic depth was quarterly evaluated (every 15 minutes) with the monitoring of physiological parameters (respiratory rate, heart rate) and the assessment of reflexes (palpebral reflex, corneal reflex, ear pinch withdrawal reflex and jaw tone). Supplementary anesthetic doses were administered in case of too light anesthesia (intravenous pentobarbital bolus of 0.03 ml.kg^{-1} and intramuscular ketamine bolus of 0.01 ml.kg^{-1}). At the end of the acute experiment, euthanasia was obtained by an overdose of Dolethal (bolus of 5 ml, Vetoquinol SA, Lure, France).

As previously described [8], the trachea was exposed via a midline incision, paying attention to preserve the integrity of vagal nerves. Rabbits were then tracheotomized and intubated with a steel tracheal cannula inserted caudally, allowing spontaneous breathing. Abdominal muscles electromyograms (EMG) was recorded by bipolar fine wire stainless steel electrodes (A-M Systems, INC, Carlsborg, WA 98324) introduced in either the transversus abdominis or external oblique abdominal muscles. Rectal temperature was continuously monitored with an electrical thermistor (Physiotemp Instruments, YSI 402 Clifton, NJ, USA) and maintained at 38°C using a heated operating pad, on which rabbits were laid in the supine position.

Breathing pattern and respiratory resistance

The tracheal cannula was connected to a pneumotachograph (Fleisch # 0, Metabo, Hepalinges, Switzerland) to simultaneously record airflow and airway pressure. The flow signal was digitized at 200 Hz. Data was fed into a computer and integrated to volume. Tidal Volume (V_T) and flow were displayed continuously throughout the period of acquisition and were stored on disk for later analysis. Respiratory resistance (Rrs) was measured by an adjustment of the forced oscillation technique, as previously detailed [8, 14, 15], in order to evaluate the exercise induced bronchodilation.

Rhythmic electrical stimulation of muscle contractions (EMC)

EMC was used as a valid model of exercise. We therefore used the validated approach of Cross et al. [16] adapted and formerly described in a previous study in rabbits [8]. Briefly, hindlimbs of anesthetized rabbits were shaved and fitted with stimulating surface electrodes (Dura-Stick Premium, REF 42205, DJO, USA) taped over the skin and connected to an electrical stimulator (Neuro Trac Rehab, Verity Medical LTD, UK). Stimulation allowing rhythmic hindlimb muscles contraction was maintained for 3 or 4 min bout, during which the current intensity was progressively increased from 10 to 30 mA, in order to maintain a sufficient increase in metabolism and corresponding hyperpnea (at least a 30% increase of resting minute-ventilation) [8, 16, 17].

Tracheal stimulation and analysis of the cough reflex

The device designed to stimulate the trachea has been described in detail and validated in previous reports [8, 18–20]. A semi-rigid rotating silastic catheter introduced through the tracheotomy is driven by a small electrical motor (low voltage DC motor 719RE280, MFA/Comodrills, UK) that spins the catheter and rubs the catheter tip on the airway mucosa. The

duration of probing randomly varied from 50 ms, corresponding to almost a single probe rotation, to 1000 ms.

Characterisation of a reference breath (at rest and during exercise) was obtained by averaging V_T and peak expiratory flow (V_{Epeak}) on 3 consecutive respiratory cycles prior to tracheal stimulation [8]. Responses to tracheal stimulations were assessed by the change in V_T and V_{Epeak} relative to the reference breath, as previously described [19, 21]. A significant response to tracheal stimulation was considered when the parameter (V_T , V_{Epeak}) was situated outside the 99th percentile (i.e. larger than the mean + 3 SD). Cough reflex (CR) was defined by a significant increase in both V_T and V_{Epeak} and expiration reflex (ER) was defined by an isolated increase in V_{Epeak} , not preceded by an increase in V_T . A “no response” (NR) pattern was defined by no change in tidal flow and volume. Cough threshold (CT) was defined as the shortest stimulus duration that induced a cough reflex response [21].

Protocol

One data acquisition sequence consisted of a bout of rest followed by electrically induced muscle contractions (EMC) records (i.e. exercise) [8]. After an initial sequence allowing Rrs measurements, each rabbit underwent 2 to 3 sequences (separated by at least 10 min of recovery, i.e. without any stimulation) including tracheal stimulations. Various durations (50 ms, 150 ms, 300 ms, 600 ms, 1000 ms) of tracheal stimulations were randomly delivered at rest, while the animal had been breathing quietly for at least 1 min. All stimulations were applied either completely during inspiration (i.e. 50 ms to 300 ms) or almost starting during inspiration (i.e. 600 ms and 1000 ms). During EMC, 3 to 4 tracheal stimulations (from 50 ms to 1000 ms) were as well randomly delivered at intervals of 1 min.

Data analysis

Statistical analysis was performed using the JMP 9.0.0 package (2010 SAS Institute Inc). Respiratory variables (V_T , minute ventilation V_E and Rrs) were averaged over the relevant study period: i.e. at rest and during exercise for comparisons between groups.

The incidence and type of response were analysed by χ^2 test or the Fisher's exact test. Analysis of variance (ANOVA) was used for the comparison of the breathing pattern (V_T , V_{Epeak}) and respiratory resistance (Rrs). Comparisons of CT values between rest and exercise were performed using nonparametric Wilcoxon signed-rank test. The limit of significance was $p < 0.05$. Data are expressed as mean \pm SD.

Results

An overall of 494 tracheal stimulations were performed (271 at rest; 223 at exercise) and analyzed in 18 rabbits (10 OVA and 8 controls).

OVA intradermal skin tests and BAL eosinophil count

OVA intradermal injection challenge was highly positive in OVA rabbits with a mean wheal area of $630 \text{ mm}^2 \pm 297 \text{ mm}^2$ and strictly negative in control rabbits (0 mm^2 , $p < 0.0001$). In addition, a significant increase of eosinophils ($p = 0.008$) occurred in BAL fluid in OVA rabbits compared to control ones (Table 1).

Table 1. Wheal surface of the intradermal skin tests, total BAL cell count and BAL eosinophil count of OVA and control rabbits, expressed as mean (Standard Deviation).

Condition	Wheal surface mm ² (SD)	Total BAL cell count (SD)/ml	BAL eosinophil count (SD) %
OVA (n = 10)	630 (297)	1.61 (57) x10 ⁶	26.3 (16)
Control (n = 8)	0 (0)	1.08 (43) x10 ⁶	2.5 (2.5)

BAL: Bronchoalveolar lavage

OVA: Ovalbumin-sensitized rabbits

doi:10.1371/journal.pone.0171862.t001

Breathing pattern and respiratory resistance at rest and during exercise (EMC)

Following rhythmic electrical stimulation of muscle contractions (i.e. exercise), the mean minute ventilation increased from rest, by 36% and 35% in OVA and control rabbits, respectively (Table 2). Concomitantly, the mean reduction in Rrs was 11% (OVA) and 13% (control) (Table 2; Fig 2). No significant statistical differences were found between groups.

Types of ventilatory responses to tracheal stimulation

Three types of response to tracheal stimulation were encountered: CR (Fig 3), ER and NR. Overall stimulations, as stimulations performed at rest and during exercise (EMC) in both (OVA and control) groups are presented in Table 3.

During exercise, in the OVA group, CT remained unchanged in 5 rabbits, decreased in 4 rabbits and increased in 1 rabbit, indicating no modification of the sensitivity of the cough reflex compared to baseline (no significant difference (NS)). For the control group, CT during exercise increased in 4 rabbits and remained unchanged in 4 rabbits, even so leading to a significant decreased sensitivity of the cough reflex compared to baseline ($p = 0.0313$, Table 4).

Discussion

To the best of our knowledge, our study is the first that focused on the influence of exercise on the cough reflex to tracheal mechanical stimulation in OVA-challenged rabbits. The study demonstrates that allergen-induced airway inflammation prevents the physiological exercise-induced decrease of the CR sensitivity, previously demonstrated [8].

Cough is a common symptom in a wide range of respiratory and non-respiratory diseases, but still remains a difficult clinical problem mostly because of the poor understanding of the underlying pathophysiological processes involved. Numerous animal models have been used

Table 2. Minute ventilation and respiratory resistance at baseline and during exercise for OVA and control rabbits.

	Baseline	Exercise (2&3min)	p
	Rrs (hPa s L ⁻¹)		
OVA (n = 10)	16.8 ± 1.9	14.9 ± 2.1	0.0003
Control (n = 8)	17.9 ± 1.4	15.5 ± 1.3	< 0.0001
	V _E (mL min ⁻¹)		
OVA (n = 10)	984 ± 232	1338 ± 229	< 0.0001
Control (n = 8)	794 ± 122	1075 ± 216	0.0008

OVA: Ovalbumin-sensitized rabbits

V_E: minute ventilation

Rrs: respiratory resistance

doi:10.1371/journal.pone.0171862.t002

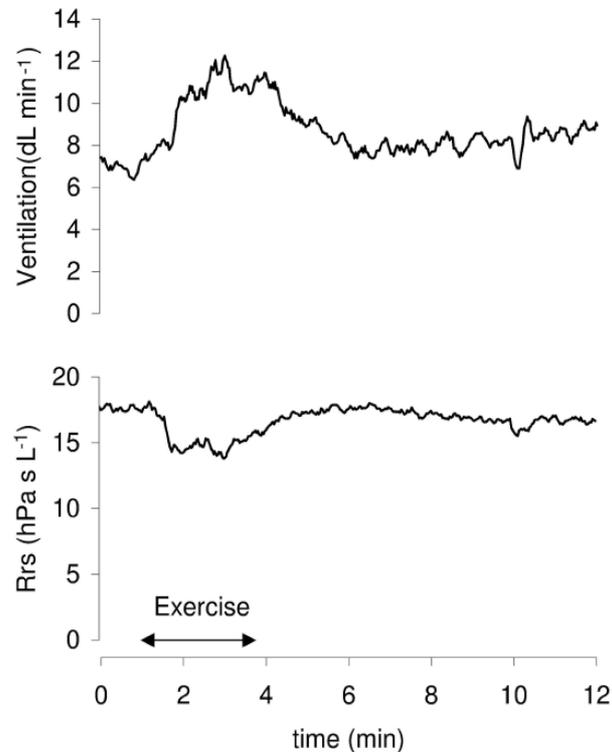


Fig 2. Sequence including rest, exercise and recovery. During electrically induced exercise (horizontal arrow), minute ventilation is increased and respiratory resistance (Rrs) is decreased, indicating concomitant bronchodilation.

doi:10.1371/journal.pone.0171862.g002

to explore the mechanisms of cough but often using irritant compounds (such as citric acid or capsaicin) and rarely dealing with physiological triggers such as exercise is [22–27]. The inflammatory responses shown by the rabbit model, especially in the case of asthma, are comparable with those that occur in humans [28–30]. Indeed, neonatally immunized rabbits exhibit many of the features of human asthma, including airway hyperresponsiveness (AHR) to inhaled antigen [28–30], acute and late-phase airways obstruction [31] and pulmonary eosinophil and lymphocyte recruitment [28, 32], as well as the production of immunoglobulin E (Ig E) antibodies [31]. Since the first rabbit immunisation protocol [33], various antigens (including OVA) have been proposed to allow valuable animal experiment [34]. The OVA model of airway inflammation is characterised by high levels of OVA-specific IgE and eosinophils, a T-cell predominant bronchial inflammatory response, and the development of AHR, which are similar to characteristics of asthma in humans [26]. The rabbit model is also of particular interest because it allows spontaneous breathing (instead of mechanical ventilation for smaller animal models) during anaesthesia, leading to, repeated physiological measurements [34], as well as it shows a similar response to the drugs commonly used in asthmatics [34]. All these similarities between the allergic rabbit model and human asthma provide relevance to this model, therefore allowing the assessment of the modulation of cough during exercise in the present study.

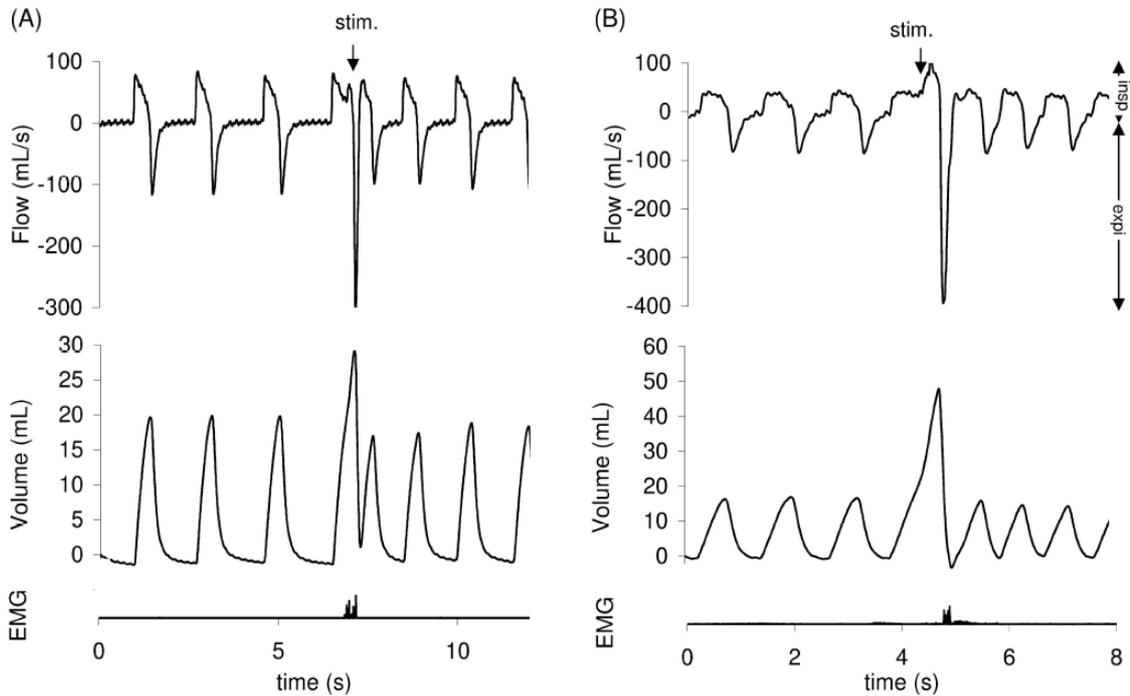


Fig 3. Cough reflex (CR) at rest (A) and during exercise (B). CR is characterized by an increase in both tidal volume (V_T) and peak expiratory flow (V_{Epeak}). Abdominal muscles electromyogram (EMG) also showed activity on the stimulation breath. The downward arrow indicates the tracheal stimulation. Positive and negative airflow rates indicate inspiration and expiration, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0171862.g003

Exercise represents a quantifiable and reproducible stressor that can be easily modified experimentally [35]. It is also able to trigger various and complex interacting mechanisms within the psycho-neuro-immune-endocrine pathways [36]. Exercise-induced bronchoconstriction (EIB) is common but key aspects of its pathogenesis are still lacking [37]. Regarding to the pathophysiological mechanisms involved, it is generally assumed that exercise-induced asthma/bronchoconstriction involves both osmolar (“airway drying”) and vascular (“thermal”) modifications of the airways, in addition to parasympathetic stimulation caused by the entrance of fresh air into the respiratory tract [38]. Both hypotheses are based on the marked hyper-ventilation during physical activity, leading to significant water and heat loss through respiration. Increased water loss is responsible for hyper-osmolality of the extracellular fluid

Table 3. Overall tracheal stimulations performed at rest and during exercise (electrically induced muscle contractions) for OVA and control rabbits (expressed as absolute value (percentage)).

	OVA (n = 10)	Control (n = 8)
Total number of stimulations	261 (53%)	233 (47%)
Stimulations at rest	141/261 (54%)	130/233 (56%)
Stimulations during exercise	120/261 (46%)	103/233 (44%)

OVA: Ovalbumin-sensitized rabbits

doi:10.1371/journal.pone.0171862.t003

Table 4. Cough threshold (CT) at rest and during exercise for OVA and control rabbits. Data expressed in ms (mean ± SD).

	OVA (n = 10)	Control (n = 8)	p
Rest-CT (ms)	230 ± 294	62 ± 35	NS (0.1304)
Exercise-CT (ms)	190 ± 184	125 ± 46	NS (0.3463)

OVA: Ovalbumin-sensitized rabbits

CT: Cough threshold

doi:10.1371/journal.pone.0171862.t004

lining the bronchial mucosa [39] further leading to the release of inflammatory mediators from mast cells, eosinophils, neutrophils, and other inflammatory cells, including newly formed eicosanoids [40, 41]. The epithelium may act as a key regulator of the balance of eicosanoids in the airways by both the induction of the release of constrictive eicosanoids and by the downregulation of the release of the relaxant PGE₂ [42]. Several airway TRP ion channels have been shown to sense and react to ambient air temperature opening new windows in the understanding of the pathogenesis in a diversity of airway reactions, particularly cough, appearing in many common respiratory diseases [43].

Only poor information is available regarding to the modulation of cough during human activities [5] but common low-level stimuli such as eating, drinking, talking, laughing, singing or exercising have been shown to cause cough, suggesting the emergence of a new concept (even if little explanation has so far been suggested) where cough is considered as a neuropathic disorder [44]. In the field of exercise (although available information is limited and often contradictory), present knowledge seems to indicate that the various adaptive responses brought into action by physical activity may modulate the CR [5], supporting that cough reflex exhibits plasticity at peripheral and central levels [45]. In healthy subjects, it has been shown that cough threshold to distilled water aerosol was increased during exercise and voluntary isocapnic hyperpnea [7]. Our results confirm a physiological decrease in sensitivity (i.e. increased in cough reflex threshold) of the CR during exercise (compared to sensitivity at rest) in anesthetized rabbits, as previously described [8]. Overall, it appears that cough is depressed (i.e. down-regulated) when ventilation increases, at least during isocapnic hyperpnea triggered by exercise.

Exercise-induced cough is frequent in asthmatic patients [9] or even in athletes developing airway inflammation [10], suggesting the potential of exercise to trigger cough. Our study shows an unchanged CR sensitivity during exercise in the OVA sensitized and challenged rabbits in contrast with the decrease of CR in the control animals. The impact of exercise in the modulation of cough is often discussed with respect to the state of contraction/relaxation of airway smooth muscle as a consequence of the numerous adaptive responses (involving neural and mechanical mechanisms) generated during physical activity and principally leading to exercise-induced bronchodilation [14,46,47]. As bronchoconstriction is able to modulate cough by enhancing the CR [48], one might expect that bronchodilation would decrease cough induced by mechanical stimulation of the airways [8]. Indeed, both groups (OVA and Control) showed a similar bronchodilation during exercise as suggested by the significant decrease of respiratory resistance (Table 2). There was also no difference either in the increase of V_E or the decrease of R_{rs} between OVA and control rabbits. With regard to this comparable state of hyperventilation and bronchodilation during exercise, the modulation of cough appeared however different between OVA (lack of desensitization) and controls (desensitization). Bronchodilation *per se* unlikely explains the differences in the effect of exercise on the CR. Some human studies have pointed out that bronchodilation may fail to affect CR sensitivity [49], as well as exercise without evidence of bronchodilation may increase cough threshold [7].

Our results highlight the contribution of allergen-induced experimental airway inflammation in the modulation of the CR during exercise. It has been shown that cough is associated with chronic eosinophilic disorders (such as asthma, cough-variant asthma or even eosinophilic bronchitis) [30, 31]. However, the relationship between cough receptor sensitivity and eosinophilic inflammation of the airway in patients with asthma or allergic rhinitis still remains unclear [50]. It is hypothesized that eosinophils in contact with sensory airway nerves [51] cause an eosinophil-dependent neuro-inflammation able to enhance cough [52]. Even the specific mechanisms by which this inflammation modulate the CR have not been established, it however seems that inflammatory mediators, indirectly released, sensitize airway neuronal responses to capsaicin involving the activation of the transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) [44, 53]. In a previous study in Brown-Norway rats [37], no control rats with or without exercise showed evidence of Exercise-Induced Bronchoconstriction (EIB) but 80% of the OVA-sensitized rats demonstrated abnormal breath sounds upon exposure to aerosolized OVA and 30% of OVA-sensitized rats exposed only to exercise had abnormal breath sounds. Lung tissue levels of TNF- α , IL-1 α , growth-related oncogene/keratinocyte/chemoattractant, and IFN- γ were significantly higher ($P < 0.001$) in the OVA-sensitized group. Most of these cytokines were not altered in the OVA-sensitized rats exposed only to exercise, suggesting a different mechanism of EIB [37].

If the evidence of an airway inflammation in OVA rabbits suggests a modulation of cough at a peripheral sensory nerves level, the contribution of a modulation at a central level should also be questioned. Indeed, the brainstem respiratory network should be considered as a key integrator regarding to the different afferent inputs upstream from triggering defensive airway reflexes. Moreover, coughing and breathing are initiated by neurons situated in very close (even overlapping) areas of the brainstem [54, 55]. Thus, facing a tracheal mechanical stimulation, the central respiratory integrator should trigger the most adapted motor response proper to the prevailing needs of both conditions (i.e exercise and rest) [8, 55]. The decrease of cough during exercise in control rabbits then suggests that the respiratory pattern generator favours an increase of respiratory activity and inhibits airway defensive reflexes, whereas in OVA rabbits the airway inflammation prevents the development of the exercise-driven inhibition of the defensive reflexes. This lack of desensitization of cough during exercise in OVA rabbits would make teleological sense because airways remodelling associated with airway inflammation may be considered as a weak point (facing the potential insult to the airways caused by hyperventilation during exercise [56]), allowing the preservation of defensive reflexes.

Conclusions

Our results confirm a decrease of cough during exercise in control rabbits and suggest for the first time the lack of desensitization in OVA-sensitized and challenged rabbits. This result contributes to explain the higher susceptibility to cough of asthmatics during exercise. Further studies are needed to explore the underlying inflammatory mechanisms contributing to the absence of the CR desensitization physiologically-associated to exercise.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge A-L. Leblanc for her helpful technical assistance.

Author Contributions

Conceptualization: AT BC MP.

Data curation: AT BC MP BD.

Formal analysis: AT BC MP.

Investigation: AT BC MP BD LF CC SDA.

Methodology: AT BC MP BD LF CC SDA.

Project administration: AT BC.

Resources: AT BC MP BD LF CC SDA.

Software: AT BC MP BD.

Supervision: AT BC MP.

Validation: AT BC MP BD.

Visualization: AT BC MP.

Writing – original draft: AT BC MP BD LF CC SDA.

Writing – review & editing: AT BC MP.

References

1. Widdicombe JG. Receptors in the trachea and bronchi of the cat. *The Journal of physiology*. 1954; 123:71–104. PMID: [13131247](#)
2. Widdicombe JG. Respiratory reflexes from the trachea and bronchi of the cat. *The Journal of physiology*. 1954; 123:55–70. PMID: [13131246](#)
3. Belvisi MG, Geppetti P. Cough. 7: Current and future drugs for the treatment of chronic cough. *Thorax*. 2004; 59:438–40. doi: [10.1136/thx.2003.013490](#) PMID: [15115877](#)
4. Mutolo D, Cinelli E, Iovino L, Pantaleo T, Bongianni F. Downregulation of the cough reflex by acilidinium and tiotropium in awake and anesthetized rabbits. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2016; 38:1–9.
5. Widdicombe J, Fontana G, Gibson P. Workshop—cough: exercise, speech and music. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2009; 22:143–7.
6. Turner DL. Cardiovascular and respiratory control mechanisms during exercise: an integrated view. *The Journal of experimental biology*. 1991; 160:309–40. PMID: [1960517](#)
7. Lavorini F, Fontana GA, Chellini E, Magni C, Duranti R, Widdicombe J. Desensitization of the cough reflex by exercise and voluntary isocapnic hyperpnea. *J Appl Physiol*. 2010; 108:1061–8. doi: [10.1152/jappphysiol.00423.2009](#) PMID: [20093671](#)
8. Poussel M, Bosser G, Varechova S, Demoulin B, Chalon B, Ruckebusch O, et al. Desensitization of the cough reflex during limb muscle contraction in anesthetized rabbits. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2014; 27:96–101.
9. Boulet LP, O'Byrne PM. Asthma and exercise-induced bronchoconstriction in athletes. *The New England journal of medicine*. 2015; 372:641–8. doi: [10.1056/NEJMra1407552](#) PMID: [25671256](#)
10. Kennedy MD, Davidson WJ, Wong LE, Traves SL, Leigh R, Eves ND. Airway inflammation, cough and athlete quality of life in elite female cross-country skiers: A longitudinal study. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2015.
11. Ali S, Metzger WJ, Mustafa SJ. Simultaneous measurement of cyclopentyladenosine-induced contraction and intracellular calcium in bronchial rings from allergic rabbits and its antagonism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1996; 278:639–44. PMID: [8768714](#)
12. Petak F, Hantos Z, Adamicza A, Galitsy H, Habre W. Development of bronchoconstriction after administration of muscle relaxants in rabbits with normal or hyperreactive airways. *Anesthesia and analgesia*. 2006; 103:103–9. doi: [10.1213/01.ane.0000221439.87488.08](#) PMID: [16790635](#)
13. Chambers MA, Williams A, Gavier-Widen D, Whelan A, Hall G, Marsh PD, et al. Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG auxotrophic mutant that protects guinea pigs against *M. bovis* and hematogenous spread of *Mycobacterium tuberculosis* without sensitization to tuberculin. *Infection and immunity*. 2000; 68:7094–9. PMID: [11083835](#)
14. Marchal F, Demoulin B, Schweitzer C, Leblanc AL, Bertin N. Airway response to induced muscular contraction in spontaneously breathing rabbits. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2008; 160:224–31.

15. Schweitzer C, Demoulin B, Varechova S, Poussel M, Marchal F. Neural control of airway to deep inhalation in rabbits. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2011; 177:169–75.
16. Cross BA, Davey A, Guz A, Katona PG, MacLean M, Murphy K, et al. The role of spinal cord transmission in the ventilatory response to electrically induced exercise in the anaesthetized dog. *The Journal of physiology*. 1982; 329:37–55. PMID: [6292406](#)
17. Haouzi P, Chenuel B. Control of arterial PCO₂ by somatic afferents in sheep. *The Journal of physiology*. 2005; 569:975–87. doi: [10.1113/jphysiol.2005.089649](#) PMID: [16223767](#)
18. Poussel M, Varechova S, Demoulin B, Chalon B, Schweitzer C, Marchal F, et al. Nasal stimulation by water down-regulates cough in anesthetized rabbits. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2012; 183:20–5.
19. Varechova S, Poussel M, Demoulin B, Chenuel B, Schweitzer C, Marchal F. Within breath ventilatory responses to mechanical tracheal stimulation in anaesthetised rabbits. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2010; 23:397–402.
20. Varechova S, Poussel M, Schweitzer C, Demoulin B, Chenuel B, Marchal F. Stimulus response latency of cough and expiration reflex depends on breathing in the rabbit. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2012; 25:242–7.
21. Varechova S, Demoulin B, Poussel M, Chenuel B, Marchal F. Cough threshold and reactivity to mechanical stimulation of the trachea in the rabbit preliminary observations. *Bratislavské lekárske listy*. 2011; 112:136–9. PMID: [21452765](#)
22. Jackson DM. The effect of nedocromil sodium, sodium cromoglycate and codeine phosphate on citric acid-induced cough in dogs. *British journal of pharmacology*. 1988; 93:609–12. PMID: [2836011](#)
23. Schelegle ES, Gershwin LJ, Miller LA, Fanucchi MV, Van Winkle LS, Gerriets JP, et al. Allergic asthma induced in rhesus monkeys by house dust mite (*Dermatophagoides farinae*). *The American journal of pathology*. 2001; 158:333–41. doi: [10.1016/S0002-9440\(10\)63973-9](#) PMID: [11141508](#)
24. Duz M, Whittaker AG, Love S, Parkin TD, Hughes KJ. Validation of a digital audio recording method for the objective assessment of cough in the horse. *Research in veterinary science*. 2010; 89:266–71. doi: [10.1016/j.rvsc.2010.03.005](#) PMID: [20363008](#)
25. Liu Q, Fujimura M, Tachibana H, Myou S, Kasahara K, Yasui M. Characterization of increased cough sensitivity after antigen challenge in guinea pigs. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2001; 31:474–84.
26. Kamaruzaman NA, Kardia E, Kamaldin N, Latahir AZ, Yahaya BH. The rabbit as a model for studying lung disease and stem cell therapy. *BioMed research international*. 2013; 2013:691830. doi: [10.1155/2013/691830](#) PMID: [23653896](#)
27. Clay E, Patacchini R, Trevisani M, Preti D, Brana MP, Spina D, et al. Ozone-Induced Hypertussive Responses in Rabbits and Guinea Pigs. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2016; 357:73–83. doi: [10.1124/jpet.115.230227](#) PMID: [26837703](#)
28. Herd CM, Donigi-Gale D, Shoupe TS, Burroughs DA, Yeadon M, Page CP. Effect of a 5-lipoxygenase inhibitor and leukotriene antagonist (PF 5901) on antigen-induced airway responses in neonatally immunized rabbits. *British journal of pharmacology*. 1994; 112:292–8. PMID: [8032653](#)
29. Herd CM, Gozzard N, Page CP. Capsaicin pre-treatment prevents the development of antigen-induced airway hyperresponsiveness in neonatally immunised rabbits. *European journal of pharmacology*. 1995; 282:111–9. PMID: [7498265](#)
30. Bloom JW, Baumgartener-Folkerts C, Palmer JD, Halonen M. Airway cholinergic responsiveness in rabbits in relation to antigen sensitization and challenge. *Immunopharmacology*. 1988; 15:157–67. PMID: [3292455](#)
31. Shampain MP, Behrens BL, Larsen GL, Henson PM. An animal model of late pulmonary responses to *Aspergillus* challenge. *The American review of respiratory disease*. 1982; 126:493–8. doi: [10.1164/arrd.1982.126.3.493](#) PMID: [6889825](#)
32. Marsh WR, Irvin CG, Murphy KR, Behrens BL, Larsen GL. Increases in airway reactivity to histamine and inflammatory cells in bronchoalveolar lavage after the late asthmatic response in an animal model. *The American review of respiratory disease*. 1985; 131:875–9. doi: [10.1164/arrd.1985.131.6.875](#) PMID: [4003939](#)
33. Pinckard RN, Halonen M, Palmer JD, Butler C, Shaw JO, Henson PM. Intravascular aggregation and pulmonary sequestration of platelets during IgE-induced systemic anaphylaxis in the rabbit: abrogation of lethal anaphylactic shock by platelet depletion. *J Immunol*. 1977; 119:2185–93. PMID: [915295](#)
34. Keir S, Page C. The rabbit as a model to study asthma and other lung diseases. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2008; 21:721–30.
35. Hoffman-Goetz L, Pedersen BK. Exercise and the immune system: a model of the stress response? *Immunology today*. 1994; 15:382–7. doi: [10.1016/0167-5699\(94\)90177-5](#) PMID: [7916952](#)

36. Verratti V. Neuroimmune biology of physical exercise. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. 2009; 23:203–6. PMID: [19628098](#)
37. Kodesh E, Zaldivar F, Schwindt C, Tran P, Yu A, Camilon M, et al. A rat model of exercise-induced asthma: a nonspecific response to a specific immunogen. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2011; 300:R917–24. doi: [10.1152/ajpregu.00270.2010](#) PMID: [21228339](#)
38. Del Giacco SR, Firinu D, Bjermer L, Carlsen KH. Exercise and asthma: an overview. *European clinical respiratory journal*. 2015; 2:27984. doi: [10.3402/ecrj.v2.27984](#) PMID: [26672959](#)
39. Anderson SD, Daviskas E. The mechanism of exercise-induced asthma is. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000; 106:453–9. doi: [10.1067/mai.2000.109822](#) PMID: [10984363](#)
40. Hallstrand TS, Henderson WR Jr. Role of leukotrienes in exercise-induced bronchoconstriction. *Current allergy and asthma reports*. 2009; 9:18–25. PMID: [19063820](#)
41. Hallstrand TS, Moody MW, Wurfel MM, Schwartz LB, Henderson WR Jr., Aitken ML. Inflammatory basis of exercise-induced bronchoconstriction. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005; 172:679–86. doi: [10.1164/rccm.200412-1667OC](#) PMID: [15947280](#)
42. Hallstrand TS. New insights into pathogenesis of exercise-induced bronchoconstriction. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2012; 12:42–8. doi: [10.1097/ACI.0b013e32834ecc67](#) PMID: [22157157](#)
43. Millqvist E. TRP channels and temperature in airway disease-clinical significance. *Temperature (Austin)*. 2015; 2:172–7.
44. Chung KF, McGarvey L, Mazzone SB. Chronic cough as a neuropathic disorder. *The Lancet Respiratory medicine*. 2013; 1:414–22. doi: [10.1016/S2213-2600\(13\)70043-2](#) PMID: [24429206](#)
45. Bonham AC, Sekizawa SI, Joad JP. Plasticity of central mechanisms for cough. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2004; 17:453–7; discussion 69–70.
46. Fontana GA, Pantaleo T, Lavorini F, Bongiani F, Mannelli M, Bridge PD, et al. Handgrip-induced airway dilation in asthmatic patients with bronchoconstriction induced by MCh inhalation. *J Appl Physiol*. 2002; 93:1723–30. doi: [10.1152/jappphysiol.00326.2002](#) PMID: [12381760](#)
47. Marchal F, Evrot E, Schweitzer C, Demoulin B, Poussel M, Varechova S. Bronchodilation induced by muscular contraction in spontaneously breathing rabbits: neural or mechanical? *Respiratory physiology & neurobiology*. 2012; 180:311–5.
48. Widdicombe J. Airway receptors. *Respiration physiology*. 2001; 125:3–15. PMID: [11240149](#)
49. Fujimura M, Sakamoto S, Kamio Y, Matsuda T. Effects of methacholine induced bronchoconstriction and procaterol induced bronchodilation on cough receptor sensitivity to inhaled capsaicin and tartaric acid. *Thorax*. 1992; 47:441–5. PMID: [1386691](#)
50. Brozmanova M, Calkovsky V, Plevkova J, Bartos V, Plank L, Tatar M. Early and late allergic phase related cough response in sensitized guinea pigs with experimental allergic rhinitis. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2006; 55:577–84.
51. Kingham PJ, McLean WG, Sawatzky DA, Walsh MT, Costello RW. Adhesion-dependent interactions between eosinophils and cholinergic nerves. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2002; 282:L1229–38. doi: [10.1152/ajplung.00278.2001](#) PMID: [12003778](#)
52. Gu Q, Wiggers ME, Gleich GJ, Lee LY. Sensitization of isolated rat vagal pulmonary sensory neurons by eosinophil-derived cationic proteins. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008; 294:L544–52. doi: [10.1152/ajplung.00271.2007](#) PMID: [18178677](#)
53. Sikand P, Premkumar LS. Potentiation of glutamatergic synaptic transmission by protein kinase C-mediated sensitization of TRPV1 at the first sensory synapse. *The Journal of physiology*. 2007; 581:631–47. doi: [10.1113/jphysiol.2006.118620](#) PMID: [17363391](#)
54. McGovern AE, Davis-Poynter N, Farrell MJ, Mazzone SB. Transneuronal tracing of airways-related sensory circuitry using herpes simplex virus 1, strain H129. *Neuroscience*. 2012; 207:148–66. doi: [10.1016/j.neuroscience.2012.01.029](#) PMID: [22306285](#)
55. Bolser DC, Poliacsek I, Jakus J, Fuller DD, Davenport PW. Neurogenesis of cough, other airway defensive behaviors and breathing: A holarchical system? *Respiratory physiology & neurobiology*. 2006; 152:255–65.
56. Larsson K, Tornling G, Gavhed D, Muller-Suur C, Palmberg L. Inhalation of cold air increases the number of inflammatory cells in the lungs in healthy subjects. *The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 1998; 12:825–30.

BIBLIOMETRIE (le 07.07.2021)

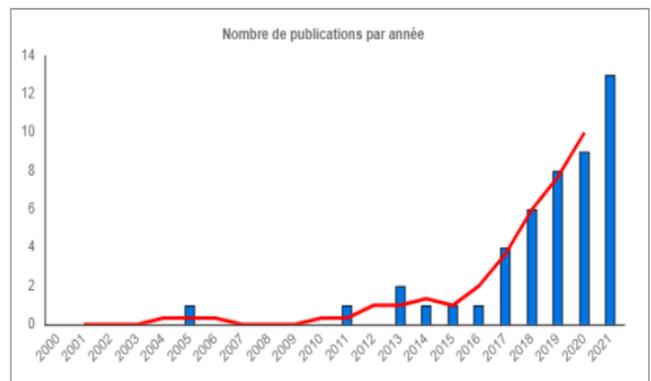
SIGAPS = 598
Citations = 295
Indice h = 8
Indice i = 8

Nombre de publications par type

Période : 2000 - 2021		
Type	Nb	%
Journal Article	31	65.96
Review	12	25.53
Letter	2	4.26
Other	1	2.13
Editorial	1	2.13
Total	47	100%

Nombre de publications par année

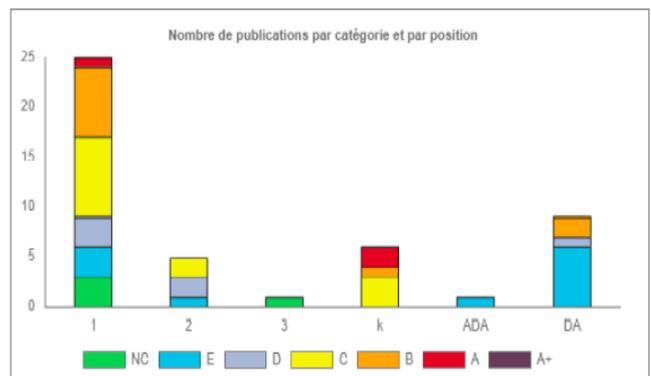
Période : 2000 - 2021	
Année	Nombre
2000	0
2001	0
2002	0
2003	0
2004	0
2005	1
2006	0
2007	0
2008	0
2009	0
2010	0
2011	1
2012	0
2013	2
2014	1
2015	1
2016	1
2017	4
2018	6
2019	8
2020	9
2021	13
Total	47



Nombre de publications par catégorie et par position

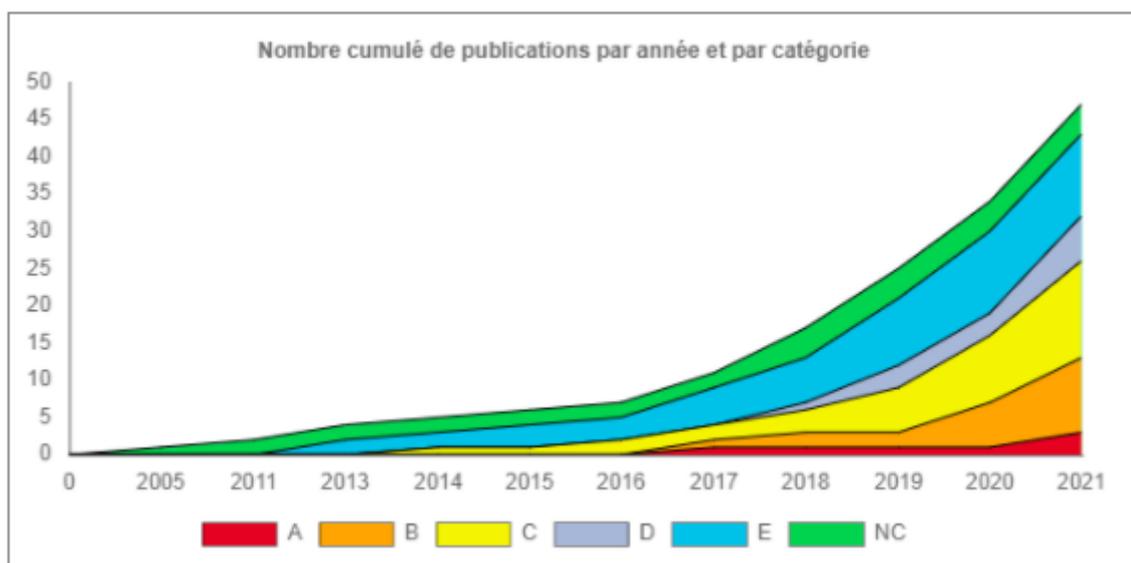
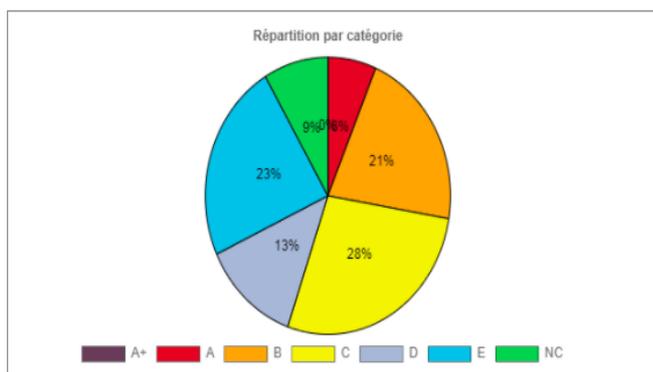
Période : 2000 - 2021								
Position	Total	A+	A	B	C	D	E	NC
1	25	0	1	7	8	3	3	3
2	5	0	0	0	2	2	1	0
3	1	0	0	0	0	0	0	1
k	6	0	2	1	3	0	0	0
ADA	1	0	0	0	0	0	1	0
DA	9	0	0	2	0	1	6	0
Total	47	0	3	10	13	6	11	4

k = toute position intermédiaire entre 3 et ADA
 ADA = Avant Dernier Auteur
 DA = Dernier Auteur
 Inv = Investigateur



Répartition par catégorie et par année

Période : 2000 - 2021									
Année	Total	A+	A	B	C	D	E	NC	Score
2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2001	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2002	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2003	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2004	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2005	1	0	0	0	0	0	0	1	4
2006	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2007	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2008	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2009	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2010	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2011	1	0	0	0	0	0	0	1	4
2012	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2013	2	0	0	0	0	0	2	0	14
2014	1	0	0	0	1	0	0	0	4
2015	1	0	0	0	0	0	1	0	8
2016	1	0	0	0	1	0	0	0	16
2017	4	0	1	1	0	0	2	0	46
2018	6	0	0	1	1	1	1	2	51
2019	8	0	0	0	3	2	3	0	96
2020	9	0	0	4	3	0	2	0	130
2021	13	0	2	4	4	3	0	0	225
Total	47	0	3	10	13	6	11	4	598



RÉFÉRENCES

1. GINA-2020-full-report_final_wms.pdf. [cited 2021 Mar 10]. Available from: https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2020/04/GINA-2020-full-report_final_wms.pdf
2. Wang E, Wechsler ME, Tran TN, Heaney LG, Jones RC, Menzies-Gow AN, et al. Characterization of Severe Asthma Worldwide: Data From the International Severe Asthma Registry. *Chest*. 2020;157:790–804.
3. Porsbjerg C, Menzies-Gow A. Co-morbidities in severe asthma: Clinical impact and management. *Respirology*. 2017;22:651–61.
4. GINA-SA-FINAL-wms.pdf. [cited 2021 Mar 11]. Available from: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2018/11/GINA-SA-FINAL-wms.pdf>
5. Humbert M, Beasley R, Ayres J, Slavin R, Hébert J, Bousquet J, et al. Benefits of omalizumab as add-on therapy in patients with severe persistent asthma who are inadequately controlled despite best available therapy (GINA 2002 step 4 treatment): INNOVATE. *Allergy*. 2005;60:309–16.
6. Humbert M, Taillé C, Mala L, Le Gros V, Just J, Molimard M, et al. Omalizumab effectiveness in patients with severe allergic asthma according to blood eosinophil count: the STELLAIR study. *Eur Respir J*. 2018;51:1702523. doi: 10.1183/13993003.02523-2017
7. xolair-epar-product-information_fr.pdf. [cited 2021 Mar 12]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xolair-epar-product-information_fr.pdf
8. Barlesi F, Mazieres J, Merlio J-P, Debieuvre D, Mosser J, Lena H, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet*. 2016 Apr 2;387:1415–26.
9. Varechova S, Poussel M, Demoulin B, Chenuel B, Schweitzer C, Marchal F. Within breath ventilatory responses to mechanical tracheal stimulation in anaesthetised rabbits. *Pulm Pharmacol Ther*. 2010;23:397–402.
10. Chung KF, Pavord ID. Prevalence, pathogenesis, and causes of chronic cough. *Lancet*. 2008;371:1364–74.
11. Widdicombe J, Fontana G. Cough: what's in a name? *Eur Respir J*. 2006;28:10–5.
12. Varechova S, Poussel M, Schweitzer C, Demoulin B, Chenuel B, Marchal F. Stimulus response latency of cough and expiration reflex depends on breathing in the rabbit. *Pulm Pharmacol Ther*. 2012;25:242–7.
13. Varechova S, Demoulin B, Leblanc AL, Coutier L, Ioan I, Bonabel C, et al. Neonatal hyperoxia up regulates cough reflex in young rabbits. *Respir Physiol Neurobiol*. 2015;208:51–6.
14. Poussel M, Bossier G, Varechova S, Demoulin B, Chalon B, Ruckebusch O, et al. Desensitization of the cough reflex during limb muscle contraction in anesthetized rabbits. *Pulm Pharmacol Ther*. 2014;27:96–101.
15. Arora S, Dev K, Agarwal B, Das P, Syed MA. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology*. 2018;223:383–96.

16. Mould KJ, Barthel L, Mohning MP, Thomas SM, McCubbrey AL, Danhorn T, et al. Cell Origin Dictates Programming of Resident versus Recruited Macrophages during Acute Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017;57:294–306.
17. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13. doi: 10.12703/P6-13.
18. Kim Y-K, Oh S-Y, Jeon SG, Park H-W, Lee S-Y, Chun E-Y, et al. Airway exposure levels of lipopolysaccharide determine type 1 versus type 2 experimental asthma. *J Immunol*. 2007;178:5375–82.
19. Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity*. 2014;40:274–88.
20. Becker M, De Bastiani MA, Parisi MM, Guma FT, Markoski MM, Castro MAA, et al. Integrated Transcriptomics Establish Macrophage Polarization Signatures and have Potential Applications for Clinical Health and Disease. *Sci Rep*. 2015;5:13351. doi: 10.1038/srep13351.
21. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Reyfman PA, Cuda CM, Walter JM, McQuattie-Pimentel AC, et al. Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *J Exp Med*. 2017;214:2387–404.
22. Kuo C-HS, Pavlidis S, Loza M, Baribaud F, Rowe A, Pandis I, et al. A Transcriptome-driven Analysis of Epithelial Brushings and Bronchial Biopsies to Define Asthma Phenotypes in U-BIOPRED. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195:443–55.
23. Méndez-Enríquez E, Hallgren J. Mast Cells and Their Progenitors in Allergic Asthma. *Front Immunol*. 2019;10:821. doi: 10.3389/fimmu.2019.00821
24. Dudeck A, Köberle M, Goldmann O, Meyer N, Dudeck J, Lemmens S, et al. Mast cells as protectors of health. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;144:S4–18.
25. Stassen M, Hartmann A-K, Delgado SJ, Dehmel S, Braun A. Mast cells within cellular networks. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;144:S46–54.
26. Maurer M, Köberle M, Metz M, Biedermann T. Mast cells: Promoters of health and modulators of disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;144:S1–3.
27. Espinosa E, Valitutti S. New roles and controls of mast cells. *Curr Opin Immunol*. 2018;50:39–47.
28. Huber M, Cato ACB, Ainooson GK, Freichel M, Tsvilovskyy V, Jessberger R, et al. Regulation of the pleiotropic effects of tissue-resident mast cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2019; 144:S31–S45. doi: 10.1016/j.jaci.2019.02.004.
29. Wang G, Baines KJ, Fu JJ, Wood LG, Simpson JL, McDonald VM, et al. Sputum mast cell subtypes relate to eosinophilia and corticosteroid response in asthma. *Eur Respir J*. 2016;47:1123–33.
30. Olivera A, Beaven MA, Metcalfe DD. Mast cells signal their importance in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142:381–93.
31. Draber P, Halova I, Polakovicova I, Kawakami T. Signal transduction and chemotaxis in mast cells. *Eur J Pharmacol*. 2016;778:11–23.

32. Virk H, Arthur G, Bradding P. Mast cells and their activation in lung disease. *Transl Res.* 2016;174:60–76.
33. Newman AM, Liu CL, Green MR, Gentles AJ, Feng W, Xu Y, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods.* 2015;12:453–7.
34. Jayapal M, Tay HK, Reghunathan R, Zhi L, Chow KK, Rauff M, et al. Genome-wide gene expression profiling of human mast cells stimulated by IgE or FcεRI aggregation reveals a complex network of genes involved in inflammatory responses. *BMC Genomics.* 2006;7:210. doi: 10.1186/1471-2164-7-210.
35. Nagarkar DR, Ramirez-Carrozzi V, Choy DF, Lee K, Soriano R, Jia G, et al. IL-13 mediates IL-33-dependent mast cell and type 2 innate lymphoid cell effects on bronchial epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136:202–5.
36. Suurmond J, Habets KLL, Tatum Z, Schonkeren JJ, Hoen PAC 't, Huizinga TWJ, et al. Repeated FcεRI triggering reveals modified mast cell function related to chronic allergic responses in tissue. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2016;138:869–80.
37. Okumura S, Kashiwakura J, Tomita H, Matsumoto K, Nakajima T, Saito H, et al. Identification of specific gene expression profiles in human mast cells mediated by Toll-like receptor 4 and FcεRI. *Blood.* 2003;102:2547–54.
38. Park J-E, Botting RA, Domínguez Conde C, Popescu D-M, Lavaert M, Kunz DJ, et al. A cell atlas of human thymic development defines T cell repertoire formation. *Science.* 2020 21;367. eaay3224. doi: 10.1126/science.aay3224.
39. Zhang H, Wang J, Wang L, Xie H, Chen L, He S. Role of IL-18 in atopic asthma is determined by balance of IL-18/IL-18BP/IL-18R. *J Cell Mol Med.* 2018;22:354–73.
40. Sanders NL, Mishra A. Role of interleukin-18 in the pathophysiology of allergic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;32:31–9.
41. Yasuda K, Nakanishi K, Tsutsui H. Interleukin-18 in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20: 649. doi: 10.3390/ijms20030649.
42. Saluja R, Ketelaar ME, Hawro T, Church MK, Maurer M, Nawijn MC. The role of the IL-33/IL-1RL1 axis in mast cell and basophil activation in allergic disorders. *Mol Immunol.* 2015;63:80–5.
43. Martin NT, Martin MU. Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat Immunol.* 2016;17:122–31.
44. Saluja R, Zoltowska A, Ketelaar ME, Nilsson G. IL-33 and Thymic Stromal Lymphopoietin in mast cell functions. *Eur J Pharmacol.* 2016;778:68–76.
45. Olivera A, Beaven MA, Metcalfe DD. Mast cells signal their importance in health and disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;142:381–93.
46. Espinosa E, Valitutti S. New roles and controls of mast cells. *Curr Opin Immunol.* 2018;50:39–47.
47. Joulia R, L'Faqihi F-E, Valitutti S, Espinosa E. IL-33 fine tunes mast cell degranulation and chemokine production at the single-cell level. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140:497-509.e10.

48. Liu T, Kanaoka Y, Barrett NA, Feng C, Garofalo D, Lai J, et al. Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease Involves a Cysteinyl Leukotriene-Driven IL-33-Mediated Mast Cell Activation Pathway. *J Immunol*. 2015;195:3537–45.
49. Ambient (outdoor) air pollution. [cited 2021 Apr 20]. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health)
50. Khan MS, Coulibaly S, Matsumoto T, Yano Y, Miura M, Nagasaka Y, et al. Association of airborne particles, protein, and endotoxin with emergency department visits for asthma in Kyoto, Japan. *Environ Health Prev Med*. 2018;23:41. doi: 10.1186/s12199-018-0731-2.
51. Mirowsky JE, Dailey LA, Devlin RB. Differential expression of pro-inflammatory and oxidative stress mediators induced by nitrogen dioxide and ozone in primary human bronchial epithelial cells. *Inhal Toxicol*. 2016;28:374–82.
52. Li Q, Yi Q, Tang L, Luo S, Tang Y, Zhang G, et al. Influence of Ultrafine Particles Exposure on Asthma Exacerbation in Children: A Meta-Analysis. *Curr Drug Targets*. 2019;20:412–20.
53. Mölter A, Agius RM, de Vocht F, Lindley S, Gerrard W, Lowe L, et al. Long-term exposure to PM10 and NO2 in association with lung volume and airway resistance in the MAAS birth cohort. *Environ Health Perspect*. 2013;121:1232–8.
54. Brunst KJ, Ryan PH, Brokamp C, Bernstein D, Reponen T, Lockey J, et al. Timing and Duration of Traffic-related Air Pollution Exposure and the Risk for Childhood Wheeze and Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192:421–7.
55. Rider CF, Yamamoto M, Günther OP, Hirota JA, Singh A, Tebbutt SJ, et al. Controlled diesel exhaust and allergen coexposure modulates microRNA and gene expression in humans: Effects on inflammatory lung markers. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138:1690–700.
56. Zhou Z, Liu Y, Duan F, Qin M, Wu F, Sheng W, et al. Transcriptomic Analyses of the Biological Effects of Airborne PM2.5 Exposure on Human Bronchial Epithelial Cells. *PLoS ONE*. 2015;10:e0138267.
57. O’Beirne SL, Shenoy SA, Salit J, Strulovici-Barel Y, Kaner RJ, Visvanathan S, et al. Ambient Pollution-related Reprogramming of the Human Small Airway Epithelial Transcriptome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;198:1413–22.
58. Li R, Meng Z, Xie J. Effects of sulfur dioxide derivatives on four asthma-related gene expressions in human bronchial epithelial cells. *Toxicol Lett*. 2007;175:71–81.
59. Fry RC, Rager JE, Bauer R, Sebastian E, Peden DB, Jaspers I, et al. Air toxics and epigenetic effects: ozone altered microRNAs in the sputum of human subjects. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;306:L1129-1137.
60. Bachert C, Vignola AM, Gevaert P, Leynaert B, Van Cauwenberge P, Bousquet J. Allergic rhinitis, rhinosinusitis, and asthma: one airway disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2004;24:19–43.
61. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008;63:8–160.
62. Howarth P, Chupp G, Nelsen LM, Bradford ES, Bratton DJ, Smith SG, et al. Severe eosinophilic asthma with nasal polyposis: A phenotype for improved sinonasal and asthma outcomes with mepolizumab therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145:1713–5.

63. Harrison TW, Chanez P, Menzella F, Canonica GW, Louis R, Cosio BG, et al. Onset of effect and impact on health-related quality of life, exacerbation rate, lung function, and nasal polyposis symptoms for patients with severe eosinophilic asthma treated with benralizumab (ANDHI): a randomised, controlled, phase 3b trial. *Lancet Respir Med*. 2021;9:260–74.
64. Tashiro H, Shore SA. Obesity and severe asthma. *Allergol Int*. 2019;68:135–42.
65. Dicipinigaitis PV, Morice AH, Birring SS, McGarvey L, Smith JA, Canning BJ, et al. Antitussive drugs--past, present, and future. *Pharmacol Rev*. 2014;66:468–512.
66. Birrell MA, Bonvini SJ, Dubuis E, Maher SA, Wortley MA, Grace MS, et al. Tiotropium modulates transient receptor potential V1 (TRPV1) in airway sensory nerves: A beneficial off-target effect? *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133:679-687.e9.
67. DeGeorge KC, Ring DJ, Dalrymple SN. Treatment of the Common Cold. *Am Fam Physician*. 2019;100:281–9.
68. Fukumitsu K, Kanemitsu Y, Asano T, Takeda N, Ichikawa H, Yap JMG, et al. Tiotropium Attenuates Refractory Cough and Capsaicin Cough Reflex Sensitivity in Patients with Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2018;6:1613-1620.e2.
69. Bordeleau M, Turmel J, Boulet L-P. Effects of ipratropium on exercise-induced cough in winter athletes: a hypothesis-generating study. *Phys Sportsmed*. 2014;42:7–13.
70. Hayes D, Collins PB, Khosravi M, Lin R-L, Lee L-Y. Bronchoconstriction triggered by breathing hot humid air in patients with asthma: role of cholinergic reflex. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185:1190–6.
71. Bolser DC, DeGennaro FC, O'Reilly S, Hey JA, Chapman RW. Pharmacological studies of allergic cough in the guinea pig. *Eur J Pharmacol*. 1995;277:159–64.
72. Sun W, Liu H-Y. Montelukast and Budesonide for Childhood Cough Variant Asthma. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2019;29:345–8.
73. Takemura M, Niimi A, Matsumoto H, Ueda T, Matsuoka H, Yamaguchi M, et al. Clinical, physiological and anti-inflammatory effect of montelukast in patients with cough variant asthma. *Respiration*. 2012;83:308–15.
74. Mincheva RK, Kralimarkova TZ, Rasheva M, Dimitrov Z, Nedeva D, Staevska M, et al. A real - life observational pilot study to evaluate the effects of two-week treatment with montelukast in patients with chronic cough. *Cough*. 2014;10:2. doi: 10.1186/1745-9974-10-2.
75. Lin J, Wang Z, Qiu C, Wang Z, Jiang S, Tang H, et al. A multicenter, prospective, observational study on montelukast monotherapy or montelukast-based combinations treating cough variant asthma. *J Thorac Dis*. 2020;12:6573–85.
76. Wang K, Birring SS, Taylor K, Fry NK, Hay AD, Moore M, et al. Montelukast for postinfectious cough in adults: a double-blind randomised placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med*. 2014;2:35–43.
77. Brozmanova M, Plevkova J, Tatar M, Kollarik M. Cough reflex sensitivity is increased in the guinea pig model of allergic rhinitis. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59:153–61.
78. Nishitsuji M, Fujimura M, Oribe Y, Nakao S. Effect of montelukast in a guinea pig model of cough variant asthma. *Pulm Pharmacol Ther*. 2008;21:142–5.

79. Chung KF. Precision medicine in asthma: linking phenotypes to targeted treatments. *Curr Opin Pulm Med.* 2018;24:4–10.
80. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Brightling CE, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178:218–24.
81. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181:315–23.
82. Lefaudeux D, De Meulder B, Loza MJ, Peffer N, Rowe A, Baribaud F, et al. U-BIOPRED clinical adult asthma clusters linked to a subset of sputum omics. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139:1797–807.
83. Park SY, Baek S, Kim S, Yoon S-Y, Kwon H-S, Chang Y-S, et al. Clinical significance of asthma clusters by longitudinal analysis in Korean asthma cohort. *PLoS One.* 2013;8:e83540.
84. Ray A, Kolls JK. Neutrophilic Inflammation in Asthma and Association with Disease Severity. *Trends Immunol.* 2017;38:942–54.
85. Winckelmans E, Nawrot TS, Tsamou M, Den Hond E, Baeyens W, Kleinjans J, et al. Transcriptome-wide analyses indicate mitochondrial responses to particulate air pollution exposure. *Environ Health.* 2017 18;16:87. doi: 10.1186/s12940-017-0292-7.

ANNEXE

- L'étude **IFCT-0501** comparait l'efficacité et la tolérance d'un doublet de chimiothérapie à dose réduite vs monothérapie chez les sujet âgés de plus de 75 ans ayant un cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC).
- **IFCT-0502** testait l'intérêt de la maintenance par Gemcitabine ou Erlotinib après 4 cycles de chimiothérapies par Cisplatine-Gemcitabine dans le CBNPC.
- **IFCT-0702** comparait l'efficacité de l'association sels de platine-Docetaxel vs Docetaxel en monothérapie dans le CBNPC en rechute post-chirurgie.
- **IFCT-0703** évaluait l'intérêt du Panzopanib comme traitement adjuvant vs placebo dans le CBNPC de stade I opéré.
- **IFCT-0802** évaluait l'intérêt du Bevacizumab en maintenance après 4-6 cures de chimiothérapie standard dans le CBNPC.
- L'étude **S124** (laboratoire Lilly) évaluait l'intérêt de la maintenance par Pemetrexed après 4 cures de chimiothérapie par Carboplatine-Pemetrexed dans les adénocarcinomes bronchiques métastatiques en cas de réponse tumorale.
- Le **protocole RADIANT** (laboratoire Roche) évaluait l'intérêt d'un traitement par un inhibiteur de tyrosine-kinase EGFR, Erlotinib, comme traitement adjuvant en post-chirurgie dans le CBNPC.
- Le **protocole MAPS** (laboratoire Lilly) étudiait l'intérêt du rajout du Benralizumab à l'association Cisplatine-Pemetrexed en première ligne thérapeutique dans le mésothéliome pleural malin.
- L'étude **BRAIN** (laboratoire Lilly) évaluait la tolérance du Bevacizumab ajouté à la chimiothérapie conventionnelle chez les patients ayant un CBNPC avec des métastases cérébrales non traitées.
- Le **protocole GENENTECH METMAB** (Laboratoire Roche) évaluait l'efficacité de l'association du MetMab (un anticorps anti-récepteur de MET)–Erlotinib vs Erlotinib seul en 2ème ligne thérapeutique dans le CBNPC.
- L'étude **CALLISTO** évaluait l'efficacité du Daratumumab administré en association à l'Atézolizumab par rapport à l'Atézolizumab seul chez des patients présentant un cancer bronchique non à petites cellules avancé ou métastatique déjà traité.
- L'étude **FLAURA** (laboratoire AstraZeneca) comparait l'efficacité de l'Osimertinib vs Gefitinib ou Erlotinib chez des patients ayant un CBNPC présentant des mutations EGFR de type délétion de l'exon 19 ou L858R.
- L'étude **GO29537** (laboratoire Roche) évaluait l'intérêt du rajout de l'Atézolizumab à la chimiothérapie par Carboplatin-nab-Paclitaxel dans le CBNPC de stade IV non-épidermoïde.
- L'étude **IFCT-1003 LADIE** évaluait l'intérêt du rajout d'un traitement anti-oestrogénique (Fulvestrant) au traitement par Gefitinib ou Erlotinib chez les femmes ménopausées ayant un CBNPC de stade IV.
- Le **PHRC STALKLUNG** évaluait l'intérêt de l'analyse des cellules tumorales circulantes en complément de la biopsie tissulaire dans le CBNPC avec des translocations ALK et comme facteur prédictif de réponse aux inhibiteurs de la tyrosine kinase ALK.
- Le **protocole RTEP5** évaluait l'efficacité et la tolérance d'un complément de dose de radiothérapie des lésions hypoxiques, identifiées par TEP/TDM au F-miso, chez des patients ayant un CBNPC candidats à une radio-chimiothérapie à visée curative.
- Le **PHRC NéoSAS** évaluait l'intérêt du dépistage et du traitement du syndrome d'apnées-hypopnées du sommeil chez les patients ayant un cancer bronchique.
- L'essai **ACSé Vemurafénib** évaluait l'efficacité et la tolérance du vemurafenib dans différents types de cancers ayant une mutation V600E du gène BRAF.