

# La métabolomique : quel apport en allergologie pédiatrique?

Karine Adel-Patient

Département Médicaments et Technologies pour la Santé

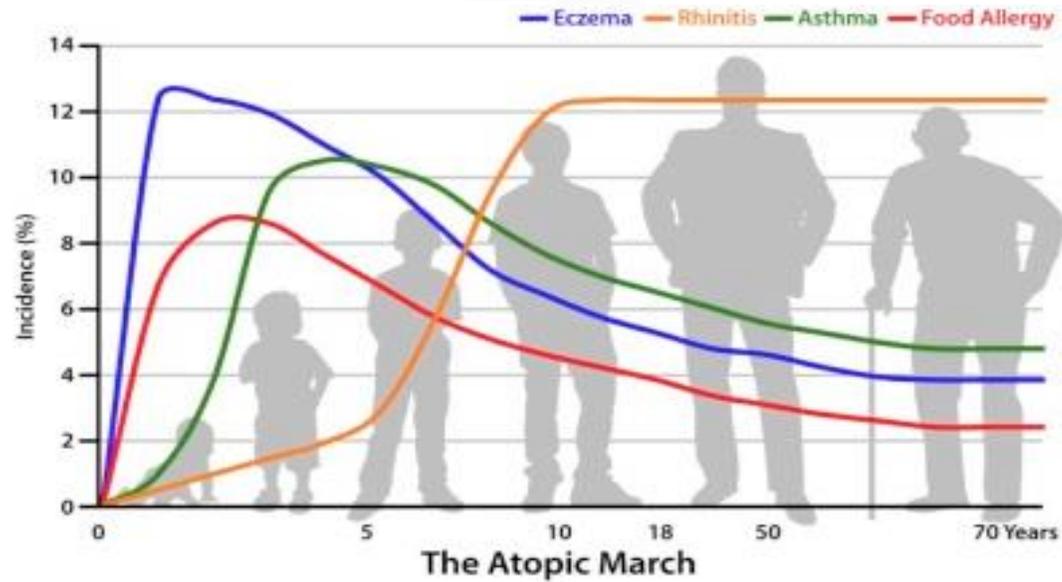
INRAE, CEA, Université Paris Saclay

Laboratoire d'Immuno-Allergie Alimentaire



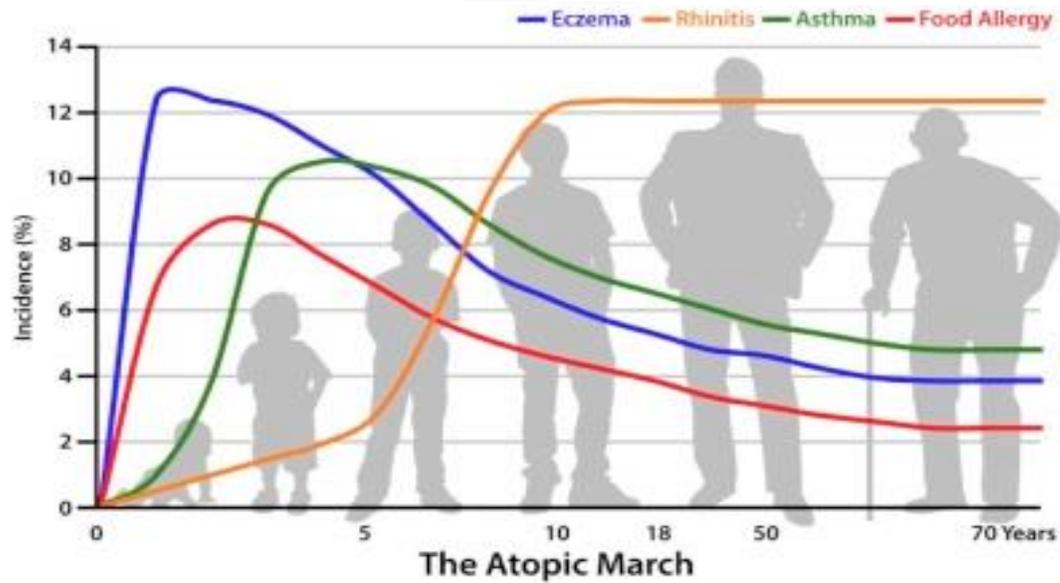
# Complexité et diversité des maladies allergiques

## 1. Dans son histoire "naturelle"

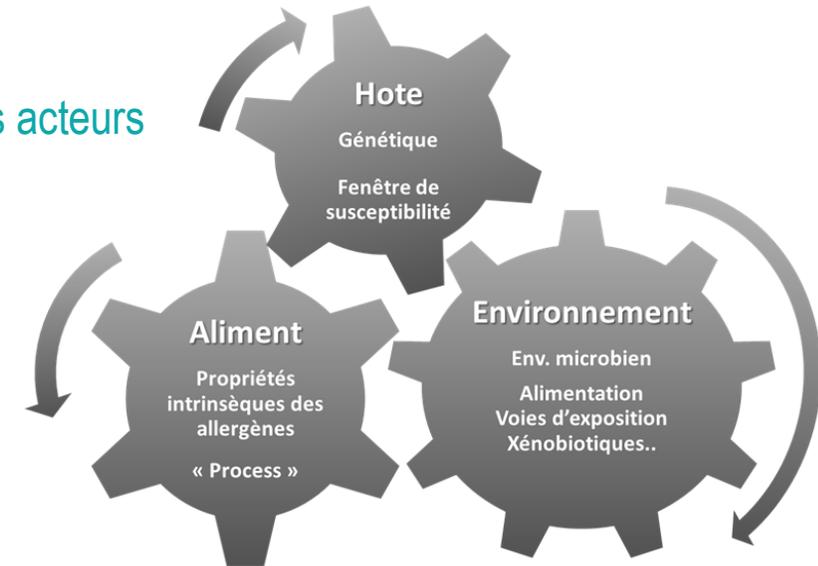


# Complexité et diversité des maladies allergiques

## 1. Dans son histoire "naturelle"

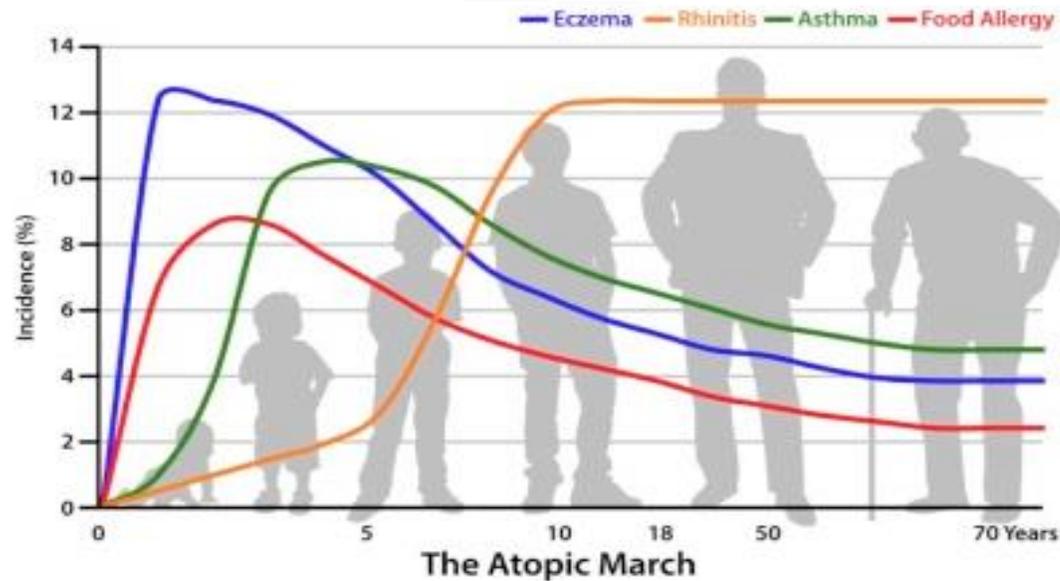


## 2. Dans ses acteurs

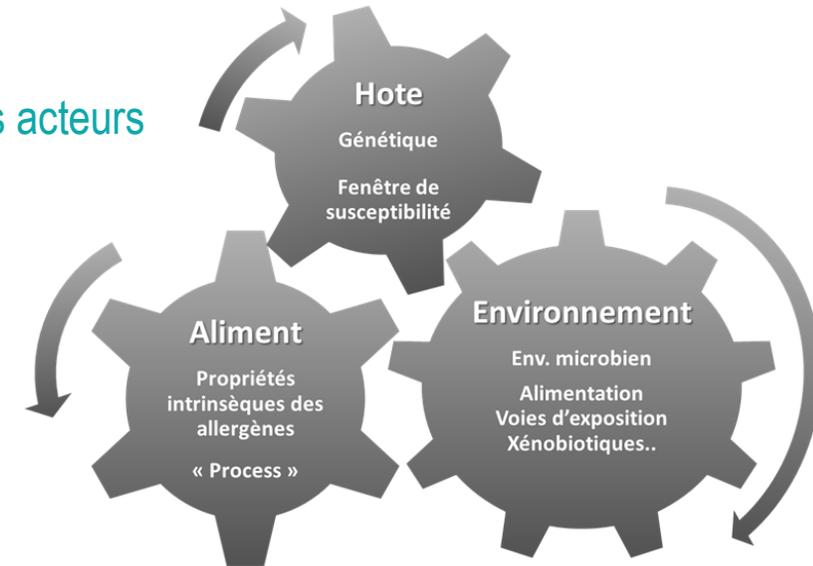


# Complexité et diversité des maladies allergiques

## 1. Dans son histoire "naturelle"



## 2. Dans ses acteurs

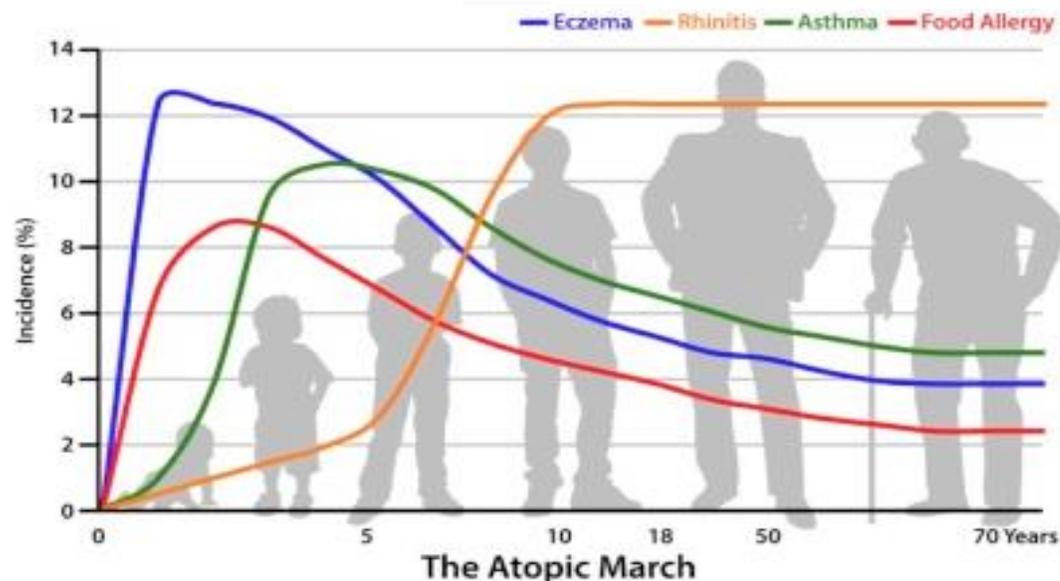


## 3. Dans ses phenotypes cliniques

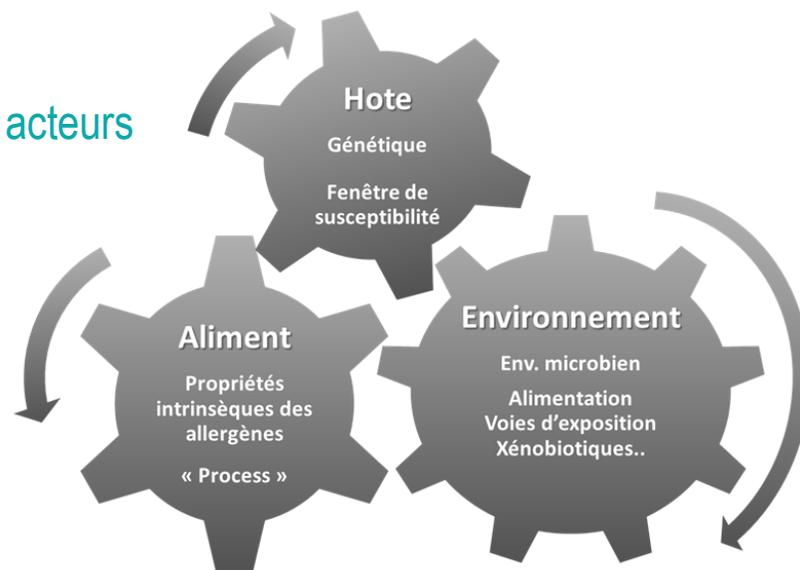
Symptomes, sévérité, dose déclenchante, ....

# Complexité et diversité des maladies allergiques

## 1. Dans son histoire "naturelle"



## 2. Dans ses acteurs



## 3. Dans ses phenotypes cliniques

Symptomes, sévérité, dose déclenchante, ....

## 4. Dans son histoire individuelle

Pour un même phénotype, grande variabilité interindividuelle / réponse au traitement et trajectoire,  
Résulte de différents mécanismes physiopathologiques, i.e. **endotypes**, définis par des signatures biologiques différentes

# Complexité et diversité des maladies allergiques: nécessité d'approche globale

Le **diagnostic** reposant sur le dosage des IgE et les tests cutanés, bien qu'essentiel, a une **valeur prédictive limitée**, notamment en terme de sévérité des réactions et de réponse potentielle au traitement

# Complexité et diversité des maladies allergiques: nécessité d'approche globale

Le **diagnostic** reposant sur le dosage des IgE et les tests cutanés, bien qu'essentiel, a une **valeur prédictive limitée**, notamment en terme de sévérité des réactions et de réponse potentielle au traitement

**Prise en charge des patients** = en poser un diagnostic précis (endotype) permettant d'adapter le traitement à l'individu, en optimiser l'efficacité et le suivi => **Médecine personnalisée**

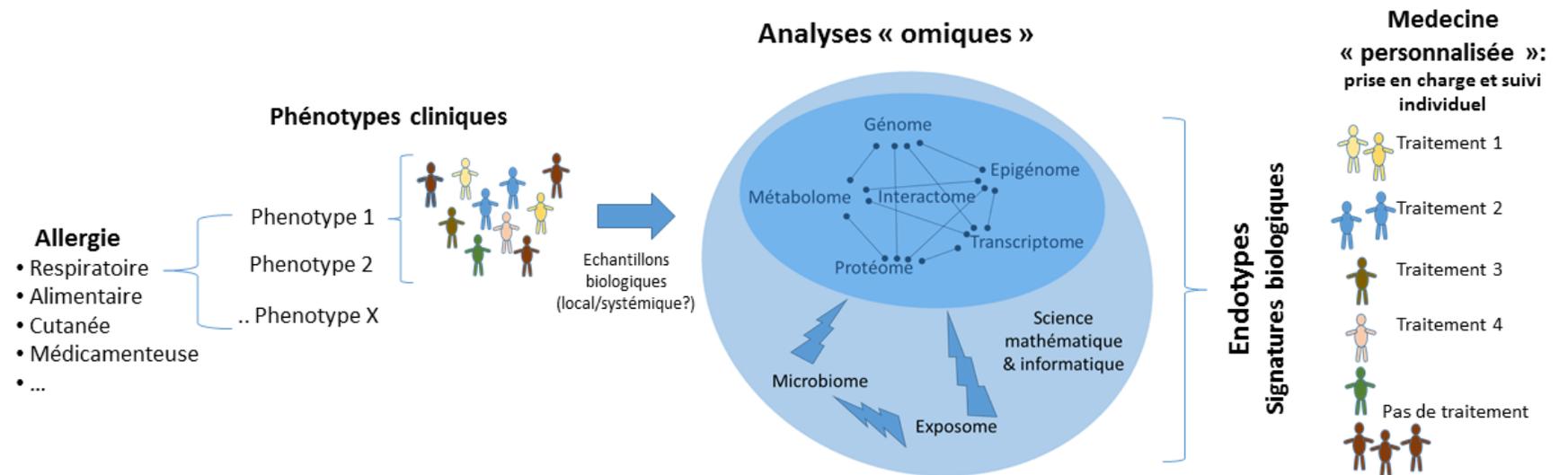
# Complexité et diversité des maladies allergiques: nécessité d'approche globale

Le **diagnostic** reposant sur le dosage des IgE et les tests cutanés, bien qu'essentiel, a une **valeur prédictive limitée**, notamment en terme de sévérité des réactions et de réponse potentielle au traitement

**Prise en charge des patients** = en poser un diagnostic précis (endotype) permettant d'adapter le traitement à l'individu, en optimiser l'efficacité et le suivi => **Médecine personnalisée**

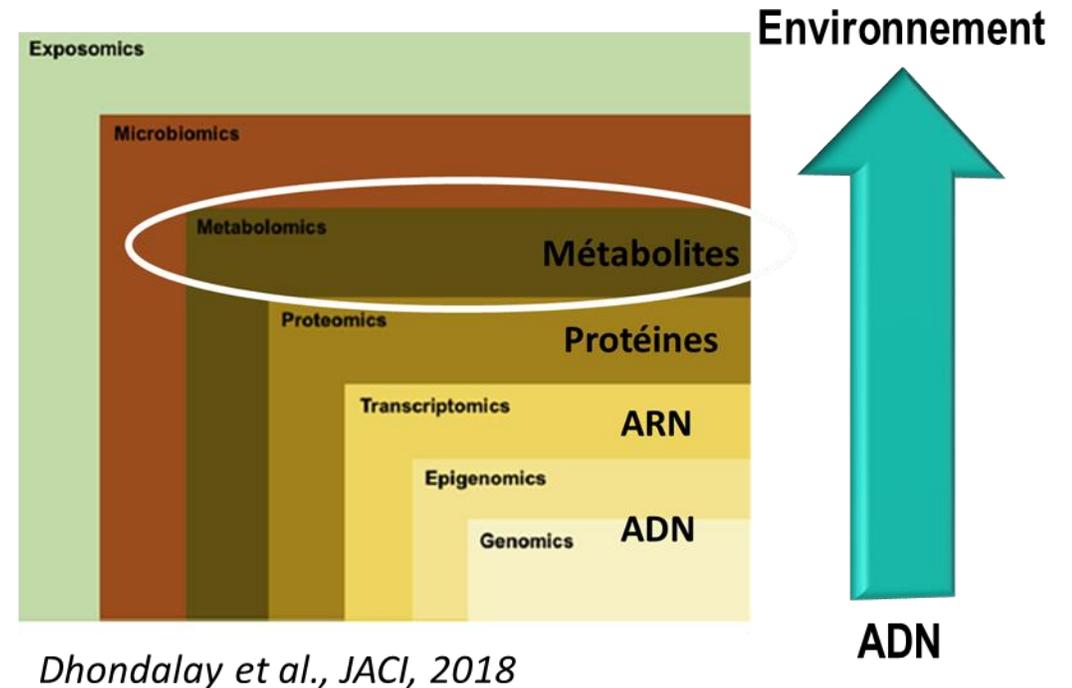
## Apport des "omics":

- aide à la compréhension des mécanismes physiopathologiques
- définition des endotypes
- Identification de biomarqueurs pour l'aide au diagnostic et suivi des patients



# « Omics »?

- ❖ **Analyse « globale »** utilisant des technologies à haut débit pour
  - ❖ caractériser et quantifier des molécules / constituants d'une cellule/organe/organisme dans un état physiologique et un environnement donnés
  - ❖ comprendre leurs associations et interactions
- ❖ Génération de **grands jeux de données**, qui peuvent être analysées **sans a priori** & de façon non ciblée,
  - ❖ ≠ expériences conduites sous une hypothèse « x »
  - ❖ Challenge = en tirer l'information pertinente / pathologie considérée!
- ❖ Approches omiques => **biologie « systémique »**
  - identification des **voies biologiques** & de leurs **interactions**, impliquées dans une pathologie donnée => nouvelles hypothèses
  - identification de **biomarqueurs** et de **cibles thérapeutiques**

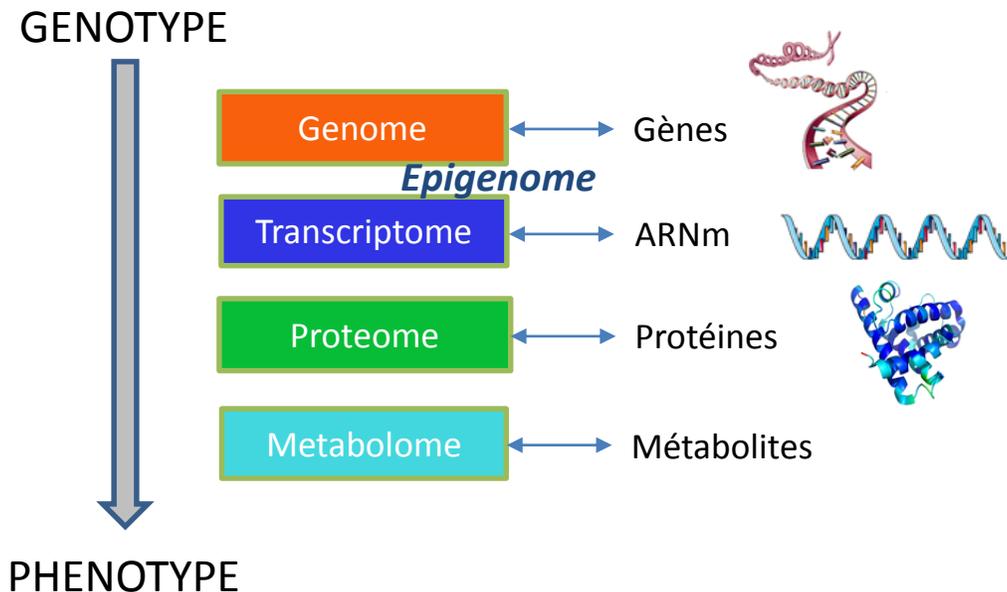


# Qu'est ce que la métabolomique?

Analyse **qualitative / semi-quantitative, non sélective**, de l'ensemble des **métabolites\*** présents dans un système biologique (fluides, tissus...) à un instant donné, à l'aide de plateformes analytiques puissantes

\*Métabolites: composés organiques **<1000 Da**

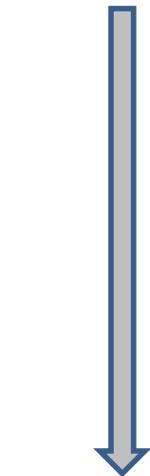
Premiers travaux (fin 1990, début 2000), *Jeremy Nicholson et Oliver Fiehn*



# Qu'est ce que la métabolomique?

Analyse **qualitative / semi-quantitative, non sélective**, de l'ensemble des **métabolites\*** présents dans un système biologique (fluides, tissus...) à un instant donné, à l'aide de plateformes analytiques puissantes

GENOTYPE



PHENOTYPE

Genome

*Epigénome*

Transcriptome

Proteome

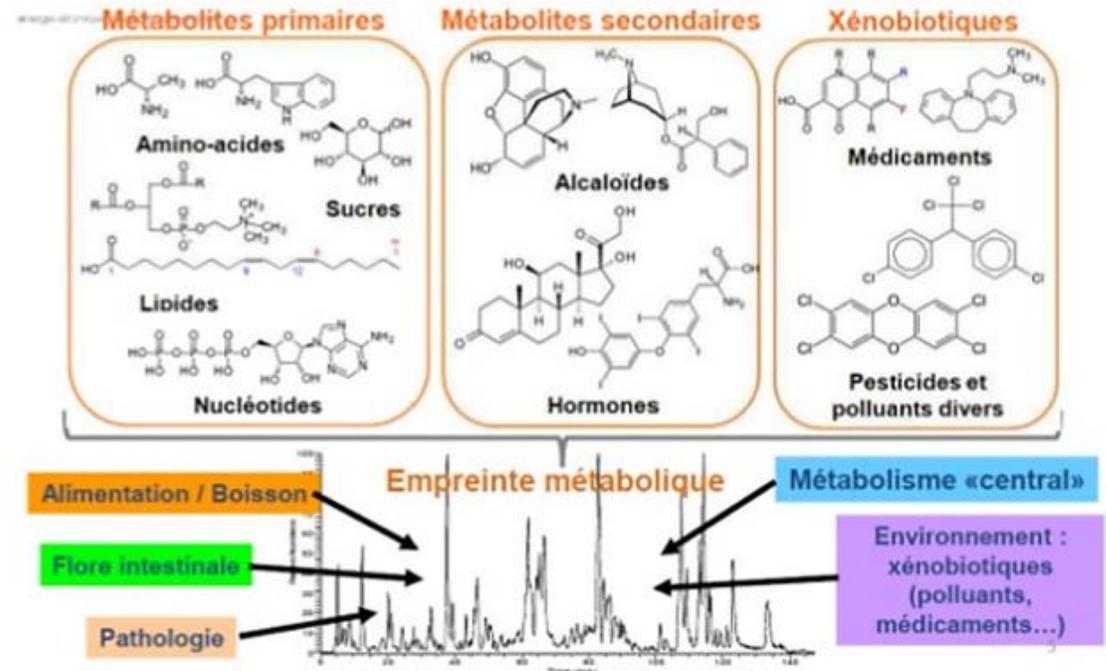
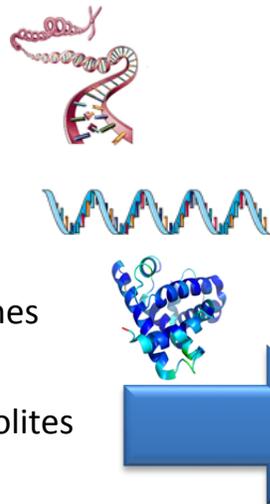
Metabolome

Gènes

ARNm

Protéines

Métabolites



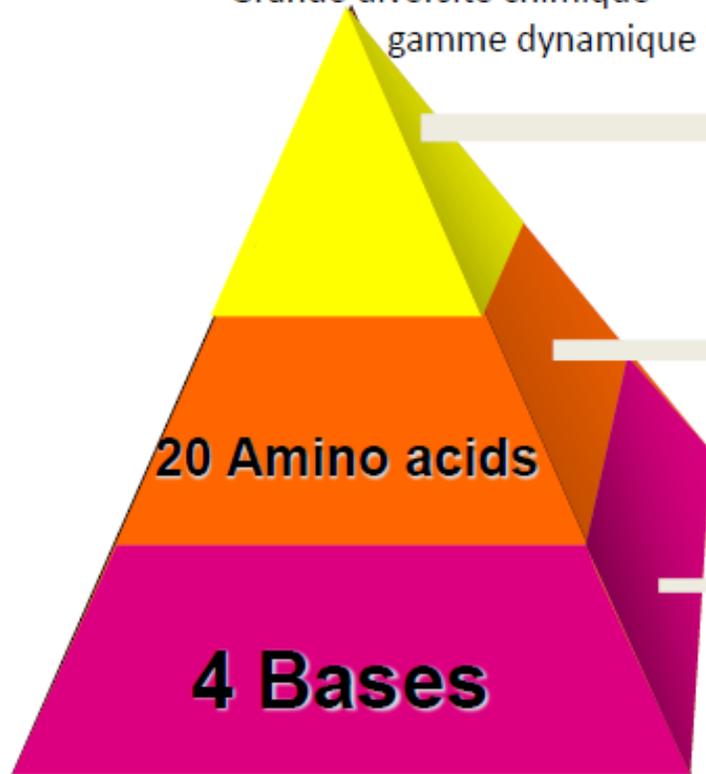
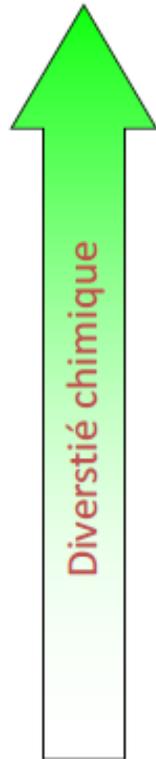
=> Intégration des interactions hôte x environnement

# Qu'est ce que la métabolomique?

Ne peut être déduite du génome

Grande diversité chimique

gamme dynamique 7 log



Metabolomics

Métabolome humain (*Human Metabolome DataBase*; 2018)

> 100000 métabolites potentiels

Identification  $\approx$  2500 métabolites endogènes

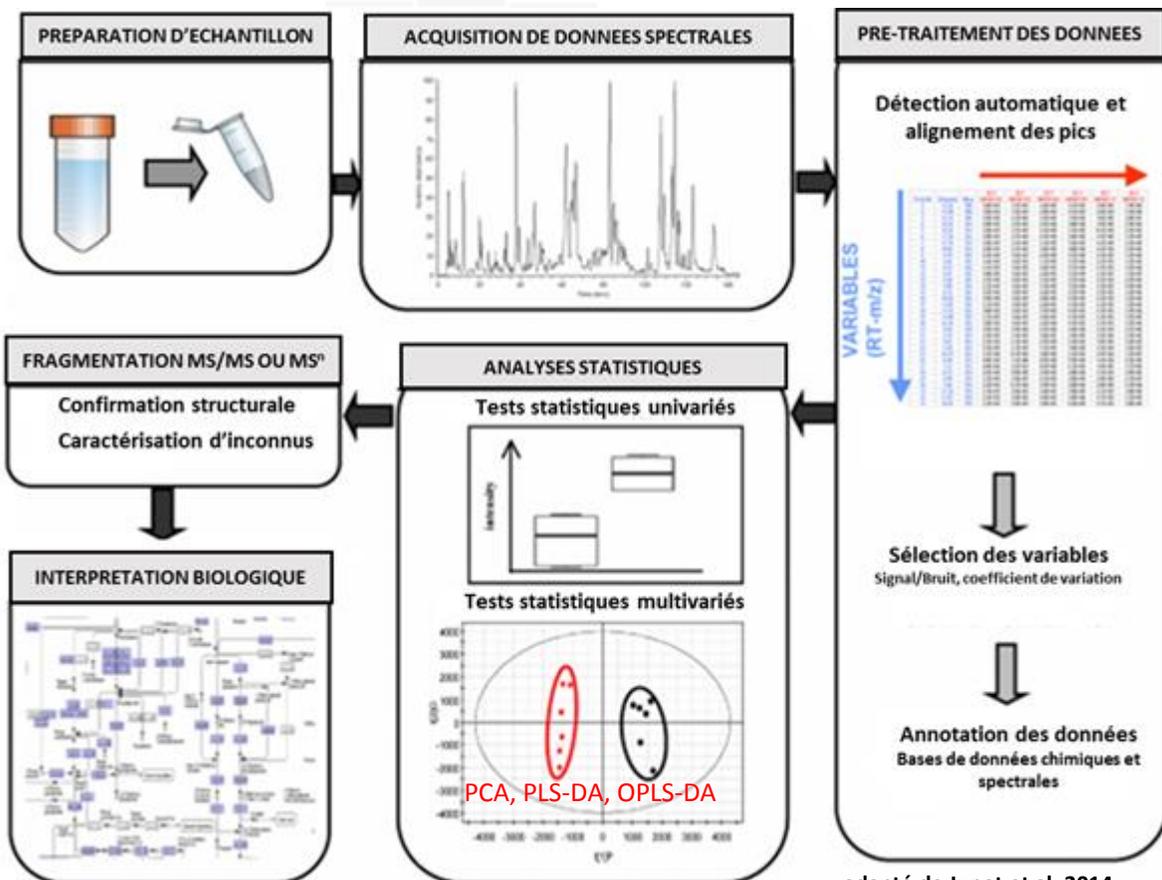
Métabolites exogènes: 1200 médicaments

3500 composants alimentaires

Proteomics

Genomics

# Comment réaliser une analyse métabolomique?



*Plasma LC-MS / un type chromatographique*

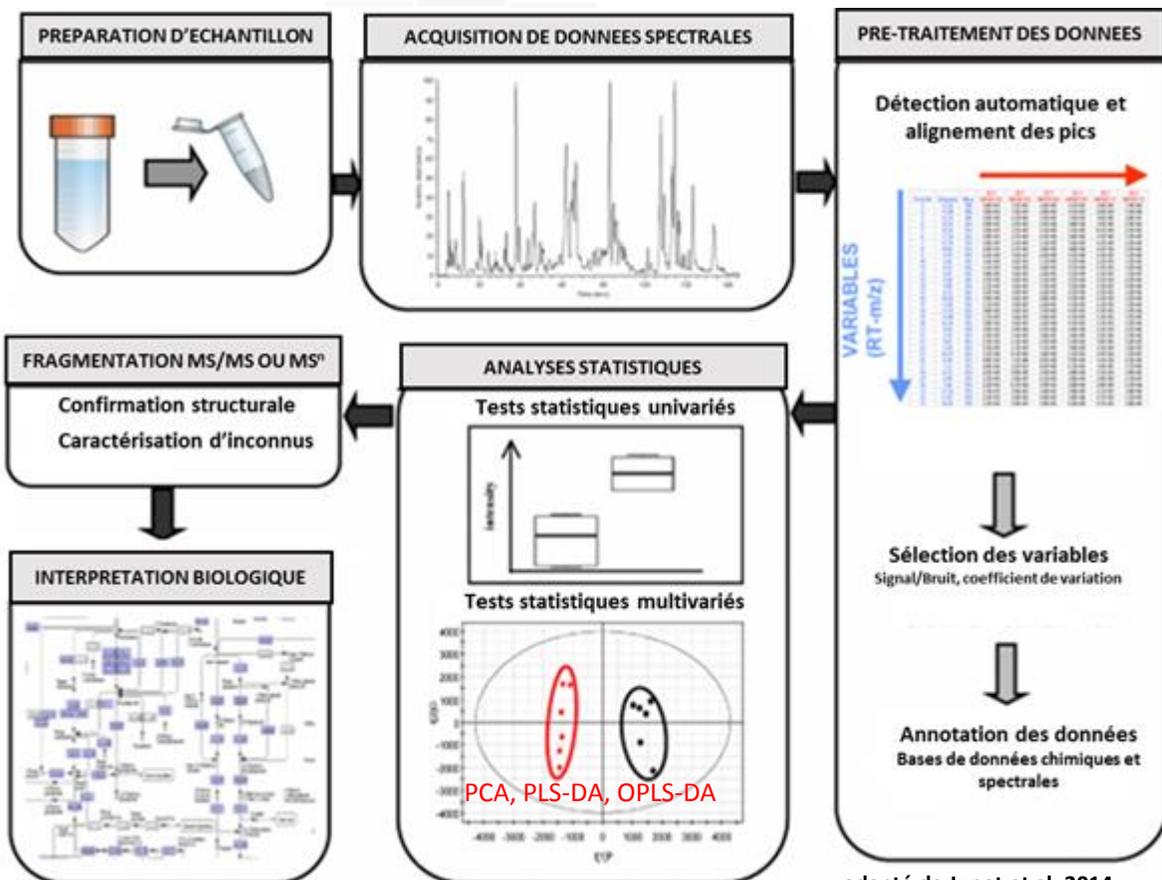
*>20000 signaux*

*4000-6000 variables extraites*

*~2000 après tri*

adapté de Junot et al. 2014

# Comment réaliser une analyse métabolomique?



adapté de Junot et al. 2014

*Plasma LC-MS / un type chromatographique*

*>20000 signaux*

*4000-6000 variables extraites*

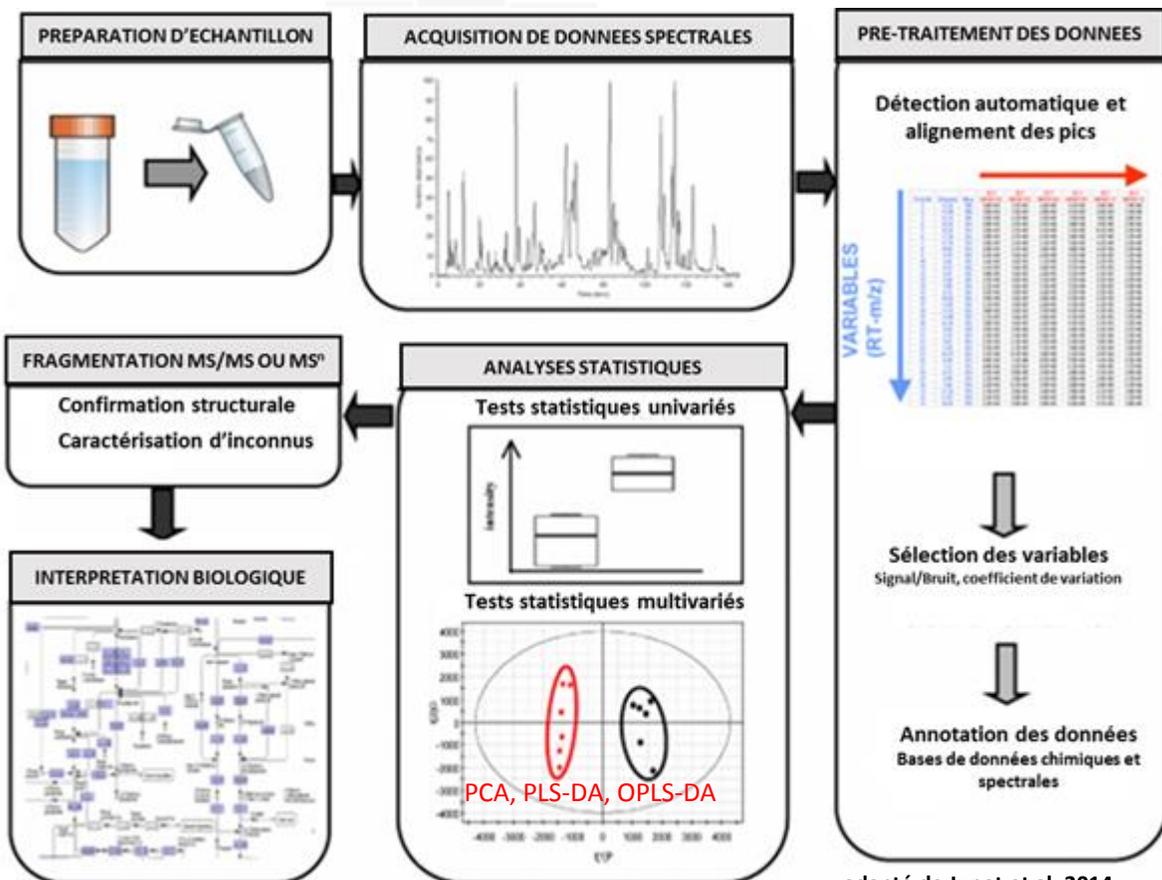
*~2000 après tri*

**Analyses des données selon la question posée**

- ✓ Analyses **multivariées non supervisées** (ACP; structuration des données, ech. aberrants)
- ✓ Analyses **multivariées supervisées** (PLS-DA & OPLS-DA)  
=> Identification de variables discriminantes selon la question posée
- ✓ Analyses **univariées** (test correctifs; variables >> individus):  
Visualisation des individus / variable

**=> biomarqueurs pertinents? => identification...**

# Comment réaliser une analyse métabolomique?



adapté de Junot et al. 2014

*Plasma LC-MS / un type chromatographique*

*>20000 signaux  
4000-6000 variables extraites  
~2000 après tri*

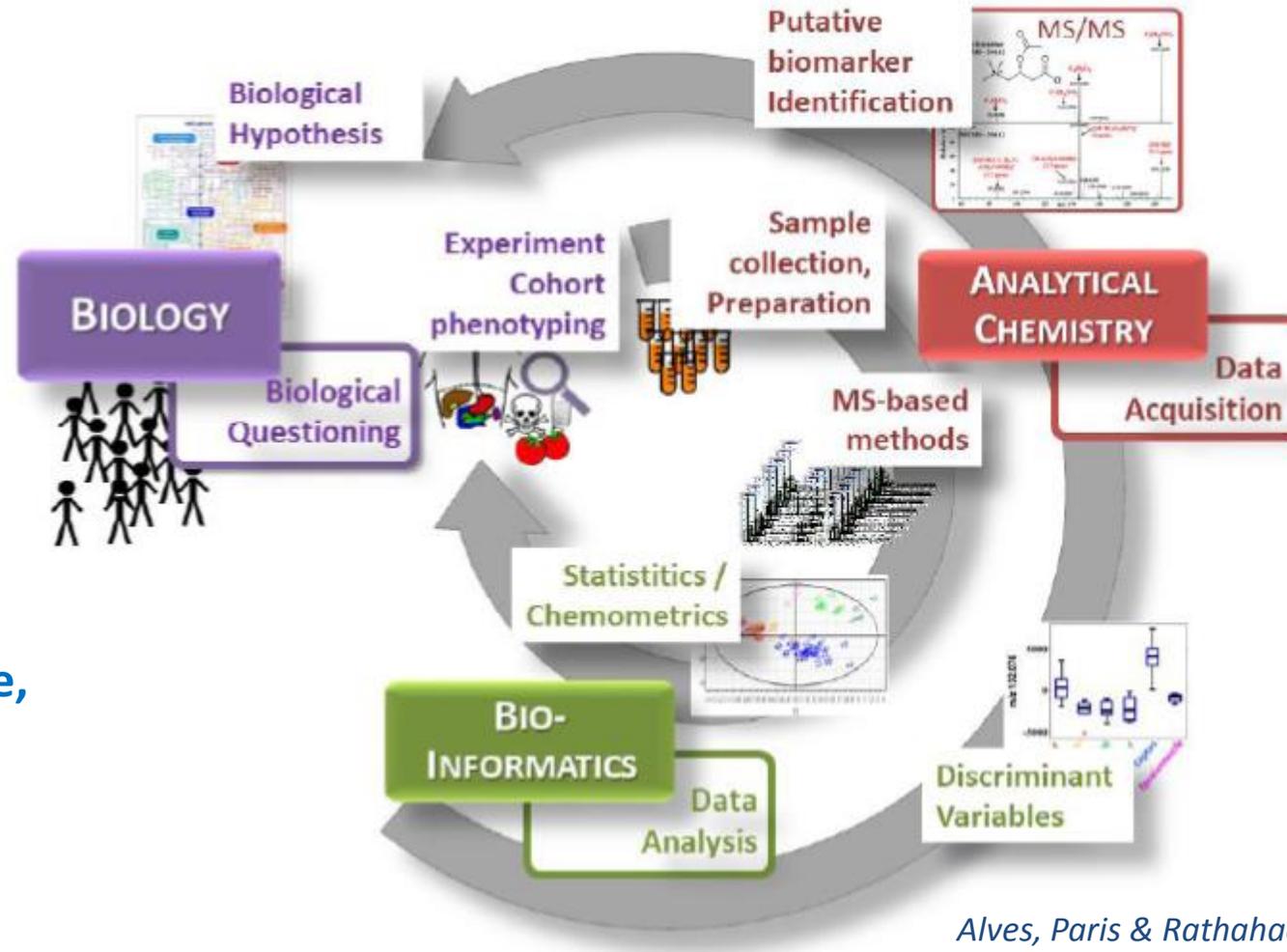
**Analyses des données selon la question posée**

- ✓ Analyses **multivariées non supervisées** (ACP; structuration des données, ech. aberrants)
- ✓ Analyses **multivariées supervisées** (PLS-DA & OPLS-DA)  
=> Identification de variables discriminantes selon la question posée
- ✓ Analyses **univariées** (test correctifs; variables >> individus):  
Visualisation des individus / variable

**=> biomarqueurs pertinents? => identification...**

**2-5 % des variables détectées sont identifiées...!!!**

# Comment réaliser une analyse métabolomique?



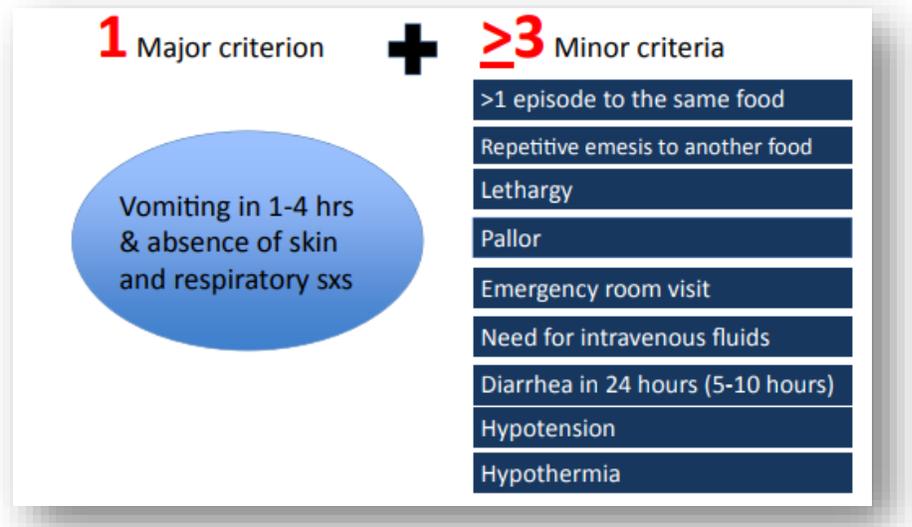
Approche globale puissante,  
multidisciplinaire  
dans l'ère des « big data »

Alves, Paris & Rathahao-Paris;  
Advances in Clinical Chemistry

# Apport de la métabolomique en allergologie pédiatrique?



# Métabolomique et aide au diagnostic dans le cas des allergies non IgE médiées, les SEIPA (FPIES)



Pas d'**outil diagnostic** biologique  
Dosage des IgE et tests cutanés immédiats (SPT) ou retardés (atopy patch test) négatifs  
Mauvais diagnostic et **mauvaise prise** en charge des patients

Nowak-Wegrzyn A, Chehade M, Groetch ME, Spergel JM, Wood RA, Allen K, et al. International consensus guidelines for the diagnosis and management of food protein-induced enterocolitis syndrome: executive summary—Workgroup Report of the Adverse Reactions to Foods Committee, American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. J Allergy Clin Immunol 2017;139:1111-26.e4.

# Métabolomique et aide au diagnostic dans le cas des allergies non IgE médiées, les SEIPA (FPIES)

Comparaison d'une population **d'allergiques au LdV IgE dépendant / SEIPA**

- Recrutement des patients au moment d'un test de réintroduction du lait de vache (SEIPA, n=9) ou du LdV cuit (IgE, n=9 / 3 devenus tolérant))
- Prélèvement de **10 ml de sang, avant le TPO**

**Tous sont sous régime d'exclusion du lait**

# Métabolomique et aide au diagnostic dans le cas des allergies non IgE médiées, les SEIPA (FPIES)

Comparaison d'une population d'allergiques au LdV IgE dépendant / SEIPA

- Recrutement des patients au moment d'un test de réintroduction du lait de vache (SEIPA, n=9) ou du LdV cuit (IgE, n=9 / 3 devenus tolérant))
- Prélèvement de **10 ml de sang, avant le TPO**

**Tous sont sous régime d'exclusion du lait**



**Absence de réponse humorale spécifique (IgE, IgG, IgA) qui permettrait un diagnostic fiable chez les SEIPA**

**Pas de réponse cellulaire spécifique au niveau systémique**

Mise en évidence de **cellules T activées & d'ILC dans la muqueuse intestinale**, dont la spécificité et le rôle dans la pathogénèse reste à déterminer – résultats à confirmer sur des cohortes plus importantes... et qui n'aident pas au diagnostic!

# Métabolomique et aide au diagnostic dans le cas des allergies non IgE médiées, les SEIPA (FPIES)

## Comparaison d'une population d'allergiques au LdV IgE dépendant / SEIPA

- Recrutement des patients au moment d'un test de réintroduction du lait de vache (SEIPA, n=9) ou du LdV cuit (IgE, n=9 / 3 devenus tolérant))
- Prélèvement de **10 ml de sang, avant le TPO**

**Tous sont sous régime d'exclusion du lait**



**Absence de réponse humorale spécifique (IgE, IgG, IgA) qui permettrait un diagnostic fiable chez les SEIPA**

**Pas de réponse cellulaire spécifique au niveau systémique**

Mise en évidence de **cellules T activées & d'ILC dans la muqueuse intestinale**, dont la spécificité et le rôle dans la pathogénèse reste à déterminer – résultats à confirmer sur des cohortes plus importantes... et qui n'aident pas au diagnostic!



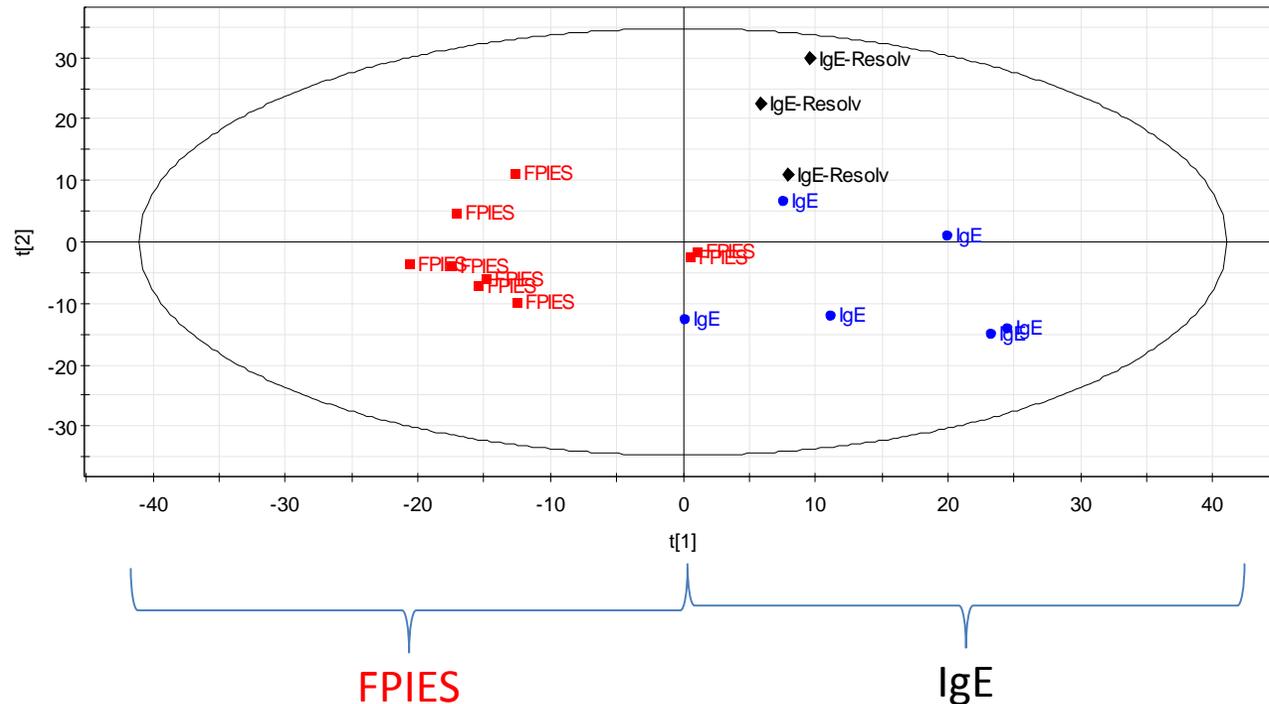
**Analyses métabolomiques sur le plasma**



# Métabolomique et aide au diagnostic dans le cas des allergies non IgE médiées, les SEIPA (FPIES)

## Analyses métabolomiques sur le plasma

Analyse discriminantes des variables (PLS-DA)



Les patients atteints de CM-FPIES se distinguent des IgE-CMA dans leur **métabolome plasmatique global**  
⇒ **23 métabolites identifiés (lipides, acides aminés)**, permettant de discriminer entre allergies au lait IgE-médiée et FPIES

- pistes pour l'identification d'une **signature spécifique**, qui pourrait aider au diagnostic
- lien entre dérégulation métabolique et immunitaire

Adel-Patient et al. *Clin Transl Allergy* (2018) 8:38  
<https://doi.org/10.1186/s13601-018-0224-9>

Clinical and  
Translational Allergy

RESEARCH

Open Access



## Deep analysis of immune response and metabolic signature in children with food protein induced enterocolitis to cow's milk

Karine Adel-Patient<sup>1\*</sup>, Guillaume Lezmi<sup>2</sup>, Florence Anne Castelli<sup>1</sup>, Sibylle Blanc<sup>2,4</sup>, Hervé Bernard<sup>1</sup>, Pascale Soulaïnes<sup>2</sup>, Pascale Dumond<sup>3</sup>, Sandrine Ah-Leung<sup>1</sup>, Florence Lageix<sup>2</sup>, Delphine de Boissieu<sup>2</sup>, Naima Cortes-Perez<sup>1</sup>, Stéphane Hazebrouck<sup>1</sup>, François Fenaille<sup>1</sup>, Christophe Junot<sup>1</sup> and Christophe Dupont<sup>2</sup>

# Analyses métabolomiques: identification d'une signature spécifique de l'allergie alimentaire et de sa sévérité

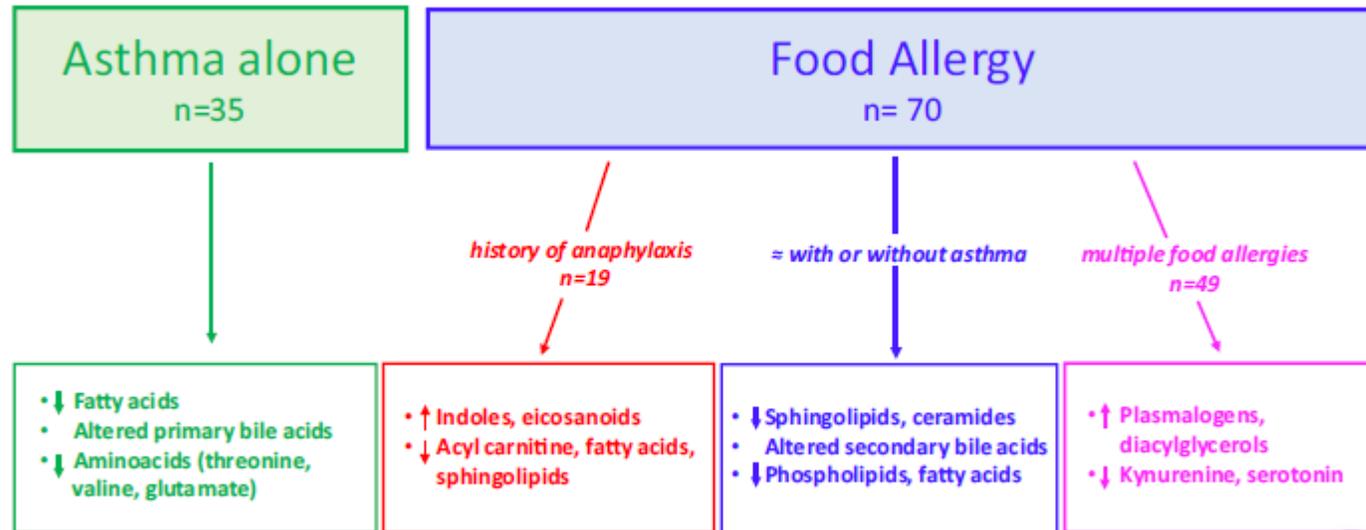
## Untargeted metabolomic profiling identifies disease-specific signatures in food allergy and asthma

Elena Crestani, MD, MS,<sup>a</sup> Hani Harb, PhD,<sup>a</sup> Louis-Marie Charbonnier, PhD,<sup>a</sup> Jonathan Leirer, MS,<sup>b</sup> Alison Motsinger-Reif, PhD,<sup>c</sup> Rima Rachid, MD,<sup>a</sup> Wanda Phipatanakul, MD, MS,<sup>a</sup> Rima Kaddurah-Daouk, PhD,<sup>d</sup> and Talal A. Chatila, MD, MSc<sup>a</sup> *Boston, Mass, and Raleigh and Durham, NC*

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.10.014>

	Asthmatic children (n = 35)	Children with FA (n = 35)	Children with FA and asthma (n = 35)	Control subjects (n = 20)
Age (y)	7.5*	4.1*	5.5	6.3

Métabolome sur sérum



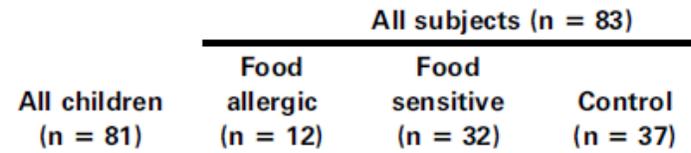
# Analyses métabolomique sur fécès: micro-environnement intestinal et allergie alimentaire

## Intestinal microbial-derived sphingolipids are inversely associated with childhood food allergy

Kathleen Lee-Sarwar, MD<sup>a</sup>

Available online May 2, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.04.016>



Collecte des selles entre 3-6 mois



Métabolomique + composition du microbiote (16sRNA)

## Cohorte VDAART

AA à 3 ans

rapportée par les parents  
+ IgE spécifiques à  $\geq 1$  aliment

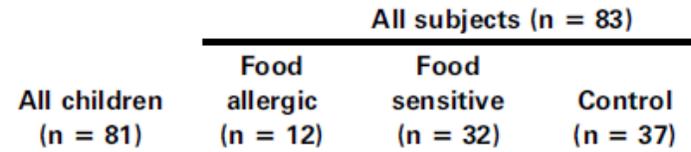
# Analyses métabolomique sur fécès: micro-environnement intestinal et allergie alimentaire

## Intestinal microbial-derived sphingolipids are inversely associated with childhood food allergy

Kathleen Lee-Sarwar, MD<sup>a</sup>

Available online May 2, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.04.016>



## Cohorte VDAART

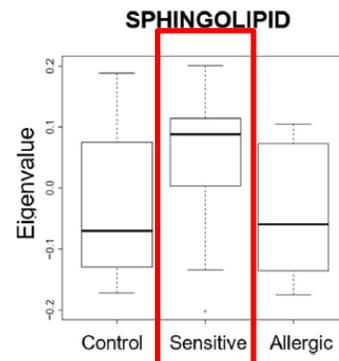
AA à 3 ans

rapportée par les parents  
+ IgE spécifiques à  $\geq 1$  aliment

Collecte des selles entre 3-6 mois

Métabolomique + composition du microbiote (16sRNA)

29 modules de métabolites corrélés entre eux,  
3 différents selon les groupes (acides biliaires, diacylglycerol & sphingolipids)



Protection du phénotype  
clinique d'allergie?

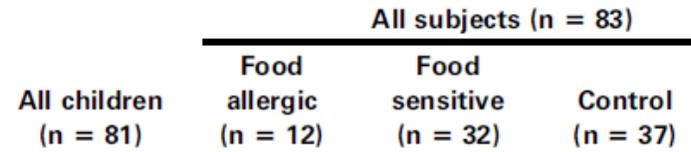
# Analyses métabolomique sur fécès: micro-environnement intestinal et allergie alimentaire

## Intestinal microbial-derived sphingolipids are inversely associated with childhood food allergy

Kathleen Lee-Sarwar, MD<sup>a</sup>

Available online May 2, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.04.016>



## Cohorte VDAART

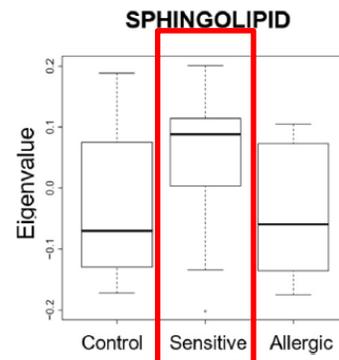
AA à 3 ans

rapportée par les parents  
+ IgE spécifiques à ≥1 aliment

Collecte des selles entre 3-6 mois

Métabolomique + composition du microbiote (16sRNA)

29 modules de métabolites corrélés entre eux,  
3 différents selon les groupes (acides biliaires, diacylglycerol & sphingolipids)



Protection du phénotype clinique d'allergie?

OTU ID	Taxa	Association with sphingolipid module		Association with food allergy (vs food sensitization)	
		Log <sub>2</sub> fold change	P <sub>BH</sub> value	Log <sub>2</sub> fold change	P value
577170	<i>Bacteroides</i> unidentified species	10.1	.002	-3.6	.01
184753	<i>Bacteroides</i> unidentified species	9.2	.01	-5.2	<.001
3472078	<i>Bacteroides</i> unidentified species	8.9	.01	-3.3	.04
182157	<i>Bacteroides</i> unidentified species	7.8	.02	-2.9	.03
188735	<i>Bacteroides</i> unidentified species	7.5	.02	-3.3	.04
4354042	<i>Bacteroides</i> unidentified species	7.1	.03	-3.4	.03

Les métabolites lipidiques de *Bacteroidetes* (*a-GalCer* de *B. fragilis*) participeraient à l'activation locale des iNKT, protégeant du déclenchement de l'allergie alimentaire chez les enfants sensibilisés  
Sous représentés chez les enfants nés par césarienne

# Analyses métabolomiques: identification des médiateurs de l'effet protecteur d'une supplémentation en LCPUFA sur l'asthme

## Cohorte COPSA

Supplémentation 2.4 g /jour n-3 LCPUFA (EPA & DHA) pendant dernier trimestre de grossesse et 1 semaine post partum

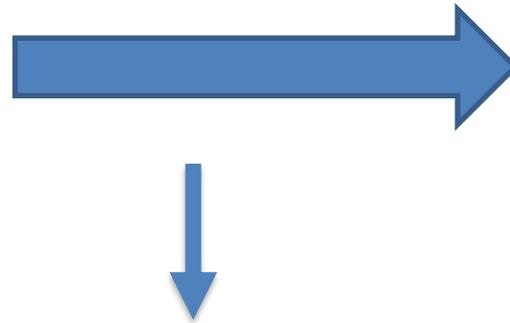


Réduction du risque d'asthme à 5 ans de 31%

# Analyses métabolomiques: identification des médiateurs de l'effet protecteur d'une supplémentation en LCPUFA sur l'asthme

## Cohorte COPSA

Supplémentation 2.4 g /jour n-3 LCPUFA (EPA & DHA) pendant dernier trimestre de grossesse et 1 semaine post partum



Réduction du risque d'asthme à 5 ans de 31%

## Analyse métabolomique non ciblée des plasmas collectés à 4-8 mois

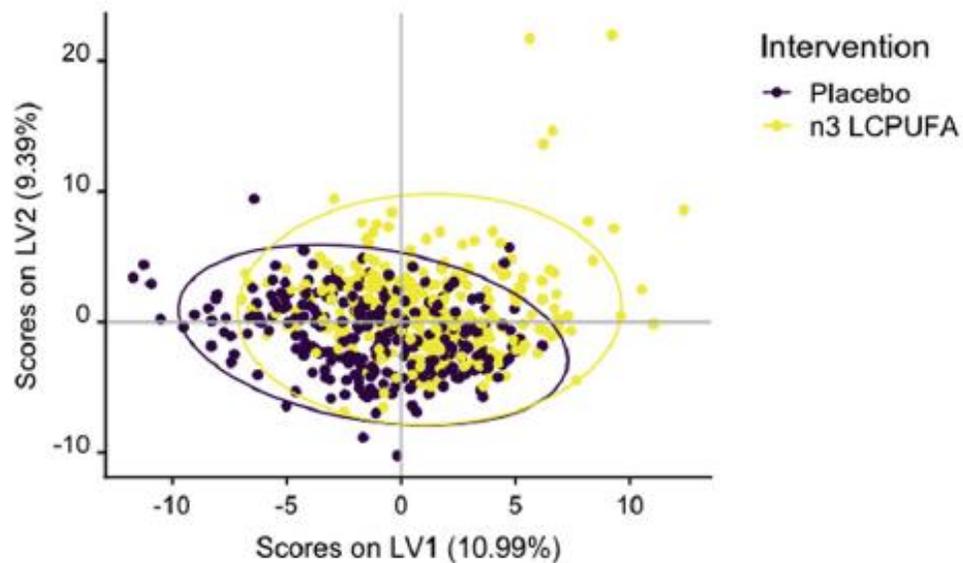


Research paper

Fish-oil supplementation in pregnancy, child metabolomics and asthma risk



Daniela Rago<sup>a</sup>, Morten A. Rasmussen<sup>a,b</sup>, Kathleen A. Lee-Sarwar<sup>c</sup>, Scott T. Weiss<sup>c</sup>, Jessica Lasky-Su<sup>c</sup>, Jakob Stokholm<sup>a,d</sup>, Klaus Bønnelykke<sup>a</sup>, Bo L. Chawes<sup>a,\*</sup>, Hans Bisgaard<sup>a,\*</sup>

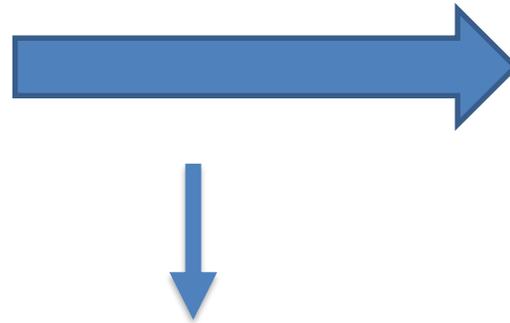


- ↘ Voies métaboliques n-6 LCPUFA & tryptophane
- ↗ Voies métaboliques tyrosine & glutamate

# Analyses métabolomiques: identification des médiateurs de l'effet protecteur d'une supplémentation en LCPUFA sur l'asthme

## Cohorte COPSA

Supplémentation 2.4 g /jour n-3 LCPUFA (EPA & DHA) pendant dernier trimestre de grossesse et 1 semaine post partum



Réduction du risque d'asthme à 5 ans de 31%



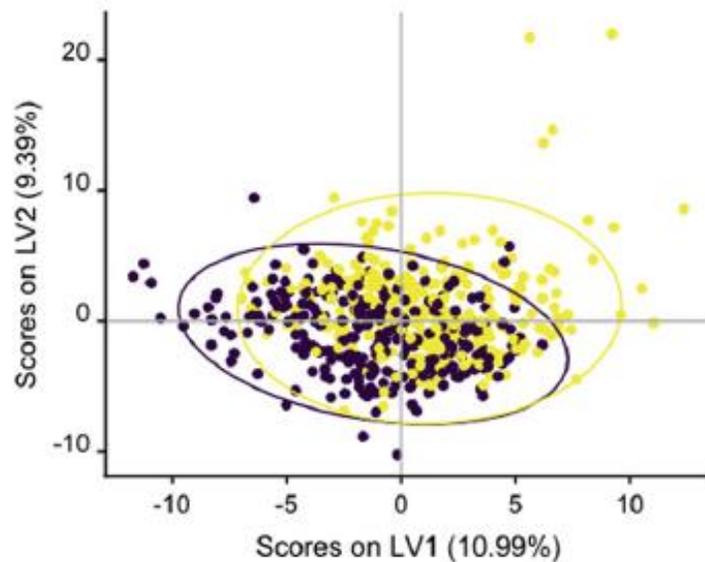
Research paper

Fish-oil supplementation in pregnancy, child metabolomics and asthma risk



Daniela Rago<sup>a</sup>, Morten A. Rasmussen<sup>a,b</sup>, Kathleen A. Lee-Sarwar<sup>c</sup>, Scott T. Weiss<sup>c</sup>, Jessica Lasky-Su<sup>c</sup>, Jakob Stokholm<sup>a,d</sup>, Klaus Bønnelykke<sup>a</sup>, Bo L. Chawes<sup>a,\*</sup>, Hans Bisgaard<sup>a,\*</sup>

## Analyse métabolomique non ciblée des plasmas collectés à 4-8 mois



Intervention

- Placebo
- n3 LCPUFA

↘ Voies métaboliques n-6 LCPUFA & tryptophane

↗ Voies métaboliques tyrosine & glutamate

Association entre profil métabolique lié à la supplémentation & réduction de l'asthme à 5 ans

Médiation de 24% de l'effet par ces modifications métaboliques

=> **Hypothèses mécanistiques** / métabolites identifiés



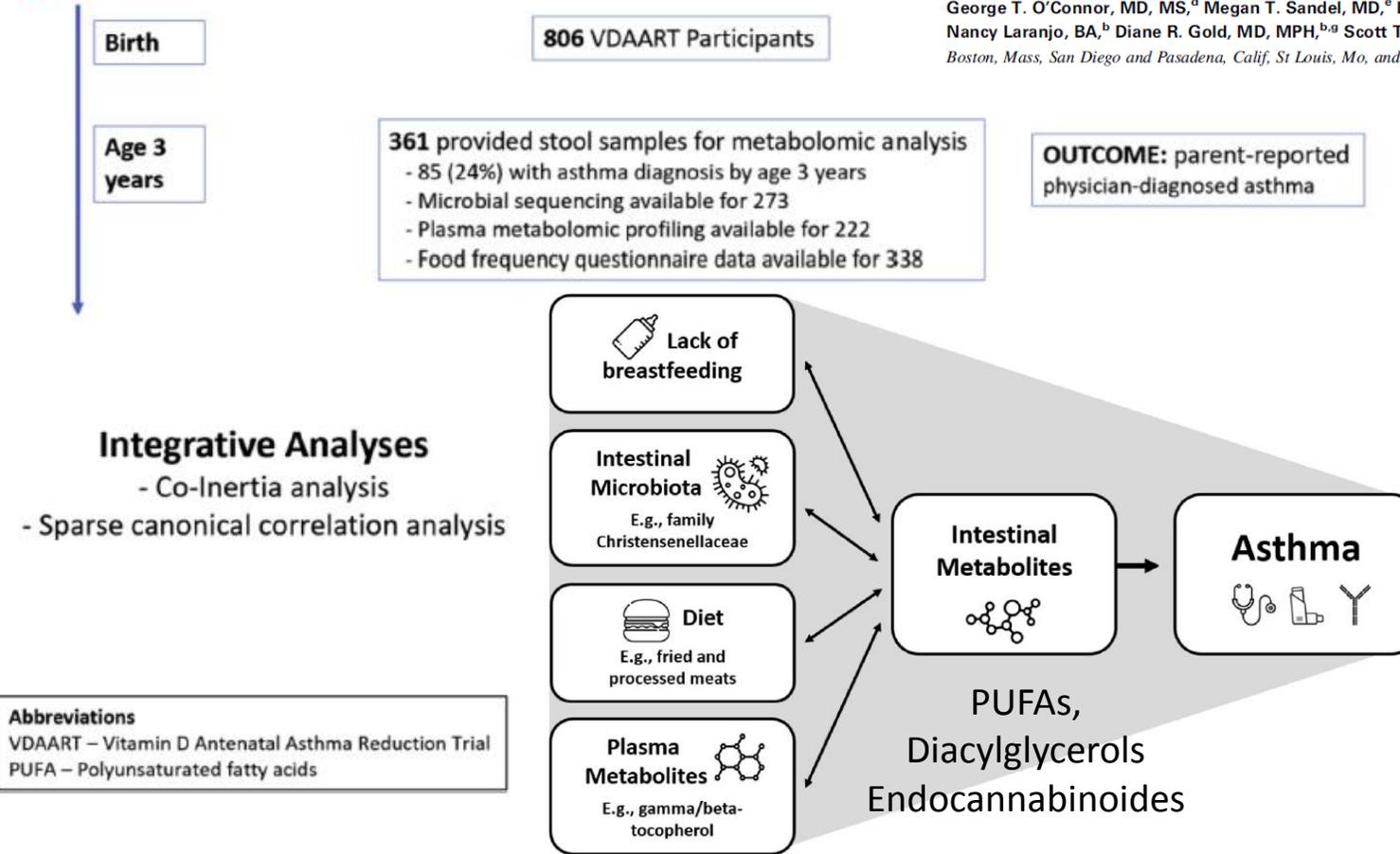
# Analyse intégrée du microenvironnement intestinal dans le contexte de l'asthme



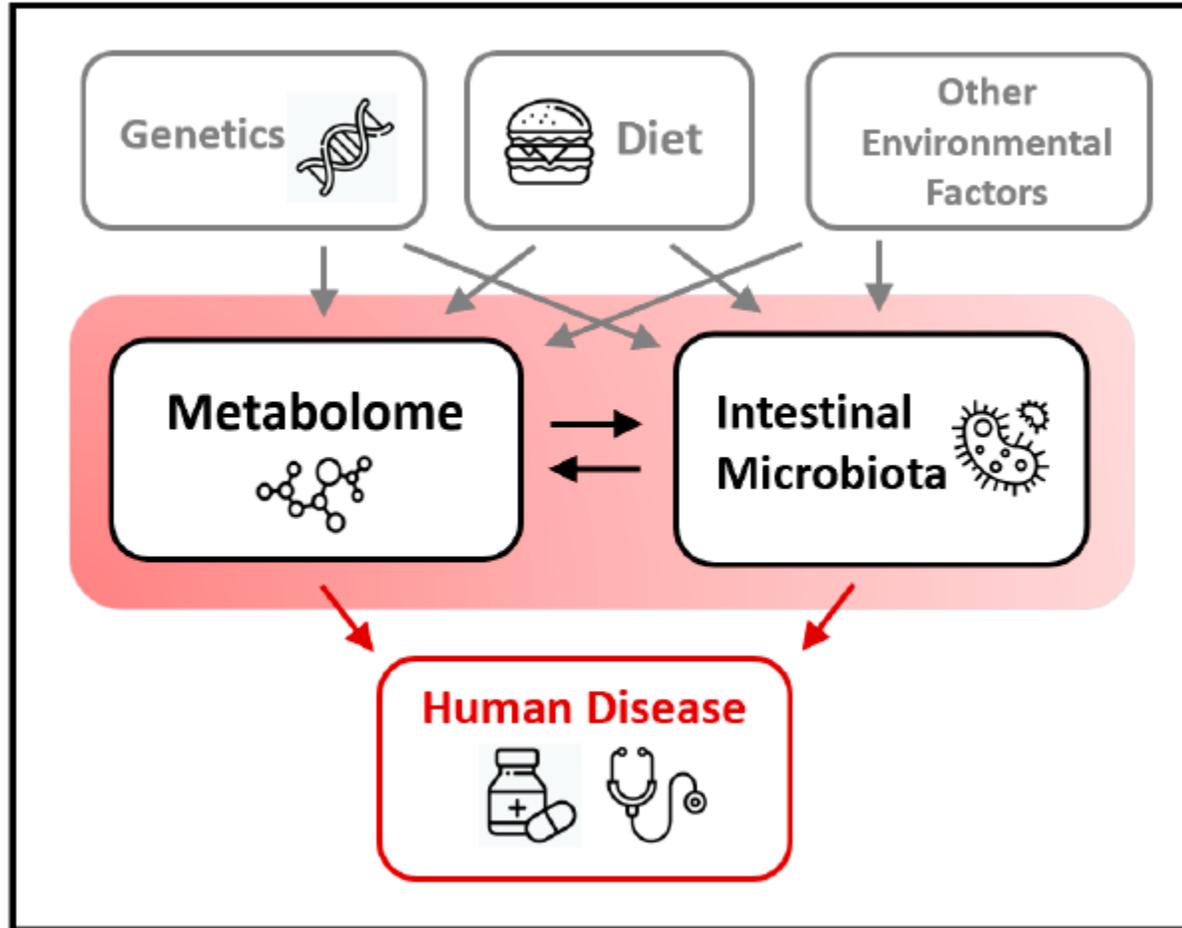
## Integrative Analysis of the Intestinal Metabolome of Childhood Asthma

Kathleen A. Lee-Sarwar, MD, MS,<sup>a,b</sup> Rachel S. Kelly, PhD,<sup>b</sup> Jessica Lasky-Su, ScD,<sup>b</sup> Robert S. Zeiger, MD, PhD,<sup>c</sup> George T. O'Connor, MD, MS,<sup>d</sup> Megan T. Sandel, MD,<sup>e</sup> Leonard B. Bacharier, MD,<sup>f</sup> Avraham Beigelman, MD, MSCI,<sup>f</sup> Nancy Laranjo, BA,<sup>b</sup> Diane R. Gold, MD, MPH,<sup>b,g</sup> Scott T. Weiss, MD, MS,<sup>b</sup> and Augusto A. Litonjua, MD, MPH<sup>b</sup>  
 Boston, Mass, San Diego and Pasadena, Calif, St Louis, Mo, and Rochester, NY

JACI 2019



# Analyse intégrée du microenvironnement intestinal dans le contexte des maladies allergiques



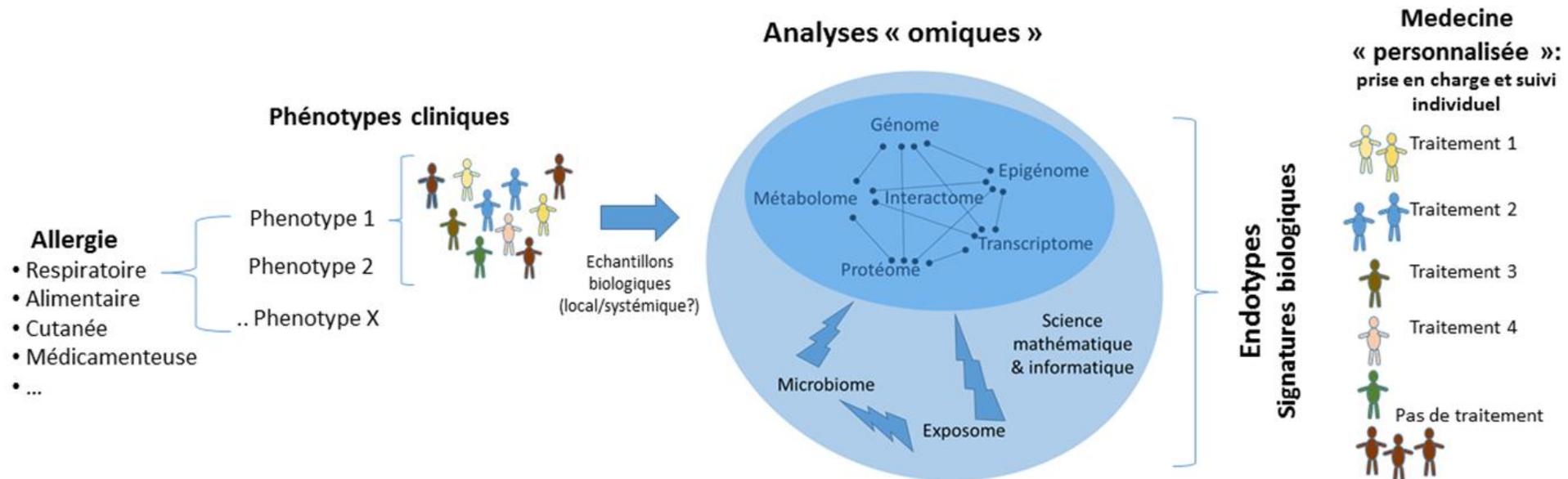
Environnement fermier  
Mode de naissance  
Allaitement

# Conclusion:

**Métabolomique** = Outil très puissant pour un **phénotypage moléculaire fin, en lien avec la clinique**, et pouvant répondre à différents objectifs

- ✓ compréhension des mécanismes
- ✓ identification des médiateurs
- ✓ définition des endotypes & stratification des patients
- ✓ prédiction, diagnostic, réponse au traitement,...

Intégration de métadonnées cliniques, immunologiques, ...et autres omiques!



# Conclusion:

Mais, en amont...

## ❖ Définir et cadrer la question et sélectionner les populations d'études:

- ✓ connaissance des facteurs potentiellement confondants (age, sexe, traitement en cours et passé, IMC; exposition environnementale – alcool, tabac...): **variabilité individuelle** du métabolome liée à d'autres facteurs que celle induite par le facteur analysé
- ✓ **grande cohorte** nécessaire (dans l'idéal,  $n > 100$ /groupe!)
- ✓ sélection de population relativement homogène, bien stratifiés cliniquement, allergiques & contrôles
- ✓ cohorte identification + cohorte de validation des biomarqueurs

## ❖ Equipement lourd (et cher!), expertises technique et analytique

Séquence d'acquisition, effets batch, encrassement des sources.....

## ❖ Intégration et modélisation des données compliquées!

Données métabolomiques différentes selon appareillage & traitement de l'échantillon

Annotation/identification

**Analyses statistiques** poussées

$n$  variables  $\gg$   $p$  individus (risque sur-modélisation)

intégration des facteurs confondants et des tests multiples (FDR, ...)

Merci de votre attention!

