



HAL
open science

Les biomarqueurs dans l'asthme

Camille Taillé, Arnaud Bourdin, Gilles Garcia

► **To cite this version:**

Camille Taillé, Arnaud Bourdin, Gilles Garcia. Les biomarqueurs dans l'asthme. La Presse Médicale, 2016, 45 (11), pp.1019 - 1029. 10.1016/j.lpm.2016.04.021 . hal-01786236

HAL Id: hal-01786236

<https://hal.umontpellier.fr/hal-01786236>

Submitted on 9 Dec 2019

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.

Les biomarqueurs dans l'asthme

Camille Taillé¹, Arnaud Bourdin², Gilles Garcia³

1. Université Paris Diderot, hôpital Bichat, centre de compétence des maladies pulmonaires rares, département hospitalo-universitaire FIRE, service de pneumologie, Inserm UMR 1152, Paris, France
2. University of Montpellier, hôpital Arnaud-de-Villeneuve, département de pneumologie et addictologie, PhyMedExp, Inserm U1046, CNRS UMR 9214, Montpellier, France
3. Hôpital universitaire de Bicêtre (AP-HP), structure des explorations fonctionnelles respiratoires, clinique de l'asthme sévère, centre de référence de l'hypertension pulmonaire sévère, service de physiologie, Le Kremlin-Bicêtre, France

Correspondance :

Arnaud Bourdin, University of Montpellier, hôpital Arnaud-de-Villeneuve, département de pneumologie et addictologie, PhyMedExp, Inserm U1046, CNRS UMR 9214, Montpellier, France.
a-bourdin@chu-montpellier.fr

■ Résumé

Il est licite d'évaluer la pertinence de la recherche destinée à identifier des biomarqueurs et à les confronter à la routine clinique. Au-delà de l'effet de mode, le développement actuel de biomarqueurs dans toutes les pathologies est probablement lié aux progrès considérables des sciences cliniques et biologiques, les plateformes biologiques et les biobanques s'étant appuyées sur des capacités nouvelles à constituer des bases de données longitudinales robustes sous formes de registres ou de cohortes. Le plus délicat, si étrange que cela puisse paraître, reste de poser la bonne question, c'est-à-dire de correctement identifier pour quelle zone de la problématique clinique posée par la pathologie un biomarqueur pourrait être utile. Les spécificités de l'asthme, en tant que maladie chronique, semblent effectivement indiquer qu'il existe de réels besoins non couverts. La variabilité dans le temps, la chronicité, la faiblesse des arguments diagnostiques, et l'hétérogénéité de la présentation clinique impliquent effectivement de disposer d'aides supplémentaires diagnostiques et pronostiques, potentiellement pour l'aide à la prise en charge et l'ajustement thérapeutique, mais aussi pour l'identification phénotypique et/ou endotypique déjà utilisée dans les premières initiatives de médecine personnalisée. Dans l'asthme, le volume expiré maximal pendant une seconde (VEMS) est un biomarqueur disponible depuis longtemps, et on peut raisonnablement penser qu'il couvre déjà d'assez nombreux secteurs. Aussi, il semble opportun d'identifier les caractéristiques nécessaires pour qu'un biomarqueur puisse voir le jour dans l'asthme, ceux dont on dispose déjà, et identifier les méthodes potentielles pour en mettre de nouveaux en évidence. Pour cela, nous proposons une revue de la littérature récente sur le sujet.

■ Summary

Biomarkers in asthma

Identifying new biomarkers in asthma is attractive but requires assessing their relevance and their reliability to clinical practice. Beyond fashion, the improvement in identification of new candidate biomarkers benefited of scientific and biologic progresses, biobanks and platforms robustly backed on longitudinal cohorts and registries. Paradoxically, the main issue is now to stress up the good question, in other words to correctly characterize the unmet needs in asthma that might benefit of a biomarker. Chronicity, variability, weakness of diagnostic tools and the heterogeneity of the disease are features of asthma claiming for identifying new biomarkers. Unmet needs in asthma encompass areas such as diagnosis, prognosis, management and follow-up, therapeutic guidance and phenotypic/endotypic identification. FEV1 is an available biomarker largely tested in asthma worth in most of these areas. Albeit, mandatory features required for a new biomarker to emerge, pro/con debates on those already existing and currently used methods for identifying new ones are worth explorations. We reviewed and summarized the current literature focusing biomarkers in asthma.

Introduction

Il est licite d'évaluer la pertinence de la recherche destinée à identifier des biomarqueurs et à les confronter à la routine clinique. Au-delà de l'effet de mode, le développement actuel de biomarqueurs dans toutes les pathologies est probablement lié aux progrès considérables des sciences cliniques et biologiques, les plateformes biologiques et les biobanques s'étant appuyées sur des capacités nouvelles à constituer des bases de données longitudinales robustes sous formes de registres ou de cohortes. La définition d'un biomarqueur est très large, il s'agit d'une caractéristique biologique mesurable liée à un processus normal ou non [1]. Mais le plus délicat, si étrange que cela puisse paraître, reste de poser la bonne question, c'est-à-dire de correctement identifier pour quelle zone de la problématique clinique posée par la pathologie un biomarqueur pourrait être utile.

Les spécificités de l'asthme, en tant que maladie chronique, semblent effectivement indiquer qu'il existe de réels besoins non couverts. La variabilité dans le temps, la chronicité, la faiblesse des arguments diagnostiques, et l'hétérogénéité de la présentation clinique impliquent effectivement de disposer d'aides supplémentaires diagnostiques et pronostiques, potentiellement pour l'aide à la prise en charge et l'ajustement thérapeutique, mais aussi pour l'identification phénotypique et/ou endotypique déjà utilisée dans les premières initiatives de médecine personnalisée.

Endotype : il est émis l'hypothèse que l'asthme puisse correspondre à différentes entités distinctes par leurs mécanismes physiopathologiques sous-jacent. Un endotype serait une sous-entité ou une forme d'asthme liée à un mécanisme

physiopathologique particulier, sans que cela soit nécessairement perceptible cliniquement (la distinction clinique correspondant au phénotype) [2].

Dans l'asthme, le volume expiré maximal pendant une seconde (VEMS) est un marqueur fonctionnel respiratoire disponible depuis longtemps, et on peut raisonnablement penser qu'il couvre déjà d'assez nombreux secteurs.

Aussi, il semble opportun d'identifier les caractéristiques nécessaires pour qu'un biomarqueur puisse voir le jour dans l'asthme, ceux dont on dispose déjà, et identifier les méthodes potentielles pour en mettre de nouveaux en évidence.

Pour cela, nous proposons une revue de la littérature récente sur le sujet.

Quels sont les biomarqueurs dont on a besoin ?

D'après la Food and Drug Administration, le biomarqueur idéal devrait avoir les caractéristiques proposées dans l'*encadré 1* (FDA. Characteristics of "an ideal" biomarker. Available from: <http://www.fda.gov/> [Internet]).

Pour l'heure, aucun de ceux dont on dispose ne peut vraiment atteindre tous ces objectifs. Mais de quoi avons-nous réellement besoin dans l'asthme ?

Pour analyser les besoins non couverts où l'apport d'un biomarqueur serait indéniable, il faut se reposer la question de l'histoire naturelle de la maladie, et des zones actuellement prises en charge de manière déjà optimale.

L'histoire naturelle de l'asthme est de mieux en mieux décrite et rappelée dans de nombreuses revues détaillées. On distingue classiquement les critères reliés aux interrogations du patient et

Caractéristiques du biomarqueur idéal

- Haut ratio bronche/sérum
- Spécifiquement bronchique (même pathologie)
- Différencie les situations
 - Aiguë vs chronique
 - Différencie inflammation, remodelage, HRB
- Sensible
 - Niveau de base = 0
 - Marqueur précoce et réversible
 - Libération instantanée en cas d'atteinte aiguë
- Prédicatif
 - Longue demi-vie sérique : donne indications de réversibilité
 - Libération proportionnelle à l'atteinte
- Robuste
 - Rapide, simple, précis, peu cher, reproductible
- Substrat physiopathologique pré-clinique
- Non invasif
- Accessible

aux critères analysés médicalement. À travers des suivis de cohortes et des registres, il a été identifié que les risques futurs les plus importants à prendre en compte sont essentiellement liés au risque de déclin accéléré de la fonction respiratoire, au risque d'asthme aigu grave voire fatal, et au risque d'effets secondaires inacceptables du traitement, ce qui va souvent de pair avec, in fine, le risque d'exacerbation (Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA). Date last updated: April 2015. Available from: <http://www.ginasthma.org> [Internet]).

Classiquement, la faible adhésion à la prise en charge thérapeutique est décrite comme une caractéristique de l'asthme. Les moteurs en sont multiples ; la faible robustesse des éléments diagnostiques en est probablement le premier.

Un biomarqueur pour le diagnostic d'asthme

Établir un diagnostic d'asthme solide et convainquant pour le patient et le médecin reste ainsi un vrai sujet de recherche et les initiatives nombreuses, notamment pour s'affranchir soit du test d'hyperréactivité bronchique dont on connaît les limites, soit de la nécessité de suivre l'évolution sous traitement. Dans les recommandations internationales, l'algorithme diagnostique conduisant au traitement de l'asthme repose sur des critères essentiellement cliniques et prospectifs. Les critères spirométriques à rechercher sont difficiles à généraliser en pratique quotidienne : variabilité de la fonction respiratoire, hyperréactivité bronchique, réversibilité sous bronchodilatateurs. Mais, l'absence de critère spirométrique évocateur d'asthme mène malgré tout à un « traitement d'épreuve » selon ces recommandations, et c'est probablement là la

principale faiblesse de cette prise en charge et qui justifie le plus d'identifier un biomarqueur. L'étape visant à réviser le diagnostic ne vient qu'en second plan, lorsque le contrôle est impossible à atteindre malgré le traitement s'il est correctement observé. Les investigations proposées alors sont multiples et visent plutôt à affirmer un autre diagnostic qu'à invalider celui d'asthme [3].

Ainsi, malgré l'hétérogénéité phénotypique et endotypique de la maladie, il paraît utile d'identifier un marqueur sérique ou exhalé discriminant. En 2007, la mesure de l'épaisseur de la membrane basale sur une biopsie bronchique de routine permettait de distinguer asthme sévère et BPCO avec une spécificité de l'ordre de 68 % (et de distinguer l'asthme léger ou sévère des témoins avec une spécificité de 100 %) [4], mais bien sûr cet examen est difficilement généralisable et ne répond donc pas vraiment au besoin clinique. Plus récemment, l'équipe de Peter Gibson a proposé des résultats intéressants à partir d'une simple prise de sang. En utilisant une technique de protéomique (ici du MALDI-TOF) [5] permettant une analyse exhaustive ou presque du contenu protéique plasmatique de patients souffrant d'asthme, de BPCO, de formes frontières et de témoin, cette équipe a identifié une combinaison de biomarqueurs utilisable pour distinguer ces pathologies avec d'assez bonnes performances (en l'occurrence, l'haptoglobine, l' α 2-macroglobuline et l'hémopexine). Il s'agit encore d'initiatives complexes essentiellement de recherche car le coût reste élevé à ce jour mais des kits rapides industrialisés pourraient être développés sur cette base.

Plus simplement, la mesure du monoxyde d'azote dans les gaz expirés (ou FENO pour fraction expirée du NO) chez une personne présentant des symptômes compatibles et non traité ET non tabagique peut avoir des performances diagnostiques intéressantes également [6].

À Amsterdam, Peter Sterk et son équipe développent un « nez électronique », permettant une analyse métabolomique de l'air exhalé. Les résultats obtenus sont assez prometteurs également avec une spécificité de l'ordre 90 % pour affirmer le diagnostic d'asthme dans une population de patients souffrant de trouble ventilatoire obstructif persistant [7].

Les performances de l'imagerie et la généralisation en particulier des scanners offrent des perspectives attrayantes dans ce domaine, ce d'autant que les protocoles d'acquisition en doses ultra-faibles de rayons X (et donc imposant une irradiation inférieure à une radiographie thoracique de face et de profil) seront bientôt à la disposition de tous. Ceci a d'autant plus d'intérêt qu'une imagerie thoracique sensiblement normale continue à être exigée pour le diagnostic d'asthme [3]. Aussi, si cet examen est déjà très largement répandu pour l'orientation diagnostique différentielle et pour éventuellement documenter les épisodes aigus, des développements sont en cours pour en établir la valeur pour le diagnostic positif.

Un biomarqueur pour prédire le risque de développer de l'asthme

En pédiatrie, les objectifs de la prise en charge sont assez différents. Le positionnement global vise surtout à identifier les enfants à risque de développer de l'asthme, en fonction de l'histoire familiale, environnementale, et des symptômes identifiables. Un score prédictif tenant compte de ces points a été développé et adapté [8]. En utilisant des techniques sophistiquées pléthysmographiques chez des enfants âgés de 1 mois seulement, Bisgaard et son équipe ont pu montrer qu'ils étaient capables de prédire le risque de présenter de l'asthme à l'âge de 7 ans [9]. Dans leurs commentaires, ils suggèrent donc que le pré-requis est présent dès le plus jeune âge, avant même que le système immunitaire ne soit mature, et qu'un biomarqueur doit donc être possible à identifier. Le taux plasmatique de la chimiokine TARC permet effectivement de prédire cette évolution vers la maladie, chez les enfants atopiques [10].

Il est probable que de telles initiatives soient effectivement généralisées une fois validées de manière robuste, car les conséquences peuvent être fondamentales non seulement pour mettre en place des stratégies préventives précoces, mais également pour identifier la capacité d'interventions (quelles qu'elles soient) à interférer avec l'histoire naturelle de la maladie, sorte de Graal dans le domaine.

Un biomarqueur pour aider à évaluer le contrôle des symptômes et prédire les exacerbations et le risque futur de l'asthme

L'originalité de l'asthme, parmi les maladies chroniques, repose essentiellement sur ses deux caractéristiques principales, la variabilité et la réversibilité. Une sorte « d'hémoglobine glyquée de l'asthme » serait ainsi idéale pour résumer en un point et un seul avec une forte valeur prédictive l'activité et le contrôle de la maladie.

La prise en charge de l'asthme vise à atteindre et maintenir le contrôle, c'est-à-dire l'absence ou presque de symptômes, sorte de quasi-guérison sous traitement par exemple pour le contrôle total [3]. Dans ce contexte, le contrôle total maintenu sur une longue période devrait bénéficier d'une désescalade thérapeutique, rarement appliquée en pratique [11]. L'adjonction d'un biomarqueur prédictif du risque de perte de contrôle serait donc le bienvenu. Mais depuis quelques années, l'accent a été mis sur la nécessité de prendre en compte également le risque futur, détaillé en trois points : le risque d'exacerbation (risque d'absentéisme, risque d'hospitalisation voire de décès, risque des doses cumulées de traitement et en particulier des corticoïdes systémiques), le risque de développer un trouble ventilatoire obstructif chronique (et donc un handicap respiratoire) et le risque d'effets secondaires des thérapeutiques (et en particulier des corticoïdes systémiques). En ce sens, la prise en charge clinique vise à apprécier le contrôle rétrospectivement sur la période courte précédent la consultation et à prédire le

risque futur. Aussi, ces éléments restent délicats à apprécier, et l'apport de biomarqueurs semble indispensable pour guider la thérapeutique. L'hyperréactivité bronchique [12], le taux d'éosinophiles dans l'expectoration induite [13] ou la FENO [14] ont été testés dans ce sens avec des succès divers. Si le FENO semble peu valide en pratique lorsqu'on compare la prise en charge fondée sur le biomarqueur à la prise en charge fondée sur la clinique, ses fluctuations dans le temps pourraient offrir un avantage, mais il manque la disponibilité immédiate et impose donc un suivi prolongé [15].

Un biomarqueur pour évaluer l'observance et l'environnement domestique ou professionnel

La question de l'adhésion à la prise en charge reste extraordinairement peu accessible en routine clinique. Il est impossible, à moins d'une inobservance clairement déclarée, pour un professionnel, d'avoir une authentique certitude dans ce cadre, ce d'autant que l'inobservance est souvent involontaire (c'est-à-dire liée à un maniement inefficace du dispositif d'inhalation) [16]. Cela reste fondamental car l'escalade thérapeutique ne se justifie évidemment pas alors. Certaines expériences avec des dosages sériques montrent que la FENO pourrait jouer un rôle dans ce cadre dans des situations très particulières [17].

L'adaptation de l'environnement est une étape fondamentale dans la prise en charge de l'asthme en particulier lorsqu'il est difficile à contrôler. Mais les outils dont on dispose aujourd'hui pour évaluer le poids de l'environnement dans la maladie restent modestes et d'interprétation délicate. Des conseillers en environnement intérieur effectuent des diagnostics environnementaux et apportent une importante charge éducative au domicile. Le diagnostic environnemental reste essentiellement observationnel et établir une relation causale dans le contexte encore très difficile. Potentiellement, des biomarqueurs témoignant de l'impact environnemental spécifique des patients pourraient être développés.

Dans le contexte professionnel, des initiatives sont actuellement proposées avec par exemple la documentation d'une augmentation de l'éosinophilie dans l'expectoration induite ou du FENO lors de l'exposition professionnelle et une diminution lors de l'éviction [18].

Un biomarqueur pour l'identification phénotypique et guider la thérapeutique

Lorsque l'asthme est difficile à contrôler malgré un diagnostic solidement établi, une adhésion à la prise en charge parfaite incluant l'utilisation de corticoïdes inhalés associés à des bronchodilatateurs de longue durée d'action, on propose de parler d'asthme sévère après 6 à 12 mois de suivi [3]. Ainsi, on tient compte d'une hétérogénéité des mécanismes physiopathologiques en cause pour guider la thérapeutique, et les recommandations suggèrent plutôt de multiplier les voies thérapeutiques plutôt que d'insister sur une seule. On propose même de tenter d'identifier à l'échelle individuelle si un

biomarqueur permettra de proposer une thérapeutique la plus spécifique et donc personnalisée possible. La mesure de la FENO est un outil intéressant pour prédire la réponse thérapeutique aux corticostéroïdes inhalés chez les patients atopiques non fumeurs [14]. L'omalizumab impose déjà ce type de démarche par le dosage des IgE totales et la réalisation de tests cutanés positifs [19]. Les anticorps monoclonaux dirigés contre l'interleukine-5 semblent efficaces spécifiquement chez les patients hyperéosinophiliques [20]. Le dosage de la périostine sérique permet de prédire l'efficacité d'un traitement par un anticorps monoclonal dirigé contre l'IL-13. D'autres biomarqueurs verront peut-être le jour dans ce cadre pour identifier les mécanismes en cause dans la sévérité de la maladie et contourner ces particularités à l'aide de molécules spécifiquement dédiées, même si ce type de prise en charge imposera une analyse pharmaco-économique certainement complexe.

Au total

La prise en charge de l'asthme a considérablement évolué ces dernières années, et plutôt vers la simplification et le pragmatisme. Pourtant, les constats de vraie vie identifient deux points-clés. En premier, le contrôle n'est atteint que pour un patient sur deux [21], et sans réel progrès sur les quinze dernières années. Ensuite, l'efficacité des traitements de référence que sont les associations fixes permettent de maintenir un contrôle acceptable pour environ 60 à 80 % des patients [22], ce qui laisse une marge de progrès considérable où le développement de biomarqueurs semble une réelle nécessité.

Quels sont les biomarqueurs dont nous disposons actuellement ?

Plusieurs biomarqueurs de l'inflammation bronchique sont des outils potentiels qui pourraient aider au diagnostic d'asthme mais également à assurer un suivi plus précis des patients et de leurs traitements. Ces différents biomarqueurs n'ont d'intérêt que s'ils sont simples à obtenir, à interpréter, et bien sûr non invasifs (mesure des composants de l'air expiré, prélèvements sanguins ou urinaires). Les biopsies bronchiques ont longtemps été considérées comme le « gold standard » de l'évaluation de l'inflammation bronchique mais le caractère invasif, coûteux et complexe de cette technique ne permet pas de retenir les paramètres obtenus par l'étude de ces prélèvements comme des biomarqueurs d'avenir.

Les biomarqueurs issus des voies aériennes

La mesure du NO expiré

Le monoxyde d'azote ou NO est produit par les cellules épithéliales bronchiques et les cellules endothéliales des vaisseaux pulmonaires. La mesure de la fraction expirée de NO peut être réalisée simplement par chimioluminescence ou par une méthode électrochimique. C'est une technique non invasive et rapide. Sa réalisation est maintenant bien standardisée [23]. La fraction expirée de NO varie avec le débit expiratoire. La mesure

doit être réalisée avec un débit expiratoire de 50 mL/s (FE_{NO50} pour fraction expirée du NO à 50 mL/s). Les valeurs normales chez le sujet sain se situent entre 10 et 20 ppb.

La FE_{NO50} est significativement plus élevée chez les sujets asthmatiques que chez les sujets sains, mais cette mesure est modifiée par l'âge, le poids, le genre, la consommation tabagique ou le caractère atopique ou non du patient [14]. La mesure du NO expiré serait plus sensible, pour le diagnostic d'asthme, que les épreuves fonctionnelles respiratoires et posséderait la même spécificité que la mesure de l'hyperréactivité bronchique non spécifique à la métacholine (le test de provocation à la métacholine a une spécificité faible qui varie en fonction du statut atopique ou non du patient) [24]. Cet intérêt diagnostique, limité aux patients atopiques non fumeurs, n'est pas définitivement validé.

La FE_{NO50} corrèle faiblement avec l'inflammation bronchique à éosinophiles [6,25]. Toutefois une FE_{NO50} supérieure à 50 ppb est significativement associée à une inflammation bronchique à éosinophiles ainsi qu'à une probabilité plus élevée d'obtenir une amélioration clinique des symptômes d'asthme grâce à une corticothérapie inhalée quotidienne (CSI) [26]. L'intérêt de mesurer régulièrement la FE_{NO50} afin d'adapter la dose quotidienne de CSI n'est pas clairement démontré. Les études sont contradictoires notamment en raison de l'hétérogénéité des critères d'inclusion et des objectifs primaires étudiés, et ce malgré l'importance du nombre de sujets inclus [27-29]. L'utilisation de la mesure de la FE_{NO50} pour adapter la dose quotidienne de CSI n'est pas recommandée à l'heure actuelle mais il faut noter qu'aucune autre méthode d'explorations fonctionnelles respiratoires n'a prouvé son utilité dans cette indication précise. En pratique, il s'agit d'une mesure simple non invasive qui apporte des arguments supplémentaires à la décision médicale mais qui n'a pour l'instant pas été retenue dans les recommandations internationales comme un outil diagnostique ou de suivi. Son intérêt est également lié au caractère atopique du patient puisque la FENO est souvent normale chez les sujets non atopiques mais également chez les sujets fumeurs.

Le condensat de l'air expiré

Cette méthode consiste à recueillir le liquide qui se dépose à la surface des voies aériennes. Ces gouttelettes sont vaporisées dans le flux aérien et recueillies par condensation lorsque les gaz expirés sont en contact avec du froid. La technique est simple et non invasive puisque le sujet respire normalement pendant environ 10 minutes. Un grand nombre de biomarqueurs ont été évalués comme la mesure du pH, du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), des leucotriènes, des isoprostanes et de nombreuses cytokines. Cependant le recueil du condensat ainsi que les techniques de mesure des différents biomarqueurs ne sont pas clairement standardisées et limitent ainsi l'utilisation de cette technique en pratique clinique quotidienne [30]. Cette

technique a fait l'objet d'un très grand nombre de publications mais actuellement aucune recommandation nationale ou internationale sur l'asthme ne la retient comme un élément diagnostique ou de suivi.

L'expectoration induite

La production d'une expectoration induite est bien tolérée et bien standardisée [31]. Elle est induite par l'inhalation d'aérosols de sérum salé hypertonique de concentration croissante. La mesure du pourcentage de polynucléaires éosinophiles (PNE) dans l'expectoration induite (EI) est le marqueur clé de cette technique. Chez le sujet sain le pourcentage de PNE est toujours inférieur à 2,2 %. La valeur seuil pour définir un phénotype éosinophilique est donc un pourcentage de PNE > 2 % dans l'EI [30]. Cette valeur seuil est variable selon les études (2 ou 3 %). Le résultat de l'EI possède une valeur diagnostique, puisqu'en l'absence de traitement de fond quotidien par CSI, un pourcentage de PNE > 3 % aurait une sensibilité de 86 % et une spécificité de 88 % pour le diagnostic d'asthme [24]. Mais l'EI n'est pas actuellement retenue dans l'arbre diagnostique actuellement proposé par le GINA 2014. L'augmentation du pourcentage de PNE n'est pas lié à la sévérité de l'asthme mais permettrait de mieux caractériser les différents phénotypes d'asthme sévère et notamment le phénotype éosinophilique [3,32,33]. L'expectoration induite permet également de définir plusieurs phénotypes inflammatoires (éosinophilique, neutrophilique, paucigranulocytique et mixte). Le phénotype éosinophilique (environ 50 % des patients asthmatiques) et le phénotype paucigranulocytique sont les plus fréquemment retrouvés (40 % des patients) tandis que le phénotype neutrophilique ne représente que 18 % des patients [34]. La corrélation entre l'éosinophilie sanguine et celle de l'expectoration induite est statistiquement significative mais difficile à utiliser en clinique. Par contre la coexistence d'une éosinophilie sanguine ($> 0,4 \times 10^9/L$) et d'une éosinophilie > 3 % dans l'expectoration est statistiquement associée à un mauvais contrôle des symptômes d'asthme [35]. Par contre, un pourcentage élevé de PNE dans l'EI est associé au mauvais contrôle des symptômes et à un risque plus élevé d'exacerbation. Il semble qu'il s'agisse d'un critère de suivi performant permettant de limiter significativement la survenue d'exacerbations à éosinophiles mais des études complémentaires sont encore nécessaires [13].

Les biomarqueurs sanguins

Le taux d'IgE totales

Le taux sanguin des IgE totales est un marqueur biologique d'asthme [36]. Mais le taux d'IgE totales ne permet pas différencier un patient allergique d'un patient non allergique [37]. Ce n'est donc pas un biomarqueur d'allergie. Par contre la présence d'IgE spécifiques associées à l'existence de signes cliniques d'allergie confirme le diagnostic d'allergie.

Le taux d'IgE totales varie chez un même patient sur plusieurs dosages successifs mais également d'un patient à l'autre en

fonction de l'âge, de la sévérité de la maladie, des traitements et également en fonction du contrôle des symptômes d'asthme. L'omalizumab, un anticorps monoclonal, qui cible directement les IgE circulantes a permis de réduire significativement la fréquence des exacerbations d'asthme et d'améliorer le contrôle des symptômes et la qualité de vie des patients asthmatiques sévères. Ce traitement est actuellement la seule biothérapie à disposer d'une AMM dans la prise en charge de l'asthme sévère en France [38,39]. Mais le taux d'IgE totales initial avant l'instauration du traitement par omalizumab ne permet pas de prédire la réponse clinique à ce traitement [40]. Toutefois une réponse clinique significative est plus fréquemment observée lorsque le taux d'IgE totales est supérieur à 75 kUI/L [40]. Une étude rétrospective suggère également que la réponse clinique à l'omalizumab est plus fréquente si la FENO est > 19 ppb et si l'éosinophilie sanguine est supérieure à $0,26 \times 10^9/L$ [41].

L'éosinophilie sanguine

Le taux de polynucléaires éosinophiles circulants est augmenté chez les patients asthmatiques en rapport avec le mauvais contrôle des symptômes et cette augmentation est reliée à un grand nombre de paramètres inflammatoires ou immunologiques (taux sanguins ou infiltration tissulaire de cytokines ou de chimiokines). L'interleukine-5 joue un rôle essentiel dans la différenciation, la prolifération, l'activation et l'augmentation de la survie tissulaire des PNE [42]. Le taux des PNE circulants change en réponse aux traitements qui modifient l'expression de ces paramètres inflammatoires ou immunologiques, notamment lors d'un traitement par CSI. On retrouve une corrélation négative entre les paramètres de fonction respiratoire et le taux sanguin d'éosinophiles [30].

De plus, l'éosinophilie sanguine est un biomarqueur qui permet de caractériser le phénotype inflammatoire des patients et c'est également un paramètre important dans l'évaluation des patients dans le cadre d'essais thérapeutiques évaluant l'efficacité des nouvelles biothérapies. L'étude Mensa qui a évalué l'efficacité du mepolizumab, un anticorps anti-IL-5, a montré que ce produit était efficace chez les patients qui présentaient à l'inclusion une éosinophilie sanguine $> 0,3 \times 10^9/L$ [43].

Cependant, ce test présente un certain nombre de faiblesses. L'éosinophilie sanguine est très variable au cours du suivi d'un patient. Les valeurs normales sont comprises entre 0,015 et $0,65 \times 10^9/L$ et une valeur de 0,3 ou de $0,4 \times 10^9/L$ utilisée dans la plupart des essais cliniques évaluant les biothérapies correspondent à des valeurs normales. De plus, l'éosinophilie sanguine peut varier de plus de 40 % au cours des 24 heures. Elle est notamment modifiée par la cortisolémie sanguine. L'éosinophilie est d'autant plus élevée que le cortisol plasmatique est bas. Idéalement, elle devrait donc être mesurée à la même heure chez un patient pour que la cinétique de cette mesure puisse être interprétable [42,44].

La périostine

La périostine est une protéine qui joue un rôle dans l'adhérence, la migration cellulaire et dans le recrutement tissulaire notamment des PNE. La sécrétion de périostine par les cellules épithéliales bronchiques est augmentée par l'IL-13. L'augmentation des taux sanguins de périostine serait un marqueur d'inflammation bronchique de type Th2. À l'inverse, une valeur sanguine basse de la périostine pourrait être un marqueur d'inflammation Th1 mais ces données ne sont pas encore confirmées. Enfin un taux de périostine augmenté pourrait prédire une meilleure réponse thérapeutique à certaines biothérapies comme le lebrikizumab ou l'omalizumab [41,45].

Panel de biomarqueurs

Verrills et al. ont proposé l'utilisation d'un panel de biomarqueurs pour discriminer les sujets sains des sujets asthmatiques. Les auteurs ont identifié 4 protéines de la phase inflammatoire aiguë que sont la céruloplasmine, l'haptoglobine, l'hémopexine et l' α 2-macroglobuline [5]. Cette combinaison de biomarqueurs est difficile à utiliser en clinique mais elle soulève la question de l'intérêt d'évaluer des combinaisons de biomarqueurs qui pourraient avoir un intérêt diagnostique et/ou pronostique. La combinaison d'un taux d'IgE totales > 100 kUI/L, d'une éosinophilie sanguine $> 0,14 \times 10^9/L$ et d'une éosinophile dans l'EI > 2 % semble identifier un phénotype inflammatoire « Th2-high » [46]. L'objectif est ensuite de mieux cibler les traitements proposés aux patients asthmatiques les plus sévères.

Les biomarqueurs urinaires

La mesure des métabolites urinaires est une méthode non invasive simple qui pourrait apporter des informations sur le phénotype inflammatoire mais également sur l'intensité de l'inflammation chez les patients asthmatiques atopiques ou non.

Les leucotriènes urinaires (LTC4, LTD4 et LTE4) sont des dérivés de l'acide arachidonique synthétisés par les mastocytes, les polynucléaires basophiles et éosinophiles par l'intermédiaire de la voie de la 5-lipooxygénase. Les taux urinaires de LTE4 sont augmentés chez les sujets asthmatiques mais cette élévation ne peut être considérée ni comme un argument diagnostique, ni comme un paramètre de suivi du contrôle des symptômes, ni encore comme un marqueur de sévérité [33].

La bromotyrosine (BrTyr) est également mesurée dans les urines. Sa synthèse résulte de l'activité des protéines libérées par des polynucléaires éosinophiles activés. Les dosages urinaires de BrTyr sont significativement augmentés chez les asthmatiques et après une exacerbation d'asthme [47]. Les taux de BrTyr sont également significativement diminués après l'instauration d'un traitement par CSI chez 46 patients asthmatiques initialement naïfs de traitement. Parallèlement la FENO et l'éosinophilie dans l'expectoration induite sont également significativement diminuées chez ces patients après instauration du traitement, comparativement aux résultats observés chez 40 sujets sains. Les

auteurs concluent que la combinaison d'une FENO et d'une concentration urinaire de BrTyr élevées est la meilleure association pour prédire l'effet positif d'un traitement par CSI chez un patient. Bien évidemment ces résultats sont préliminaires car ils ne concernent qu'un petit échantillon de patient et doivent être validés sur une plus large cohorte. La BrTyr est un outil potentiellement intéressant, seul ou dans un panel de biomarqueurs [48].

Comment trouver de nouveaux biomarqueurs ?

Mettre en œuvre une stratégie d'identification d'un biomarqueur nécessite avant toute mise en œuvre de répondre à un certain nombre de questions : à quoi doit servir le marqueur recherché ? Dans quel compartiment l'identifier et quelle population étudier ? Quelle technique utiliser ? Dans l'asthme, ce sont des marqueurs du phénotype éosinophile ou Th2 (éosinophilie sanguine ou bronchique, périostine), prédicteurs de la réponse à des thérapies ciblées (anti-IL-5, IL-13, IL-4) qui sont actuellement ou vont être prochainement utilisés en routine. Néanmoins, des marqueurs permettant de distinguer asthme/BPCO/syndrome de chevauchement [49], de prédire la survenue des exacerbations ou d'une obstruction bronchique fixée, de monitorer l'effet d'un traitement [48]... pourraient être utiles à la prise en charge, tel que déjà discuté dans la première partie. Cette recherche est très active dans le domaine de l'asthme, notamment grâce à des projets de grande envergure comme le projet U-BIOPRED (*unbiased biomarkers in prediction of respiratory disease outcomes*, www.imi.europa.eu/content/u-biopred), cohorte incluant plusieurs centaines d'asthmatiques sévères adultes et enfants dans plusieurs centres européens. Les biobanques ainsi créées permettront de rechercher des marqueurs de l'asthme sévère.

Où chercher le biomarqueur ?

Le choix du compartiment à étudier est un élément critique, qui doit prendre en compte à la fois la spécificité d'un marqueur isolé sur un prélèvement d'origine bronchique, le caractère invasif de certains prélèvements respiratoires et la facilité à obtenir ce prélèvement, éventuellement de façon répétée, pour une utilisation en routine.

Les prélèvements histologiques (brossage bronchique, biopsies bronchiques) permettent d'aborder un des principaux acteurs de l'asthme, la cellule épithéliale, avec des techniques très diverses, soit de routine (histologie, dosages cytokiniques dans le lavage bronchoalvéolaire) soit de recherche (génomique, protéomique, ...) [50]. Bien que sans danger, même chez l'asthmatique sévère [51], il est difficile d'envisager de faire une endoscopie chez tous les asthmatiques, en dehors de la recherche. L'hétérogénéité de l'échantillonnage en fonction du site prélevé peut être un point critiqué, notamment pour les descriptions histologiques.

L'expectoration induite peut sembler une bonne alternative pour l'étude du compartiment bronchique : la technique est

peu invasive et elle permet différents types d'analyse (étude cytologique ou biochimique, du protéome. . .) [52]. Le suivi du taux d'éosinophiles dans l'expectoration chez certains asthmes sévères est par exemple proposé par les recommandations internationales ATS-ERS [3]. Cependant, il s'agit d'une technique relativement lourde à réaliser en routine, difficile à généraliser en dehors de centres experts. De plus, il est montré que la formule leucocytaire est très variable chez un même individu, influencée par exemple par le tabac, la prise de corticoïdes, les infections. Ceci signifie qu'il est sans doute difficile de se baser sur un seul prélèvement pour définir par exemple un phénotype d'asthme [53].

L'étude de l'air exhalé utilise une technique non invasive relativement simple pour le recueil. Si l'analyse du FENO pour le suivi des asthmatiques est faisable en routine grâce à de petits appareils portables, son intérêt dans la pratique quotidienne n'est actuellement pas démontré de façon formelle [3,30]. L'analyse du condensat de l'air exhalé, qui permet d'utiliser des techniques d'analyse du protéome ou du métabolome, notamment les métabolites issus du stress oxydatif, relève pour l'instant de la recherche, mais pourrait permettre par exemple d'identifier des « signatures moléculaires » propre à l'asthme sévère [54] ou à certains profils inflammatoires [55].

Les prélèvements sanguins ont l'avantage d'être peu invasifs, de pouvoir être répétés facilement, de se prêter à un certain nombre de techniques (dosages de cytokines, analyse du génome, du transcriptome, du métabolome. . .). Le choix de la technique d'analyse va conditionner le type de prélèvement (sérum, plasma, ARN. . .) et son mode de stockage. Utiliser des prélèvements sanguins suppose que le biomarqueur d'intérêt circule à des taux détectables dans le sang ou qu'il est exprimé dans les cellules circulantes. Les prélèvements urinaires, encore moins invasifs, partagent globalement les mêmes avantages et inconvénients.

Quelle technique utiliser pour chercher un biomarqueur ?

Deux types d'approches peuvent être utilisés pour définir un biomarqueur. L'approche ciblée consiste à évaluer la valeur, dans une population ou une situation données, d'un marqueur déterminé. Ce type d'approche nécessite donc une population bien caractérisée pour répondre à la question posée. La construction d'une cohorte de patients, sa taille (une dizaine pour la protéomique, plusieurs centaines pour la génomique), les données recueillies et les caractéristiques des patients inclus, nécessite donc d'avoir déterminé à l'avance les objectifs (par exemple, on ne peut pas chercher un marqueur d'exacerbation dans une cohorte où ne sont inclus que des patients vus à l'état stable). C'est l'approche la plus fréquemment utilisée pour les marqueurs utilisés actuellement (FENO, éosinophilie sanguine, périostine. . .). « Aller à la pêche » aux marqueurs (*fishing*), fait appel des techniques de plus en plus complexes, les « omics » (néologisme faisant références à un ensemble d'analyses biologiques ayant pour suffixe « omique », générant des données en masse), qui nécessitent des compétences multiples, notamment statistiques et informatiques et la collaboration avec des plateformes spécialisées. Ces techniques permettent d'identifier un grand nombre de marqueurs (protéines pour l'analyse du protéome ou protéomique, gènes pour la génomique, métabolites pour la métabolomique. . .) (figure 1), dont les plus intéressantes sont d'abord sélectionnées à partir de calculs statistiques, mais dont il faut ensuite évaluer la pertinence sur le plan physiopathologique puis la pertinence clinique. Dans l'asthme, les cibles identifiées par génomique, protéomique ou épigénomique ne sont pas toutes les mêmes (figure 2), bien que certaines soient identifiées de façon récurrente, comme les enzymes de la voie du NO, la *calcium binding protein A9*, les chitinases, des chemokines (CCL8, CXCL15), des cytokines [56]. . . Coupler plusieurs biomarqueurs à des données cliniques

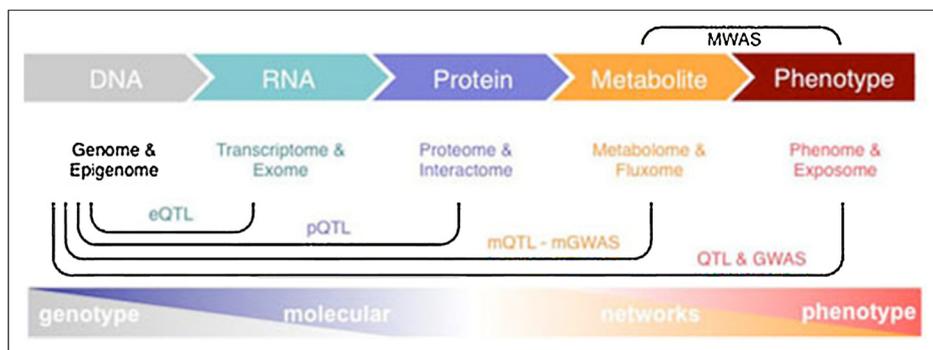


FIGURE 1

Techniques utilisées pour la recherche de biomarqueurs. On peut associer l'analyse du génome et celle d'un autre matériel. eQTL : *expression quantitative trait loci* (locus contribuant à la variation d'expression des niveaux d'ARNm) ; pQTL : *protein quantitative trait loci* ; mQTL : *metabolomic quantitative trait loci* ; mGWAS : *metabolome genome-wide association study*

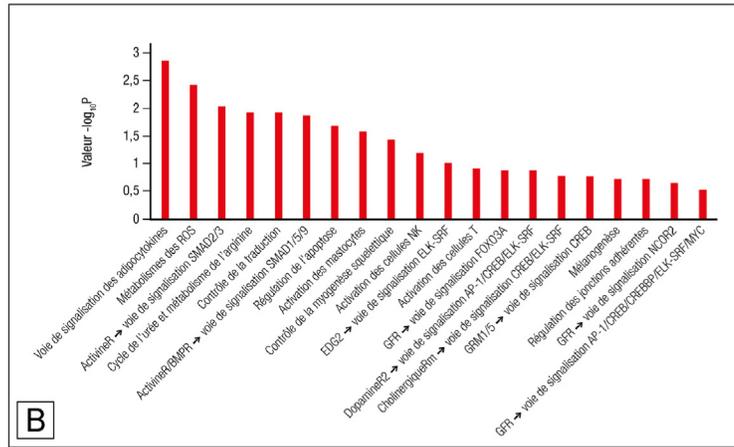
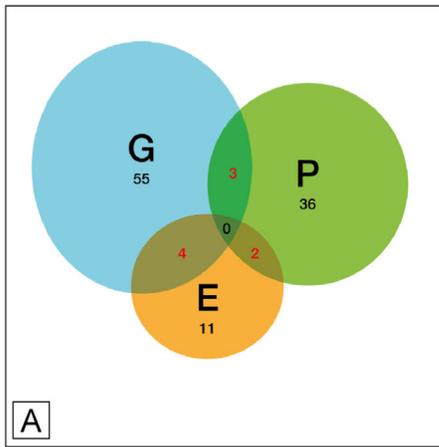


FIGURE 2
A. Diagramme de Venn montrant des biomarqueurs d'asthme identifiés selon différentes approches : génomique (G), protéomique (P) et épigénétique (E). Aux intersections, les marqueurs identifiés par plusieurs techniques. B. Voies identifiées de manière récurrente. Elles sont considérées comme significatives à 0,05 % ($-\log_{10}P \geq 1,3$). D'après Sircar [56]

dans une approche intégrée basée sur des modèles mathématiques parfois complexes permettra peut-être d'avancer dans la compréhension des différents phénotypes d'asthme et de la complexité de l'asthme [57].

La périostine est un exemple de biomarqueur d'abord identifié à partir d'une analyse génomique réalisée sur un broyage de cellules épithéliales bronchiques [58]. Sa pertinence dans la physiopathologie de l'asthme a ensuite été démontrée par un travail montrant que la protéine, sécrétée par les cellules épithéliales bronchiques, était régulée par l'IL-13 et qu'elle jouait un rôle dans la structure de la matrice extracellulaire [58]. Par la suite, il a été montré que la périostine était un marqueur d'un phénotype « Th2 » (expression élevée d'IL-13 et d'IL-5), concernant environ les deux tiers des asthmatiques, associé à la sensibilité aux stéroïdes inhalés, à une plus grande hyperréactivité bronchique, à l'éosinophilie sanguine et au remodelage bronchique [46]. Enfin, la meilleure réponse à un anticorps anti-IL-13 (lebrikizumab) chez des asthmatiques sévères ayant un taux élevé de périostine a montré définitivement l'intérêt pratique de ce marqueur [45]. Cependant, la périostine étant associée au remodelage bronchique, elle n'est pas

spécifique de l'asthme, ni même des maladies bronchiques. L'utilisation à bon escient d'un biomarqueur nécessite d'en connaître les intérêts et les limites.

Conclusion

Le développement de biomarqueurs diagnostiques, pronostiques, phénotypiques, est une recherche en plein essor. Elle devrait aider à mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques du « syndrome asthme » et à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Déclaration de liens d'intérêts : Camille Taillé déclare avoir reçu des honoraires des laboratoires GSK, AstraZeneca, Teva, Roche, Novartis, Chiesi, MundiPharma pour des activités d'expertise ou pour participation à des congrès.
 Arnaud Bourdin déclare participer à des advisory boards organisés par GSK, AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, Novartis ; être investigateur pour des études cliniques promues par GSK, AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, Novartis, Cephalon, Medimmune, Roche, Teva, Chiesi ; avoir participé à des congrès grâce au soutien d'industriel dont GSK, AZ, Intermune, MundiPharma, Chiesi, Novartis, Boehringer Ingelheim.
 Gilles Garcia déclare : « Dans le domaine de l'asthme, j'ai été en relation avec les laboratoires AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, GSK, Merck, Novartis, Roche, TEVA, Sanofi, Chiesi ».

Références

[1] Group BDW. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69(3):89-95.
 [2] Lötvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Björner L, Casale TB, Custovic A, et al. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127(2):355-60.
 [3] 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(2):343-73.
 [4] Bourdin A, Neveu D, Vachier I, Paganin F, Godard P, Chanez P. Specificity of basement membrane thickening in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119(6):1367-74.
 [5] Verrills NM, Irwin JA, He XY, Wood LG, Powell H, Simpson JL, et al. Identification of novel diagnostic biomarkers for asthma and chronic

- obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183(12):1633–43.
- [6] Berry MA, Shaw DE, Green RH, Brightling CE, Wardlaw AJ, Pavord ID. The use of exhaled nitric oxide concentration to identify eosinophilic airway inflammation: an observational study in adults with asthma. *Clin Exp Allergy* 2005;35(9):1175–9.
- [7] Fens N, Roldaan AC, van der Schee MP, Boksem RJ, Zwiderman AH, Bel EH, et al. External validation of exhaled breath profiling using an electronic nose in the discrimination of asthma with fixed airways obstruction and chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Allergy* 2011;41(10):1371–8.
- [8] Castro-Rodríguez JA, Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD. A clinical index to define risk of asthma in young children with recurrent wheezing. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(4 Pt 1):1403–6.
- [9] Bisgaard H, Jensen SM, Bønnelykke K. Interaction between asthma and lung function growth in early life. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185(11):1183–9.
- [10] Reubsæet LL, Meerding J, de Jager W, de Klee IM, Hoekstra MO, Prakken BJ, et al. Plasma chemokines in early wheezers predict the development of allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188(8):1039–40.
- [11] Clearie KL, Jackson CM, Fardon TC, Williamson PA, Vaidyanathan S, Burns P, et al. Supervised step-down of inhaled corticosteroids in the community – an observational study. *Respir Med* 2011;105(4):558–65.
- [12] Sont JK, Willems LN, Bel EH, van Krieken JH, Vandenbroucke JP, Sterk PJ. Clinical control and histopathologic outcome of asthma when using airway hyperresponsiveness as an additional guide to long-term treatment. The AMPUL Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159(4 Pt 1):1043–51.
- [13] Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360(9347):1715–21.
- [14] Dinh-Xuan AT, Annesi-Maesano I, Berger P, Chambellan A, Chanez P, Chinot T, et al. Contribution of exhaled nitric oxide measurement in airway inflammation assessment in asthma. A position paper from the French Speaking Respiratory Society. *Rev Mal Respir* 2015;32(2):193–215.
- [15] Stern G, de Jongste J, van der Valk R, Baraldi E, Carraro S, Thamrin C, et al. Fluctuation phenotyping based on daily fraction of exhaled nitric oxide values in asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128(2): 293–300.
- [16] Boulet LP, Vervloet D, Magar Y, Foster JM. Adherence: the goal to control asthma. *Clin Chest Med* 2012;33(3):405–17.
- [17] McNicholl DM, Stevenson M, McGarvey LP, Heaney LG. The utility of fractional exhaled nitroadherence in difficult asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186(11):1102–8.
- [18] Lemiere C, NGuyen S, Sava F, D'Alpaos V, Huaux F, Vandenplas O. Occupational asthma phenotypes identified by increased fractional exhaled nitric oxide after exposure to causal agents. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134(5): 1063–7.
- [19] Bourdin A, Humbert M, Chanez P. Immunologic therapeutic interventions in asthma: impact on natural history. *Clin Chest Med* 2012;33(3):585–97.
- [20] Pavord ID, Korn S, Howarth P, Bleecker ER, Buhl R, Keene ON, et al. Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2012;380(9842):651–9.
- [21] Demoly P, Annunziata K, Gubba E, Adamek L. Repeated cross-sectional survey of patient-reported asthma control in Europe in the past 5 years. *Eur Respir Rev* 2012;21(123):66–74.
- [22] Bateman ED, Boushey HA, Bousquet J, Busse WW, Clark TJ, Pauwels RA, et al. Can guideline-defined asthma control be achieved? The gaining optimal asthma control study. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170(8):836–44.
- [23] Society AT, Society ER. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171(8):912–30.
- [24] Smith AD, Cowan JO, Filsell S, McLachlan C, Monti-Sheehan G, Jackson P, et al. Diagnosing asthma: comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169(4): 473–8.
- [25] Warke TJ, Fitch PS, Brown V, Taylor R, Lyons JD, Ennis M, et al. Exhaled nitric oxide correlates with airway eosinophils in childhood asthma. *Thorax* 2002;57(5):383–7.
- [26] Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, Filsell S, McLachlan C, Monti-Sheehan G, et al. Exhaled nitric oxide: a predictor of steroid response. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(4):453–9.
- [27] Szeffler SJ, Mitchell H, Sorkness CA, Gergen PJ, O'Connor GT, Morgan WJ, et al. Management of asthma based on exhaled nitric oxide in addition to guideline-based treatment for inner-city adolescents and young adults: a randomised controlled trial. *Lancet* 2008; 372(9643):1065–72.
- [28] Petsky HL, Cates CJ, Lasserson TJ, Li AM, Turner C, Kynaston JA, et al. A systematic review and meta-analysis: tailoring asthma treatment on eosinophilic markers (exhaled nitric oxide or sputum eosinophils). *Thorax* 2012;67(3):199–208.
- [29] Petsky HL, Cates CJ, Li A, Kynaston JA, Turner C, Chang AB. Tailored interventions based on exhaled nitric oxide versus clinical symptoms for asthma in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;4:CD006340.
- [30] Szeffler SJ, Wenzel S, Brown R, Erzurum SC, Fahy JV, Hamilton RG, et al. Asthma outcomes: biomarkers. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129(3 Suppl):S9–23.
- [31] Djukanovic R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargreave FE. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J Suppl* 2002;37:1s–2s.
- [32] Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology* 2006;11(1):54–61.
- [33] Hastie AT, Moore WC, Meyers DA, Vestal PL, Li H, Peters SP, et al. Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(5): 1028–1036.e13.
- [34] Schleich FN, Manise M, Sele J, Henket M, Seidel L, Louis R. Distribution of sputum cellular phenotype in a large asthma cohort: predicting factors for eosinophilic vs neutrophilic inflammation. *BMC Pulm Med* 2013;13:11.
- [35] Schleich F, Louis R. [Uncontrolled asthma: importance of phenotypes and local and systemic eosinophilia]. *Rev Med Liege* 2014;69 (Spec No):62–5.
- [36] Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 1989;320(5):271–7.
- [37] Beeh KM, Kroll M, Buhl R. Elevation of total serum immunoglobulin E is associated with asthma in nonallergic individuals. *Eur Respir J* 2000;16(4):609–14.
- [38] Humbert M, Beasley R, Ayres J, Slavin R, Hebert 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 [Denmark].
- [39] Hanania NA, Alpan O, Hamilos DL, Condemi JJ, Reyes-Rivera I, Zhu J, et al. Omalizumab in severe allergic asthma inadequately controlled with standard therapy: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2011;154:573–82 [United States].
- [40] Bousquet J, Cabrera P, Berkman N, Buhl R, Holgate S, Wenzel S, et al. The effect of treatment with omalizumab, an anti-IgE antibody, on asthma exacerbations and emergency medical visits in patients with severe persistent asthma. *Allergy* 2005;60:302–8 [Denmark].
- [41] Hanania NA, Wenzel S, Rosén K, Hsieh HJ, Mosesova S, Choy DF, et al. Exploring the effects of omalizumab in allergic asthma: an analysis of biomarkers in the EXTRA study. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187(8):804–11.
- [42] Prussin C, Metcalfe DD. 4. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(2 Suppl):S486–94.
- [43] Ortega HG, Liu MC, Pavord ID, Brusselle GG, FitzGerald JM, Chetta A, et al. Mepolizumab

- treatment in patients with severe eosinophilic asthma. *N Engl J Med* 2014;371(13):1198-207.
- [44] Winkel P, Statland BE, Saunders AM, Osborn H, Kupperman H. Within-day physiologic variation of leukocyte types in healthy subjects as assayed by two automated leukocyte differential analyzers. *Am J Clin Pathol* 1981; 75(5):693-700.
- [45] Corren J, Lemanske RF, Hanania NA, Korenblat PE, Parsey MV, Arron JR, et al. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *N Engl J Med* 2011;365(12):1088-98.
- [46] Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180(5):388-95.
- [47] Mita H, Higashi N, Taniguchi M, Higashi A, Kawagishi Y, Akiyama K. Urinary 3-bromotyrosine and 3-chlorotyrosine concentrations in asthmatic patients: lack of increase in 3-bromotyrosine concentration in urine and plasma proteins in aspirin-induced asthma after intravenous aspirin challenge. *Clin Exp Allergy* 2004;34(6):931-8.
- [48] Cowan DC, Taylor DR, Peterson LE, Cowan JO, Palmay R, Williamson A, et al. Biomarker-based asthma phenotypes of corticosteroid response. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135(4):877-8830.
- [49] Iwamoto H, Gao J, Koskela J, Kinnula V, Kobayashi H, Laitinen T, et al. Differences in plasma and sputum biomarkers between COPD and COPD-asthma overlap. *Eur Respir J* 2014;43(2):421-9.
- [50] Alexis NE. Biomarker sampling of the airways in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2014;20(1):46-52.
- [51] Moore WC, Evans MD, Bleecker ER, Busse WW, Calhoun WJ, Castro M, et al. Safety of investigative bronchoscopy in the Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:328-36000 [United States: Asthma & Immunology. Published by Mosby Inc].
- [52] Gharib SA, Nguyen EV, Lai Y, Plampin JD, Goodlett DR, Hallstrand TS. Induced sputum proteome in healthy subjects and asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128(6):1176-1184.e6.
- [53] Davies AR, Hancox RJ. Induced sputum in asthma: diagnostic and therapeutic implications. *Curr Opin Pulm Med* 2013;19(1):60-5.
- [54] Carraro S, Giordano G, Reniero F, Carpi D, Stocchero M, Sterk PJ, et al. Asthma severity in childhood and metabolomic profiling of breath condensate. *Allergy* 2013;68(1):110-7.
- [55] Ibrahim B, Marsden P, Smith JA, Custovic A, Nilsson M, Fowler SJ. Breath metabolomic profiling by nuclear magnetic resonance spectroscopy in asthma. *Allergy* 2013;68(8):1050-6.
- [56] Sircar G, Saha B, Bhattacharya SG, Saha S. Allergic asthma biomarkers using systems approaches. *Front Genet* 2014;4:308.
- [57] George BJ, Reif DM, Gallagher JE, Williams-DeVane CR, Heidenfelder BL, Hudgens EE, et al. Data-driven asthma endotypes defined from blood biomarker and gene expression data. *PLoS One* 2015;10(2):e0117445.
- [58] Woodruff PG, Boushey HA, Dolganov GM, Barker CS, Yang YH, Donnelly S, et al. Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(40):15858-63.