



Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com

REVUE FRANÇAISE
D'**Allergologie**

Revue française d'allergologie xxx (2016) xxx–xxx

Revue Générale

Biomarqueurs associés au contrôle de l'asthme allergique de l'enfant

Biomarkers associated with allergic asthma control in children

F. Amat^{a,b,c,*}, M. Bourgoïn-Heck^{a,b}, N. Lambert^{a,c}, J. Just^{a,b,c}

^a Service d'allergologie pédiatrique, centre de l'asthme et des allergies, hôpital d'Enfants–Armand-Trousseau, Assistance publique–Hôpitaux de Paris, 75012 Paris, France

^b UPMC université Paris 06, Sorbonne universités, 75013 Paris, France

^c Équipe EPAR, Institut Pierre-Louis d'épidémiologie et de santé publique, UMR_S1136, Inserm, 75012 Paris, France

Reçu le 18 octobre 2016 ; accepté le 19 octobre 2016

Résumé

L'asthme allergique nécessite une évaluation clinique régulière afin de proposer une prise en charge thérapeutique adaptée et personnalisée. Différents biomarqueurs corrélés au non contrôle de l'asthme et à l'activité inflammatoire sous-jacente ont été étudiés. Parmi eux, l'éosinophilie pulmonaire évaluée par la FeNO et l'éosinophilie sanguine mesurée soit directement soit par le taux sérique d'ECP semblent, surtout lorsqu'elles sont élevées de façon concomitante, le reflet d'une inflammation systémique plus difficile à maîtriser, mais qui serait sensible à l'action anti-inflammatoire globale de l'omalizumab.

© 2016 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Asthme ; Non contrôle ; Allergique ; Enfant ; Biomarqueurs

Abstract

Frequent clinical evaluation is needed in allergic asthma in order to propose personalized medicine. Various biomarkers linked to uncontrolled asthma and to inflammatory activity have been studied. Among them, pulmonary eosinophilia evaluated by FeNO and blood eosinophilia measured directly or via serum level of ECP, mostly if pooled together, seemed to reflect systemic inflammation sensitive to global anti-inflammatory action of omalizumab.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords : Asthma; Uncontrol; Allergic; Children; Biomarkers

1. Introduction

Les raisons pour lesquelles certains patients vont développer un asthme persistant sévère, difficile à traiter et moins sensible à l'action des corticostéroïdes inhalés ne sont pas encore bien élucidées [1]. Il est évidemment nécessaire dans ce cas d'éliminer des causes évidentes de non contrôle, comme la mauvaise observance, un environnement défavorable, l'exposition

aux allergènes et aux irritants, les problèmes psychologiques, ou la non-prise en charge de comorbidités aggravantes telles que l'obésité, la rhinite allergique ou le reflux gastro-œsophagien [2,3]. Toutefois, certains patients peuvent encore nécessiter une forte charge thérapeutique après exclusion ou prise en charge de ces facteurs aggravants, sans atteindre le contrôle de la maladie.

Indépendamment de ces causes, chez certains patients, l'asthme va rester mal contrôlé, faisant suggérer par certains auteurs l'idée d'un phénotype particulier d'asthme prédéterminé plutôt qu'une progression d'un asthme paucisymptomatique vers un asthme sévère non contrôlé [4]. Le concept de thérapie ciblée prend alors tout son sens, la réponse au traitement dépendant aussi du phénotype initial de l'asthme

* Auteur correspondant. Service d'allergologie, centre de l'asthme, hôpital Trousseau, 26, avenue du Dr-Netter, 75012 Paris, France.

Adresse e-mail : flore.amat@aphp.fr (F. Amat).

et du mécanisme d'action du médicament. Dans ce contexte, des marqueurs phénotypiques et physiopathologiques sont utiles, non seulement pour caractériser différentes populations de patients mais également pour fournir des informations pertinentes pour la décision thérapeutique, complémentaire de l'évaluation clinique habituelle du contrôle [3].

La recherche dans l'évaluation non invasive de l'inflammation bronchique a considérablement progressé au cours des 15 dernières années [5]. Un certain nombre de marqueurs candidats ont ainsi été développés et validés [6–8] et il y a des preuves indiscutables de leur apport en pratique clinique pour le monitoring des traitements anti-asthmatiques [9–12].

2. Rationnel physiopathologique : rôle des éosinophiles dans l'asthme allergique

Les éosinophiles sont des cellules circulantes appartenant à la lignée granulocytaire, impliquées dans la physiopathologie de l'asthme allergique. Une cascade inflammatoire médiée par les cytokines produites par les lymphocytes Th2 entraîne un recrutement des éosinophiles dans le poumon. Parmi les médiateurs, l'IL-5, l'IL-13, l'éotaxine, les cellules de Clara et le récepteur CC3 des chémokines (CCR3) semblent particulièrement impliqués. Une fois le recrutement effectué, les éosinophiles participent à la modulation de la réponse immunitaire [13]. En particulier, ils semblent avoir un rôle dans l'apparition du remodelage bronchique [13,14].

Chez l'enfant, l'asthme sévère non contrôlé sous fortes doses de corticoïdes inhalés est d'ailleurs pour certains plus volontiers lié à une inflammation bronchique de type éosinophilique, malgré un profil cytokinique différent de l'asthme sévère non contrôlé de l'adulte, comme l'ont montré Bossley et al. dans une cohorte d'enfants asthmatiques majoritairement allergiques [15].

Leur rôle important dans la physiopathologie de l'asthme allergique en a donc fait une cible particulière de recherche depuis plusieurs années.

3. L'éosinophilie sanguine

L'évaluation indirecte de l'inflammation bronchique dans l'asthme allergique par la numération des éosinophiles dans le sang périphérique est réalisée depuis longtemps en pratique clinique [16,17]. La mesure de l'éosinophilie périphérique est peu onéreuse et facilement accessible en routine.

L'éosinophilie sanguine semble relativement bien corrélée à l'éosinophilie pulmonaire chez l'adulte, comme l'ont montré récemment Simpson et al. (aire sous la courbe 0,82, $p=0,08$) [18], confirmant des résultats antérieurs [19,20] mais avec des seuils et des performances variables en fonction de la population concernée et de l'objectif clinique : asthme plus ou moins sévère [20], détection de l'asthme hyper-éosinophilique, prédiction ou évaluation de la réponse au traitement [19].

L'éosinophilie sanguine est corrélée chez l'adulte au contrôle de l'asthme. Ainsi, dans une étude récente menée dans une cohorte de 2392 patients asthmatiques, une éosinophilie

sanguine d'au moins 400/mm³ était associée à un risque plus élevé d'exacerbation et de recours aux bronchodilatateurs de secours dans l'année [21]. Les auteurs ont retrouvé des résultats similaires chez l'enfant [22]. Des résultats concordants ont été retrouvés dans une large cohorte de patients au Royaume-Uni. Dans cette étude de cohorte historique, les auteurs se sont en effet intéressés à la relation entre l'éosinophilie sanguine et les événements liés à l'asthme pendant un an. Dans cette cohorte de 130 248 patients adolescents et adultes suivis pour asthme en soins primaires, 20 929 (16 %) avaient une éosinophilie sanguine supérieure à 400/mm³. Durant l'année de suivi, ces patients avaient de façon significative plus d'exacerbations sévères et une chance plus faible d'obtention du contrôle des symptômes (OR 0,74 ; intervalle de confiance 0,72–0,77). Il existait une relation entre l'augmentation des éosinophiles sériques et la fréquence des exacerbations [23].

Toutefois, l'éosinophilie sanguine chez l'enfant n'est pas toujours corrélée à l'intensité de l'activité inflammatoire bronchique et au contrôle de l'asthme, dans la mesure où certains auteurs ont mis en évidence un certain nombre de faux négatifs. Ainsi, dans une cohorte européenne de 88 enfants présentant un asthme persistant sévère non contrôlé, 84 % des enfants ayant une éosinophilie sanguine inférieure à 100/mm³ avaient une éosinophilie pulmonaire (déterminée par lavage broncho-alvéolaire ou biopsie bronchique) significative, alors que tous avaient un asthme non contrôlé [24]. Utilisé de façon isolée, l'éosinophilie sanguine ne serait donc pas un biomarqueur suffisant de l'activité inflammatoire bronchique.

4. Éosinophilie de l'expectoration induite

L'intérêt de l'analyse des crachats recueillis par expectoration induite a montré son intérêt chez l'adulte, avec une technique de recueil validée [25]. Un pourcentage d'éosinophiles dans l'expectoration supérieur à 2 % semble bien corrélé à l'inflammation bronchique [4]. Un taux anormal est retrouvé dans 66 à 100 % des cas dans des cohortes de patients adultes asthmatiques [26]. Plus particulièrement, un monitoring de l'éosinophilie dans l'expectoration induite paraît utile dans la prédiction du risque d'exacerbation à l'arrêt des corticoïdes inhalés [27]. La normalisation du compte d'éosinophiles dans le sputum semble être un objectif intéressant dans la prise en charge thérapeutique de l'asthme sévère non contrôlé, puisque dans une étude réalisée chez l'adulte, elle était associée à une réduction du risque d'exacerbations sévères et d'hospitalisations [9]. Ces résultats ont été confirmés dans une autre cohorte de patients adultes atteints d'asthme modéré à sévère et en font un outil potentiellement utile dans l'adaptation thérapeutique [11].

Toutefois, elle nécessite une expertise technique qui la rend difficilement accessible en routine [4]. De plus, la réalisation d'une expectoration induite n'est pas possible chez l'enfant avant l'âge de 8 ans [4], et même au-delà de cet âge, cette technique peut être difficile à réaliser [28]. Covar et al. dans la cohorte Childhood Asthma Management Program-CAMP rapportaient 76 % de prélèvements analysables chez des enfants âgés de 11 à 15 ans. Neuf des 117 enfants ont présenté un

bronchospasme lié à l'induction de l'expectoration ; il s'agissait d'enfants ayant un asthme plus sévère, soulevant la question de la faisabilité et de la tolérance de ce type d'examen chez les enfants ayant un asthme sévère non contrôlé [29]. Les résultats de l'étude de Fleming et al. ont de plus remis en question depuis la stabilité des phénotypes liés à l'éosinophilie dans le sputum chez l'enfant asthmatique, puisqu'ils n'ont retrouvé aucune corrélation entre la sévérité, le contrôle de l'asthme, la pression thérapeutique, la comorbidité atopique et le taux d'éosinophiles dans l'expectoration induite [30].

5. Fraction exhalée de l'oxyde nitrique (FeNO)

Le NO est une petite molécule produite par les cellules sécrétantes des endothélia vasculaires et respiratoires [31]. La FeNO est augmentée chez les patients asthmatiques [32–34], en rapport avec une sur-expression de l'enzyme NO-synthase [35,36]. Le NO peut être produit par les cellules endo- et épithéliales des voies aériennes et par les cellules de l'inflammation. Bien que la fonction précise du NO dans la pathologie respiratoire ne soit pas encore complètement élucidée, il est dorénavant bien établi que la FeNO est un marqueur corrélé à l'inflammation à éosinophiles des voies aériennes de l'asthme allergique [34,37–39]. Son taux diminue sous l'action des corticoïdes inhalés [34,40,41]. D'autre part, l'augmentation de la FeNO était associée à la perte de contrôle des symptômes à l'arrêt du traitement de fond dans une étude de cohorte néo-zélandaise d'adultes toute sévérité confondue de l'asthme [42], ce qui a également été retrouvé dans des cohortes pédiatriques [43,44]. Des taux plus élevés sont toutefois retrouvés chez les patients ayant un asthme sévère non contrôlé sous traitement par rapport aux patients ayant un asthme plus léger, contrôlé sous traitement, faisant proposer la mesure du FeNO pour le monitoring non invasif de l'inflammation bronchique [45].

Des résultats similaires ont été retrouvés chez le nourrisson, ainsi la FeNO serait plus élevée chez les nourrissons ayant un asthme non contrôlé sous traitement versus un groupe témoin d'enfants ayant un asthme contrôlé [46]. Une étude menée récemment dans une cohorte du Trousseau Asthma Program (TAP) a confirmé ces résultats, suggérant que les valeurs de FeNO chez les nourrissons asthmatiques sont fortement influencées par le contrôle et la sévérité de la maladie, puis par l'atopie [47]. De même chez les enfants plus grands, une FeNO plus élevée était retrouvée de façon persistante en cas de non contrôle des symptômes après traitement maximal dans une cohorte de 46 enfants ayant un asthme persistant sévère, majoritairement atopiques (89 %) [48].

Toutefois, d'autres auteurs avancent des résultats plus nuancés [27,49–52], probablement en raison des influences multiples auxquelles est soumise la mesure : intensité du traitement par corticoïdes, exposition au tabac, surface épithéliale et possiblement sexe du patient [53]. Ainsi dans une étude suédoise récente, une FeNO élevée était associée à un défaut de contrôle de l'asthme et à une hyper-réactivité bronchique plus importante que lorsqu'elle était associée à une éosinophilie importante [54].

Il semblerait in fine que la mesure de la FeNO et de l'éosinophilie au cours de la prise en charge seraient

complémentaires, les patients ayant des niveaux élevés de ces deux paramètres ayant un asthme plus sévère reflétant une maladie plus systémique sans doute plus difficile à contrôler [52,54–56] et ce, également chez l'enfant [57]. La mesure de la FeNO ne doit donc pas être considérée de façon isolée pour évaluer le contrôle de l'asthme, mais plutôt de façon combinée aux autres outils d'évaluation [58].

6. Analyse du condensat exhalé

L'acidification endogène des voies aériennes peut être mesurée dans le condensat exhalé. La diminution du pH mesuré dans le condensat est fortement liée à l'activité de l'inflammation sous-jacente et est influencée par le stress oxydatif et les produits issus du métabolisme du NO [59]. Une altération de la balance oxydants/anti-oxydants est associée à l'obstruction bronchique [60]. Les acides uriques semblent être des anti-oxydants prépondérants dans les sécrétions nasales [61], mesurables également dans le condensat exhalé. Une étude récente menée dans une cohorte d'enfants asthmatiques a montré un taux d'acides uriques dans le condensat significativement plus bas chez les enfants ayant un asthme non contrôlé par rapport à ceux dont l'asthme était contrôlé [61], ce qui pourrait en faire un biomarqueur intéressant dans l'évaluation du contrôle. Toutefois la spécificité de liaison à l'atopie de ce marqueur n'était pas clairement décrite, bien que la majorité des patients inclus soit sensibilisée.

7. Autres molécules liées aux éosinophiles

7.1. Protéine cationique des éosinophiles : ECP

L'ECP est une protéine sécrétée par les éosinophiles, qui semble jouer un rôle central dans la réponse allergique [62]. Plusieurs études anciennes ont corrélé les taux sériques d'ECP avec le degré d'inflammation à éosinophiles, aussi l'ECP pourrait être un biomarqueur indirect de l'activité des éosinophiles [63–65]. Ainsi, Prehn et al. ont montré, chez l'enfant, que les taux sériques d'ECP étaient plus élevés chez les asthmatiques et étaient corrélés à l'intensité de la symptomatologie clinique, à la multiplicité de la sensibilisation allergénique, et qu'ils étaient le reflet de l'éosinophilie sanguine [64]. Niimi et al. sont allés plus loin en montrant, chez l'adulte cette fois-ci, que le taux sérique d'ECP était également en rapport avec l'infiltration éosinophilique dans les tissus pulmonaires [65]. Les taux sériques d'ECP augmentent en période d'exacerbation et sont sensibles à l'action des corticoïdes oraux [66]. Dans une étude récente menée chez 339 adultes asthmatiques, des taux élevés simultanément d'ECP sérique et de FeNO étaient associés à un risque plus élevé d'exacerbations [67]. Finalement, la mesure de l'ECP sérique serait substituable à l'éosinophilie sanguine, et donc un marqueur similaire reflète de l'inflammation systémique [52].

7.2. Neurotoxine dérivée des éosinophiles : EDN ou EPX

L'EDN est elle aussi une protéine issue de la dégranulation des éosinophiles. Elle a des propriétés biochimiques proches de

l'ECP notamment sur le relargage d'histamine et la stimulation de l'expression de certains récepteurs des cellules épithéliales, mais ne semble pas avoir d'effet cytotoxique [68]. Ses taux sériques semblent corrélés à l'atopie, mais également à la sévérité de l'asthme [69,70], peut-être de façon plus discriminante que l'ECP [70]. Toutefois cette protéine reste peu étudiée à ce jour et une validation de ses performances dans des études plus larges est nécessaire.

7.3. Périostine

La périostine, protéine de la matrice extracellulaire induite par l'IL-4 et l'IL-13 dans les cellules de l'épithélium respiratoire et les fibroblastes, a un rôle dans la formation de la fibrose épithéliale et l'infiltration tissulaire par les éosinophiles [71,72]. Le dosage de la périostine sérique a été proposé comme biomarqueur de l'asthme allergique en rapport avec l'intensité de l'inflammation Th2 [72]. Des taux élevés de périostine sérique sont corrélés avec l'éosinophilie pulmonaire [73] et des paramètres moins bons de la fonction respiratoire [74] et sont prédictifs de la réponse aux corticoïdes inhalés [75,76], mais également à l'omalizumab [77] ou au lébrikizumab (anticorps anti-IL-13). Un déclin accéléré de la fonction respiratoire est constaté pour des taux élevés de périostine sérique [78]. La périostine est facilement mesurable dans la circulation sanguine, mais son manque de spécificité du fait de sa production possible par d'autres tissus que le poumon [71,79] et de l'influence de paramètres environnementaux [79,80] en limite les applications [81]. De plus, il semble que ses performances prédictives chez le jeune enfant soient plus nuancées ; par exemple, Konradsen et al. n'ont retrouvé aucune différence entre les taux sériques de périostine et la sévérité de l'asthme, ni entre les taux sériques de périostine et les autres marqueurs de l'inflammation locale (FeNO) ou systémique (IgE totales, éosinophilie sanguine) [57]. Un faible écart entre les taux observés chez les individus malades et les enfants sains [82] pourrait en être l'explication, avec une production osseuse plus importante chez l'enfant [72].

De ce fait, la mesure de la périostine dans le sputum pourrait être un marqueur encore plus intéressant car plus spécifique d'organe [81], en combinaison avec d'autres biomarqueurs. Ainsi, les patients ayant une FeNO augmentée et un taux de périostine élevé auraient un risque de déclin accéléré de leur fonction respiratoire et d'exacerbations plus fréquentes, et ce malgré l'utilisation d'un traitement de fond par corticoïdes inhalés à fortes doses [83].

8. Conclusion

Au sein du phénotype d'asthme persistant sévère allergique, donc chez les enfants ayant développé une forme systémique rare d'atopie, certains vont ainsi nécessiter une pression thérapeutique supplémentaire avec nécessité de recours à une biothérapie. Toutefois, nous l'avons vu, les biothérapies ciblées peuvent elles aussi obtenir un succès incomplet, reflétant probablement des mécanismes physiopathologiques différents à l'intérieur du phénotype sévère allergique non contrôlé. Les conséquences du non-contrôle de la maladie sur le patient, d'une part, le coût

particulièrement élevé de ces traitements, et, d'autre part, la durée non prédéfinie de ces traitements nécessite l'utilisation de biomarqueurs permettant d'aider le clinicien dans la décision thérapeutique.

Les études concernant les biomarqueurs sériques associés au contrôle ou non de l'asthme sévère restent rares, et cet axe de recherche nécessite d'être développé dans les prochaines années.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Chung KF. New treatments for severe treatment-resistant asthma: targeting the right patient. *Lancet Respir Med* 2013;1:592.
- [2] Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention; 2016. Disponible sur www.ginasthma.org. Consulté le 4 octobre 2016.
- [3] Taylor DR, Bateman ED, Boulet LP, Boushey HA, Busse WW, et al. A new perspective on concepts of asthma severity and control. *Eur Respir J* 2008;32:545–54.
- [4] Reddel HK, Taylor R, Bateman ED, Boulet LP, Boushey HA, Busse WW, et al. An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Asthma Control and Exacerbations: Standardizing Endpoints for Clinical Asthma Trials and Clinical Practice. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:59–99.
- [5] Scichilone N, Deykin A, Pizzichini E, Bellia V, Polosa R. Monitoring response to treatment in asthma management: food for thought. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1168–77.
- [6] Pavord ID, Pizzichini MM, Pizzichini E, Hargreave FE. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax* 1997;52:498–501.
- [7] American Thoracic Society, European Respiratory Society. 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;171:912–30.
- [8] Horváth I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005;26:523–48.
- [9] Green RH, Brighting CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:1715–21.
- [10] Chlumsky J, Striz I, Terl M, Vondracek J. Strategy aimed at reduction of sputum eosinophils decreases exacerbation rate in patients with asthma. *J Int Med Res* 2006;34:129–39.
- [11] Jayaram L, Pizzichini MM, Cook RJ, Boulet LP, Lemièrre C, Pizzichini E, et al. Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: effect on exacerbations. *Eur Respir J* 2006;27:483–94.
- [12] Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, Herbison GP, Taylor DR. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N Engl J Med* 2005;352:2163–73.
- [13] Possa SS, Leick EA, Prado CM, Martins MA, Tibério IFLC. Eosinophilic inflammation in allergic asthma. *Front Pharmacol* 2013;4:1–9.
- [14] Humbles AA, Lloyd CM, McMillan SJ, Friend DS, Xanthou G, McKenna EE, et al. A Critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science* 2004;305:1776–9.
- [15] Bossley CJ, Fleming L, Gupta A, Regamey N, Frith J, Oates T, et al. Pediatric severe asthma is characterized by eosinophilia and remodeling without TH2 cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:974–82.
- [16] Horn BR, Robin ED, Theodore J, Van Kessel A. Total eosinophil counts in the management of bronchial asthma. *N Engl J Med* 1975;292:1152–5.
- [17] Ulrik CS, Frederiksen J. Mortality and markers of risk of asthma death among 1075 outpatients with asthma. *Chest* 1995;108:10–5.

- [18] Simpson JL, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, Hodge S, James AL, et al. Periostin levels and eosinophilic inflammation in poorly-controlled asthma. *BMC Pulm Med* 2016;16:67.
- [19] Ortega H, Katz L, Gunsoy N, Keene O, Yancey S. Blood eosinophil counts predict treatment response in patients with severe eosinophilic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:825.
- [20] Fowler SJ, Tavernier G, Niven R. High blood eosinophil counts predict sputum eosinophilia in patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:822–4.
- [21] Zeiger RS, Schatz M, Li Q, Chen W, Khatri DB, Gossage D, et al. High blood eosinophil count is a risk factor for future asthma exacerbations in adult persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2014;2:741–50.
- [22] Zeiger RS, Schatz M, Li Q, Chen W, Khatri DB, Gossage D, et al. The association of blood eosinophil counts to future asthma exacerbations in children with persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2015;3:283–7.
- [23] Price DB, Campbell JD, Bleecker ER, Corrigan CJ, Thomas M, Wenzel SE, et al. Blood eosinophil count and prospective annual asthma disease burden: a UK cohort study. *Lancet Respir Med* 2015;3:849–58.
- [24] Ullmann N, Bossley CJ, Fleming L, Silvestri M, Bush A, Saglani S. Blood eosinophil counts rarely reflect airway eosinophilia in children with severe asthma. *Allergy* 2013;68:402–6.
- [25] Djukanović R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargreave FE. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J Suppl* 2002;37:1s–2s.
- [26] Gibson PG, Fujimura M, Niimi A. Eosinophilic bronchitis: clinical manifestations and implications for treatment. *Thorax* 2002;57:178–82.
- [27] Deykin A, Lazarus SC, Fahy JV, Wechsler ME, Boushey HA, Chinchilli VM, et al. Sputum eosinophil counts predict asthma control after discontinuation of inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:720–7.
- [28] Paro-Heitor ML, Bussamra MHCF, Saraiva-Romanholo BM, Martins MA, Okay TS, Rodrigues JC. Exhaled nitric oxide for monitoring childhood asthma inflammation compared to sputum analysis, serum interleukins and pulmonary function. *Ped Pulm* 2008;43:134–41.
- [29] Covar RA, Spahn JD, Martin RJ, Silkoff PE, Sundstrom DA, Murphy J, et al. Safety and application of induced sputum analysis in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:575–82.
- [30] Fleming L, Tsartsali L, Wilson N, Regamey N, Bush A. Sputum inflammatory phenotypes are not stable in children with asthma. *Thorax* 2012;67:675–81.
- [31] Ricciardolo FLM, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004;84:731–65.
- [32] Persson MG, Zetterström O, Agrenius V, Ihre E, Gustafsson LE. Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet* 1994;343:146–7.
- [33] Lundberg JO, Weitzberg E, Nordvall SL, Kuylenstierna R, Lundberg JM, Alving K. Primarily nasal origin of exhaled nitric oxide and absence in Kartagener's syndrome. *Eur Respir J* 1994;7:1501–4.
- [34] Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994;343:133–5.
- [35] Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howarth P, Redington A, et al. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* 1993;342:1510–3.
- [36] Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, et al. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;9:371–7.
- [37] Strunk RC, Szeffler SJ, Phillips BR, Zeiger RS, Chinchilli VM, Larsen G, et al. Relationship of exhaled nitric oxide to clinical and inflammatory markers of persistent asthma in children. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:883–92.
- [38] Taylor DR, Pijnenburg MW, Smith AD, De Jongste JC. Exhaled nitric oxide measurements: clinical application and interpretation. *Thorax* 2006;61:817–27.
- [39] Wang Y, Han R, Lei W, Li Z, Li K, Kang J, et al. Diagnostic value and influencing factors of fractional exhaled nitric oxide in suspected asthma patients. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:5570–6.
- [40] Voorend-van Bergen S, Vaessen-Verberne AA, Brackel HJ, Landstra AM, van den Berg NJ. Monitoring strategies in children with asthma: a randomised controlled trial. *Thorax* 2015;70:543–50.
- [41] Massaro AF, Gaston B, Kita D, Fanta C, Stamler JS, Drazen JM. Expired nitric oxide levels during treatment of acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:800–3.
- [42] Jones SL, Kittelson J, Cowan JO, Flannery EM, Hancox RJ, McLachlan CR, et al. The predictive value of exhaled nitric oxide measurements in assessing changes in asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:738–43.
- [43] Pijnenburg MW, Hofhuis W, Hop WC, De Jongste JC. Exhaled nitric oxide predicts asthma relapse in children with clinical asthma remission. *Thorax* 2005;60:215–8.
- [44] Zacharasiewicz A, Wilson N, Lex C, Erin EM, Li AM, Hansel T, et al. Clinical use of noninvasive measurements of airway inflammation in steroid reduction in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:1077–82.
- [45] Dweik RA, Sorkness RL, Wenzel S, Hammel J, Curran-Everett D, Comhair SAA, et al. Use of exhaled nitric oxide measurement to identify a reactive, at-risk phenotype among patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:1033–41.
- [46] Ghdifan S, Verin E, Couderc L, Lubrano M, Michelet I, Marguet C. Exhaled nitric oxide fractions are well correlated with clinical control in recurrent infantile wheeze treated with inhaled corticosteroids. *Pediatr Allergy Immunol* 2010;21:1015–20.
- [47] Gouvêa-Echraghi R, Saint-Pierre P, Besharaty AA, Bernard A, Just J. Exhaled nitric oxide measurement confirms 2 severe wheeze phenotypes in young children from the Trousseau Asthma Program. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:1005–6.
- [48] Agache I, Ciobanu C. Predictive value of lung function trend and feno for difficult asthma in children. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2012;22:419–26.
- [49] Leuppi JD, Salome CM, Jenkins CR, Anderson SD, Xuan W, Marks GB, et al. Predictive markers of asthma exacerbation during stepwise dose reduction of inhaled corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:406–12.
- [50] Waibel V, Ulmer H, Horak E. Assessing asthma control: symptom scores, gina levels of asthma control, lung function, and exhaled nitric oxide. *Ped Pulmonol* 2012;47:113–8.
- [51] Yavuz ST, Civelek E, Sahiner UM, Buyuktiyaki AB, Tuncer A, Karabulut E, et al. Identifying uncontrolled asthma in children with the childhood asthma control test or exhaled nitric oxide measurement. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2012;109:36–40.
- [52] Malinovschi A, Fonseca JA, Jacinto T, Alving K, Janson C. Exhaled nitric oxide levels and blood eosinophil counts independently associate with wheeze and asthma events in National Health and Nutrition Examination Survey subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:821–7.
- [53] Mahut B, Peyrard S, Delclaux C. Exhaled nitric oxide and clinical phenotypes of childhood asthma. *Respir Res* 2011;12:65.
- [54] Malinovschi A, Janson C, Borres M, Alving K. Simultaneously increased fraction of exhaled nitric oxide levels and blood eosinophil counts relate to increased asthma morbidity. *J Allergy Clin Immunol* 2016 [e-pub ahead of print].
- [55] Pavord ID, Bafadhel M. Exhaled nitric oxide and blood eosinophilia: independent markers of preventable risk. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:828–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.07.045>.
- [56] Schleich FN, Chevremont A, Paulus V, Henket M, Manise M, Seidel L, et al. Importance of concomitant local and systemic eosinophilia in uncontrolled asthma. *Eur Respir J* 2014;44:97–108.
- [57] Konradsen JR, Skantz E, Nordlund B, Lidegran M, James A, Ono J, et al. Predicting asthma morbidity in children using proposed markers of Th2-type inflammation. *Pediatr Allergy Immunol* 2015;26:772–9.
- [58] Green RJ, Klein M, Becker P, Halkas A, Lewis H, Kitchin O, et al. Disagreement among common measures of asthma control in children. *Chest* 2013;143:117–22.
- [59] Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1364–70.

- [60] Riedl MA, Nel AE. Importance of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8:49–56.
- [61] Navratil M, Plavec D, Erceg D, Bulat Lokas S, Zivkovic J, Turkalj M. Urates in exhaled breath condensate as a biomarker of control in childhood asthma. *J Asthma* 2015;52:437–46.
- [62] Carlson M, Håkansson L, Peterson C, Stålenheim G, Venge P. Secretion of granule proteins from eosinophils and neutrophils is increased in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87(1 Pt 1):27–33.
- [63] Oddera S, Silvestri M, Balbo A, Jovovich BO, Penna R, Crimi E, et al. Airway eosinophilic inflammation, epithelial damage, and bronchial hyper-responsiveness in patients with mild-moderate, stable asthma. *Allergy* 1996;51:100–7.
- [64] Pohn A, Seger RA, Faber J, Torresani T, Molinari L, Gerber A, et al. The relationship of serum eosinophil cationic protein and eosinophil count to disease activity in children with bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 1998;9:197–203.
- [65] Niimi A, Amitani R, Suzuki K, Tanaka E, Murayama T, Kuze F. Serum eosinophil cationic protein as a marker of eosinophilic inflammation in asthma. *Clin Exp Allergy* 1998;28:233–40.
- [66] Tang RB, Chen SJ. Serum levels of eosinophil cationic protein and eosinophils in asthmatic children during a course of prednisolone therapy. *Ped Pulm* 2001;31:121–5.
- [67] Mogensen I, Alving K, Bjerg A, Borres MP, Hedlin G, Sommar J, et al. Simultaneously elevated exhaled nitric oxide and serum-ECP related to recent asthma events in asthmatics in a cross sectional population based study. *Clin Exp Allergy* 2016 [e-pub ahead of print].
- [68] Kim CK, Callaway Z, Fletcher R, Koh YY. Eosinophil-derived neurotoxin in childhood asthma: correlation with disease severity. *J Asthma* 2010;47(5):568–73, <http://dx.doi.org/10.3109/02770901003792833>.
- [69] Koller DY, Halmerbauer G, Frischer T, Roithner B. Assessment of eosinophil granule proteins in various body fluids: is there a relation to clinical variables in childhood asthma? *Clin Exp Allergy* 1999;29:786–93.
- [70] Kim KW, Lee KE, Kim ES, Song TW, Sohn MH, Kim KE. Serum eosinophil-derived neurotoxin (EDN) in diagnosis and evaluation of severity and bronchial hyperresponsiveness in childhood asthma. *Lung* 2007;185:97–103.
- [71] Parulekar AD, Atik MA, Hanania NA. Periostin, a novel biomarker of TH2-driven asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2014;20:60–5.
- [72] Izuhara K, Ohta S, Ono J. Using periostin as a biomarker in the treatment of asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* 2016;8:491–8.
- [73] Jia G, Erickson RW, Choy DF, Mosesova S, Wu LC, Solberg OD, et al. Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:647–54.
- [74] Kanemitsu Y, Matsumoto H, Izuhara K, Tohda Y, Kita H, Horiguchi T, et al. Increased periostin associates with greater airflow limitation in patients receiving inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:305–12.
- [75] Kato G, Takahashi K, Izuhara K, Komiya K, Kimura S, Hayashi S, et al. Markers that can reflect asthmatic activity before and after reduction of inhaled corticosteroids: a pilot study. *Biomark Insights* 2013;8: 97–105.
- [76] Hoshino M, Ohtawa J, Akitsu K. Effect of treatment with inhaled corticosteroid on serum periostin levels in asthma. *Respirology* 2016;21: 297–303.
- [77] 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;187:804–11.
- [78] Kanemitsu Y, Ito I, Niimi A, Izuhara K, Ohta S, Ono J, et al. Osteopontin and periostin are associated with a 20-year decline of pulmonary function in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:472–4.
- [79] Chiappori A, De Ferrari L, Folli C, Mauri P, Riccio AM, Canonica GW. Biomarkers and severe asthma: a critical appraisal. *Clin Mol Allergy* 2015;13:20.
- [80] Thomson NC, Chaudhuri R, Spears M, Haughney J, McSharry C. Serum periostin in smokers and never smokers with asthma. *Respir Med* 2015;109:708–15.
- [81] Bayes HK, Cowan DC. Biomarkers and asthma management: an update. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2016;16:210–7.
- [82] Inoue Y, Izuhara K, Ohta S, Ono J, Shimojo N. No increase in the serum periostin level is detected in elementary schoolage children with allergic diseases. *Allergol Int* 2015;64:289–90.
- [83] Nagasaki T, Matsumoto H, Kanemitsu Y, Izuhara K, Tohda Y, Horiguchi T, et al. Using exhaled nitric oxide and serum periostin as a composite marker to identify severe/steroid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:1449–52.